

Reçu le 17 avril 1966.

NUTRITION PROTIDIQUE CHEZ *TENEBRIO MOLITOR* L.VII. — NOUVEAUX ESSAIS DE REMPLACEMENT
DE LA CASÉINE
PAR DES PRÉPARATIONS D'ACIDES AMINÉS

PAR

Jean LECLERCQ et Luis LOPEZ-FRANCOS
(Zoologie générale, Faculté des Sciences Agronomiques,
Gembloux)

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 », « Berichte », « Ergebnisse », « Analyses », « Abstracts » ou « Referate ».

Titre et rédaction. — Les auteurs choisiront un titre qui donne une idée précise du contenu de leur travail et condenseront leur rédaction de manière à ne dépasser qu'exceptionnellement l'étendue d'une feuille d'impression (16 pages).

Manuscrits dactylographiés. — Nous invitons les auteurs à fournir des manuscrits dactylographiés sous forme *ne varietur*, et dont la rédaction soit *entièrement terminée* (afin d'éviter sur les épreuves les remaniements et les corrections, très onéreux, qui sont à la charge des auteurs).

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

Citations. — Les citations seront réunies à la fin de l'article sous la rubrique « Bibliographie » (Pour les mémoires en langue anglaise, le titre sera « References »). Elles seront classées par ordre alphabétique des noms d'auteurs.

Chaque citation comprendra :

1° Nom et prénom (ou initiales des prénoms) de l'auteur en **PETITES CAPITALES** (souligner deux fois dans le manuscrit); 2° année de publication, entre parenthèses; 3° titre abrégé du recueil, *en italique* (souligner une fois dans le manuscrit); 4° tome, en chiffres arabes, caractères gras (souligner d'un trait ondulé); 5° première et dernière pages du mémoire en chiffres arabes ordinaires.

Les indications Vol., T., Bd., pag. sont supprimées.

Exemples :

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

RITCHIE, J. M. (1954). — *J. of Physiol.*, 124, 605-612.

Pour les livres cités dans la Bibliographie, on indiquera :

1° nom et initiales des prénoms de l'AUTEUR; 2° (date de publication); 3° titre de l'ouvrage; 4° nom de l'éditeur; 5° 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. Si plusieurs travaux du même auteur, publiés la même année, sont cités, l'indication chronologique est donnée par les lettres *a*, *b*, *c* (en italique, souligner une fois), placées après l'indication de l'année.

Exemple :

BREMER, F. (1947, *a*).

BOEMER, F. (1947, *b*).

Figures. — Leur nombre doit être limité au minimum strictement indispensable à l'intelligence du texte.

Les *dessins* seront exécutés à l'encre de Chine sur carton bristol blanc, et uniquement en traits, hachures et points, sans « gris » ni « dégradés ».

Les *graphiques originaux* doivent être tracés en lignes bien blanches sur fond uniformément noir.

Pour les *courbes sur papier quadrillé*, employer du papier millimétré *noir* ou *rouge* si le quadrillé doit apparaître sur la figure définitive; du papier millimétré *bleu*, si le quadrillé doit disparaître.

Ce n'est qu'à titre exceptionnel que les « Archives » peuvent accepter de publier des *photographies* ou des tracés destinés à être reproduits en *similigravure* sur cuivre; dans ce cas une entente préalable avec la Direction scientifique est nécessaire.

Les *dimensions* de toutes les figures seront réduites au minimum. La dimension des clichés sera telle que toutes les figures puissent être intercalées dans le texte.

Il est d'ailleurs conseillé de fournir des figures originales très grandes, destinées à être réduites aux 2/3, à la 1/2, au 1/4, etc. (La réduction ainsi indiquée porte sur les dimensions linéaires). Tenir compte de la réduction prévue dans les dimensions à donner aux chiffres, lettres et signes conventionnels incorporés dans les dessins et graphiques.

Prière de réduire dans la même proportion toutes les figures d'un même mémoire.

Les *légendes* des figures doivent être fournies dactylographiées, sur feuillets séparés, et non incorporées dans le manuscrit.

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.

Nous avons montré précédemment que les larves de *Tenebrio molitor* ne croissent pas normalement si, dans leur régime alimentaire, on remplace la caséine purifiée par un mélange artificiel d'acides aminés composé en s'inspirant de la composition de la caséine (LECLERCQ et LOPEZ-FRANCOS, 1964). Nous avons repris la question en formulant diverses hypothèses fondées sur des considérations d'ordre pratique ou d'ordre théorique.

Dispositions expérimentales

Elles sont les mêmes que précédemment : 27°C, 65 % d'humidité relative, larves de race F, soumises à un jeûne de 3 jours avant d'être mises en présence des rations expérimentales, 10 g de ration pour 10 larves, même composition du régime de base sans protides, etc. Pour chaque essai : 20 larves de $a' = \pm 26$ mg; pesée après une semaine de régime (phase de réalimentation : *a*) puis après la quatrième semaine : *b*) Résultats exprimés selon deux critères : poids frais gagné après quatre semaines d'alimentation soit $c = \frac{b - a'}{a'} 100$, et poids frais gagné ou perdu après la semaine de réalimentation, c'est-à-dire en trois semaines, soit $c' = \frac{b - a}{a} 100$.

Sauf avis contraire, l'ingrédient protidique est encore la caséine Roche sans vitamines (HOFFMANN-LAROCHE, Bâle) ou un mélange de 18 acides aminés désigné par l'abréviation C₁, semblable à quelques détails près à celui que nous avions trouvé relativement meilleur dans nos essais rapportés en 1964, et composé en s'inspirant de la composition de la caséine en acides aminés naturels selon GORDON *et al.* (1949). Voici la composition de ce mélange dans la condition standard où 3.25 g entrent dans la préparation de 100 g de ration expérimentale : *L-alanine* 0.07, *L-arginine* 0.095, *acide aspartique* 0.17, *L-cystine*

0.01, acide *L*-glutamique 0.54, glycine 0.065, *L*-histidine 0.075, *DL*-isoleucine 0.29, *L*-leucine 0.215, *L*-lysine-HCl 0.19, *DL*-méthionine 0.145, *DL*-phénylalanine 0.24, *L*-proline 0.24, *DL*-sérine 0.265, *DL*-thréonine 0.24, *DL*-tryptophane 0.085, *L*-tyrosine 0.145 et *DL*-valine 0.17.

