

UTILISATION DES LARVES DE *TENEBRIO MOLITOR* POUR COMPARER LA VALEUR NUTRITIVE DES PROTÉINES DE FEUILLES DE VÉGÉTAUX

par

Jean LECLERCQ, Claire DUYCKAERTS et Charles GASPAR

Laboratoire de zoologie générale, Faculté des sciences agronomiques, Gembloux
et Centre national d'écologie générale (Belgique)

Malgré toutes les analyses faites à ce jour, on ne dispose pas d'informations adéquates pour classer les feuilles des végétaux les plus ordinaires, sous le rapport de la valeur effective des protides qu'elles contiennent. L'importance que l'on peut attribuer à la question diffère beaucoup selon le domaine particulier de la nutrition que l'on considère.

En nutrition humaine, les feuilles des plantes potagères n'ont qu'un intérêt très secondaire pour ce qui concerne l'apport de protides : ce sont les besoins en vitamines et en minéraux qui justifient, avant tout, leur consommation. Nonobstant, des recherches récentes (9, 17, 18, 19) font croire qu'on pourrait utilement extraire et concentrer les protéines de certaines feuilles et les mettre en concurrence avec les protéines nobles traditionnellement fournies par les animaux. Cette perspective rend évidemment souhaitable qu'on identifie les espèces végétales, cultivées ou non, qui mériteraient le plus de retenir l'attention.

Pour les homéothermes domestiques principalement phytophages, les protéines des feuilles de végétaux constituent une source permanente et primitivement suffisante d'acides aminés. Mais on sait qu'une bonne partie des progrès de la zootechnie tient au fait qu'on a pu composer des régimes enrichis, notamment en procurant des farines de graines beaucoup plus riches en azote que les feuilles. En tous cas, même à l'état primitif, ces animaux consomment

presque toujours des mélanges de feuilles de végétaux, illustrant la notion empirique non controuvée par les découvertes scientifiques, selon laquelle l'alimentation la meilleure est faite d'aliments variés. Il s'ensuit qu'on ne sait généralement pas, ce qui est le plus essentiel ou le plus dispensable, sous le rapport des protéines, parmi les constituants foliaires des herbes, des foins et autres fourrages. On ne sait pas non plus si les formations végétales spontanées ne comportent pas des espèces plus valables, au point de vue considéré, que celles dont on assure la multiplication dans les cultures.

Beaucoup d'insectes sont exclusivement phytophages, parfois au point de se nourrir des feuilles d'une seule espèce de végétaux. On doit en inférer que, pour eux, les protides des feuilles choisies sont d'excellente qualité. On reconnaît ainsi comme le fait FRAENKEL (4,5) et comme le dit FLORKIN (3) « que les constituants primaires des végétaux, résultant des cycles métaboliques et des voies biosynthétiques qu'on retrouve chez les bactéries et chez les animaux sont semblables dans toutes les espèces végétales », et ainsi « les constituants communs aux cellules couvrent les besoins fondamentaux des Insectes phytophages ». Dès lors, la spécificité du régime de tant d'insectes s'explique non par des besoins nutritifs particuliers, mais par le comportement des insectes réagissant aux « substances secondaires » élaborées par les végétaux et que FLORKIN (3) propose d'appeler *coactones*. Cette conception s'accommode parfaitement de ce que les insectes phytophages déjà étudiés à ce point de vue, ont des besoins en acides aminés très ordinaires, semblables à ceux des autres insectes et des Vertébrés (1, 2, 4, 5, 8, 10, 11). Elle a été remarquablement confirmée par l'identification des coactones intervenant dans de nombreux cas de régime très spécifique, notamment dans le cas du ver à soie, *Bombyx mori* (7, 20 et cf. 3).

Nonobstant, on peut continuer à se demander si les feuilles des végétaux contiennent des protéines tellement semblables qu'on pourrait les donner indifféremment à n'importe quel phytophage et obtenir sa croissance optimale, ayant seulement veillé à satisfaire ses autres besoins et les impératifs de sa physiologie sensorielle. On imagine difficilement que l'unité biochimique des végétaux aille à ce point, mais on manque de données expérimentales pour en discuter.

