

**RAPPORT DE STAGE
DE D.E.A. DE NUTRITION
OPTION NUTRITION ET ALIMENTATION
DES ANIMAUX DOMESTIQUES**

Francis DELPEUCH

Laboratoire de Monsieur G. DURAND

STATION DE RECHERCHES DE NUTRITION

CNRZ - INRA

78, Jouy en Josas

Juin 1972

Francis DELPEUCH

INFLUENCE DE L'INGESTION DE B.H.T.
(DI-TERTIO-BUTYL-HYDROXY-TOLUENE)
SUR LA CROISSANCE CORPORELLE ET LE TISSU HEPATIQUE DU RAT BLANC
EN FONCTION DU TAUX PROTEIQUE DU REGIME

S O M M A I R E

- Trois lots très homogènes de rats mâles reçoivent, ad libitum depuis le sevrage, des régimes semi-synthétiques contenant respectivement 8 p.100, 13 p. 100 et 18 p.100 de protéines d'origine animale ; ces lots sont dits témoins. Trois autres lots, expérimentaux, reçoivent les mêmes régimes additionnés de 0,2 p.100 de B.H.T. Enfin, trois derniers lots ingèrent les régimes témoins mais leur consommation alimentaire est alignée sur celle des lots traités au B.H.T ; c'est-à-dire qu'ils reçoivent chaque jour les quantités de protéines, minéraux, vitamines... que consomment les animaux de même poids soumis à l'ingestion de B.H.T, ces lots sont appelés "témoins restreints".

- Les neuf lots sont mis en expérience à un poids moyen de 70 g et ils sont tous sacrifiés lorsqu'ils atteignent le poids de 300 g.

- La consommation et le poids des animaux sont mesurés chaque jour ; leur vitesse de croissance et leur niveau d'ingestion sont ainsi étudiés.

- Au moment du sacrifice, le foie est prélevé, pesé et analysé ; les analyses portent sur les contenus en acides nucléiques et en protéines. Les résultats se rapportent aux valeurs suivantes : - contenu total en ADN, proportionnel au nombre de cellules - rapport poids frais/ADN, proportionnel à la taille des cellules - contenu total en ARN et rapports ARN/ADN et poids frais/ADN, qui témoignent du métabolisme des hépatocytes.

De l'ensemble de ces résultats plusieurs faits nouveaux se dégagent.

1° - L'accroissement du taux protéique du régime, lorsqu'on passe de 8 p.100 à 13 p.100 et à 18 p.100 de matières azotées totales, provoque chez les témoins :

- a) une augmentation du niveau d'ingestion et une diminution de l'indice de consommation
- b) une stimulation importante de la vitesse de croissance
- c) une hypertrophie très nette du foie
- d) une augmentation du contenu total en ADN hépatique mais pas de variation du rapport poids frais/ADN, ce qui signifie que l'hypertrophie hépatique, provoquée par l'enrichissement du régime en protéines, est d'origine hyperplasique.

2° - La comparaison des lots témoins et des lots expérimentaux indique que l'addition de 0,2 p.100 de B.H.T. dans le régime entraîne les effets suivants :

- a) diminution du niveau d'ingestion et augmentation de l'indice de consommation
- b) réduction sensible de la vitesse de croissance

- c) hypertrophie hépatique nette
- d) tendance à l'augmentation du contenu hépatique total en ADN
- e) augmentation systématique et importante du contenu en ARN et du rapport poids frais/ADN.

3° - Toutefois les résultats des lots restreints montrent que l'effet de l'ingestion de B.H.T sur la vitesse de croissance est due en partie à l'effet de la restriction alimentaire qu'elle provoque. Très faible avec les régimes à 13 p.100 de protéines, un effet propre du B.H.T ne semble se manifester de manière nette qu'avec les régimes à 8 p.100 de matières azotées totales.

4° - L'influence du taux protéique sur l'action du B.H.T semble démontrée : si la diminution de croissance provoquée par le B.H.T. est systématique, elle est d'autant plus nette que la teneur en protéines du régime est faible.

De même l'augmentation du contenu hépatique en ADN, induite par le B.H.T., est d'autant plus importante que la concentration en protéines du régime diminue. Ainsi cet accroissement ne devient significatif que pour les régimes contenant 8 p.100 de protéines.

- Cette influence apporte des indications nouvelles quant à la part de l'hyperplasie et de l'hypertrophie cellulaires dans l'augmentation du poids du foie : l'hypertrophie des hépatocytes, systématiquement provoquée par 0,2 p.100 de B.H.T., est augmentée lorsque les régimes s'enrichissent en protéines ; inversement le B.H.T., semble induire une hyperplasie hépatique d'autant plus importante que la concentration du régime en matières azotées totales est faible.

L'action du B.H.T. et le rôle des protéines sont discutés ; les résultats sont confrontés avec ceux obtenus précédemment et la signification physiologique de l'hypertrophie hépatique est envisagée.

S U M M A R Y

From weaning three groups of male rats (controls) were subjected to ad libitum feeding with semi-synthetic diets containing 8, 13 and 18 per cent proteins. Three experimental groups were fed the same diets with addition of 0,2 per cent B.H.T. Finally the three last groups were offered the control diets, but their feed intake was adjusted to that of the B.H.T. treated groups these animals received every day the same amounts of proteins, vitamins, minerals as the B.H.T. treated rats of similar weights.

The nine groups were subjected to the experiment at a weight of 70 g and were sacrificed at 300 g.

The amount of feed and the weight of the animals were recorded each day. Feed intake and growth rate were studied.

The liver was taken, weighed and analyses of the DNA, RNA and proteins were made. Following ratios were calculated : the fresh weight/DNA RNA/DNA, Proteins/DNA.

The results obtained reveal several new fact :

- 1° - Increase of the diet's protein content stimulates the growth rate and causes obvious hepatic hypertrophy, of hyperplastic origin.
- 2° - The intake of B.H.T. at a level of 0,2 per cent decreases the ingestion level and reduces the growth rate.

It brings about a hepatic hypertrophy, showing a tendency to increase the DNA content of the liver.

- 2° - B.H.T. seems to have a specific effect on growth (different from that due to underfeeding) in the case of diets with a low protein content (8 per cent).
- 4° - The influence of the protein level on the action of B.H.T. has been determined. The B.H.T. induced hyperplasia, is all the more important as the protein content of the diet is low.

This is the contrary of cellular hypertrophy.

The action of B.H.T. as well as the role of the proteins is discussed and the physiological significance of hepatic hypertrophy is considered.

I N T R O D U C T I O N .

Un récent travail effectué par PASCAL, DURAND et PENOT (12) a mis en évidence l'influence néfaste d'un additif alimentaire, le Ditertio-Butyl-Hydroxy-Toluène (B.H.T.) au taux de 0,5 p.100 dans le régime, sur la consommation et la vitesse de croissance du rat blanc soumis à des conditions nutritionnelles précises.