Le problème posé dans un tableau de référence

Le principal de ce que nous savons déjà du comportement des larves de *Tenebrio molitor* en fonction de la source de protides de leur alimentation s'est trouvé pleinement confirmé à l'occasion de nouveaux essais dont les résultats sont réunis dans le tableau I.

TABLEAU I. — Modifications du poids chez des larves de *Tenebrio molitor* de race F, recevant une alimentation artificielle diversement constituée pour son apport de protides
Poids moyen des larves au départ : $a' = \pm 27$ mg

Source d'acides aminés	Nombre de larves	Poids gagné ou perdu (—) après quatre semaines de régime	
		<i>c</i> : pendant les quatre semaines	<i>c'</i> : sans compter la récupération de la première semaine
Nulla	100	26.5 %	— 2.1 %
$C_1 = 18$ acides aminés, 0.25 %	20	29.0	0.3
Idem, 0.50 %	20	32.2	— 1.6
Idem, 1 %	20	44.5	4.3
Idem, 2 %	20	54.7	16.6
Idem, 3 ou 3.25 %	160	63.1	14.3
Idem, 4 %	20	61.9	14.1
Idem, 5 %	20	65.6	14.6
Idem, 6.5 %	20	66.3	14.9
Caséine Roche, 0.25 %	20	51.5	17.2
Idem, 0.50 %	40	102.2	34.4
Idem, 1 %	60	158.7	72.2
Idem, 3 %	80	248.3	135.7
Idem, 5 %	20	255.6	123.7
Idem, 6.5 %	20	254.0	117.8

Notre objet est clair : il faut chercher une explication à l'insuffisance du mélange C_1 qui, après la première semaine de réalimentation permet un taux de croissance (*c'*) presque dix fois inférieur à celui que supporte la caséine pure administrée à la même dose. Il faut s'efforcer de trouver les conditions qui permettraient de réduire cet écart considérable.

On remarquera qu'il existe une bonne corrélation entre les deux critères *c* et *c'* utilisables pour comparer la valeur des rations expérimentales. Toutefois, le critère *c'* s'avère incontestablement plus significatif car il exprime des taux de croissance plus largement indépendants des réserves protidiques internes dont les larves ont pu tirer parti pendant la première semaine des expériences, laquelle constitue une phase de réalimentation de sujets affamés. Par ailleurs, il est superflu d'alourdir notre exposé en rapportant dans tous les cas, les valeurs du poids initial *a'*, du poids après une semaine *a*, après quatre semaines *b* et des taux de croissance *c* et *c'*. Nous nous contenterons donc, désormais d'indiquer les valeurs de *c'*.

Rappelons enfin que nos expériences sont toujours arrêtées après un mois, pour maintes raisons d'ordre pratique très compréhensibles. Qu'arriverait-il si on les prolongeait au prix d'un renouvellement des rations ? Nous en savons assez pour affirmer que toutes les croissances caractérisées par des valeurs de *c'* inférieures à 30 % se trouveraient bloquées tôt ou tard et n'aboutiraient pas à la transformation des larves du type choisi (race F, $a' = \pm 26$ mg) en nymphes. Nous ne pourrions donc pas tenir pour réellement efficace une amélioration du régime qui permettrait seulement de doubler la valeur de *c'* obtenue avec 3 % du mélange d'acides aminés C' (14.3 %). Un régime ne devient définitivement meilleur que s'il assure des taux de croissance comparables à ce qu'on obtiendrait avec au moins 0.5 % de caséine ROCHE ($c' = 34,4$ %).

Importance de la présentation physique des ingrédients protidiques

Notre attention a été attirée sur cet aspect à la suite de résultats inattendus obtenus au cours d'essais de remplacement de la caséine ROCHE par d'autres préparations de caséines. Avec la caséine « vitamin free » fournie par les MANN Research Laboratories Inc., New York, on obtient des taux de croissance sensiblement inférieurs à ceux permis par la caséine ROCHE, soit $c' = 116$ (moyenne pour 60 larves), mais néanmoins excellents. Par contre, avec une caséine pure selon HAMMARSTEN, fournie par la firme E. MERCK Ag., on n'obtient que $c' = 64$ (moyenne pour 80 larves), ce qui est manifestement peu pour une caséine.

Fallait-il mettre en cause une insuffisance dans la composition de la caséine Merck et reprendre un thème de recherches qu'on croyait épuisé depuis les travaux de FRAENKEL et LECLERCQ (1956) et de FRAENKEL (1958) ?