*
* *

Nous avons cru opportun de verser à ces dossiers, une pièce originale répondant en l'occurrence à la question : *que valent diverses feuilles de végétaux, notamment des feuilles d'arbres, comme sources d'acides aminés pour les larves d'un insecte phytophage qui accepte facilement n'importe quel aliment : le ver de farine, Tenebrio molitor ?*

Le même insecte a été présenté comme susceptible d'aider à classer préliminairement mais rapidement, des sources d'acides aminés, selon leur valeur

nutritionnelle (12). Les premiers essais tentés avec diverses protéines ou complexes protidiques classiques ont été encourageants (13, 16).

La méthode a donc été appliquée, comme précédemment, en remplaçant la protéine optimale (caséine purifiée) prévue dans un mélange artificiel par ailleurs complet et bien déterminé (sans autre protide), par des poudres de feuilles de végétaux, préalablement séchées et dégraissées.

MÉTHODES

Les conditions expérimentales ont été les mêmes que précédemment, sauf que, pour chaque matériel étudié, on a prévu quatre lots de 10 larves (au lieu de trois). On a aussi utilisé des larves de même race (F) et à peu près de même poids initial : $P_0 =$ de 9,6 mg à 10,2 mg. Ayant pu assurer cette homogénéité des poids initiaux dans tous les cas, il ne s'impose plus que nous surchargions les tableaux de résultats, en rapportant ces valeurs.

Le déroulement des expériences nous a donc livré un poids P_1 après une semaine de régime, et un poids P_4 après quatre semaines. Ces valeurs figureront, exprimées en moyenne pour 40 larves, dans les tableaux de résultats.

Dans le travail précédent (13) le rendement des aliments a été jugé en considérant la différence $P_4 - P_0$. On retrouvera ce critère dans nos tableaux de résultats. Toutefois, on peut lui objecter qu'il accorde une part trop importante au comportement des larves pendant la première semaine des essais. On sait qu'alors les larves sont affamées par deux jours de jeûne absolu et que, nonobstant, elles peuvent encore tirer parti des réserves faites avant leur sélection pour l'expérience. Incontestablement, c'est la différence $P_4 - P_1$, donc le poids gagné en trois semaines (après une semaine d'adaptation), qui exprime le mieux la réponse à la qualité de l'aliment imposé. C'est donc cette différence que nous rapporterons, pour clore nos tableaux, l'exprimant comme dans d'autres recherches sur le même animal (14, 15, 16), par le symbole c' , et en p. 100, soit :

$$c' = \frac{P_4 - P_1}{P_1} \times 100$$

PRODUITS UTILISÉS

Le milieu nutritif témoin comporte donc 3 p. 100 de caséine purifiée (HOFFMAN-LAROCHE, Bâle), comme source unique d'acides aminés, 95,5 p. 100 de glucose pur, et toutes les molécules minérales et organiques essentielles pour une croissance normale des larves.

Les milieux comparés comportent, en lieu et place de la caséine, de la poudre séchée et dégraissée de feuilles, au taux nécessaire pour que la teneur

en azote soit équivalente à ce que 3 p. 100 de caséine apporteraient. Ainsi, aucune différence dans les résultats ne peut être attribuée à une différence dans la *quantité* d'azote du régime. La correction est faite en réduisant corrélativement la teneur en glucose, ce qui est sans effet sur la croissance des larves. Mais bien entendu, il reste possible que celle-ci se trouve activée ou déprimée par un facteur contenu dans la fraction non protidique des produits testés. On en reparlera en discutant les résultats obtenus.

Les feuilles utilisées ont été récoltées proprement, aux dates indiquées dans les tableaux. La plupart l'ont été dans les forêts de Ferage (province de Namur, commune de Mesnil-Église) ou de Virelles (province de Hainaut) qui font actuellement l'objet de *recherches méthodiques sur la productivité de l'écosystème-forêt*, organisées par le *Centre national d'Écologie générale* (Directeur : professeur Paul DUVIGNEAUD, Bruxelles). Les feuilles d'ortie, de coudrier, de charme, de chêne et un des échantillons de graminées proviennent de Ferage. Celles de mercuriales, de hêtre, de pin sylvestre et l'autre échantillon de graminées proviennent de Virelles. On a ainsi assuré un minimum d'homogénéité dans la provenance du matériel et peut-être ouvert une perspective pratique dans l'étude comparée de la productivité primaire des deux forêts.