Déjà en 1959, BROWN et coll. (1) notent que la vitesse de croissance de rats mâles adultes qui reçoivent un régime contenant 0,1 p.100 de B.H.T., baisse si ce régime est additionné de 20 p.100 de saindoux ; par contre cette action est supprimée s'il ne contient plus 10 p.100 de saindoux. De même, lorsque la concentration du B.H.T. est plus élevée, soit 0,5 p.100, la vitesse de croissance baisse plus si le régime est supplémenté avec 20 p.100 de saindoux au lieu de 10 p.100 JOHNSON et HOLDSWORTH cités par PASCAL (11).

C'est également à de tels résultats qu'aboutissent d'autres séries d'études américaines FRAMLEY et al. (4), GAUNT et al. (6).

La plupart des auteurs s'accordent par ailleurs à reconnaître qu'un régime contenant 0,1 p.100 de B.H.T. n'a pratiquement aucun effet significatif sur la croissance du rat. En outre, d'autres auteurs définissent un seuil d'action du B.H.T. sur la croissance qui se situerait entre 0,8 et 1 p.100 de la ration. Au-dessous du taux de 0,8 p.100 le B.H.T n'aurait pas d'autre effet que celui induit par une sous-alimentation ; par contre, à 1 p.100 le B.H.T. réduit toujours l'ingestion, mais en plus il a une influence spécifique sur la croissance ainsi que le montrent les comparaisons avec des témoins restreints (pair fed control). Enfin d'autres résultats, en contradiction avec les précédents, indiquent qu'un régime à 0,2 p.100 de B.H.T. exerce un effet favorable sur la croissance du rat.

Pour toutes ces questions on se reportera à une analyse récente de PASCAL et TERROINE (10) qui aborde les effets biochimiques et physiologiques du B.H.T

- De l'ensemble de ces résultats il est par conséquent difficile de tirer des conclusions précises, mais l'importance de la nature et de la composition du régime apparaît nettement. C'est ce qui ressort des travaux de BROWN et al. (1) qui indiquent que plus la quantité de lipides du régime est grande, plus l'effet dépressif du B.H.T. sur la vitesse de croissance est important. Dans ce même ordre d'idées PASCAL et DURAND (12) suggèrent la possibilité d'une influence du taux protéique de la ration en remarquant que la toxicité de nombreuses drogues est diminuée lorsque ce taux augmente.

De leur côté, GONTZEA, BISTRICEANU, DRAGHIGESCO et MANEA (8) observent l'effet bénéfique d'un apport de protéine d'origine animale sur la résistance et les processus de détoxication de rats qui subissent une intoxication chronique au toluène. Ils soulignent que l'augmentation de l'apport en protéines a compensé l'effet inhibiteur du toluène, enregistré sur la vitesse de croissance de rats soumis à un régime plus pauvre en protéines de qualité identique.

Il semble donc particulièrement intéressant de reprendre l'étude de l'influence de l'ingestion de B.H.T sur la vitesse de croissance, en faisant varier le taux protéique de la ration.

- Un autre aspect de l'action du B.H.T. sur l'organisme se manifeste par une augmentation du poids du foie par rapport à celui du corps. PASCAL et TERROINE discutent, dans une revue d'ensemble (10), la signification physiologique de cette hypertrophie hépatique en regard d'une éventuelle toxicité du B.H.T.

Le problème se pose notamment de savoir quelle est l'action du B.H.T. sur l'ADN hépatique et l'importance des parts respectives prises par

l'hyperplasie et par l'hypertrophie cellulaires dans le phénomène de l'hypertrophie hépatique induite par le B.H.T.

Sur la base d'études en microscopie électronique il semble que le nombre de mitoses soit sensiblement accru par le B.H.T. , de même l'incorporation de thymidine radioactive est augmentée dans le foie d'animaux traités au B.H.T., ce qui peut confirmer une certaine stimulation de la synthèse d'ADN (cf. Biblio dans PASCAL et TERROINE (10).

De son côté, PASCAL (11) enregistre une augmentation de 17 p.100 de la quantité totale d'ADN hépatique chez des rats ayant ingéré pendant dix jours 300 mg/kg/j de B.H.T.

Ces premiers résultats semblent donc indiquer que l'hypertrophie du foie est en partie provoquée par une certaine hyperplasie. Toutefois, KERR et coll. cités par PASCAL et DURAND (12) notent un accroissement de 30 p.100 de la dimension des cellules du foie, et suggèrent une augmentation importante du réticulum endoplasmique agranulaire.

En contradiction avec les résultats relevés plus haut, PASCAL et DURAND (12) concluent à une diminution de la quantité globale d'ADN hépatique de rats en croissance ayant un régime à 0,5 p.100 de B.H.T., par rapport à celle d'animaux témoins de même âge mais de poids différents. La question se pose cependant de savoir quelle est la part de l'effet direct du B.H.T et celle de la sous-alimentation provoquée par le B.H.T., dans la diminution de l'ADN hépatique.

L'utilisation de témoins restreints dont la consommation est alignée sur celle des animaux ingérant le B.H.T., ceci pendant 28 jours, montre que l'effet direct du B.H.T. sur la quantité d'ADN hépatique est nul DURAND (3) ; cependant l'auteur souligne que la durée de l'expérience est trop courte pour que l'on puisse conclure définitivement, une action du B.H.T sur l'ADN

pouvant s'envisager à plus long terme. De plus l'expérience est ici conduite, non sur des rats en croissance, mais sur des rats mâles adultes.

L'action spécifique du B.H.T. sur le contenu au acides nucléiques du foie reste ainsi mal définie et c'est pourquoi il a paru intéressant d'entreprendre de nouvelles études tenant compte des facteurs expérimentaux énoncés précédemment.

Le but de ce travail est donc double :

- Il s'agit, dans un premier temps, d'étudier la vitesse de croissance de rats ayant ingéré 0,2 p.100 de B.H.T., en la comparant à celle de témoins restreints, pour faire la part entre l'effet éventuel propre du B.H.T. et l'effet dû à la sous-alimentation. On observera l'influence des protéines du régime.

- Dans un deuxième temps, de préciser l'influence exacte du B.H.T. sur le contenu en acides nucléiques du foie, en fonction du taux de protéines des régimes.

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL ANIMAL

Régimes et lots

Neuf lots de dix rats mâles Wistar CF sont utilisés, les caractéristiques d'âge, de poids et de consommation alimentaire sont portées dans le tableau 2. Les rats sont mis en expérience à l'âge de quatre semaine et à un poids de 70 ± 2 g ; les neuf lots sont rassemblés en trois groupes, I, II, III, recevant respectivement des régimes à 8 p.100 13 p.100 de protéines (Nx6,25). La composition précise de ces régimes est indiquée dans le tableau 1.

Chacun de ces trois groupes contient donc trois lots numérotés 1, 2 et 3 ; les lots 1 sont nourris ad libitum avec les régimes témoins de chaque groupe. Les lots 2 reçoivent le même régime mais leur consommation est alignée sur celle des animaux des lots 3 qui ingèrent des régimes contenant 2 g de B.H.T. par kg de matière sèche.

