

Reçu le 31 janvier 1964.

NUTRITION PROTIDIQUE CHEZ *TENEBRIO MOLITOR* L.  
 VI. — ESSAIS DE REMPLACEMENT DE LA CASÉINE  
 PAR DES MÉLANGES ARTIFICIELS D'ACIDES AMINÉS

PAR

Jean LECLERCQ et Luis LOPEZ-FRANCOS  
 (Zoologie générale, Institut Agronomique de l'Etat, Gembloux)

Dans la liste des molécules indispensables à la nutrition des larves de *Tenebrio molitor*, une seule, la caséine purifiée, reste un complexe nécessairement produit par biosynthèse, qui pourrait comporter des constituants dispensables et peut-être un facteur de croissance non encore identifié. La prochaine étape à franchir consisterait donc à remplacer la caséine par un mélange d'acides aminés essentiels, étape que l'on a franchie sans difficulté majeure pour le rat, pour d'autres Vertébrés de laboratoire, et pour divers Insectes parmi lesquels *Blatella germanica* (HOUSE, 1949), *Drosophila melanogaster* (HINTON *et al.*, 1951), *Apis mellifica* (DE GROOT, 1952, 1953), *Pseudosarcophaga affinis* (HOUSE, 1954), *Phormia regina* (MCGINNIS *et al.*, 1955; HODGSON *et al.*, 1956), *Calliphora erythrocephala* (SEDEE, 1954, 1956), *Chilo simplex* (ISHII et HIRANO, 1955), *Musca domestica vicina* (CHANG et WANG, 1958), *Myzus persicae* (MITTLER et DADD, 1962), et un proche du *Tenebrio molitor*, le *Tribolium confusum* (LEMONDE et BERNARD, 1951; FRAENKEL et PRINTY, 1954). Mais la même tentative a échoué jusqu'ici pour les larves de *Tenebrio molitor* (FRAENKEL et PRINTY, 1954; HUOT et LECLERCQ, 1958). Pourquoi ?

On imagine assez facilement des explications qui rencontrent d'ailleurs les hypothèses plus ou moins acceptables qui ont été formulées pour rendre compte de ce que même chez les animaux plus propices, un bon mélange d'acides aminés n'assure jamais une croissance aussi excellente qu'une bonne protéine naturelle très purifiée. Mais on doit aussi se demander si les échecs ne sont pas dus à des aléas de la technique employée pour élever

les sujets d'expérience, pour préparer les milieux nutritifs expérimentaux. C'est dans cette direction que nous avons d'abord reconsidéré la question, puis après avoir défini les conditions d'une expérimentation plus rigoureuse, nous avons essayé de remplacer la caséine par des mélanges d'acides aminés essentiels classiques, par des mélanges d'acides aminés plus nombreux rappelant fidèlement la composition naturelle de la caséine, par le mélange qui fit ses preuves pour un autre Insecte, *Myzus persicae* (MITTLER et DADD, 1962), et par d'autres mélanges empiriques s'inspirant de considérations diverses.

Ce que nous rapportons ici ne résoud pas le problème, loin s'en faut. Mais au moins avons-nous maintenant les informations nécessaires pour diriger des recherches futures et aussi la preuve définitive que les larves de *Tenebrio molitor* manifestent une sensibilité exceptionnelle à ce qu'on appelle « la valeur biologique des protéines », sensibilité que l'on pourrait certainement exploiter ultérieurement pour préciser certains aspects fondamentaux des « préalables à la biosynthèse des protéines » chez les animaux en général.

#### Dispositions expérimentales

Elles sont les mêmes que dans les essais antérieurs de HUOT et LECLERCQ (1958) et LECLERCQ et LOPEZ-FRANCOS (1963) : même température de 27° C, mêmes sources de facteurs de croissance, y compris la même caséine sans vitamines (HOFFMANN-LAROCHE, Bâle), mêmes quantités, larves soumises à un jeûne préalable de 3 jours, etc... mais nous avons choisi cette fois des larves de la race F (LECLERCQ, 1963), nous avons d'abord réglé le taux hygrométrique des étuves de culture à 75 %, puis ce fut 65 %.

Le nombre de larves disponibles à un moment donné ne permet pas toujours de réaliser simultanément tous les essais que l'on prévoit pour répondre à une question. De plus il faut parfois répéter des essais en tenant compte des indications fournies par les premiers. Par contre il est préférable que le lecteur trouve ici, présentés synoptiquement, tous les résultats que nous avons obtenus en réponse à une même question particulière. Mais cela nous oblige à préciser les précautions qu'il faut prendre pour consulter nos tableaux et analyser les résultats. En règle générale, la comparaison des résultats n'est parfai-

tement licite que dans les cas où ces résultats ont été obtenus au cours d'une même série d'essais. C'est pourquoi nos tableaux comportent la mention du numéro de la série d'essais qui a permis chaque résultat. Néanmoins on peut comparer aussi les données fournies par des essais portant un autre numéro, c'est-à-dire qui ont été réalisés à un autre moment, mais il faut alors accepter l'éventualité d'un « granum salis ». Nous ne pensons pas que de légères différences d'une série à l'autre puissent être imputables à quelque détail secondaire dans la préparation des milieux nutritifs, ni à de minimes fluctuations de la température, nous sommes moins sûrs qu'on ne puisse les expliquer partiellement par de petites différences dans le taux hygrométrique et dans le taux d'hydratation des aliments. Mais ce qui est certain c'est que les larves de *Tenebrio molitor* de deux lots consécutifs peuvent présenter des courbes de croissance pondérale très légèrement différentes, même s'il s'agit de larves de même race, de mêmes parents, de même âge et de même poids initial. Cela tient à la *variabilité individuelle incompressible* qui persiste inévitablement malgré la sélection artificielle et malgré la stabilisation de tous les facteurs écologiques (MOREAU et LECLERCQ, 1963; LECLERCQ, 1963). Il ne s'agit pas là d'un phénomène propre au *Tenebrio molitor*, on retrouve des fluctuations similaires pour divers caractères mesurables, même avec de très grands nombres d'individus, chaque fois qu'on se pose la question pour d'autres organismes (voir à ce sujet : SOKAL et HUNTER, 1958 et SOKAL, 1959, pour *Drosophila melanogaster*; CAMPBELL, 1962 pour *Choristoneura fumiferana*).