Après séchage à 90 °C, les échantillons ont été dégraissés à l'éther, par la méthode Soxhlet, par le professeur P. MARTENS (*Chimie analytique*, Gembloux) que nous tenons à remercier de sa coopération. Nous remercions aussi les professeurs L. HENNAUX, A. ANTOINE et R. COMPÈRE (*Zootechnie*, Gembloux) qui ont assuré la détermination des teneurs en azote de tous les produits dégraissés. Ces teneurs figurent en première colonne dans nos tableaux de résultats.

RÉSULTATS

Le tableau I présente un ensemble de résultats obtenus avec diverses sources d'acides aminés, classées de la plus efficace aux plus insuffisantes. Les milieux témoins, à base de caséine, ont assuré des taux de croissance nettement supérieurs à ceux qui ont été rapportés précédemment (13), cela peut s'expliquer très simplement par les soins accrus que nous avons apportés à la surveillance de l'humidité des étuves et de l'hydratation optimale des milieux nutritifs. On appréciera la variabilité qui persiste néanmoins, d'un essai à l'autre, et n'a rien d'extraordinaire.

Aucune feuille ne permet un taux de croissance aussi efficace que la caséine. Mais on remarque de suite la performance des feuilles d'ortie qui semblent trouver ici justification à la réputation qui leur est faite dans certaines vieilles recettes agronomiques méconnues par l'agriculture évoluée. Viennent alors, sensiblement moins bonnes mais néanmoins efficaces, les herbes des prairies et les feuilles de mercuriale, puis les mousses du genre *Polytrichum*.

TABLEAU I

Modifications du poids chez des larves de *Tenebrio molitor* de race F, recevant une alimentation artificielle standard comportant 3 p. 100 de protéine

40 larves dans chaque condition.

Poids moyen en mg : P₁ après une semaine; P₄ après quatre semaine.

N : teneur en azote des produits dégraissés.

Sources d'acides aminés	N	P ₁	P ₄	P ₄ - P ₀	c'
Caséine	16	17,3	79,0	68,9	357
Caséine	16	17,6	76,5	66,9	347
Caséine	16	17,9	69,3	59,2	287
Caséine	16	16,4	62,9	53,2	284
Caséine	16	16,4	62,0	52,2	278
<hr/>					
Feuilles d' <i>Urtica dioica</i> , 28. IV. 66	3,99	17,4	57,4	47,3	230
Graminées et plantes herbacées de prairie, Virelles, 7. VII. 66	2,96	17,2	51,7	41,6	201
Graminées et plantes herbacées de prairie, Ferage, 7. VII. 66	3,36	16,9	50,5	40,4	199
Feuilles de <i>Mercurialis perennis</i> 28. IV. 66.	3,98	15,8	36,2	26,1	199
Feuilles de <i>Polytricum</i> (hêtraie à luzule) 30. VI. 66	1,58	14,2	32,9	23,0	132
<hr/>					
Feuilles de :					
<i>Luzula albida</i> (hêtraie à luzule) 30. VI. 66 .	2,19	15,0	26,8	16,9	78,7
<i>Luzula albida</i> (hêtraie à fétuque) 30. VI. 66	2,29	14,5	20,9	11,0	44,1
<i>Festuca silvatica</i> , 30. VI. 66	2,10	13,4	19,2	9,3	43,3
<i>Quercus robur</i> 7. VII. 66	2,29	15,7	26,9	16,9	71,3
Idem, 3. VI. 65	2,42	15,3	25,6	11,0	67,3
Idem, 22. IX. 65	1,84	15,9	21,7	12,1	36,5
<i>Corylus avellana</i> , 3 VI. 65	2,79	15,2	27,4	17,8	80,3
Idem, 22. IX. 65	2,35	15,5	23,1	13,5	49,0
Idem, 22. IX. 65	2,35	15,8	21,1	11,3	33,5
Idem, 7 VII. 66	2,52	13,9	14,7	4,9	5,8
<i>Carpinus betulus</i> , 7. VII. 66	2,50	14,7	21,1	11,1	43,5
Idem, 3 VI. 65	2,65	15,4	19,6	10,0	27,3
Idem, 22. IX. 65	2,04	14,9	17,8	8,2	19,5
<i>Pinus silvestris</i> , 7. VII. 66	1,38	15,1	19,3	9,2	27,8
<i>Larix decidua</i> , 7. VII. 66	1,72	15,0	16,5	6,4	10,0
<i>Fagus silvatica</i> , (hêtraie à luzule) 30. VI. 66	2,21	15,1	23,3	13,5	54,3
<i>Fagus silvatica</i> , 3. VI. 65	2,21	14,7	17,0	7,4	15,7
Idem, 22. IX. 65	2,16	15,1	16,5	6,9	9,3
Idem, 22. IX. 65	2,16	14,5	16,2	6,5	11,7
<i>Fagus silvatica</i> , (hêtraie à fétuque) 30. VI. 66	2,54	15,5	15,4	5,5	0,7
Idem, 7. VII. 66	2,28	14,4	15,1	5,4	4,9
<i>Sambucus nigra</i> , 7. VII. 66	3,87	14,1	16,3	6,2	15,6
<i>Fraxinus excelsior</i> , 7. VII. 66	2,21	13,8	15,6	5,5	13,0