Les lots 2 reçoivent donc la même quantité de protéines, de lipides, d'énergie, de vitamine et de minéraux que les animaux de même poids traités au B.H.T. ; ces lots 2 sont appelés "témoins restreints".

Les rats sont pesés tous les jours ainsi que la nourriture consommée ; les résultats sont rapportés dans le tableau 2.

Tableau 1 : Nature et composition des régimes en g/kg de Matière sèche

Numéros des régimes	I	II	III
Protéines en p.100	8	13	18
Farine de poisson de Norvège	110	180	250
Amidon de maïs	516	446	376
DL méthionine		1,3	
Sucre cristallisé		220	
Huile d'arachide		92,5	
Mélange minéral		30	
Agar-Agar		20	
Mélange vitaminique		10	
Biotine		0,1	
Choline		0,1	

2 g de B.H.T sont ajoutée aux dépens de l'amidon dans les régimes des lots I₃ II₃ III₃

Tableau 2 : Effets du taux protéique de la ration et du B.H.T. sur le gain de poids et la consommation alimentaire de rats en croissance.

	Numéro des lots								
	I ₁	I ₂	I ₃	II ₁	II ₂	II ₃	III ₁	III ₂	III ₃
Protéines en p.100 de la ration.....	8	8	8	13	13	13	18	18	18
B.H.T en p.100 de la ration	0	0	0,2	0	0	0,2	0	0	0,2
Nombre de rats	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Nombre de jours	62	75	86	41	47	48	34	38	38
Poids vif initial (g)	69	69	69	71	72	71	71	71	71
Poids vif final (g) ..	309	304	312	313	312	311	315	309	318
Gain de poids (g)....	240	235	243	242	240	240	244	238	247
Gain de poids/j (g) ..	3,87	3,13	2,82	5,90	5,10	5,00	7,18	6,26	6,50
Aliment consommé (g) ..	950	1025	1204	669	742	760	582	609	612
Aliment consommé/j (g).....	15,3	13,7	14,0	16,3	15,8	15,8	17,1	16,0	16,1
Indice de consommation.....	3,96	4,36	4,95	2,76	3,09	3,17	2,38	2,56	2,48

Abattage et prélèvement

Tous les lots sont abattus à 300 g et la durée de l'expérience varie donc selon le temps que met chaque lot à atteindre ce poids. Avant l'abattage les rats subissent un jeûne de 24h, ce qui explique les pertes de poids indiquées sur les courbes (fig.II) ; les animaux sont saignés sous anesthésie à l'éther, le foie est prélevé, pesé et placé dans l'azote liquide. Lorsque les analyses ne peuvent être faites aussitôt, les foies sont conservés à -18°C .

II. METHODES ANALYTIQUES

Ces méthodes ont déjà fait l'objet d'une description précise dans une publication précédente DURAND et coll. (2) ; on se limite donc ici à en rappeler les grandes lignes et les principes généraux.

1. Extraction des éléments acido-solubles

Le foie est broyé au Turmix en présence d'acide trichloracétique (TCA) à 10 p.100, refroidi à 0°C ; trois broyages successifs de une minute chacun sont effectués ; les broyats sont centrifugés pendant dix minutes à 1800 g et à -2°C , les surnageants sont filtrés et l'opération est répétée trois fois. Les éléments acido-solubles sont contenus dans ces surnageants.

2. Extraction des lipides

Les culots sont ensuite neutralisés par le mélange méthanolacétate de sodium N à PH. On opère un dégraissage par le mélange méthanol-chloroforme (1v/2v) ; deux traitements successifs sont effectués, l'un de une heure, l'autre pendant toute la durée de la nuit, à l'aide de 100 ml de mélange pour 100 g de tissu frais. Après chaque traitement les échantillons sont centrifugés à 1800 g. Enfin les résidus dégraissés sont lavés à l'éthanol à 100°C puis centrifugés.

3. Séchage et broyage

Les culots sont mis sur Büchner, lavés sous vide à l'éther sulfurique et séchés sous vide dans un dessiccateur. On les broye avec un broyeur à billes après les avoir pesés et l'on obtient "la poudre sèche et dégraissée". Elle contient les acides nucléiques, les protéines et en partie les sels minéraux ; la poudre non analysée immédiatement peut être conservée à -18°C .

4. Séparation et dosage de l'ARN et l'ADN

On pratique une hydrolyse différentielle selon la méthode de SCHMIDT et TANNHAUSER pour séparer l'ARN de l'ADN.

a) Hydrolyse de l'ARN

La poudre sèche et dégraissée subit d'abord une hydrolyse alcaline. 50 ml de NaOH 0,5N sont ajoutés à 1 à 2 g de poudre ; le mélange est placé au bain marie à 37°C pendant 18h, puis les hydrolysats ainsi obtenus sont neutralisés par de l'acide formique 13N. On ajoute à ces hydrolysats une quantité de TCA 40 p.100 suffisante pour que la concentration finale de la solution soit de 10 p.100. Les protéines et l'ADN précipitent dans cette solution et après 10 minutes à 0°C on centrifuge à 2000 g pendant 10 autres minutes. Les culots sont lavés trois fois au TCA 10 p.100 et les surnageants ainsi recueillis contiennent les mononucléotides constitutifs de l'ARN. Ils sont filtrés et amenés à un volume de 200 ml par de l'eau bidistillée.

b) Hydrolyse de l'ADN

Les culots sont soumis à une autre hydrolyse par 50 ml d'acide perchlorique 0,5 N pendant une heure au Bain-marie bouillant. Ils sont centrifugés ensuite pendant dix minutes à 0°C puis remis en suspension avec 50 ml du même acide perchlorique 0,5N et à nouveau hydrolysés pendant une heure dans les mêmes conditions. Finalement les culots sont relavés avec 30 ml de C_{10}H_4 ; les surnageants, qui contiennent les bases puriques de l'ADN, sont filtrés et amenés à un volume de 150 ml par l'eau bidistillée.

c) Dosage de l'ARN

Les mononucléotides de l'ARN sont fixés sur colonnes de résine Dowex 1x8 sous forme HCOO^- ; les colonnes reçoivent une charge de 150 à 200 DO à 160 mu. Deux systèmes de gradient linéaire sont utilisés pour l'élution; le premier qui est constitué par HCOOH 2N dans le flacon principal et par de l'eau dans le flacon mélangeur, à raison de 250 ml par flacon, élue d'abord le CMP puis l'AMP; le deuxième, constitué par 300 ml dans chaque flacon de deux mélanges, CHO_2NH_4 2N- HCOOH 0,15N et CHO_2NH_4 0,2N- HCOOH 0,06 N, élue le pseudo UMP et le GMP. L'élution se fait sous pression, la localisation des fractions est précisée par un absorptiomètre et un collecteur recueille les éluats par volume de 4 ml. La quantité de chaque mononucléotide est mesurée au spectrophotomètre.

d) Dosage de l'ADN

Les bases puriques de l'ADN sont fixées sur des colonnes de résine Amberlite IR 120; ces colonnes reçoivent une charge de 200 à 250 D.O. à 260 mu. Un gradient linéaire d'HCL (flacon principal HCL 4N, mélangeur HCL 0,75N) élue les bases sous pression. Des fractions de 10 ml sont collectées et la quantité de chacune des bases est mesurée au spectrophotomètre, ce qui permet de calculer la quantité d'ADN selon la relation $\text{ADN} = (\text{Adénine} + \text{Guanine}) \times 2$.