La caséine Roche se présente sous un aspect finement granulé. La caséine Merck est réduite en une poudre extrêmement fine. La caséine Mann a un aspect intermédiaire. C'est cela qui, principalement, explique les différences observées. On l'a démontré en réalisant une suspension de la caséine Merck dans l'eau et en la séchant de nouveau, lui assurant un aspect final comparable à celui de la caséine Roche. Voici le protocole des essais réalisés dans ce sens, avec des larves de poids initial moyen un peu supérieur à la norme du présent travail (a' de 29.0 à 29.6 mg) :

Caséine Merck telle quelle	$c' = 54$
Caséine Merck après suspension dans l'eau distillée puis séchage à 38° C	$c' = 116$
<i>Idem</i> , mais lyophilisation pour le séchage	$c' = 125$
Solution dans NaOH 1 N et précipitation au point iso-électrique	$c' = 137$
Solution dans l'urée 6.6 M et précipitation par un excès d'eau	$c' = 129$

Par ailleurs, une opération inverse a été réalisée avec un échantillon de caséine Roche : on l'a broyé plus finement sans toutefois le réduire en une poussière aussi fine que la caséine Merck telle quelle. Cela n'a aucunement affecté la valeur du produit. La granulométrie un peu grossière de la caséine Roche telle quelle n'est donc pas une condition absolument intangible tandis que l'état pulvérulent caractéristique de la caséine Merck du commerce est à proscrire. On ne sait pas de quelle manière ces particularités affectent le comportement alimentaire des larves, problème qui mériterait d'être étudié en soi. Mais on a appris empiriquement qu'il faut surveiller l'aspect purement granulométrique des ingrédients protidiques ajoutés aux rations de base des sujets d'expériences. On l'a fait autant que possible en préparant les mélanges dont il va être question. Mais la solution pratique de ce problème est souvent difficile et nous ne pouvons pas exclure définitivement l'hypothèse que l'insuffisance des mélanges d'acides aminés et d'autres préparations de protides s'explique partiellement par un défaut de granulométrie.

Les mélanges d'acides aminés seraient-ils toxiques *per se* ?

On s'est déjà demandé si les mélanges artificiels d'acides aminés ne contiennent pas un acide aminé dispensable doué de toxicité. Nous avons rejeté cette hypothèse à peu près définitivement, après une série d'essais du type « 18 acides aminés moins un » (1964, p. 291).

Il nous paraît maintenant qu'il faut écarter aussi l'hypothèse plus générale d'une toxicité particulière des mélanges d'acides aminés, imputable à la présence de radicaux qui deviendraient nocifs lorsque les liaisons caractéristiques des protéines sont rompues. En effet, une toxicité *per se* des mélanges devrait se marquer d'autant plus intensément qu'on augmente la dose administrée. Or, le Tableau I le prouve, c'est une amélioration nette du taux de croissance que l'on observe quand on administre des doses croissantes de mélange C_1 entre 0.25 et 2 %, tandis que la croissance reste bloquée mais ne se trouve absolument pas déprimée quand on élève la dose jusqu'à 6.5 %. Nous n'avons pas non plus enregistré de toxicité croissante en administrant de 0.025 à 0.25 % d'un mélange de cinq acides aminés dont quatre étaient de la forme racémique DL (phénylalanine, thréonine, tryptophane, valine, le cinquième sous forme L étant la leucine), cela ni en ajoutant ces quantités à une ration de base sans protides, ni en les ajoutant à des rations contenant diverses doses utiles de caséine.

Écartons aussi l'hypothèse que les mélanges d'acides aminés deviendraient progressivement toxiques ou inactifs. Dans les conditions où nous avons opéré (65 % d'humidité relative), une réaction de MAILLARD ne se produit pas ou guère. Mais surtout, de nouveaux essais consistant à remplacer le glucose par de l'amidon avec ou sans cellulose, ou bien à renouveler la ration toutes les semaines, n'ont jamais conduit à une amélioration très significative du taux de croissance.

Hypothèse d'un encombrement du métabolisme protidique ?

On s'est demandé précédemment (1964, p. 289) si les mélanges d'acides aminés ne provoquent pas un encombrement de métabolites azotés en procurant ceux-ci tous ensemble, de façon

trop immédiate au niveau de la paroi absorbante des tubes digestifs. On peut imaginer qu'un tel inconvénient est évité lorsque la source d'acides aminés est une protéine qui doit être hydrolysée progressivement *in vivo*, avant de procurer les différents matériaux de la protéosynthèse.

Si cette hypothèse était plausible, on devrait avoir intérêt à réduire la dose de mélange C₁ incorporée dans les rations expérimentales, mais nous savons déjà (tableau I) qu'il n'en est rien. Ou bien on devrait obtenir une certaine amélioration du taux de croissance en prévoyant en cours d'expérience, des périodes de jeûne intermittent, au cours desquelles l'encombrement que nous avons imaginé serait résorbé. Qu'en est-il ?

Deux séries d'expériences ont été réalisées, la première impliquant la mise au jeûne total des sujets plusieurs jours par semaine, la seconde impliquant leur mise au jeûne protidique, c'est-à-dire leur passage alternatif d'une ration comportant 3 % de mélange C₁ à une ration dépourvue de mélange C₁. Voici les valeurs de *c'* obtenues dans ces conditions avec des larves pesant initialement ±25 mg :

Ration à 3 % de mélange C ₁ mais	
2 jours de jeûne total chaque semaine	<i>c'</i> = 13
3 jours de jeûne total chaque semaine	<i>c'</i> = 13
4 jours de jeûne total chaque semaine	<i>c'</i> = 16
7 jours d'alimentation et 7 jours de jeûne	<i>c'</i> = -2.6
2 jours de jeûne protidique chaque semaine	<i>c'</i> = 13
3 jours de jeûne protidique chaque semaine	<i>c'</i> = 4.8
4 jours de jeûne protidique chaque semaine	<i>c'</i> = 5.6
7 jours avec C ₁ alternant avec 7 jours de jeûne protidique	<i>c'</i> = 11.7

On le voit, le taux de croissance n'est pas amélioré par rapport aux 14.3 % donnés comme moyenne normale dans le tableau I. On ne peut donc pas retenir l'hypothèse pure et simple d'un encombrement du métabolisme azoté. Notons au passage certaines divergences entre le comportement des larves dans les deux séries d'expériences. Cela et d'autres faits notés pendant la conduite des essais nous font supposer que dans certaines conditions, les larves s'adaptent au jeûne périodique et réagissent particulièrement à chaque occasion de réplétion. La question mériterait de faire l'objet d'une investigation approfondie.

Hypothèse d'un besoin accru en vitamines ou en autres facteurs auxiliaires ?