Les autres matériaux, luzule, fétuque et surtout feuilles d'arbres divers, s'avèrent des sources très médiocres, sinon très insuffisantes, d'acides aminés. C'est là l'inattendu de notre investigation.

Il est toujours aléatoire de distinguer des degrés dans les résultats obtenus avec des aliments qui sont tous insuffisants. On le vérifie en constatant que les feuilles de même espèce ont donné des résultats très différents, dans plusieurs cas, sans que cela soit explicable, par exemple en considérant l'âge des feuilles dans la période de végétation. Qu'à cela ne tienne, il semble bien que les feuilles de chêne soient généralement moins mauvaises que les autres, que celles de hêtre soient généralement les plus mauvaises de toutes, et que, contrairement à ce qu'on aurait pu supposer, les aiguilles de Conifères ne soient pas plus mauvaises que les feuilles de Phanérogames ligneux.

Nous nous sommes naturellement demandés si ces insuffisances ne pourraient s'expliquer par quelque détail en rapport avec la préparation des milieux nutritifs ou par un facteur aisément mis en évidence. D'où les questions qui vont être posées.

Faut-il mettre en cause le broyage des feuilles ?

En réduisant des feuilles en poudre, on obtient deux sortes de particules, les unes très fines, les autres nettement plus grosses. On a donc répété l'essai qui fit conclure à l'extrême médiocrité des feuilles de *Fraxinus excelsior*, cette fois en prévoyant trois conditions, avec 40 larves pour chacune :

Feuilles de <i>Fraxinus</i> pulvérisées, sans plus.....	$c' = 13,5$
<i>Idem</i> , mais particules fines.....	$c' = 19,8$
<i>Idem</i> , mais particules grossières.....	$c' = 18,2$

On le voit, ce n'est pas la granulométrie des particules qui intervient.

Faut-il mettre en cause un déséquilibre minéral ?

Il se pourrait que la fraction non protidique des poudres de feuilles incorporée dans les milieux nutritifs, perturbe l'équilibre minéral de ceux-ci, par exemple en introduisant un surplus qui affecterait l'appétence ou l'assimilation. C'est pourquoi nous avons répété un essai témoin, à base de caséine, le doublant d'un essai identique, mais avec addition des cendres de feuilles de *Fraxinus excelsior* contenues dans la quantité appropriée de ces feuilles. Encore 40 larves dans chaque condition :

3 p. 100 caséine.....	$c' = 276$
<i>Idem</i> + cendres de feuilles de <i>Fraxinus</i>	$c' = 286$

Donc aucune dépression de la croissance.