III. EXPRESSION DES RESULTATS

Les quantités d'acides nucléiques sont égales à la somme de leurs bases portée en micromoles. Les quantités totales sont calculées à partir des concentrations par gramme de poids sec et dégraissé; le rendement poids sec dégraissé/poids frais est constant. Les résultats seront donnés sous forme de moyennes accompagnées de l'erreur standard; la signification statistique sera précisée au moyen d'analyses de variance.

RESULTATS

I. ACTION DU TAUX PROTEIQUE DU REGIME ET DU B.H.T. SUR LA CONSOMMATION ALIMENTAIRE ET LA CROISSANCE

A. Consommation

- Les courbes de consommation des lots témoins de chaque groupe sont d'allure normale (figure I). L'augmentation du taux protéique de la ration diminue la quantité d'aliments consommée pour que les rats atteignent le poids de 300 g. Lorsque le régime passe de 8 p.100 de protéines à 13 et 18 p.100, les quantités ingérées passent de 950 g à 669 et 582 g ; soit des diminutions de 29,5 p.100 et 38,8 p.100. Le niveau d'ingestion est donc accru (tableau 2).

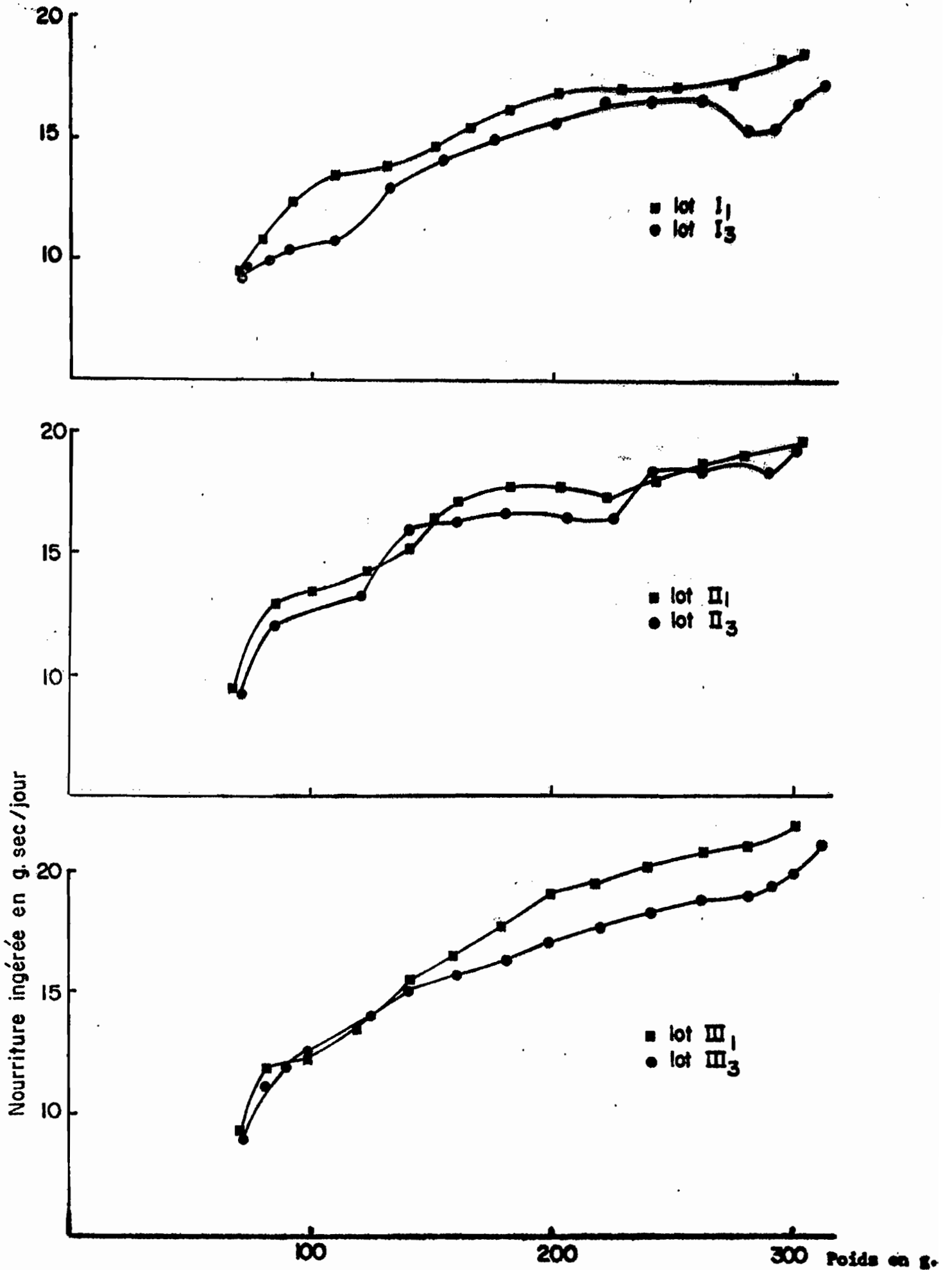
- Les courbes de consommation de lots 3 (fig.1) ayant ingéré du B.H.T sont également de forme normale mais le niveau d'ingestion reste en général inférieur à celui des lots témoins. Bien que constante, cette réduction de l'ingéré quotidien est à la limite de la signification statistique.

Enfin, la quantité d'aliments consommée par les rats pour parvenir à 300 g est, dans les trois groupes, supérieure à celle des témoins. Cependant cette augmentation est d'autant moins forte que le taux protéique est élevé puisqu'elle passe de 26,7 p.100 dans le groupe I à 13,4 p.100 dans le II et 5,1 dans le III.

- L'indice de consommation baisse chez les témoins avec l'accroissement du taux protéique, soit 3,96 p.100 pour le lot I₁, 2,76 et 2,88 respectivement pour les lots II₁ et III₁. Chez les animaux traités au B.H.T. il est augmenté par rapport à celui des témoins correspondants, de 25,3 p.100 dans le groupe I, de 11,4 et 4,2 p.100 les groupes II et III.

Fig. 1

Consommation des animaux en fonction de leurs poids



- Enfin, les résultats indiquent que l'effet dépressif de 0,2 p.100 de B.H.T sur le niveau d'ingestion est totalement compensé par un apport supplémentaire de protéines dans le régime ; ainsi l'ingéré quotidien des rats du lot II₃, qui reçoivent un régime B.H.T. à 13 p.100 de protéines, est supérieur à celui des rats du lot I₁ qui ingèrent le régime témoin à 8 p.100 de protéines, soit 15,8 g/j ; de même pour les lots III₃ et II₁ il y a sensiblement égalité de la consommation alimentaire quotidienne, c'est-à-dire 16,1/g/j contre 16,3 g/j (tableau 2).

