

Regu le 14 novembre 1966.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Les ARCHIVES INTERNATIONALES DE PHYSIOLOGIE ET DE BIOCHIMIE publient, en français ou en anglais, des travaux *originaux* de caractère *expérimental*, à l'exclusion de toutes « Revues générales », « Analyses », « Abstracts », etc.

PRÉSENTATION DES MANUSCRITS DACTYLOGRAPHIÉS :

1. — Condenser la rédaction, de manière à ne pas dépasser l'étendue d'une feuille d'impression (16 pages).

2. — Fournir un texte *ne varietur*. Les frais de remaniements sur épreuves seront facturés aux Auteurs.

3. — Chaque article sera suivi d'un court *résumé*, objectif, pouvant être utilisé directement comme « Analyse » ou « Referat » par les organisations bibliographiques.

4. — Les citations seront réunies à la fin de l'article sous la rubrique « Bibliographie » (« References » pour les travaux rédigés en anglais). Elles seront classées par ordre alphabétique des noms d'Auteurs. On les présentera en s'inspirant des exemples suivants :

ZWAARDEMAKER, H. (1904). — *Arch. internat. Physiol.*, 1, 1-16.

RITCHIE, J. M. (1954). — *J. of Physiol.*, 125, 605-612.

(Noms des Auteurs en PETITES CAPITALES : souligner deux fois; Titre du journal en italique : souligner une fois; tome en chiffres arabes et en caractères gras : souligner d'un trait ondulé).

Pour les livres cités dans la Bibliographie, on indiquera : Nom et initiales des prénoms de l'AUTEUR (souligner deux fois); (date de publication); *Titre de l'ouvrage* (italique, souligner une fois); nom de l'éditeur et ville.

Dans le texte, le nom de l'AUTEUR (souligner deux fois) et l'année de publication (entre parenthèses) suffisent à renvoyer à la Bibliographie.

Exemples :

GREGORY (1950)

BREMER, F. (1947, a). — BREMER, F. (1947, b).

5. *Figures*. — Leur nombre sera réduit au minimum strictement indispensable à l'intelligence du texte.

Les dessins seront exécutés à l'encre de Chine, uniquement en traits, hachures et points, sans « gris » ni « dégradés ». Pour les courbes sur papier millimétré, employer du millimétré noir ou rouge, si le quadrillé doit apparaître sur la figure définitive; du millimétré bleu, si le quadrillé doit disparaître.

Toutes les figures doivent pouvoir être incorporées dans le texte (dimensions maximales : 11 cm sur 18 cm). Pas de planches hors-texte.

Eviter de fournir des figures destinées à être reproduites en similitude sur cuivre, dont le coût est très élevé.

Présenter les légendes des figures sur feuillets séparés du texte.

6. *Tableaux*. — Leur nombre et leurs dimensions seront réduits au minimum indispensable. Ne pas publier deux fois les mêmes données numériques, une fois sous forme de tableaux, une autre fois sous forme de courbes.

NUTRITION PROTIDIQUE CHEZ *TENEBRIO MOLITOR* L. VIII. — SUR LA VALEUR NUTRITIVE DES FRACTIONS DE LA CASÉINE

PAR

Jean LECLERCQ et Luis LOPEZ-FRANCOS

(Zoologie générale, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux)

La caséine dite acide ou pure, pour usages de laboratoire, est préparée par précipitation dans le lait écrémé au pH 4.6-4.7, puis lavage, redispersion et reprécipitation. On la rend « vitamin free » par extraction dans l'alcool à chaud jusqu'à élimination de toute réponse vitaminique dans des tests biologiques adéquats. Malgré toutes ces manipulations, et la similitude des teneurs en acides aminés, les caséines disponibles dans le commerce ne sont pas identiques. On en a fait la démonstration maintes fois, notamment à l'occasion des recherches sur les besoins nutritifs des larves de *Tenebrio molitor* L. (FRAENKEL et LECLERCQ, 1956; FRAENKEL, 1958; LECLERCQ, 1965; LECLERCQ et LOPEZ-FRANCOS, 1966). Les différences entre les échantillons d'origines diverses s'expliquent parfois par la persistance de molécules non protidiques, jouant un rôle dans le métabolisme (par exemple le zinc et la carnitine, cf. FRAENKEL, 1958), ou plus simplement par des particularités granulométriques facilement corrigées (LECLERCQ et LOPEZ-FRANCOS, 1966). Mais on peut se demander s'il ne faut pas aussi mettre en cause la complexité naturelle de la caséine qui, on le sait, est une association de protéines différentes.