Hypothèse de carences banales en acides aminés essentiels ?

Supposons que les protéines des feuilles d'arbres, notamment celles de hêtre qui sont parmi les plus mauvaises, soient carencées en un ou plusieurs

acides aminés essentiels. Il suffirait d'y ajouter ce qui manque et l'on débloquent la croissance des larves.

C'est ce qu'on a tenté en choisissant les acides aminés essentiels que l'on sait être les plus critiques pour ces larves (12, 14, 15) et en les ajoutant aux poudres de feuilles de hêtre, à peu près dans les proportions où elles interviennent dans la composition de la caséine selon GORDON *et al.* (6). Les diverses conditions prévues et les résultats figurent dans le tableau II.

TABLEAU II

*Additions d'acides aminés à un milieu nutritif
contenant 3 p. 100 de protéines de feuilles de hêtre*

20 ou 30 larves de *Tenebrio molitor*, race F, dans chaque condition.

Source d'acides aminés	P ₄ - P ₆	c'
A = 22,2 g de Hêtre/100 g de milieu nutritif 22.IX.65	7,0	11,1
A = Idem 22.IX.65	6,8	12,7
A + 0,2 g L-lysine	7,3	15,2
A + 0,17 g DL-tryptophane + 0,24 g DL-thréonine + 0,17 g DL-valine + 0,2 g L-leucine + 0,075 g L-histidine	7,9	16,1
A + 0,17 g DL-tryptophane	8,6	18,2
A + 0,075 g L-histidine	7,4	18,2
A + 0,2 g L-leucine	8,3	19,5
A + 0,24 g DL-thréonine	9,0	20,9
A + 0,17 g DL-valine	8,8	24,3
<hr/>		
B = A + 0,5 g de gélatine	8,3	27,3
B + 0,2 g L-leucine	11,7	40,7
B + 0,17 g DL-tryptophane + 0,2 g L-lysine	12,3	41,5
B + 0,17 g DL-valine	12,0	42,6
B = A + 0,5 g gélatine	11,1	44,2
B + 0,24 g DL-thréonine	19,1	45,4
B + 0,17 g DL-tryptophane + 0,24 DL-thréonine + 0,17 g DL-valine + 0,2 g L-leucine + 0,075 g L-histidine	13,0	46,2
B + 0,075 g L-histidine	12,7	48,1
B + 0,17 g DL-tryptophane	13,7	48,8
B + 0,17 g DL-tryptophane + 0,075 g L-histidine	13,6	51,3
B + 0,17 g DL-tryptophane	15,6	61,0

Ces additions d'acides aminés ont été décevantes : la croissance a été plus ou moins améliorée avec chacun d'eux, mais si faiblement qu'on ne peut rien inférer de décisif. En outre l'addition des cinq acides aminés, à la fois, n'a pas donné plus que l'addition d'un quelconque d'entre eux.

Mais le même tableau présente aussi ce que nous avons obtenu en ajoutant une petite quantité de gélatine, ce qui produit un effet beaucoup plus net. On a encore mieux si on ajoute la même quantité de gélatine et de tryptophane, ce qui n'est pas étonnant si on s'en réfère à divers essais antérieurs (15). Mais on a tout juste rendu le milieu à base de feuilles de hêtre comparable à ceux qu'on a préparés à base de feuilles d'arbres moins mauvaises. On n'a pas, loin s'en faut, promu la croissance au niveau permis par les feuilles d'herbes et d'ortie.

Il faut donc reconnaître que si la composition des protéines foliaires en acides aminés n'est pas optimale, c'est un déséquilibre, plutôt qu'une carence bien spécifique qui est en cause. Cela rappelle les difficultés rencontrées dans les essais de remplacement de la caséine par des hydrolysats ou par des mélanges artificiels d'acides aminés (14, 15, 16).

En fin de compte, on se trouve devant un dilemme et une série d'hypothèses de travail qui suggèrent l'opportunité de nouvelles investigations :

Ou bien les larves de *Tenebrio molitor* sont affectées par des molécules organiques systématiquement présentes dans les feuilles d'arbres et dans d'autres végétaux, ces molécules ayant un effet dépressif sur l'appétit, ou sur la digestion, ou sur l'assimilation.