B. - CROISSANCE

Action du taux protéique des régimes : les courbes de gain pondéral des lots témoins (fig. II) indiquent que l'élévation du taux protéique des régimes provoque un effet favorable très significatif sur la vitesse de croissance des rats. Le gain de poids quotidien passe de 3,87 g/j pour le lot I₁ à 5,90 et 7,19 g/j pour les lots II₁ et III₁, ce qui correspond à des augmentations de 52,5 p.100 et 85,5 p.100. Parallèlement le temps mis pour atteindre le poids de 300 g s'abaisse de 62 jours à 41 et 34 jours (tableau 2).

Effet de l'ingestion du B.H.T. : l'étude comparée des courbes de poids des lots 1 et 3 de chaque groupe (fig. II) montre que l'ingestion de B.H.T à 0,2 p.100 a systématiquement une influence inhibitrice sur la vitesse de croissance. Les écarts maximum enregistrés restent cependant à la limite de la signification statistique, sauf pour le groupe I où la différence de poids est plus marquée à partir de 200 g entre les lots 1 et 3. Le gain pondéral quotidien diminue ainsi de 27,2 p.100 pour le lot I₃, 15,3 p.100 pour le II₃ et 9,5 p.100 pour le III₃, par rapport aux lots témoins 1 correspondants (tableau 3).