Il faudra aussi tenir compte de la différence de poids moyen initial de certains lots, c'est ainsi que les essais rapportés dans notre tableau II devaient nécessairement aboutir à des majorations de poids exprimées en pourcents plus fortes que les essais rapportés dans le tableau V car dans le premier cas les larves pesaient seulement au départ 11-12 mg contre 27 mg dans le second cas.

On trouvera en temps voulu des précisions sur les diverses modifications expérimentales que nous avons été amenés à apporter pour certains essais. Mais il était utile de présenter en un seul tableau ce qui concerne les différents mélanges artificiels d'acides aminés que nous avons préparés (tableau I).

TABLEAU I. — Composition des mélanges d'acides aminés

- A : 10 acides aminés, mélange pratiquement identique à celui de HUOT et LECLERCQ (1958), inspiré de la formule utilisée par BENTON *et al.* (1956) pour leurs expériences avec le rat.
- B : 11 acides aminés, soit le mélange A avec 0.40 % (g pour 100 g de milieu nutritif) d'acide L-glutamique remplaçant 0.20 % de DL-isoleucine et 0.20 % de DL-valine.
- B' : Comme B mais 1.00 % d'acide L-glutamique remplaçant 0.30 % de DL-isoleucine + 0.30 % de DL-valine + 0.20 % de L-leucine + 0.20 % de DL-phénylalanine.
- C<sub>1</sub> : 18 acides aminés, mélange selon GORDON *et al.* (1949), reproduisant approximativement la composition de la caséine en acides aminés naturels. Toutefois nous avons doublé les quantités d'acides aminés racémiques en supposant que la forme D n'est pas active.
- C<sub>2</sub> : 18 acides aminés, mélange selon BLOCK et BOLLING (1945), reproduisant approximativement la composition de la caséine en acides aminés donnée par ces chercheurs. Les quantités d'acides aminés racémiques ont été doublées sauf pour l'isoleucine et le tryptophane.
- D : 20 acides aminés, mélange à peu près identique à celui de MITTLER et DADD (1962) qui l'ont trouvé très adéquat pour le puceron *Myzus persicae*.
- E : 5 acides aminés seulement, choisis parce qu'ils se sont avérés particulièrement critiques lors des essais de HUOT et LECLERCQ (1958) et dans d'autres que nous avons réalisés.

	A	B	B'	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	D	E
L-alanine .....				0.14	0.15	0.25	
L-arginine .....	0.25	0.25	0.25	0.19	0.20	0.675	
Asparagine .....				0.34	0.35	1.375	
Acide L-aspartique ..						0.35	
L-cystéine .....				0.02	0.05	0.025	
Acide L-glutamique ..		0.40	1.00	1.08	1.10	0.35	
L-glutamine .....				0.13	0.125	0.375	
glycine .....				0.15	0.15	0.10	
L-histidine .....	0.20	0.20	0.20	0.58	0.30	0.15	
DL-isoleucine .....	1.20	1.00	0.90	0.43	0.45	0.10	0.80
L-leucine .....	1.00	1.00	0.80	0.43	0.45	0.10	
L-lysine .....	0.55	0.55	0.55	0.385	0.40	0.30	
DL-méthionine .....	0.30	0.30	0.30	0.29	0.30	0.05	
DL-phénylalanine ..	1.00	1.00	0.80	0.48	0.50	0.05	0.80
L-proline .....				0.48	0.50	0.10	
DL-sérine .....				0.53	0.325	0.40	
DL-thréonine .....	0.70	0.70	0.70	0.48	0.50	0.70	0.70
DL-tryptophane ....	0.10	0.10	0.10	0.165	0.10	0.20	0.10
L-tyrosine .....				0.29	0.30	0.10	
DL-valine .....	1.20	1.00	0.90	0.34	0.70	0.20	0.90
Total .....	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50	5.75	3.30

### Questions préalables

Les larves de race F et d'âge moins avancé se comportent-elles comme les larves de race G déjà étudiées par HUOT et LECLERCQ (1958) ? Faut-il ajouter l'acide glutamique à la liste des acides aminés essentiels ou utiles ? Doit-on considérer comme essentiel ou du moins utile chacun des dix acides aminés essentiels classiques ?

Pour répondre à ces questions, il fallait refaire la plupart des essais réalisés par HUOT et LECLERCQ (1958) en y soumettant non plus des larves de race G pesant de 60 à 70 mg, mais bien des larves de race F pesant à peine plus de 10 mg. On pouvait s'attendre à des résultats fort semblables puisqu'une étude précédente (LECLERCQ et LOPEZ-FRANCOS, 1963) a fait conclure à un comportement similaire des deux races et des deux âges considérés pour ce qui concerne l'optimum protidique. C'est pourquoi nos essais ont aussi eu pour objectif de chercher à compléter le mélange-test de dix acides aminés précédemment employé (A) par l'addition d'acide glutamique. Les résultats sont présentés dans le tableau II.

#### Réponses :

Les jeunes larves de race F ont réagi à peu près de la même manière que les larves plus âgées de race G étudiées précédemment. Tous les mélanges d'acides aminés s'avèrent incapables de remplacer la caséine. Ils sont aussi décevants que le manque total de protides s'ils ne comportent pas de leucine ou de valine ou de thréonine ou de tryptophane ou de phénylalanine, et peut-être de lysine. On obtient des croissances un peu meilleures lorsqu'ils ne comportent pas d'arginine ou d'histidine ou de méthionine ou d'isoleucine, peut-être d'acide glutamique. Mais de toutes façons les mélanges les moins défavorables sont ceux qui présentent tous ces onze acides aminés à la fois (B), ce qui fait conclure que chacun est sinon essentiel au sens strict du mot, du moins utile.

Il peut être opportun de distinguer la croissance pondérale qui s'effectue pendant la première semaine des expériences c'est-à-dire alors que les sujets peuvent encore tirer parti des réserves accumulées antérieurement, de ce qui se passe pendant les semaines qui suivent. C'est à ce titre que notre indice c' a

TABLEAU II. — Modifications du poids chez des larves de *Tenebrio molitor* de race F, recevant une alimentation artificielle diversement constituée pour son apport de protides  
30 larves dans chaque condition.  
Degré hygrométrique : 75 %.