Nous savons déjà qu'il est vain d'ajouter à un mélange d'acides aminés, des cendres de caséine ou un phosphate (1964, p. 289). Mais on s'est demandé si les rations à base de mélange C₁ n'exigent pas le complément d'une ou de plusieurs vitamines intervenant spécialement dans le métabolisme protidique, par exemple de la cobalamine (vitamine B₁₂) dont les larves de *Tenebrio* se passent apparemment fort bien quand elles disposent de caséine, ou de quantités accrues de pyridoxine ou d'acide folique (cf. HARPER *et al.*, 1955; HARPER, 1958), ou d'un complexe vitaminique et minéral plus riche que celui qui est prévu dans la ration de base.

Voici les résultats de 19 essais tentés pour voir ce qu'il en est. Dans chaque cas, la ration apportait 3 % de mélange C₁, ce qui permit un taux de croissance *c'* = 11.7 % des 20 larves témoin concomitant (soit un peu moins que la moyenne générale de 14.3 % indiquée dans le Tableau I, mais dans les limites de la variabilité normale).

+ 1.5 µg/g cobalamine	<i>c'</i> = 15.8
3.0 µg/g cobalamine	<i>c'</i> = 11.7
4.5 µg/g cobalamine	12.4
7.5 µg/g cobalamine	13.3
15.0 µg/g cobalamine	16.4
+ 12.5 µg/g pyridoxine	<i>c'</i> = 13.0
25 µg/g pyridoxine	13.0
50 µg/g pyridoxine	11.1
100 µg/g pyridoxine	10.6
+ 2.5 µg/g acide folique	<i>c'</i> = 12.7
5 µg/g acide folique	7.4
10 µg/g acide folique	8.7
20 µg/g acide folique	5.8
+ 4.5 µg/g cobalamine et 25 µg/g pyridoxine	<i>c'</i> = 14.3
4.5 µg/g cobalamine et 5 µg/g acide folique	10.7
4.5 µg/g cobalamine, 25 µg/g pyridoxine et 5 µg/g acide folique	10.9
Quantités de vitamines du régime de base normal doublées	<i>c'</i> = 11.5
+ « Supradyn » (Hoffmann-Laroche), préparation pharmacologique associant à fortes doses 11 vitamines et 10 substances minérales du type oligoéléments, après mise en suspension et solution dans l'eau	<i>c'</i> = 13.0
<i>Idem</i> , après mise en solution dans l'alcool absolu ...	18.2

Dans aucun cas, on n'a significativement amélioré le taux de croissance. Par contre, on a mis en évidence un phénomène d'hypervitaminose qui apparaît dans le cas particulier de l'acide folique, lorsque les doses de cette vitamine dépassent le double de la quantité normalement prévue (2.5 $\mu\text{g/g}$) dans le régime de base.

Les mélanges d'acides aminés seraient-ils trop acides ?

Les régimes expérimentaux auxquels les larves sont soumises comportent une proportion de substances neutres et de tampons telle qu'on ne s'est guère interrogé jusqu'ici sur l'éventualité d'une modification nocive de l'équilibre acides-bases dans les processus de la digestion. Ce genre d'inconvénient n'est évidemment pas à redouter dans les expériences plus classiques réalisées avec le rat dont l'estomac a un contenu beaucoup plus acide que tout aliment protidique même enrichi en radicaux carboxyles libres. Mais en va-t-il de même chez un animal dépourvu d'estomac et dont le tube digestif a un pH qui de 4.4 dans la bouche passe progressivement à 8.2 ? N'est-il pas dommageable que notre mélange C_1 apporte notamment sa lysine avec de l'acide chlorhydrique ?

A tout hasard, nous avons mis en train deux essais dans lesquels l'acide apporté avec la lysine se trouve largement neutralisé par une addition de bicarbonate de sodium. On a obtenu :

$C_1 + 0.075\% \text{ NaHCO}_3$	$c' = 28.0\%$
$C_1 + 0.01\% \text{ NaHCO}_3$	$c' = 30.3\%$

Voilà enfin un résultat intéressant. Les taux de croissance ont été améliorés considérablement, nettement doublés par rapport à la moyenne générale. Mais ils restent en deça du seuil d'une croissance capable de conduire les larves à la nymphose.

Malheureusement, ces résultats ont été connus trop tard pour réviser le programme des expériences qui seront présentées plus loin et qui, sans doute, auraient donné des résultats un peu meilleurs si nous avions pu décider d'ajouter un peu de bicarbonate de sodium à tous les mélanges. Par ailleurs, il faut observer que pour éviter de s'engager dans une recherche purement empirique, la question désormais posée devrait être reprise en

étudiant comparativement l'effet des ions apportés par les rations expérimentales sur le pH du tube digestif.

Trois acides aminés critiques ?

Rien ne prouve que le mélange C_1 pourtant meilleur que d'autres essayés auparavant, apporte chaque acide aminé essentiel en quantités optimales. Mais il faut bien se montrer économe car on ne peut consentir à tester toutes les variantes qu'on pourrait imaginer. Nous avons retenu trois acides aminés : la cystine, le tryptophane et la valine, comme méritant d'être rendus un peu plus abondants, parce qu'ils sont représentés par des quantités relativement faibles dans la caséine et dans le mélange C_1 et sont des acides aminés particulièrement critiques chez divers animaux. On a obtenu :

3.25 % mélange $C_1 + 0.15\%$ L-cystine	$c' = 21.1$
3.25 % mélange $C_1 + 0.30\%$ L-cystine	16.1
3.25 % mélange $C_1 + 0.15\%$ L-cystine + 0.15 % L-cystéine	24.8
3.25 % mélange $C_1 + 0.15\%$ L-cystéine	22.4
3.25 % mélange $C_1 + 0.085\%$ DL-tryptophane	18.1
3.25 % mélange $C_1 + 0.170\%$ DL-tryptophane	28.9
3.25 % mélange $C_1 + 0.170\%$ DL-valine	26.3
3.25 % mélange $C_1 + 0.340\%$ DL-valine	20.5

Nous pouvons conclure qu'il serait bénéfique de majorer quelque peu les teneurs en tryptophane et en valine du mélange C_1 et d'y ajouter de la cystéine.