MELLANDER (1939), WARNER (1944), puis HIPP *et al.* (1952) ont montré qu'on peut séparer de la caséine, trois composants α , β et γ dont ils ont fait connaître certaines propriétés physiques, électrophorétiques et de constitution. De la caséine α , WAUGH et VON HIPPEL (1956) ont isolé une fraction α , laquelle comporte aussi une composante secondaire, la caséine λ (LONG et VAN WINKLE, 1958; BRUNNER, 1961). Ce n'est pas tout, RIBADEAU-DUMAS (1961) a obtenu dix fractions différentes par chromatographie sur colonne DEAE en milieu uréique, et WAKE et

BALDWIN (1961) ont réussi à distinguer vingt composants différents, dont neuf au moins dans la seule caséine α .

Devant la difficulté persistante de trouver un mélange d'acides aminés capable de remplacer la caséine purifiée dans le régime des larves de *Tenebrio molitor* et d'autres animaux, sachant qu'on améliore les mélanges d'acides aminés les moins mauvais en y ajoutant une protéine aussi pauvre que la gélatine (LECLERCQ et LOPEZ-FRANCOS, 1966), nous nous sommes naturellement demandés si la caséine ne contient pas un facteur critique qui serait propre à une des hétéroprotéines intervenant dans la composition du complexe, ou du moins qui serait particulièrement concentré dans l'une ou l'autre fraction isolable. On sait depuis MELLANDER (1939) que les trois fractions α , β et γ diffèrent remarquablement par leurs teneurs en phosphore. Cela ne nous paraît pas très important au point de vue considéré, puisque nos essais antérieurs (1964, p. 289; 1966, p. 403) ont fait rejeter l'hypothèse d'une carence des mélanges artificiels d'acides aminés offerts aux larves de *Tenebrio*, en phosphore, en oligoéléments ou en vitamines classiques. Par contre, on s'est demandé s'il faut attribuer une signification nutritionnelle à la découverte faite par CAYEN *et al.* (1962) que l'acide N-acétylneuraminique se trouve à des concentrations très différentes d'une fraction de la caséine à l'autre, ou encore au fait que la caséine α contient seule le glycopeptide isolé par ALAIS et JOLLES (1961).

De toutes manières, il était intéressant de soumettre des fractions de caséine au test *Tenebrio*, celui-ci ayant été présenté par l'un de nous comme susceptible d'aider à classer rapidement selon leur valeur nutritive effective, diverses sources de protides disponibles en petites quantités (LECLERCQ et DE BAST, 1965; LECLERCQ, 1965). En fait, ce que nous rapportons ici, montre que vraiment, les larves de *Tenebrio* peuvent apporter des réponses à des questions qu'on pourrait très difficilement poser en expérimentant avec des animaux plus gros et exigeant une alimentation beaucoup plus abondante.

Dispositions expérimentales

Elles sont exactement les mêmes que précédemment (LECLERCQ et LOPEZ-FRANCOS, 1966) et impliquent le remplacement de la caséine purifiée par une autre source d'acides aminés, en l'occurrence par

des fractions isolées de la caséine selon des procédés connus qui seront indiqués au fur et à mesure. On a soumis aux régimes expérimentaux, des larves de race F, 20 dans chaque condition, pesant entre 25 et 30 mg après trois jours de jeûne préalable. On a déterminé leur poids après une semaine, puis après la quatrième semaine de régime. Mais pour simplifier, on se contentera de signaler les valeurs calculées pour le critère que nous désignons par c' , c'est-à-dire le pourcentage de poids frais gagné par les larves pendant les trois dernières semaines du régime. On a veillé à rendre tous les produits utilisés (protéines et mélange final) homogènes sous le rapport de la granulométrie ⁽¹⁾.

Résultats

Confirmons d'abord ce qui a été bien acquis antérieurement, à savoir que dans les conditions choisies, les larves de *Tenebrio molitor* croissent normalement si leur régime comporte 3 % de caséine purifiée comme seule source d'acides aminés. On a observé ceci avec trois caséines différentes, la granulométrie ayant dû être appropriée pour l'une d'elles (Merck) :

3 % caséine Merck (4 fois 20 larves)	$c' = 116$ à 137
3 % caséine Roche (4 fois 20 larves)	$c' = 112$ à 145
3 % caséine Mann (3 fois 20 larves)	$c' = 104$ à 132

Comment se comportent les larves, si on remplace ces caséines primaires par leur fraction α isolée soit selon la méthode de HIPP *et al.* (1952), soit selon celle de CHEESEMAN (1962)?

3 % caséine α Merck, selon HIPP <i>et al.</i>	$c' = 114$
<i>Idem</i> (répétition)	134
<i>Idem</i> (séchée à 38° C)	127
<i>Idem</i> (lyophilisée)	139
3 % caséine α Merck, selon CHEESEMAN	123
3 % caséine α Roche, selon CHEESEMAN	130
3 % caséine α Mann, selon CHEESEMAN	132

Dans ces conditions, la caséine α a manifestement la même valeur nutritive que la caséine complexe dont elle est isolée.