Source d'acides aminés	Série d'essais n°	Poids initial a' en mg	Poids moyen après une (a) ou quatre (b) semaines de réalimentation		Poids gagné ou perdu après quatre semaines de réalimentation	
			a en mg	b en mg	$c = \frac{b-a'}{a'} 100$ en %	$c' = \frac{b-a}{a} 100$ en %
Farine de froment + 10 % levure .....	1	12	18.1	62.0	416.7	+242.5
6.5 % caséine .....	1	12	17.5	60.0	400.0	+242.8
6.5 % caséine .....	2	12	17.5	72.8	506.7	+316.0
6.5 % caséine .....	3	11	17.5	60.0	445.5	+242.8
Nulle .....	1	12	16.6	16.3	35.8	- 1.8
Nulle .....	2	12	16.4	16.4	36.7	0
Nulle .....	3	11	14.0	14.5	31.8	+ 3.6
A : mélange de 10 acides aminés (6.5 %) .....	1	12	14.3	14.3	10.8	- 7.0
Idem .....	3	11	13.2	15.1	37.3	+ 14.4
B = A + acide glutamique .....	1	12	15.3	18.0	50.0	+ 17.6
Idem .....	3	11	13.6	16.2	47.3	+ 19.1
sans DL-isoleucine ....	3	11	14.8	16.8	52.7	+ 13.5
sans DL-méthionine ...	3	11	14.3	15.8	43.6	+ 10.5
sans L-histidine .....	3	11	14.4	15.8	43.6	+ 10.5
sans L-arginine .....	3	11	13.5	15.3	39.1	+ 13.3
B sans L-lysine .....	3	11	13.6	14.9	35.5	+ 9.6
sans DL-phénylalanine ..	3	11	14.2	14.3	30.0	+ 0.7
sans DL-tryptophane ..	3	11	13.1	14.2	29.1	+ 8.4
sans DL-thréonine ....	3	11	13.8	14.0	27.3	+ 1.4
sans DL-valine .....	3	11	13.5	14.0	27.3	+ 3.6
sans L-leucine .....	3	11	12.9	13.5	22.7	+ 4.6

plus de signification que l'indice c ; on remarquera néanmoins qu'il y a relativement peu de divergences entre les classements qu'on obtient selon l'un ou l'autre de ces critères. De plus ces deux critères suffisent amplement et il n'est pas nécessaire

d'en chercher d'autres en poursuivant les observations au-delà de quatre semaines : chaque fois que nous avons pris cette peine, ce fut toujours pour constater que les croissances qui avaient bien commencé aboutissaient à des développements continus et ordinairement à la nymphose, tandis que les croissances initialement médiocres (*c* et *c'* inférieurs à 100 %) ne se redressent jamais. On n'est même plus sûr alors que les larves s'alimentent encore et aient une physiologie différente de celle dont elles sont capables en inanition totale longuement prolongée (cf. LECLERCQ, 1949). Mais on n'est plus sûr non plus de la composition réelle des milieux nutritifs. Nous avons même eu des doutes à ce dernier propos en limitant la durée des essais à quatre semaines, de là les questions qui vont être examinées en vue de définir de meilleures conditions expérimentales.

#### Questions complémentaires

*Ne conviendrait-il pas d'abaisser le taux hygrométrique des étuves de culture ? Y aurait-il intérêt à expérimenter avec des larves un peu plus avancées ? Réexamen du cas de l'acide glutamique.*

On pouvait se demander si un taux hygrométrique de l'ordre de 75 %, bien que décidément optimum, ne favorise pas certaines altérations des milieux nutritifs. On pourrait évidemment songer à réaliser des essais parfaitement aseptiques car il faudra tôt ou tard se demander si les besoins nutritifs fondamentaux du ver de farine tels que nous les connaissons sont en fait ceux de l'espèce avec ses grégaires et autres symbiotes intestinaux éventuels, ou bien ceux de l'espèce seule dans des conditions de stérilité qu'elle ne rencontre jamais dans la nature. Mais il serait absurde de se préoccuper de cela avant d'avoir résolu notre problème qui est de remplacer la caséine par un mélange convenable d'acides aminés, d'autant plus qu'aucune altération dommageable ne s'est jamais révélée dans les milieux pourvus de caséine. Néanmoins il était opportun de se demander si de meilleurs résultats ne seraient pas obtenus en abaissant le taux hygrométrique à une valeur suboptimale, par exemple 65 %. Ce faisant, nous avons pensé que l'on inhiberait peut-être partiellement les réactions entre le glucose et les acides aminés libres, réactions qui se produisent incontestablement dans nos

milieux du moins après un certain temps mais que nous serons amenés à examiner plus attentivement encore dans un chapitre ultérieur.

On pouvait aussi se demander si prenant des larves de 10 mg environ, nous n'avions pas passé d'un extrême à l'autre, et si des larves en pleine phase de croissance active ayant par exemple atteint environ 25 mg ne seraient pas plus propices. Enfin l'amélioration obtenue précédemment en ajoutant de l'acide glutamique valait qu'on cherche à confirmer ce phénomène et à préciser le taux utile de cette molécule.

Les résultats sont présentés dans le tableau III.

#### Réponses :

L'allure générale des résultats est bien plus nette, aussi faudra-t-il désormais maintenir à 65 % le taux hygrométrique des étuves de culture.

Comme on devait s'y attendre, les larves de 25 mg présentent des augmentations de poids exprimées en pourcents, moins fortes que les larves plus petites. Elles réagissent néanmoins aux différentes conditions selon le même mode, on peut donc les utiliser aussi bien que des larves plus petites, bénéficiant du fait qu'elles sont moins fragiles et plus faciles à manipuler.

Il se confirme qu'à la dose de 0,40 %, l'acide glutamique améliore remarquablement la valeur des mélanges d'acides aminés ; il n'est pas exclu qu'on obtienne encore de meilleurs résultats en augmentant légèrement sa dose.

#### Incidence de la réaction de Maillard ?

En présence de glucides réducteurs, les acides aminés tendent à s'altérer, produisant des mélanoidines et prenant une coloration brune. C'est la réaction de Maillard dont le mécanisme n'est pas parfaitement connu et qui a retenu l'attention de la plupart des chercheurs expérimentant avec des mélanges artificiels d'acides aminés (SWANSON et CLARK, 1950 ; FRIEDMAN et KLINE, 1950 ; ÅLMQUIST, 1951 ; BIGWOOD, 1952, etc...). Elle se produit aussi, à un moindre degré, aux dépens des acides aminés de protéines normales (PATTON, *et al.*, 1948). Elle peut inactiver ou détruire certains acides aminés (notamment la

TABLEAU III. — Modifications du poids des larves de *Tenebrio molitor* de race F, recevant une alimentation artificielle diversement constituée pour son apport de protides 30 larves dans chaque condition.  
Degré hygrométrique : 65 %.