Tentatives d'amélioration du mélange C_1 par addition ou l'incorporation de dipeptides et de tripeptides

Comme WOOLEY (1945, 1946) devant l'insuffisance des mélanges d'acides aminés dans l'alimentation du rat, nous n'avons pas résisté à la tentation de supposer que notre matériel a besoin de liaisons peptidiques toutes faites, cela même si l'hypothèse a été abandonnée par les spécialistes de la nutrition des Vertébrés. Cela nous a conduits à essayer de valoriser le mélange C_1 d'une part en l'additionnant de certains peptides de synthèse disponibles dans le commerce (Mann Research Laboratories Inc., New York), d'autre part en incorporant les mêmes peptides dans le mélange C_1 , en remplacement des quantités d'acides aminés libres correspondantes.

On a obtenu au terme d'une série d'essais concomitants parmi lesquels le témoin recevant 3.25 % C₁ normal a présenté $c' = 16$:

+ 0.25 % DL-alanyl-glycyl-glycine	$c' = 14.5$ %
+ 0.50 % DL-alanyl-glycyl-glycine	13.3 %
0.25 % glutathion (γ -glutamyl-cystéinyl-glycine)	18.0
0.25 % DL-alanyl-glycyl-glycine + 0.25 % glutathion	11.6
0.075 % histidyl-histidine + 0.125 % DL-leucyl-glycyl-glycine + 0.05 % L-leucyl-L-phénylalanine	19.8
0.125 % DL-alanyl-glycyl-glycine + 0.125 % glutathion + 0.075 % histidyl-histidine + 0.125 % DL-leucyl-glycyl-glycine + 0.05 % L-leucyl-L-phénylalanine	12.4
C ₁ modifié par substitution avec incorporation de 0.1 %/ration DL-alanyl-glycyl-glycine	14.6
C ₁ modifié par substitution avec incorporation de 0.27 % glutathion	16.6
C ₁ modifié par substitution avec incorporation de 0.075 % histidyl-histidine, 0.12 % DL-leucyl-glycyl-glycine et 0.0175 % L-leucyl-L-phénylalanine	18.9
C ₁ modifié par substitution avec incorporation des 5 peptides précités, dans les proportions respectives indiquées	22.7

On s'est vraiment donné beaucoup de peine pour des résultats systématiquement négatifs. On n'ose même pas attribuer une signification objective au dernier taux de croissance obtenu après incorporation de cinq peptides dans le mélange de référence.

Certes, il reste possible que les larves de *Tenebrio* réclament des molécules de peptides plus originales, peut-être plus longues. Mais il semble peu rationnel d'en essayer d'autres, forcément très coûteuses, au hasard.

Efficacité d'une protéine pauvre : la gélatine

La gélatine est une protéine carencée au point qu'on tient sa valeur nutritive pour nulle (BENDER *et al.*, 1953). Toutefois BENTON *et al.* (1955) ont découvert qu'elle peut agir auxiliairement comme stimulant de la croissance des poussins, ce qui a conduit à essayer, en vain semble-t-il, d'isoler un activateur inconnu à partir d'elle (BENTON *et al.*, 1957; STUCKI, 1959).

Il est possible qu'elle intervienne en assurant un équilibre plus favorable de l'azote total des acides aminés essentiels par rapport à l'azote total des acides aminés dispensables (STUCKI et HARPER, 1961).

Que se produirait-il si nous ajoutions de la gélatine aux rations des larves de *Tenebrio* ?

La réponse est donnée dans le tableau II. Nous avons fait usage d'une part d'une préparation commerciale de gélatine que nous désignons : gélatine M et d'une préparation purifiée que nous désignons en rappelant sa provenance : gélatine Difco. La composition de cette dernière nous est connue, c'est, pour 100 g :

Alanine 8.6, arginine 8.3, acide aspartique 6.4, cystine 0.09, acide glutamique 11.5, glycine 25.7, histidine 0.85, isoleucine 1.5, leucine 3.1, lysine 5.2, méthionine, 0.92, phénylalanine 2.3, proline 16.3, sérine 3.2, thréonine 3.2, tryptophane 0, tyrosine 0.91, valine 2.8.

TABLEAU II. — Modifications du poids chez des larves de *Tenebrio molitor* de race F, recevant une alimentation artificielle comportant de la gélatine 20 larves dans chaque condition, $a' = \pm 26$ mg

Sources d'acides aminés		Taux de croissance
Mélange C ₁ %	Gélatine %	c'
2	0.25 DIFCO	21.1
2	0.50 DIFCO	32.2
2	0.75 DIFCO	28.9
2	1 DIFCO	22.1
3	0.25 DIFCO	26.2
3	0.50 DIFCO	30.0
3	0.50 M	40.7
3.25	0.50 M	30.2
3.25	0.50 M	33.3
3.25	0.50 DIFCO	32.7
3.25	0.50 DIFCO	34.1
3.25	0.50 DIFCO	36.1
3.25	0.50 DIFCO	36.1
3.25	0.50 DIFCO	38.3
3.25	0.50 DIFCO	39.1
3.25	0.50 DIFCO	43.7
3	0.75 DIFCO	37.5
3	1 DIFCO	31.5
3	1 M	16.0
3	3 M	12.1
3	6.50 M	26.1
4	0.25 DIFCO	31.8
4	0.50 DIFCO	37.7
4	0.75 DIFCO	36.4
4	1 DIFCO	36.4

Moyenne générale pour 10 essais soit pour 200 larves : 35.1

Les résultats sont concluants : la gélatine, peu importe laquelle, a un effet activateur et permet d'atteindre le seuil des croissances qui ont chance d'aboutir, au moins lorsqu'on l'ajoute à des taux de 0.50 à 0.75 % de la ration, au mélange C₁ administré au taux convenable de 3 %. Nous avons retrouvé le phénomène observé précédemment chez les poussins, mais nous avons surtout la possibilité d'instituer de nouvelles expériences avec l'espoir de réduire l'écart qui subsiste entre le seuil des croissances bien engagées et les croissances permises par la caséine.