En est-il de même si les caséines sont fournies en quantités suboptimales ou très insuffisantes? Réponses :

⁽¹⁾ Nous tenons à remercier M. le Professeur R. COPPENS et Mme E. HÔTE-BAUDART (Technologie des Industries Agricoles, section Froid, Séchage, Laiterie, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux) qui ont mis à notre disposition leur aide et les ressources de leur laboratoire, pour effectuer les séparations et préparations de caséines nécessaires pour nos essais.

1 % caséine Roche (3 fois 20 larves)	$c' = 72$
1 % caséine α Roche, selon CHEESEMANN	54
1 % caséine Mann (2 fois 20 larves)	46.5
1 % caséine α Mann, selon CHEESEMANN	64
1 % caséine α Merck, selon CHEESEMANN	42
0.50 % caséine Roche (2 fois 20 larves)	34
0.50 % caséine Mann	25
0.50 % caséine α Merck, selon HIPPEL <i>et al.</i>	17.5
0.25 % caséine Roche	17
0.25 % caséine α Merck, selon HIPPEL <i>et al.</i>	11

Ces essais conduisent à penser que les trois caséines primaires et les caséines α correspondantes se classent dans un ordre décroissant Roche > Mann > Merck, et que dans certains cas, la caséine α s'avère sensiblement moins bonne que le complexe entier. Mais il subsiste un certain doute, non seulement parce que nous n'avons pu réaliser toutes les conditions contrôle souhaitables, mais surtout parce que les différences éventuelles sont faibles.

Une autre façon de chercher une réponse aux problèmes posés consiste à opposer les croissances obtenues d'une part avec la caséine primaire, d'autre part avec la caséine α , et d'autre part avec ce qui reste lorsqu'on a isolé la fraction α . On a trouvé :

Intacte	α	Reste après extraction d' α
3 % caséine Roche, $c' = 112$ à 145	130	109
3 % caséine Mann 104 à 132	132	109
3 % caséine Merck 116 à 137	114 à 139	103
1 % caséine Roche, $c' = 72$	54	52
1 % caséine Mann 46	64	51
1 % caséine Merck ?	38	33.5

On apprend ainsi que si la caséine α possède une valeur nutritive identique à celle des caséines primaires, la caséine privée de sa composante α est sensiblement moins bonne, à une exception possible près. On doit donc supposer que les caséines β

et γ ont une valeur nutritive inférieure à celle d' α . C'est bien ce que nous avons vérifié :

1 % caséine α Merck, selon HIPPEL <i>et al.</i>	$c' = 38$
1 % caséine β Merck, <i>idem</i>	15
1 % caséine γ Merck, <i>idem</i>	21

Ce classement $\alpha > \gamma > \beta$ est facilement expliqué par les différences dans la composition en acides aminés des trois fractions, suggérées dans les tables de GORDON *et al.* (1949, 1953). Il est particulièrement significatif que les teneurs en tryptophane se classent comme ceci : 1.6 pour α , 1.2 pour γ et 0.65 pour β .

* * *

Il ne nous a pas été possible d'obtenir d'autres fractions de caséine en quantités suffisantes pour réaliser d'autres expériences semblables aux précédentes. Mais nous avons pu en avoir assez pour les besoins d'un autre type d'essais tentés pour savoir si certaines fractions pourraient mieux que d'autres améliorer un mélange artificiel de 18 acides aminés.

On a utilisé le mélange C_1 dont la composition est connue et qui, administré à raison de 3 % comme seule source d'acides aminés, maintient la croissance à des valeurs de l'ordre de $c' = 14$ (LECLERCQ et LOPEZ-FRANCOS, 1966, p. 398). On sait qu'une amélioration nette est obtenue si on ajoute à ce mélange, un peu de gélatine (par exemple 0.25 ou 0.50 % de l'aliment total) ou, bien entendu, un peu de caséine.

Des essais d'orientation ont d'abord appris qu'à la dose minimale de 0.05 %, la caséine α seule assure une croissance aussi insignifiante que le mélange C_1 à 3 %, mais qu'une légère amélioration s'indique déjà, si on fournit les deux ensemble. Voici ce qu'on a enregistré avec des doses plus élevées et avec diverses fractions de caséine séparées de la caséine Merck :

3 % $C_1 = 18$ acides aminés (8 fois 20 larves)	$c' = 14.3$
<i>Idem</i> + 0.15 % caséine intacte	20.7
<i>Idem</i> + 0.15 % caséine α , selon HIPPEL <i>et al.</i> (2 fois 20 larves)	19.8
<i>Idem</i> + 0.15 % caséine β , <i>idem</i> (2 fois 20 larves)	19.0
<i>Idem</i> + 0.15 % caséine γ , <i>idem</i> (20 larves)	19.4
<i>Idem</i> + 0.15 % caséine α , selon LONG et VAN WINKLE	21.8