Source d'acides amiés	Série d'essais n°	Poids initial a' en mg	Poids moyen après une (a) ou quatre (b) semaines de réalimentation		Poids gagné ou perdu après quatre semaines de réalimentation	
			a en mg	b en mg	$c = \frac{b-a'}{a'} 100$ en %	$c' = \frac{b-a}{a} 100$ en %
Farine de froment + 10 % levure .....	1'	10.5	14.7	54.1	415.2	268.0
Idem .....	4	11.5	18.3	67.2	484.3	245.3
6.5 % caséine .....	1'	10.5	14.8	57.5	447.6	288.5
6.5 % caséine .....	5	25	37.9	96.2	284.8	153.9
Nulle .....	1'	10.5	13.7	14.0	33.3	2.1
Nulle .....	4	11.5	15.8	16.0	39.1	1.2
Nulle .....	5	25	32.7	33.1	32.4	1.2
A : mélange de 10 acides aminés (6.5 %) .....	1'	10.5	12.6	15.2	44.8	20.6
Idem .....	5	25	31.5	34.2	36.8	8.6
B = A + 0.40 % acide glutamique .....	1'	10.5	12.8	16.0	52.4	25.0
B' = A' + 1.00 % acide glutamique .....	1'	10.5	12.7	16.6	58.1	30.7
B = A + 0.40 % acide glutamique .....	5	25	31.5	34.9	39.6	10.8
B' = A' + 1.00 % acide glutamique .....	5	25	32.9	35.5	42.0	7.8
B'' = A' + 3.00 % acide glutamique .....	5	25	31.2	36.4	45.6	16.7

lysine) au point de rendre les protéines, les hydrolysats de protéines ou les mélanges d'acides aminés peu efficaces (PATTON *et al.*, 1949; CARPENTER et ELLINGER, 1955; JACQUOT, *et al.*, 1958). Serait-elle responsable de nos échecs? Serait-ce parce que nous avons réduit son intensité que les essais réalisés à 65 % d'humidité relative ont fourni des résultats sensiblement meilleurs?

On peut chercher une réponse en remplaçant le glucose des milieux nutritifs par des glucides non réducteurs, par exemple par de l'amidon, du saccharose ou du lactose.

Le tableau IV montre ce que cela nous a fourni.

TABLEAU IV. — Modifications du poids chez des larves de *Tenebrio molitor* de race F recevant une alimentation artificielle à base de glucides non réducteurs

15 larves dans chaque condition.  
Poids moyen initial des larves : 27 mg.  
Degré hygrométrique : 65 %.  
° formation d'une nymphe.

	Poids moyen des larves (en mg) après				
	1 semaine	3 semaines	5 semaines	8 semaines	10 semaines
Amidon, aucun protide .....	31.5	30.8	30.1	29.2	28.3
Amidon + 3 % caséine .....	37.7	52.9	59.1°	69.3°	72.5°
Amidon + 3 % mélange B .....	31.9	32.3	31.7	31.5	31.5
Amidon + 3 % mélange E .....	33.5	34.1	32.9	33.2	32.2
Saccharose, aucun protide .....	32.2	32.9	32.3	30.8	—
Saccharose + 3 % caséine .....	37.7	70.2	nymphe	hose génée	ralisée
Saccharose + 3 % mélange B ..	35.2	35.7	36.0	33.7	—
Lactose, aucun protide .....	28.1	26.7	25.3	24.7	—
Lactose + 3 % caséine .....	31.5	43.5	54.0	81.1	86.9
Lactose + 3 % mélange B .....	28.3	27.4	26.7	26.8	25.0

Pendant toute la durée de ces essais, les milieux nutritifs ont été observés très attentivement pour y déceler des signes éventuels de réaction de Maillard (brunissement). Rien ne s'est produit dans les milieux à base d'amidon, une réaction très faible et très tardive s'est produite avec le lactose, une réaction plus nette mais néanmoins faiblement prononcée s'est produite avec le saccharose.

Or les résultats confirment avant tout ce qui a été observé précédemment avec des milieux à base de glucose : mélanges d'acides aminés un peu plus favorables que la condition aucun protide, sans plus ! Ils attestent une nette amélioration générale avec le saccharose mais cela n'a visiblement aucun rapport avec la réaction de Maillard puisque c'est avec cet ose qu'on

a le moins bloqué celle-ci. Quant au lactose, c'est un ose de qualité inférieure pour les larves de *Tenebrio*, ce qu'on savait déjà bien (LECLERCQ, 1948; FRAENKEL, 1955). Le plus inattendu c'est l'absence d'activation de la croissance en toutes conditions, quand on remplace le glucose par de l'amidon. Ce dernier fournissait toujours de meilleurs résultats avant qu'on ne connaisse parfaitement les besoins vitaminiques optimaux du *Tenebrio molitor* (LECLERCQ, 1948) et du *Tribolium confusum* (Bernard et LEMONDE, 1949). Toutefois plus récemment, FRAENKEL (1955) a enregistré des variations inattendues dans le comportement des larves de *Tenebrio* recevant ce polyholoside.

Remarquons que dans toutes les conditions sans protide ou avec mélange d'acides aminés, les poids des larves sont restés pratiquement constants après la première semaine de réalimentation et ce jusqu'à la huitième ou la dixième semaine. Or pareil résultat est incompatible avec l'hypothèse selon laquelle une faible réaction de Maillard comme celle qui s'est produite en fin de période avec le lactose et surtout avec le saccharose, libérerait des produits toxiques ou rendrait certains acides aminés indisponibles. Rappelons d'ailleurs que les poids des larves dans les mêmes conditions mais avec du glucose restent aussi pratiquement constants pendant plusieurs semaines après la période d'un mois considérée dans nos tableaux II, III et V, alors que la même hypothèse impliquerait des effets d'accumulation de produits toxiques et par conséquent ce que nous n'avons jamais enregistré : une forte mortalité et une forte chute des poids.