Peut-on remplacer la gélatine par un mélange comparable d'acides aminés ?

La réponse est non. Les mélanges que nous avons préparés en nous inspirant fidèlement de la composition centésimale de la gélatine ont assuré des taux de croissance du type $c' = 10.6$ minimum ou 18.1 maximum ou une valeur intermédiaire. C'est en vain que nous avons voulu y augmenter la teneur en glycine, ou essayer un mélange mixte, rappelant à la fois la composition de la caséine et celle de la gélatine. Ce dernier s'est lui aussi prêté à une parfaite confirmation du pouvoir activateur de la gélatine intacte ajoutée à raison de 0.5 %.

Peut-on remplacer le mélange C₁ par la gélatine améliorée par l'addition d'acides aminés essentiels ?

Il n'était pas nécessaire de surcharger le tableau II en y apportant la démonstration que nous avons cependant faite, que la gélatine seule est une source d'acides aminés bien plus mauvaise que le mélange C₁. Mais on pourrait peut-être avec fruit, orienter les recherches dans un sens nouveau, en prenant la gélatine comme protide à améliorer par l'addition des acides aminés que nous savons être responsables de son insuffisance chez tous les animaux étudiés. Cela valait la peine d'être considéré, car la simple addition de 0.1 % DL-tryptophane suffit déjà à porter c' de 2.3 (pour 3 % de gélatine seule) à 16.5 %, valeur qui serait aussi normale pour le mélange C₁ seul. Mais on n'obtient pas mieux (17.3) en ajoutant outre le tryptophane, de la méthionine et de l'histidine.

Procédons maintenant à l'addition des 8 ou 9 acides aminés essentiels que la gélatine apporte insuffisamment ou pas du tout. C'est l'occasion de mettre en évidence, par un biais nouveau, le caractère essentiel d'au moins certains d'entre eux pour les larves de *Tenebrio*. On a donc composé un mélange G avec les proportions L-histidine 0.07, DL-isoleucine 0.27, L-leucine 0.19, L-lysine HCl 0.15, DL-méthionine 0.12, DL-phénylalanine 0.14, DL-thréonine 0.12, DL-tryptophane 0.1, DL-valine 0.09, soit 1.25 au total, et aussi 9 autres mélanges dans lesquels, tour à tour, chaque acide aminé mentionné a été omis. Dans chaque condition, on a prévu 2 % de gélatine et 1.25 % du mélange G intégral ou du type 9-1. On a obtenu :

avec G intégral	$c' = 21.4$
avec G sans tryptophane	— 1.2
avec G sans phénylalanine	3.1
avec G sans histidine	14.9
avec G sans leucine	16.6
avec G sans thréonine	19.4
avec G sans méthionine	20.5
avec G sans valine	24.3
avec G sans lysine	26.6
avec G sans isoleucine	27.0

Le caractère essentiel et particulièrement critique du tryptophane et de la phénylalanine est très clairement confirmé. Pour les autres acides aminés, c'est moins net, sans doute parce que la gélatine en procure déjà assez. On peut même admettre qu'elle fournit trop de lysine et d'isoleucine, au point qu'il est bénéfique de ne pas en ajouter. Mais dans les meilleures conditions, avec le mélange G intégral ou privé des deux dernières molécules, la croissance reste bloquée en deçà du seuil de 30 %, on n'a pas plus d'espoir qu'avec le mélange C₁ additionné de bicarbonate de sodium, de cystéine, de tryptophane ou de valine.

Autre tentative pour dépister les acides aminés les plus critiques

Sachant que nous pouvons obtenir des taux de croissance sensiblement meilleurs avec le mélange C₁ additionné de gélatine, nous avons mis en route une autre série d'essais dans lesquels le

mélange C₁ est privé de l'un des 18 acides aminés qui entrent normalement dans sa composition. On a obtenu ceci :

3.25 % C ₁ + 0.5 % gélatine	c' = 35.1 (rappel tableau II)
Idem sans tryptophane	11.2
Idem sans histidine	20.0
Idem sans thréonine	21.6
Idem sans valine	22.0
Idem sans phénylalanine	22.4
Idem sans leucine	24.1
Idem sans méthionine	29.0
Idem sans tyrosine	29.3
Idem sans isoleucine	30.3
Idem sans glycine	30.7
Idem sans arginine	33.0
Idem sans aspartique	33.6
Idem sans cystine	33.7
Idem sans acide glutamique	35.4
Idem sans proline	35.5
Idem sans alanine	36.2
Idem sans lysine	38.4
Idem sans sérine	44.8

Les 6 premiers acides aminés mentionnés sont incontestablement de première importance pour conférer au mélange C₁ la valeur qu'il a dans les conditions envisagées. La situation des autres est moins nette, à cause de l'apport de la gélatine. La lysine, ici encore, et surtout la sérine peuvent être omises avec un bénéfice certain.