Ou bien les feuilles peu favorables contiennent des protides convenables et aucune substance dépressive pour les larves de *Tenebrio*, mais ces protides ne sont pas adéquatement disponibles en raison des modalités de leur incorporation dans les microstructures du végétal.

On retiendrait assez volontiers la seconde alternative en considérant d'une part que les mêmes feuilles satisfont parfaitement les besoins protidiques et autres des chenilles de Lépidoptères qui ne mangent qu'elles, et d'autre part que les larves de *Tenebrio* paraissent fort tolérantes vis-à-vis des substances qui peuvent agir comme coactones chez beaucoup d'autres insectes, phytophages plus stricts.

CONCLUSIONS

Des larves de *Tenebrio molitor* ont été nourries pendant quatre semaines, de mélanges artificiels standards dans lesquels la source d'acides aminés était ou bien la caséine ou bien une quantité appropriée de poudre de feuilles de végétaux. Aucune de celles-ci ne vaut la caséine, mais on a obtenu des croissances très efficaces avec les feuilles d'ortie et efficaces avec des herbes de prairies, des mercuriales, et même avec une mousse forestière.

Par contre, la luzule, la fétuque et les feuilles de huit essences forestières se sont révélées mauvaises ou très mauvaises sources d'acides aminés. Ce résultat ne semble pas dû à l'âge des feuilles, ni à la dimension des particules qu'on peut en obtenir, ni à la présence de minéraux gênants. Il n'est pas dû

non plus, essentiellement à de simples carences bien caractérisées en acides aminés essentiels ordinaires. On s'est demandé s'il faut mettre en cause l'intervention de substances dépressives. Mais on croirait plus volontiers qu'il s'agit d'un manque de disponibilité des protides foliaires emprisonnés dans la microstructure végétale.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARAI N. et ITO T., *J. Sericult. Sci. Japan*, 1964, **33**, 107. — 2. CHANG J. L. et WANG M. Y., *Nature*, 1958, **181**, 561. — 3. FLORKIN M., *Bull. Classe Sci. Acad. R. Belg.*, 1965, **51**, 239. — 4. FRAENKEL G., *Trans. Ninth Intern. Congr. Ent.*, 1953, **2**, 90. — 5. FRAENKEL G., in L. LEVENBOOK, *Biochemistry of Insects*, 1959, London, Pergamon Press. — 6. GORDON W. G., SEMMET W. F., CABLE R. S. et MORRIS M., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 3293. — 7. HAMAMURA Y. HAYASHIYA K., NAITO K. I., MATSUURA K. et NISHIDA J., *Nature*, 1962, **194**, 754. — 8. HOUSE H. L., *Ann. Rev. Ent.*, 1961, **6**, 13. — 9. IRMITTER Th. F., *Nutrition Reviews*, 1964, **22**, 33. — 10. ITO T. et ARAI N., *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1966, **40**, 110.
11. ITO T. et ARAI N., *J. Insect. Physiol.*, 1966, **12**, 861. — 12. LECLERCQ J. et DE BAST D., *Ann. Nutr. Alim.*, 1965, **19**, 19. — 13. LECLERCQ J., *Ann. Nutr. Alim.*, 1965, **19**, 47. — 14. LECLERCQ J. et LOPEZ-FRANCOS L., *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, 1964, **72**, 276. — 15. LECLERCQ J. et LOPEZ-FRANCOS L., *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, 1966, **74**, 397. — 16. LECLERCQ J. et LOPEZ-FRANCOS L., *Arch. Internat. Physiol. Bioch.*, 1967, **75**, 89. — 17. PIRIE N. W., *The British Vegetarian*, 1959, **1**. — 18. PIRIE N. W., *Science*, 1966, **152**, 1701. — 19. PIRIE N. W., *Sci. Progr. Oxf.*, 1966, **54**, 401. — 20. WATANABÉ T., *Nature*, 1958, **182**, 325.