Divers autres essais ont été réalisés pour réduire fortement l'intensité de la réaction de Maillard. Nous ne voyons pas l'utilité d'en rapporter les protocoles détaillés, tous supportent la même conclusion. Des élevages avec des milieux à base de glucose à 18° et à 27° C (la réaction étant considérablement réduite à 18°), ont mis en évidence un effet thermique banal, rien qui soit en rapport avec la réduction des acides aminés. Le remplacement du glucose par de l'amidon dans des milieux procurant 0.5 % de caséine et 1 % de mélange B ou E a permis de confirmer l'infériorité de l'amidon, sans plus. Enfin, dans trois cas qui seront considérés plus loin (tableau V), les milieux nutritifs comportant un mélange d'acides aminés ont été renouvelés

toutes les semaines, ce qui éliminait toute incidence de la réaction de Maillard, la valeur du mélange ne s'en est pas trouvée améliorée.

TABLEAU V. — Modification du poids chez des larves de *Tenebrio molitor* de race F recevant une alimentation artificielle diversement constituée pour son apport de protéides

Poids moyen initial des larves : 27 mg.

Degré hygrométrique : 65 %.

15 larves dans chaque condition sauf pour la série d'essais n° 7 où c'est 30.

\* milieu nutritif renouvelé chaque semaine.

Source d'acides aminés	Série d'essais n°	Poids gagné ou perdu après quatre semaines de réalimentation	
		$c = \frac{b - a'}{a'} 100$ en %	$c' = \frac{b - a}{a} 100$ en %
Farine de froment + 10 % levure . . . . .	6	265.2	+127.7
6.5 % caséine . . . . .	7	285.2	+158.7
6.5 % caséine . . . . .	10	265.7	—
Nulle . . . . .	1	21.5	— 4.5
Nulle . . . . .	7	15.2	— 7.3
Nulle . . . . .	10	22.9	—
Nulle . . . . .	11	24.1	—
Nulle . . . . .	13	24.1	—
Nulle . . . . .	15	22.2	— 3.8
B : mélange de 11 acides aminés : 1.0 %	12	37.4	—
B : mélange de 11 acides aminés : 3.0 %	12	13.7	—
B : mélange de 11 acides aminés : 6.5 %	10	14.1	—
B : mélange de 11 acides aminés : 1.5 %	6	31.9	+ 1.4
B : mélange de 11 acides aminés : 3.3 %	6	18.8	+ 1.9
B : mélange de 11 acides aminés : 6.5 %	6	11.1	— 3.4
E : mélange de 5 acides aminés : 3.3 %	6	21.5	+ 4.5
E : mélange de 5 acides aminés : 3.0 %	12	35.2	—
E : mélange de 5 acides aminés : 1.0 %	12	41.1	—
C <sub>1</sub> : mélange de 18 acides aminés : 6.5 %	7	55.5	+ 13.5
C <sub>1</sub> : mélange de 18 acides aminés : 6.5 %	9	22.4	+ 13.3
C <sub>2</sub> : mélange de 18 acides aminés : 1.0 %	15*	38.1	+ 4.8
C <sub>2</sub> : mélange de 18 acides aminés : 2.0 %	15*	43.7	+ 4.3
C <sub>2</sub> : mélange de 18 acides aminés : 3.0 %	15*	29.9	— 4.6
D : mélange de 20 acides aminés : 5.75 %	7	36.0	+ 3.4
D : mélange de 20 acides aminés : 11.5 %	7	30.3	— 1.7
D : mélange de 20 acides aminés : 13.0 %	9	30.0	—

Nonobstant des milieux à base d'acides aminés peuvent se révéler franchement mauvais et finalement inutilisables peut-être parce qu'il s'y produit d'intenses réactions oses-acides aminés mais surtout parce qu'ils sont fortement hygroscopiques et deviennent une pâte inhospitalière pour les larves qui s'y engluent. C'est à cause de cela que nous n'avons jamais pu réussir des essais avec l'hydrolysate de caséine « *aminosol* » préparé et mis obligeamment à notre disposition par WRETTLIND (1946, 1947) qui en avait démontré l'efficacité pour le rat. Une préparation de *peptone* nous a donné de meilleurs résultats, mais des résultats douteux en présence de glucose, les milieux prenant un aspect caramélisé dès la deuxième semaine. Nous tentâmes alors un essai en remplaçant le glucose par de l'amidon ce qui permit d'obtenir des croissances presque aussi favorables qu'avec la caséine. Mais avec des mélanges artificiels comme ceux que nous préparons, entrant dans la composition de nos milieux à raison de moins de 10 %, et au taux hygrométrique de 65 %, aucun accident n'est à redouter et nous n'avons même pas jugé utile de maintenir le remplacement du glucose par un ose non réducteur.

En conclusion, dans les conditions où nous expérimentons, les mélanges artificiels d'acides aminés ne doivent pas leur insuffisance à l'incidence d'une éventuelle réaction de Maillard. Il faut chercher une autre explication.

#### Essai de cinq mélanges d'acides aminés

Ayant clarifié le problème par tout ce qui précède, nous avons présenté à des larves de 27 mg cinq mélanges différents en prévoyant dans certains cas des taux différents. Tous, sauf E contenaient de l'acide glutamique. Les mélanges C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> reflètent aussi fidèlement que possible la composition naturelle de la caséine. Les autres ont été définis sur la base de diverses considérations empiriques. Les résultats sont présentés dans le tableau V.

#### Commentaires.

Il apparaît de suite qu'aucun mélange d'acides aminés ne peut soutenir une croissance même initiale comparable à celle que

permet la caséine. A la même dose de 6.5 %, le mélange C<sub>1</sub> (18 acides aminés selon la composition naturelle de la caséine) est incontestablement meilleur que le mélange B précédemment employé (basé sur la formule valable pour le rat et privé d'acides aminés non essentiels). Les autres résultats suggèrent aussi qu'on a intérêt à augmenter le nombre d'acides aminés jusqu'à 18 ou 20. Il est particulièrement remarquable qu'on obtienne des croissances au moins équivalentes, probablement même sensiblement améliorées en ne fournissant que cinq acides aminés, au lieu de onze. On en vient à se demander si la notion classique de la dizaine d'acides aminés essentiels est vraiment d'application pour *Tenebrio molitor* puisqu'elle a abouti à la préparation de mélanges qu'on améliore aussi bien par soustraction de certains acides aminés essentiels que par addition de certains acides aminés passant pour généralement dispensables.