Fig. II

Poids des animaux en fonction de leur âge

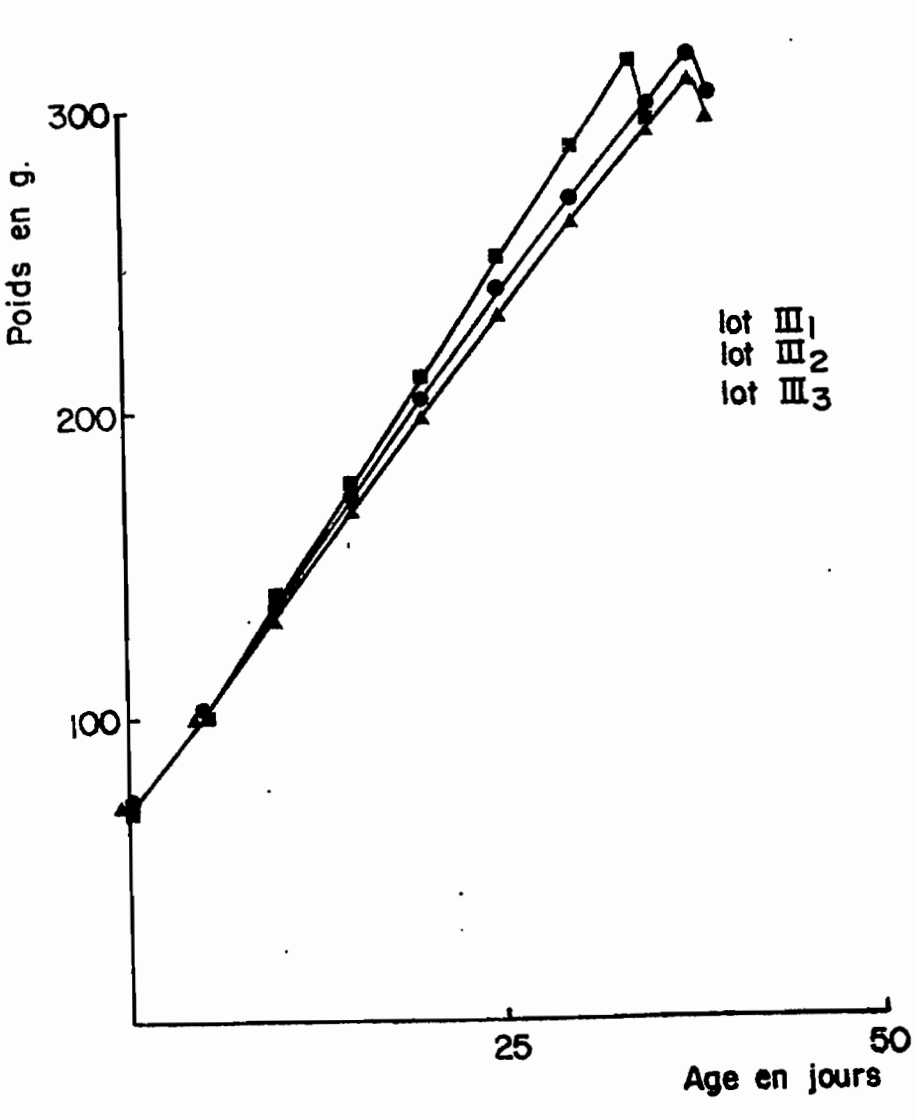
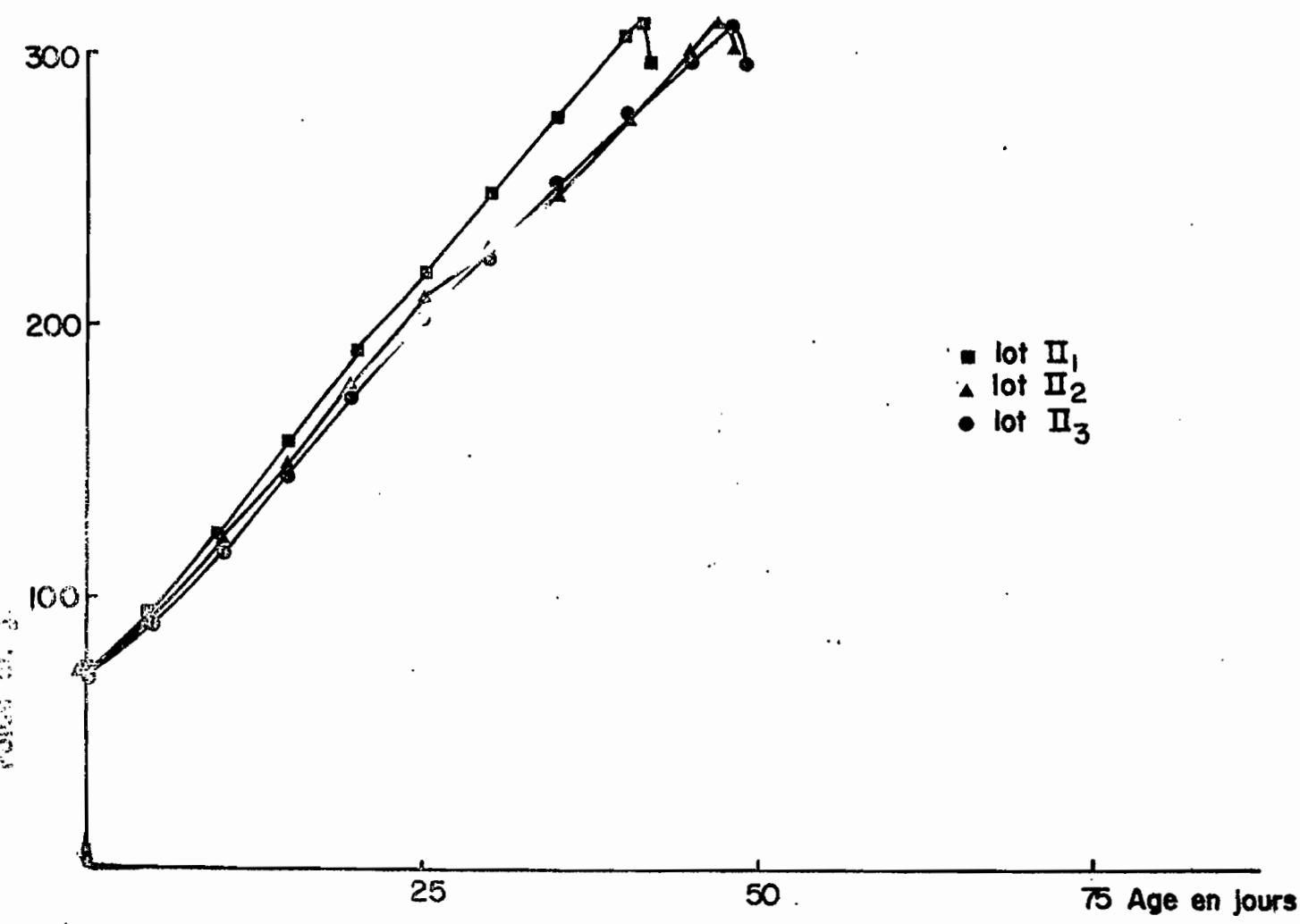
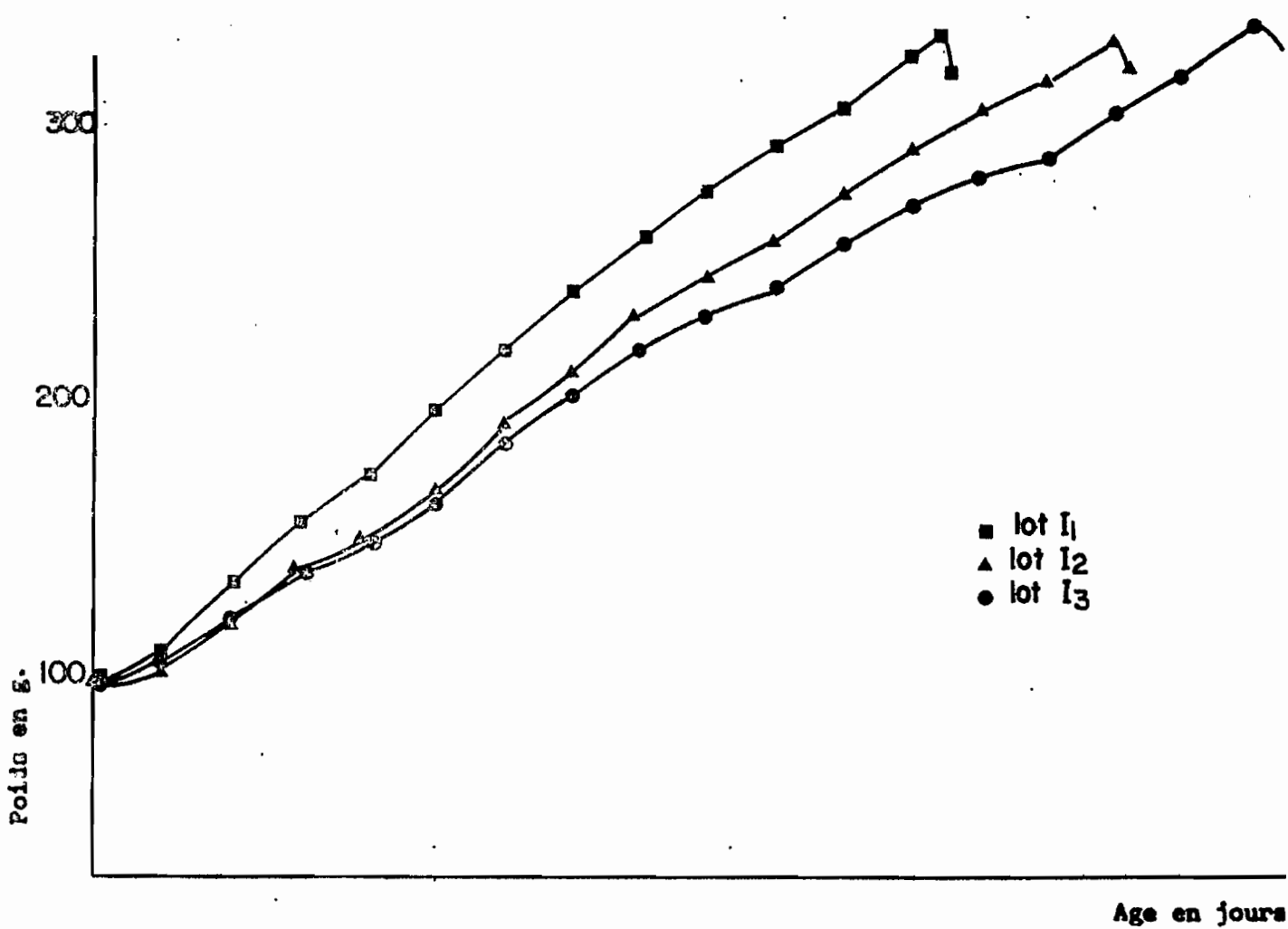


Tableau 3 : Différences de gain de poids quotidien, exprimées en p.100, entre les différents lots de chaque groupe

Groupes et p.100 de protéines	Lots B.H.T	Lots témoins	Lots B.H.T.
	Lots témoins	restreints	Lots témoins restreints
I 8 p.100	-27,2	-19,2	-10,0
II p.100	-15,3	-13,6	- 2,0
III 18 p.100	- 9,5	-12,8	+ 3,8

Effet spécifique du B.H.T : La comparaison des courbes de croissance des lots restreints et des lots traités au B.H.T. indique toutefois que les diminutions de croissance semblent dues en grande partie à l'effet de la restriction alimentaire induite par le B.H.T. Ces deux types de courbes sont pratiquement confondues pour les groupes II et III (fig. II). L'étude ponctuelle faite entre les courbes des lots I₂ et I₃, c'est-à-dire là où la différence est la plus grande entre témoins restreints et B.H.T, montre que l'écart maximum enregistré à 65 jours est à la limite de la signification statistique.

En outre, le gain pondéral des témoins restreints s'abaisse, par rapport aux témoins, dans une proportion voisine de celle du B.H.T., soit 19,2 p.100, 13,6 et 12,8 p.100 (tableau 3).