<i>Idem</i> + 0.15 % caséine α_s , <i>idem</i>	22.6
<i>Idem</i> + 0.25 % caséine α	32.8
<i>Idem</i> + 0.25 % caséine β	16.7
<i>Idem</i> + 0.25 % caséine γ	24.1
<i>Idem</i> + 0.25 % gélatine	26.2
<i>Idem</i> + 0.50 % gélatine (10 fois 20 larves)	35.1

On a donc de nouvelles raisons de penser que la caséine β a une valeur nutritive inférieure à celle des autres fractions et que γ tolère une situation intermédiaire. Malgré l'originalité de leur composition en acides aminés et à d'autres points de vue (cf. HIPP *et al.*, 1961; JOLLES et ALAIS, 1962), les caséines α et α_s ne s'avèrent par radicalement différentes d' α . Elles ont peut-être un peu plus d'effet que celle-ci, mais elle n'apportent aucun facteur qui redresserait spectaculairement les croissances. En fait, à faibles doses, la caséine intacte et ses diverses fractions n'ajoutent à un mélange artificiel de 18 acides aminés, rien qui ne soit procuré aussi sûrement par la gélatine ! Cela est en parfait accord avec ce que nous avons conclu dans le travail précédent.

Summary

Several fractions isolated from ordinary vitamin free caseins were supplied both as sole sources of amino acids and as supplement to an artificial mixture of 18 amino acids, to *Tenebrio molitor* larvae kept on a synthetic diet, in standard conditions. It was found that their nutritive value is quite similar to that of whole casein. At most, it was recorded that β casein is not so good as the others, also that they are likely to be ranked in the following order : $\alpha_s = \alpha > \alpha > \gamma > \beta$, according to their efficiency in supporting growth.

None of them is so much better than the others as to suggest that it concentrates an unknown or particularly efficient growth factor. In low protein diet tests where they supplement the 18 amino acids mixture, they do not produce better results than gelatin. Thus we are confirming the conclusion of our previous paper : the failure of amino acids mixtures to replace a whole protein is not due to lack of known or unknown accessory factors, nor to imbalance in vitamins or minerals, but rather to imbalance in the amino acids themselves, as available in the animal's gut.

BIBLIOGRAPHIE

- ALAIS, Ch. et JOLLES, P. (1961). — *Biochim. Biophys. Acta*, **51**, 315.
 BRUNNER, J. R. (1961). — *J. Dairy Sci.*, **44**, 1163.
 CAYEN, M. N., HENNEBERRY, G. O. et BAKER, B. E. (1962). — *J. Dairy Sci.*, **45**, 706.
 CHEESEMAN, G. C. (1962). — *J. Dairy Res.*, **29**, 163.
 FRAENKEL, G. (1958). — *J. Nutrition*, **65**, 361.
 FRAENKEL, G. et LECLERCQ, J. (1956). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **64**, 601.
 GORDON, W. G., SEMMETT, W. F., CABLE, R. S. et MORRIS, M. (1949). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**, 3293.
 GORDON, W. G., SEMMETT, W. F. et BENDER, M. (1953). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 1678.
 HIPP, N. J., BASCH, J. J. et GORDON, W. G. (1961). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 35.
 HIPP, N. J., GROVES, M. L., CUSTERS, J. H. et McMEEKIN, T. L. (1952). — *J. Dairy Sci.*, **35**, 272.
 JOLLES, P. et ALAIS, Ch. (1962). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 56.
 LECLERCQ, J. (1965). — *Ann. Nutr. Alim.*, **19**, 47.
 LECLERCQ, J. et DE BAST, D. (1965). — *Ann. Nutr. Alim.*, **19**, 19.
 LECLERCQ, J. et LOPEZ-FRANCOS, L. (1964). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **72**, 276.
 LECLERCQ, J. et LOPEZ-FRANCOS, L. (1966). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **74**, 397.
 LONG, J. et VAN WINKLE, Q. (1958). — *J. Dairy Sci.*, **41**, 317.
 MELLANDER, O. (1939). — *Biochem. Z.*, **300**, 240.
 RIBADEAU-DUMAS, B. (1961). — *Biochim. Biophys. Acta*, **54**, 400.
 WAKE, R. G. et BALDWIN, R. L. (1961). — *Biochim. Biophys. Acta*, **47**, 225.
 WARNER, C. (1944). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **66**, 1725.
 WAUGH, D. F. et VON HIPPEL, P. H. (1956). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 4576.