Serions-nous en présence d'un animal qui exige un nombre d'acides aminés essentiels bien plus grand que ce que réclament tous les autres animaux étudiés à ce jour ? Ce n'est pas exclu, mais avant d'y penser il faut souligner un fait réellement inattendu révélé par le tableau V : on a eu tort de vouloir remplacer 6.5 % de caséine par 6.5 % de mélanges d'acides aminés. Il faut fournir beaucoup moins et il semble que des doses de l'ordre de 1 ou 2 % seulement soient préférables dans toutes les conditions. Cela est d'autant plus surprenant qu'aux mêmes larves on peut indifféremment procurer des aliments qui comportent de 3 à 20 % de caséine (LECLERCQ et LOPEZ-FRANCOS, 1963). L'interprétation de ce phénomène n'est pas facile. On pourrait avancer que les mélanges d'acides aminés à raison de 3 % et davantage provoquent un encombrement de métabolites azotés insupportable par ces larves alors que l'hydrolyse progressive d'une protéine entière dans leur tube digestif se fait à un rythme qui évite cet inconvénient.

#### Hypothèse d'un déficit minéral

Outre ses acides aminés pondéralement dominants, la caséine la mieux purifiée contient toujours d'autres molécules notamment du phosphore sous forme d'esters phosphoriques des acides hydroxyaminés sérine et thréonine. D'après BEAU (1952) la

caséine pure contient encore 3.7 % de  $P_2O_5$ . Ce phosphore se retrouve intégralement dans les cendres quand l'incinération est faite en présence d'une matière alcaline par exemple  $Na_2CO_3$ , qui assure sa fixation en évitant toute volatilisation. On estime par ailleurs à 0.1-0.4 % la teneur en cendres de la caséine purifiée, tandis que la caséine ordinaire en renferme de 2 à 8 %.

Nous souvenant des difficultés qui conduisirent naguère FRAENKEL et LECLERCQ (1956) à se méfier des résidus de la caséine pure et à découvrir la nécessité du zinc pour les larves de *Tenebrio* (FRAENKEL, 1958), nous nous sommes demandés si la caséine ne complète pas l'équilibre minéral des aliments artificiels que nous préparons, ce que nos mélanges d'acides aminés ne peuvent réaliser à leur tour. Nous avons donc préparé plusieurs milieux nutritifs à base de mélanges B,  $C_1$ , D et E, en y ajoutant les cendres d'une quantité équivalente de 6.5 % de caséine, ou du  $K_3PO_4$  en quantité appropriée. On nous dispensera de présenter le détail des protocoles de ces essais : aucune amélioration ne fut observée.

#### Hypothèse d'un acide aminé toxique ou dispensable dans le mélange $C_2$ ?

Rappelons que le mélange  $C_2$  qui rappelle fidèlement la composition naturelle de la caséine a permis des croissances assez suggestives aux taux de 1 et 2 %. On devait évidemment se demander si pareil mélange n'apporte pas l'un ou l'autre acide aminé toxique et si chacun des 18 acides aminés qu'il comporte est réellement utile. Pour répondre à cette question, il suffisait de comparer l'efficacité de milieux identiques représentant chacun des conditions 18 — 1 acide aminé. Le tableau VI montre ce que cela a donné.

#### Commentaires.

Les résultats ont été classés selon le critère  $c$  mais il est clair qu'on doit les discuter en considérant aussi « cum grano salis » le critère  $c'$  et en ignorant les petites différences inférieures à 1 ou 2 %, lesquelles n'ont certainement aucune signification.

Ces précautions prises, il apparaît que certains acides aminés

TABLEAU VI. — Modifications du poids chez des larves de *Tenebrio molitor* de race F recevant une alimentation artificielle avec 18 ou 17 acides aminés

Poids moyen initial des larves : 27 mg.

Degré hygrométrique : 65 %.

15 larves dans chaque condition.

Série d'essais n° 15 comme pour  $C_2$  dans le tableau V (essais simultanés).

Source d'acides aminés	Poids gagné ou perdu après quatre semaines de réalimentation		
	$c = \frac{b-a'}{a} 100$ en %	$c' = \frac{b-a}{a} 100$ en %	
Nulla .....	22.2	-3.8	
$C_2$ 1 %	sans L-arginine .....	25.2	+0.3
	sans DL-méthionine .....	29.2	-2.5
	sans L-lysine .....	32.2	+0.6
	sans L-cystine .....	33.3	+3.7
	sans acide L-aspartique .....	34.1	+0.6
	sans DL-sérine .....	34.4	+1.1
	sans L-proline .....	34.4	+3.1
	sans DL-isoleucine .....	34.8	-1.1
	sans acide L-glutamique .....	35.2	+4.6
	sans DL-thréonine .....	36.0	+1.4
	sans DL-tryptophane .....	37.4	-2.1
	sans DL-phénylalanine .....	37.4	+4.0
$C_2$ : mélange de 18 acides aminés : 1.0 % ..	38.1	+4.8	
$C_2$ 1 %	sans glycine .....	38.5	+5.6
	sans L-histidine .....	38.9	-0.5
	sans L-leucine .....	39.6	-1.0
	sans L-tyrosine .....	40.0	+0.2
	sans L-alanine .....	41.4	+3.5
sans DL-valine .....	41.9	+4.9	
$C_2$ : mélange de 18 acides aminés : 2.0 % ..	43.7	+4.3	

peuvent être supprimés sans nuire aux croissances. Ce sont la *phénylalanine*, la *glycine*, l'*alanine* et la *valine*, peut-être aussi l'*acide glutamique*, la *proline* et la *cystine*. L'absence d'*alanine* et de *valine* a même permis des résultats tels qu'on peut se demander si ces molécules ne sont pas légèrement toxiques.

Trois autres acides aminés représentent un cas intermédiaire assez incertain : l'*histidine*, la *leucine* et la *tyrosine*. Sans eux les larves augmentent aussi bien de poids qu'en leur présence,

mais il semble qu'un effet de carence assez net se manifeste après la première semaine.

Il nous reste alors huit acides aminés qu'on ne peut omettre sans diminuer de façon marquée la valeur de l'aliment, ce sont reclassés ici selon le critère *c'* : la méthionine, le tryptophane, l'isoleucine, l'arginine, la lysine, l'acide aspartique, la sérine et la thréonine.

Tout cela n'a guère de concordance avec la distinction classique que l'on fait entre acides aminés essentiels et acides aminés dispensables, pas plus d'ailleurs qu'avec ce que nous avons obtenu précédemment en omettant un acide aminé dans le mélange B. Cela n'est pas étonnant. De toutes manières, le mélange C<sub>2</sub> reste carencé dans toutes les conditions en quelque chose que nous ne connaissons pas ; comme il comporte au moins 17 acides aminés, un besoin particulier en un radical essentiel peut être satisfait par un des acides aminés dispensables et il doit se produire des phénomènes complexes en rapport avec l'urgence relative de certains besoins.