En conclusion on peut admettre que l'ingestion de 0,2 p.100 de B.H.T. déprime systématiquement la vitesse de croissance ; l'effet dû à la restriction alimentaire est constant mais l'effet spécifique du B.H.T. sur la croissance très faible avec les régimes à taux protéique normal, ne devient net qu'avec les régimes pauvres en matières azotées totales (8 p.100).

Il faut enfin remarquer que le gain pondéral quotidien des lots témoins est plus faible que celui des lots traités au B.H.T. qui reçoivent un régime

plus riche en protéines. Chez les témoins ingérant 8 p.100 de protéines il est en effet de 3,87 g/j contre 5,00 g/j pour les lots recevant le régime B.H.T. à 13 p.100 de protéines ; de même pour le lot témoin avec 13 p.100 de protéines le gain est de 5,90 g/j pour les lots traités au B.H.T. qui consomment 18 p.100 de protéines (tableau 2).

Cela signifie que l'effet dépressif sur la croissance, provoqué par l'ingestion de 0,2 p.100 de B.H.T., est compensé par un apport supplémentaire, même modéré, de protéines d'origine animale.

II. - ACTION SUR LE POIDS DU FOIE ET SON CONTENU EN ACIDES NUCLEIQUES

A. Poids du foie

Effet des protéines du régime : l'augmentation de la teneur en protéines du régime accroît le poids frais du foie qui passe de 7,5 g dans le lot I₁ à 8,5 g et 9,3 g dans les lots II₁ et III₁, soit des gains respectifs de 13,5 p.100 et 24 p.100 (tableaux 4 et 6).

Effet du B.H.T. : à la concentration de 0,2 p.100 dans le régime, le B.H.T. provoque une hypertrophie significative et d'importance sensiblement égale quel que soit le taux protéique de la région. Il s'agit bien d'un effet propre dû au B.H.T. puisque la restriction alimentaire globale (Protéines + Energie) diminue le poids du foie. La comparaison avec les témoins restreints indique que le poids du foie s'élève de 7,03 g, 8,15 g, 8,10 g pour les lots 2 à 9,43 g, 10,0 g, 11,2 g pour les lots 3, respectivement dans les groupes I, II et III (tableau 4).

B. Contenu du foie en acides nucléiques

Influence du B.H.T. : à la concentration de 0,2 p.100 et comparativement aux témoins restreints correspondants qui ingèrent chaque jour une quantité identique d'un même régime, le B.H.T. montre une tendance à provoquer l'augmentation

du capital hépatique en ADN. La quantité totale d'ADN s'accroît de 22,9 p.100, 6,7 p.100 et 10,5 p.100 respectivement dans les lots I₃, II₃ et III₃ (tableau 5).

Toutefois cet accroissement n'est significatif que pour le lot I₃, qui ingère le régime B.H.T. à 8 p.100 de protéines.

Le B.H.T. provoque aussi une diminution de la concentration d'ADN par rapport au poids frais du foie.

Le contenu hépatique en ARN est également significativement augmenté par l'ingestion de 0,2 p.100 de B.H.T. , par contre la concentration en ARN ne semble pas modifiée.

On trouvera groupé dans le tableau 4 les valeurs des rapports poids frais/ADN, ARN/ADN, protéines/ADN, et leurs augmentations, exprimées en p.100, dans le tableau 5.

Tableau 4 :

Influence de la teneur en protéines et du B.H.T. sur le contenu en acides nucléiques du foie de rat.

	Numéros des lots								
	I ₁	I ₂	I ₃	II ₁	II ₂	II ₃	III ₁	III ₂	III ₃
Poids vif (g).....	292	294	299	294	300	293	293	295	299
Poids frais du foie (g).....	7,5 +0,4	7,03 +0,10	9,43 +0,51 P<0,001	8,5 +0,2	8,15 +0,1	10,0 +0,3 P<0,001	9,3 +0,3	8,1 +0,2 P<0,01	11,2 +0,4 P<0,01
Poids frais en p.100 du poids vif.....	2,57	2,40	3,16	2,89	2,75	3,36	3,2	2,75	3,75
ADN total (N-bases)...	63,1 + 2,6	59,0 + 1,4	72,5 + 2,7 P<0,05	68,5 + 1,6	68,6 + 1,5	73,2 + 2,9	78,2 + 2,8	75,5 + 2,4	83,4 + 3,8
ARN total (M-bases)...	190,2 + 9,3	167,0 + 1,3 P<0,025	238,8 + 13,3 P<0,001	214,1 + 4,5	206,2 + 3,9	246,9 + 9,8 P<0,01	241,1 + 7,8	195,9 + 2,8 P<0,001	282,2 + 14,0 P<0,001
Poids frais (mg).....									
ADN (N-bases)	119	119	129 P<0,05	124	119	137 P<0,001	121	107 P<0,01	135 P<0,001
ARN/ADN	3,01	2,84	3,27	3,13	3,00	3,37	3,08	2,61	3,38
Protéines/ADN (N total x 6,25 en mg)...	22,4	20,7	24,3	23,3	22,5	26,3	23,5	21,0	26,5

Numérotation des lots :

1 : témoins
2 : témoins restreints
3 : traités au B.H.T.

I : régime à 8 p.100 de protéines
II : régime à 13 p.100 de protéines
III : régime à 18 p.100 de protéines

Tableau 5 : Différences de contenu en acides nucléiques, exprimées en p.100, entre les foies des lots traités au B.H.T. et les témoins restreints correspondants.

	I ₃ - I ₂	II ₃ - II ₂	III ₃ - III ₂
Poids frais du foie.....	+ 34,1	+ 22,6	+ 38,2
ADN total	+ 22,8	+ 6,7	+ 10,5
Poids frais/ADN	+ 8,4	+ 15,1	+ 26,1
ARN total	+ 43,0	+ 19,7	+ 44,0
ARN/ADN	+ 15,1	+ 12,3	+ 29,5
Protéines/ADN.....	+ 17,4	+ 16,9	+ 26,2

Influence des protéines : les valeurs des variations du poids frais, de l'ADN et du rapport poids frais/ADN, consécutives à l'action des protéines du régime, sont consignées dans le tableau 6.

L'augmentation de la concentration en protéines dans la ration accroît essentiellement le contenu du foie en ADN, soit 8,5 p.100 et 23,9 p.100 lorsqu'on passe du régime témoin I aux régimes témoins II et III ; cependant, elle ne semble pas agir sur la concentration en ADN, le rapport poids frais/ADN reste pratiquement constant dans les trois lots témoins.

Tableau 6 : Différence de contenu en acides nucléiques, exprimées en p.100 entre les foies des lots témoins

	II ₁ - I ₁	III ₁ - II ₁	III ₁ - I ₁
Poids frais du foie	+ 13,5	+ 9,4	+ 24
ADN total	+ 8,5	+ 14,1	+ 23,9
Poids frais/ADN.....	+ 4,2	- 2,4	+ 1,7

Influence de la teneur en protéines sur l'action du B.H.T

Le B.H.T augmente à la fois l'ADN total et le rapport poids frais/ADN mais l'augmentation de l'ADN est d'autant plus importante que le régime est pauvre en protéines ; c'est l'inverse pour le rapport poids

frais/ADN qui s'élève d'autant plus que le régime est riche en protéines (tableau 5).