Ces classements des acides aminés selon leur caractère critique pourraient être comparés à ceux qui ont été obtenus dans d'autres conditions et avec d'autres critères (LECLERCQ et HUOT, 1958, p. 473; LECLERCQ et LOPEZ-FRANCOS, 1964, p. 291). Toutefois, il ne faut pas méconnaître qu'il s'agit d'observations faites sur des sujets mis dans l'impossibilité d'effectuer leurs protéosynthèses d'une manière normale. Leur intérêt se limite à démontrer que chez les larves de *Tenebrio*, l'anabolisme protidique n'obéit pas à une loi de tout ou rien absolument stricte, du moins si on examine le problème au niveau des fournitures exigées par l'animal entier. Selon ce qui est disponible, selon l'état physiologique des sujets, tel acide aminé se révèle critiqueusement essentiel, ou moins gravement nécessaire, ou inutile, ou même toxique (lysine et sérine ci-dessus). Il peut même arriver qu'un acide aminé très probablement dispensable s'avère utile (cas de l'acide aspartique et de

la sérine, dans LECLERCQ et LOPEZ-FRANCOS, 1964, p. 291). Mais en faisant la synthèse de tout ce qui a été observé à ce jour, dans les travaux antérieurs et dans celui-ci, on arrive à la conclusion qu'en dépit des discordances et des curiosités métaboliques, les larves de *Tenebrio* ont besoin de chacun des 10 acides aminés essentiels reconnus comme tels pour le rat et le chien par ROSE (1938), pour le poussin par ALMQUIST (1947) et pour plusieurs Insectes. C'est le tryptophane qui apparaît le plus critique de tous, trois autres s'avèrent aussi particulièrement critiques : phénylalanine, thréonine et valine.

Toxicité ou effet encombrant des acides aminés de la série D- et modifications du mélange C₁

L'insuffisance des mélanges artificiels d'acides aminés pour le rat et autres Vertébrés a été attribuée au moins partiellement au fait que ces mélanges comportent, pour de simples raisons d'ordre pratique, des isomères D- qui peuvent être encombrants, sinon toxiques (VAN PILSUM et BERG 1950; PHILLIPS et BERG, 1954; WACHTER et BERG, 1960; etc.). Nous avons négligé cette question jusqu'ici, aussi à cause du coût exorbitant de mélanges composés exclusivement d'isomères L-.

Nous avons d'abord attaqué le problème en substituant au mélange C₁ des hydrolysats enzymatiques de caséine : l'aminosol (VITRUM A. B., Stockholm; cf. WRETLIND, 1947) et la casamine E (Mann Research Laboratories Inc., New York). Outre que ces essais mettaient de nouveau en question l'hypothèse du rôle éventuel des peptides à faible poids moléculaire (24 % dans l'aminosol), ils exigeaient aussi des mesures spéciales pour supprimer l'hygroscopicité des milieux d'élevage et la réaction de MAILLARD qui s'y fait avec une intensité défavorable. Des résultats acceptables furent obtenus en remplaçant partiellement le glucose par de l'amidon et de la cellulose. On put ainsi atteindre :

3.25 % aminosol	c' = 28.3 et 28.7
3.25 % casamine E	24.3 et 51.4

C'est passablement mieux qu'avec un mélange C₁ mais, trois fois sur quatre, moins bon qu'avec un mélange C₁ additionné

de gélatine. Mais on arrive à des résultats spectaculaires si, de nouveau, on ajoute 0.5 % de gélatine à ces hydrolysats :

3.25 % aminosol + 0.5 % gélatine	$c' = 53.3$
3.25 % casamine E + 0.5 % gélatine	78.4 et 80.8

On peut donc inférer que les hydrolysats utilisés valent mieux qu'un mélange artificiel C_1 et que cela pourrait être imputable au moins partiellement à l'absence d'isomères D-, mais il leur manque de même quelque chose d'important qui est apporté par la gélatine.

Il était dès lors raisonnable de chercher une réponse plus décisive en composant des mélanges de type C_1 dans lesquels presque tous les acides aminés seraient de forme L-. On en a préparé cinq.

Le plus semblable à C_1 , appelons-le C_2 , comporte les 18 acides aminés dans les mêmes proportions que C_1 sauf que a) cinq acides aminés DL- sont remplacés par les isomères L- correspondants, b) les doses de ces acides aminés L- de substitution sont ramenées à la moitié des doses pour les DL- et, c) le même total de 3.25 g est assuré en majorant les doses de glycine et d'acide glutamique. Cela conduit au tableau suivant :

$C_2 = 18$ aminés, soit : alanine 0.07, arginine 0.095, acide aspartique 0.17, cystine 0.01, acide glutamique 0.765, glycine 0.365, histidine 0.075, isoleucine 0.145, leucine 0.215, lysine-HCl 0.19, proline 0.24, sérine 0.1325, thréonine 0.120, tryptophane 0.0425, tyrosine 0.145, valine 0.085, tous de forme L-, et DL-méthionine 0.145, DL-phénylalanine 0.24.

Avec 3.25 % de ce mélange C_2 et 0.5 % de gélatine, on a obtenu un taux de croissance $c' = 38.6$, ce qui reste dans l'ordre de grandeur de ce qui fut obtenu avec C_1 .

Les autres mélanges ont été composés en tenant compte de l'expérience acquise, c'est-à-dire en augmentant les doses de certains acides aminés essentiels critiques et en supprimant l'un ou l'autre des acides aminés dispensables. C'est dans ces conditions qu'on a vu apparaître le bénéfice de la suppression des isomères D-. Qu'on en juge :

3.25 % mélange C_3 composé comme C_2 mais avec dose double pour la thréonine et le tryptophane (compensé par l'abaissement de la dose d'acide glutamique à 0.6025) + 0.5 % gélatine	$c' = 45.7$
---	-------------

3.25 % mélange C_4 composé comme le précédent, mais avec suppression totale de la proline et de la tyrosine (compensée par élévation de la dose d'acide glutamique à 0.9875) + 0.5 % gélatine	$c' = 43.4$
3.25 % mélange C_5 composé comme C_5 mais avec dose double pour la valine et taux de glycine ramené à 0.065 (acide glutamique corrigé à 0.8175) + 0.5 % gélatine	$c' = 41.9$
3.25 % mélange C_6 composé comme C_6 mais avec dose double pour l'isoleucine, la leucine et la valine, suppression de l'alanine et de la sérine, augmentation de la phénylalanine (0.35), acide aspartique abaissé à 0.105 et acide glutamique ramené à 0.54	
+ 0.5 % gélatine	$c' = 51.3$
+ 1 % gélatine	$c' = 64.1$