Nous avons essayé des mélanges d'acides aminés dans des conditions tellement différentes et nous avons trouvé si peu de chose en postulant tantôt le caractère essentiel d'un acide aminé dispensable, tantôt la toxicité de l'un ou de l'autre, tantôt l'intérêt d'augmenter ou de réduire la proportion de tel ou tel acide aminé (par exemple l'isoleucine) ou l'acide glutamique (ou nous excusera de ne pas rapporter tous ces essais complémentaires), que nous avons la conviction que le problème posé sort du cadre habituel dans lequel on voudrait limiter les préalables de la croissance des larves de *Tenebrio molitor*. Ce n'est pas un des vingt acides aminés qui est entré dans la fabrication de l'un ou l'autre de nos mélanges qui est en cause, il est même douteux qu'il s'agisse d'un simple jeu de proportions adéquates entre les divers acides aminés.

#### Essais de supplémentation de 0.5 % de caséine

Comme nous l'avons démontré précédemment (1963), la croissance des larves de *Tenebrio molitor* s'effectue lente mais efficace dès que l'on prévoit 0.5 % de caséine dans les milieux ;

elle devient très bonne sans être optimale avec 1 %. Nous avons donc jugé intéressant de tenter une dernière série d'essais en prenant comme condition témoin 0.5 % de caséine et en réalisant diverses conditions expérimentales dans lesquelles ces 0.5 % de caséine se trouvent complétés par l'addition d'un quelconque, ou de plusieurs acides aminés, ou d'un mélange de type B ou C<sub>2</sub>.

Supposons en effet que la caséine doive sa supériorité au fait qu'elle apporte une substance bien définie qui manque systématiquement dans les mélanges d'acides aminés et qui correspond au facteur protéique animal. (cf ZUCKER, 1950) ou à la stréptogénine (WOOLEY, 1945, 1946) ou à l'acide orotique (MORUZZI, *et al.*, 1954, 1956 ; VIVIANI, *et al.*, 1955, 1957, 1958 ; RABBI, *ET AL.*, 1956), etc... Supposons en outre que cette substance essentielle soit présente en quantités amplement suffisantes dans 0.5 % de notre caséine (pourquoi pas ?). Dans ces conditions, l'addition d'un mélange convenable d'acides aminés à 0.5 % de caséine devrait améliorer la croissance et la rapprocher de celle qu'on enregistre avec 1 % de caséine. En est-il ainsi ?

Il est inutile de présenter les chiffres que nous avons obtenus en travaillant dans cette direction. En ajoutant 0.5, 1 ou 3 % des mélange B ou E, ou 0.5 % de mélange C<sub>2</sub>, ou un acide aminé quelconque à raison de 0.5 %, ou en réalisant d'autres suppléments empiriques, nous n'avons jamais obtenu mieux qu'avec simplement 0.5 % de caséine, parfois ce fut sensiblement moins bon.

Tout se passe donc comme si la molécule de caséine telle que nous l'utilisons représentait une combinaison protéique idéale, qu'il n'est pas possible d'améliorer. Si elle véhicule une substance critique de nature non protéique comme l'acide orotique ou une vitamine inconnue, il faut admettre que cette substance est présente en quantités parfaitement équilibrées par gramme de caséine, au point qu'on ne peut même pas réussir avec elle une banale expérience de « low protein diet » avec addition d'acides aminés essentiels. C'est difficilement acceptable.

En fin de compte, l'hypothèse la plus plausible qu'il nous paraît légitime de formuler est celle de l'exigence par les larves de *Tenebrio molitor* d'un certain nombre d'acides aminés associés

en peptides, ce qui revient à postuler l'incapacité de ces larves d'effectuer elles-mêmes certaines liaisons peptidiques préalables à leurs biosynthèses de protéines.

### Summary

*Tenebrio molitor* larvae of the F strain were fed synthetic diets in which vitamin-free casein was replaced by various mixtures of 5, 10, 11, 18 or 20 amino acids. In no case their growth reached the standard weight values recorded with casein. However they kept generally better than without any protein at all. They grew slightly but significantly during four weeks, with mixtures of 11 amino acids including glutamic acid, in place of any other combination of 10 amino acids. Among the best was a mixture of 18 amino acids similar to the natural composition of casein according to GORDON, *et al.* (1949) : more than 13 % increase of weight between the second and fourth week, but still this is only about one-tenth of what is possible with casein.

This failure is not related with the age of the larvae, nor with phosphorus or oligoelements persisting in purified casein, nor with a strong toxicity of any individual amino acid, nor with a slight browning reaction between amino acids and glucose. Anyway the latter was considerably inhibited and more security was found, by reducing the relative humidity of the incubators to 65 % ; also nothing better was found when synthetic media were changed every week.

A point of great importance is the amount of amino acids mixtures supplied to the larvae, much better results are obtained with levels of 1 or 2 % instead of 6.5 % (the control level for casein), this in spite of the fact that the same does not apply at all to casein itself. One may believe that amino acids mixtures at higher doses introduce at once too much of nitrogenous compounds provoking some kind of metabolic obstruction.

So far as conclusions can be drawn from experiments so near to the threshold of protein biosynthesis, it can be suggested that the following amino acids are essential or at least useful for *Tenebrio molitor* larvae : méthionine, tryptophane, isoleucine, arginine, lysine, threonine, also in certain circumstances :

histidine, serine, glutamic acid and aspartic acid. The needs for alanine, valine and leucine remain doubtful. Anyhow we cannot reject the hypothesis that *Tenebrio molitor* larvae require more than 11 or even 12 amino acids as essential.

We may well have failed to find the convenient proportions of amino acids, however the various patterns of our mixtures, the resemblance of two of them with the composition of casein, and several unsuccessful attempts to supplement mixtures with individual amino acids, leave us with great doubts as to the reliability of that criticism. We found also that amino acids mixtures added to small levels of casein (0.5 %) did not improve at all that threshold for active growth. Therefore it is not likely that the limiting factor is some kind of unknown vitamin present in purified casein and missing in our basic diet. We are left with the suitable hypothesis that *Tenebrio molitor* larvae require not only individual amino acids but also some of them already bound, for instance as dipeptides.