Les derniers résultats sont les meilleurs, devenant proches de ceux qui ont été obtenus avec les hydrolysats enzymatiques de caséine additionnés de gélatine. Dans tous les cas, les taux de croissance sont améliorés très nettement par rapport à ce que le mélange C_1 permettait. Sans doute ne sommes-nous qu'en vue de la moitié du chemin que les mêmes larves peuvent faire avec un taux convenable de caséine. Mais on vient de constater que d'autres améliorations pourraient se produire, au prix de remaniements raisonnés de la composition des mélanges. Il semble légitime de penser qu'on irait plus loin encore en portant en compte des informations sur les phénomènes ioniques particuliers qui se produisent dans les bols alimentaires comportant des mélanges d'acides aminés.

Résumé

Un mélange d'acides aminés imitant la composition de la caséine s'est avéré près de 10 fois moins efficace que la caséine purifiée pour supporter la croissance des larves de *Tenebrio molitor* de race F au stade de ± 26 mg. On ne l'a pas amélioré en ajoutant des vitamines, des oligoéléments, des dipeptides ou des tripeptides. On n'a pu expliquer son insuffisance en postulant un encombrement du métabolisme azoté, ni en postulant une toxicité des acides aminés libres.

Les taux de croissance ne deviennent relativement favorables que si les mélanges d'acides aminés ou même les hydrolysats enzymatiques de caséine sont additionnés de gélatine, protéine

pourtant très carencée. On retrouve ainsi le phénomène bien connu chez le poussin et qui semble devoir s'expliquer selon STUCKI et HARPER (1961) en reconnaissant que la gélatine assure un meilleur équilibre des teneurs en acides aminés variés. D'ailleurs, on a amélioré encore, très nettement, les taux de croissance en rectifiant la composition du mélange de référence, c'est-à-dire en procédant simultanément au remplacement des formes DL- par des formes L-, à l'élévation des teneurs en certains acides aminés essentiels très critiques (tryptophane, thréonine, valine...), et en réduisant les teneurs de certains acides aminés dispensables. Le mélange empirique qui nous a donné les meilleurs résultats a été administré à raison de 3.25 g/100 g de ration avec 0.5 ou mieux, 1 g de gélatine, il contenait :

L-arginine 0.095, acide L-aspartique 0.105, L-cystine 0.01, acide L-glutamique 0.54, glycine 0.065, L-histidine 0.075, L-isoleucine 0.29, L-leucine 0.43, L-lysine HCl 0.19, DL-méthionine 0.145, DL-phénylalanine 0.35, L-proline 0.24, L-thréonine 0.24, L-tryptophane 0.085 L-tyrosine 0.145 et L-valine 0.17.

D'autres modifications de la composition des mélanges permettraient, on peut l'espérer, d'obtenir des taux de croissance encore améliorés. Mais pour se débarrasser de l'hypothèque constituée par le besoin paradoxal de gélatine et résoudre définitivement les problèmes posés, il faudra aussi se soucier de deux aspects d'ordre pratique reconnus dans le présent travail. Il faut surveiller la présentation physique des mélanges d'acides aminés : des ingrédients trop pulvérulents ne conviennent pas. Il faut neutraliser l'acidité qui peut se produire *in situ* dans les bols alimentaires et examiner de près ce qui se passe dans le tube digestif des larves.

BIBLIOGRAPHIE

- ALMQUIST, H. J. (1947). — *J. Nutrition*, **34**, 543.
 BENDER, A. E., MILLER, D. S. et TUNNAH, E. J. (1953). — *Chemistry and Industry*, **2**, 799.
 BENTON, D. A., SPIVEY, H. E., HARPER, A. E. et ELVEHJEM, C. A. (1955). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **57**, 262.
 BENTON, D. A., SPIVEY, H. E. et ELVEHJEM, C. A. (1957). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**, 491.
 FRAENKEL, G. et LECLERCQ, J. (1956). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **64**, 601.
 FRAENKEL, G. (1958). — *J. Nutrition*, **61**, 361.
 GORDON, W. G., SEMMETT, W. F., CABLE, R. S. et MORRIS, M. (1949). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**, 3293.

- HARPER, A. E., BENTON, D. A. et ELVEHJEM, C. A. (1955). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **57**, 1.
 HARPER, A. E. (1958). — *Ann. New York Acad. Sci.*, **69**, 1025.
 LECLERCQ, J. et HUOT, L. (1958). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **66**, 473.
 LECLERCQ, J. et LOPEZ-FRANCOS, L. (1964). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **72**, 276.
 PHILLIPS, W. A. et BERG, C. P. (1954). — *J. Nutrition*, **53**, 481.
 ROSE, W. C. (1938). — *Physiol. Rev.*, **18**, 109.
 STUCKI, W. P. (1959). — Studies on factors in gelatin affecting the growth of chicks on amino acids diets. *Thesis Univ. Wisconsin, Madison*.
 STUCKI, W. P. et HARPER, A. E. (1961). — *J. Nutrition*, **74**, 377.
 VAN PILSUM, J. F. et BERG, C. P. (1950). — *J. Biol. Chem.*, **183**, 279.
 WACHTER, J. P. et BERG, C. P. (1960). — *J. Nutrition*, **70**, 31.
 WOOLEY, D. W. (1945-1946). — *J. Biol. Chem.*, **159**, 753, **162**, 383, **166**, 783.
 WRETTLIND, K. A. J. (1947). — *Acta Physiol. Scandinavica*, **13**, 45.