### BIBLIOGRAPHIE

- ALMQUIST, H. J. (1951). — Nutrition. *Amer. Rev. Biochem.*, **20**, 305.  
 BEAU, M. (1952). — *La Caséine*. Dunot, Paris.  
 BENTON, D. A., HARPER, A. E., SPIVEZ, H. E. et ELVEHJEM, C. A. (1956). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **60**, 147.  
 BERNARD, R. et LEMONDE, A. (1949). — *Rev. Canad. Biol.*, **8**, 498.  
 BIGWOOD, E. J. (1952). — Nutrition. *Amer. Rev. Biochem.*, **21**, 355.  
 BLOCK, R. J. et BOLLING, D. (1945). — *The Amino Acid composition of Protein and Foods. Analytical Methods and Results*. Ch. C. Thomas, Springfield, Illinois.  
 CAMPBELL, I. M. (1962). — *Canadian J. Genetics and Cytol.*, **4**, 272.  
 CARPENTER, K. J. et ELLINGER, J. (1955). — *Biochem. J.*, **61**, XI.  
 CHANG, J. I. et WANG, M. Y. (1958). — *Nature*, **181**, 561.  
 DE GROOT, A. P. (1952). — *Experientia*, **8**, 192.  
 DE GROOT, A. P. (1953). — *Protein and Amino Acids requirements of the honeybee (Apis mellifica L.)*. Proefschrift, Univ. Utrecht.  
 FRAENKEL, G. (1955). — *J. Cell. Comp. Physiol.*, **45**, 393.  
 FRAENKEL, G. (1958). — *J. Nutrition*, **65**, 361.  
 FRAENKEL, G. et LECLERCQ, J. (1956). — *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, **64**, 601.  
 FRAENKEL, G. et PRINTY, G. E. (1954). — *Biol. Bull.*, **106**, 14.  
 FRIEDMAN, L. et KLINE, O. L. (1950). — *J. Biol. chem.*, **184**, 599 et *J. Nutrition*, **40**, 295.  
 GORDON, W. G., SEMMETT, W. F., CABLE, R. S., MORRIS, M. (1949). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**, 3293.  
 HINTON, T., NOYES, D. T. et ELLIS, J. (1951). — *Physiol. Zool.*, **24**, 335.  
 HODGSON, E., CHELDELIN, V. H. et NEWBURGH, R. W. (1956). — *Canadian J. Zool.*, **34**, 527.

- HOUSE, H. L. (1949). — *Canad. Ent.*, **81**, 5 et 133.
- HOUSE, H. L. (1954). — *Canad. J. Zool.*, **32**, 358.
- HUOT, L. et LECLERCQ, J. (1958). — *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, **66**, 270, 276, 473 et 483.
- ISHII, S. et HIRANO, G. (1955). — *Bull. Nat. Inst. Agri. Sci. Ser. C.*, **5**, 35.
- JACQUOT, R. et VIGNERON, M. (1958). — *Le Besoin Azolé. Amino Acides, Peptides, Protéines*, A. E. C., Paris.
- JACQUOT, R., ADRIAN, J. et RERAT, A. (1958). — *Rev. Franc. Corps Gras.*, **5**, 3.
- LECLERCQ, J. (1948). — *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, **56**, 130.
- LECLERCQ, J. (1949). — *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, **57**, 173.
- LECLERCQ, J. (1963). — *Nature*, **198**, 106.
- LECLERCQ, J. et LOPEZ-FRANCOS, L. (1964). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **72**, 95.
- LECLERCQ, J. et MOREAU, Ch. (1963). — *Bull. Soc. R. Sci. Liège*, **32**, 157.
- LEMONDE, A. et BERNARD, R. (1951). — *Canad. J. Zool.*, **29**, 71 et 80.
- MCGINNIS, A. J., NEWBURGH, R. W. et CHELDELIN, V. H. (1956). — *J. Nutrition*, **58**, 309.
- MITTLER, T. E. et DADD, R. H. (1962). — *Nature*, **195**, 404.
- MORUZZI, G., RABBI, A., VIVIANI, R. et MARCHETTI, M. (1954). — *Acta Vitaminol.*, **8**, 135.
- PATTON, A. R. (1949). — *Science*, **108**, 217.
- PATTON, A. R. et HILL, E. G. (1948). — *Science*, **107**, 68.
- PATTON, A. R., HILL, E. G. et FOREMAN, E. M. (1948). — *Science*, **107**, 623.
- RABBI, A., MARCHETTI, M., VIVIANI, R. et MORUZZI, G. (1956). — *Nature*, **177**, 757.
- SEDEE, Ph. D. J. W. (1953). — *Experientia*, **9**, 142.
- SEDEE, Ph. D. J. W. (1954). — *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.*, **3**, 262.
- SEDEE, Ph. D. J. W. (1956). — *Dietetic requirements and intermediary protein metabolism of the larva of Calliphora erythrocephala Meig.* Proefschrift, Univ. Utrecht.
- SOKAL, R. R. (1959). — *J. Kansas Ent. Soc.*, **32**, 155.
- SOKAL, R. R. et HUNTER, P. E. (1958). — *Proc. Tenth Intern. Congress Ent.*, **2**, 854.
- SWANSON, P. P. et CLARK, H. E. (1950). — *Ann. Rev. Bioch.*, **19**, 235.
- VIVIANI, R., MARCHETTI, M., RABBI, A. et MORUZZI, G. (1955). — *Nature*, **176**, 464.
- VIVIANI, R., MARCHETTI, M. et RABBI, A. (1957). — *Boll. Soc. Ital. Biol. Exp.*, **33**, 1720.
- VIVIANI, R., MARCHETTI, M. et SECHI, A. M. (1957). — *Boll. Soc. Ital. Biol. Exp.*, **34**, 1903.
- VIVIANI, R. et MARCHETTI, M. (1958). — *Acta Vitamologica*, **12**, 275.
- WOOLEY, D. W. (1945). — *J. Biol. Chem.*, **159**, 753.
- WOOLEY, D. W. (1946). — *J. Biol. Chem.*, **162**, 383 et 166, 783.
- WRETLIND, K. A. J. (1946). — *Acta Phys. Scandinavia*, **11**, 279.
- WRETLIND, K. A. J. (1947). — *Acta Phys. Scandinavia*, **13**, 45.
- ZUCKER, T. F. et L. M. (1950). — *Vitamins and Hormones*, **8**, 1.