Enfin il faut remarquer que l'effet du B.H.T. sur le capital hépatique en ADN correspond à celui d'une augmentation de 5 p.100 de protéines dans le régime ; la quantité totale en ADN du foie du lot restreint du groupe II est en effet sensiblement égale à celle du lot expérimental traité au B.H.T. du groupe I, soit 68,6 et 72,5. Il en est de même pour les lots correspondants des groupes III et II, c'est-à-dire 75,5 et 73,2 (tableau 4).

DISCUSSION

I. CROISSANCE ET CONSOMMATION

Les résultats précédents montrent que l'addition de 0,2 p.100 de B.H.T. tend à provoquer chez le rat blanc mâle des diminutions, modérées mais significatives, du niveau de consommation alimentaire et de la vitesse de croissance. Ils semblent donc aller dans le même sens que ceux obtenus par PASCAL, DURAND et PENOT (12), BROWN et coll. (1), FRAWLEY et coll. (5), mais ils sont en contradiction avec ceux de SPORN et SCHOBESCH (cités par PASCAL). Ces auteurs montrent en effet que le B.H.T., à la concentration de 0,2 p.100, induit une stimulation de la vitesse de croissance du rat.

Toutefois, il ressort de ces nouvelles données que l'effet du B.H.T. sur le gain pondéral résulte surtout de la restriction alimentaire provoquée par l'ingestion de cet additif. Ceci est particulièrement net pour les lots qui reçoivent des régimes à 13 et 18 p.100 de protéines, mais il faut noter que le B.H.T. semble bien exercer un effet propre lorsque le régime ne contient plus que 8 p.100 de protéines de même qualité. L'interprétation de cet effet propre est difficile, compte tenu qu'il ne semble se manifester nettement qu'avec des régimes subcarencés en protéines ; de plus il reste toujours à la

limite de la signification statistique.

Ainsi que l'avaient suggéré PASCAL et DURAND (12) le taux protéique de la ration a donc une influence importante sur l'effet de l'ingestion de B.H.T. Une augmentation, même modérée, de ce taux protéique compense l'action dépressive exercée par le B.H.T. sur le gain de poids des rats en croissance, cette augmentation pourrait agir en apportant aux animaux une quantité satisfaisante de matières azotées et plus spécialement d'acides aminés essentiels ; on peut penser en effet que la diminution de consommation, provoquée par le B.H.T., entraîne un apport insuffisant en ces acides aminés, ce qui expliquerait le ralentissement de croissance observé.

Toutefois, si l'on admet un effet propre du B.H.T., notamment pour les régimes pauvres en protéines, il faut rechercher un autre mode d'action des protéines. GONTZEA et coll. (8) soulignent qu'un apport correct de protéines d'origine animale favorise les mécanismes de détoxification de l'organisme traité par le toluène.

En ce qui concerne le B.H.T. on peut estimer qu'un apport supplémentaire de protéines, qui favorise de manière générale la formation de nombreuses enzymes, permet une synthèse accrue de la B.H.T. oxydase ; or, cette enzyme constitue la voie principale du métabolisme du B.H.T. dans l'organisme.

L'accent doit donc être mis sur l'importance de la composition des régimes, notamment en protéines et lipides, dès qu'il s'agit d'interpréter l'action du B.H.T. sur le niveau d'ingestion et la croissance. C'est ainsi qu'il serait particulièrement intéressant d'entreprendre des études concernant l'activité de la B.H.T. oxydase en fonction du taux protéique des régimes additionnés de B.H.T.

De même l'interaction entre le B.H.T. et la quantité de lipides de la ration mériterait d'être précisée, en utilisant la technique des témoins restreints, avec des régimes bien définis. Ainsi que l'ont montré BROWN et coll. (1) l'action du B.H.T. sur la croissance est en effet renforcée par un enrichissement du régime en saindoux, cependant il convient de rester prudent quant à l'interprétation de cette action car les auteurs ne précisent pas si l'augmentation de la quantité de lipides du régime s'est faite au détriment de tous les autres constituants : dans ce cas on aboutirait à une diminution du taux protéique de la ration et l'on se retrouverait dans les conditions de l'expérience présente qui montre que le B.H.T. diminue d'autant plus la vitesse de croissance que le régime est pauvre en protéines.

Un récent travail de PASCAL et TERROINE (13), consacré à la recherche d'une éventuelle activité antioxygène du B.H.T. in vivo, apporte des éléments nouveaux quant au métabolisme lipidique et protéique du rat en croissance.

Les auteurs montrent que le B.H.T. (à 0,1 et 0,5 p.100) n'a pas d'influence sur le métabolisme protéique global ; le bilan azoté des rats en croissance n'est pas modifié. Par contre, avec des régimes à sources lipidiques bien définies et différentes, le B.H.T. provoque une baisse du quotient respiratoire, ce qui, compte tenu que le métabolisme protéique n'est pas modifié, indique un effet positif du B.H.T. sur le catabolisme lipidique.

Cette augmentation de l'oxydation des lipides corporels pourrait, de l'avis même des auteurs, expliquer en partie l'effet dépressif du B.H.T. sur l'engraissement des rats en croissance.

Pour toutes ces actions relatives à la croissance il faudrait préciser dans quelle mesure intervient la restriction alimentaire et/ou s'il s'agit d'un effet direct du B.H.T. en rapport avec les processus de lipogénèse.

II. TISSU HEPATIQUE

1. Poids du foie

L'action du B.H.T. sur l'hypertrophie hépatique se trouve confirmée par cette nouvelle expérience ; la dose de 0,2 p.100 provoque, chez tous les lots traités, une augmentation significative du poids du foie en valeur absolue et en valeur relative par rapport au poids corporel.

Dans ce sens les résultats sont en accord avec ceux de tous les autres auteurs mais plus particulièrement avec ceux de GAUNT et coll. (6) ; ils précisent que la restriction alimentaire n'intervient pas dans l'apparition de l'hypertrophie et qu'il s'agit bien là d'une action directe du B.H.T.

2. Contenu en acides nucléiques

ARN et protéines : le contenu hépatique en ARN est augmenté de manière hautement significative, ce qui est bien un effet propre au B.H.T. puisque la réduction de consommation globale provoque une diminution de l'ARN, de l'ADN et des protéines hépatiques ; c'est ce que montrent les présents résultats en accord avec ceux de DURAND et coll. (2).

Par contre PASCAL et DURAND (12) concluent dans un travail antérieur que le B.H.T. n'agit pas sur le capital hépatique en ARN ; cette divergence entre les résultats peut s'expliquer par le fait que les comparaisons portaient sur des animaux traités au B.H.T. et des témoins non restreints de poids corporels différents (supérieurs chez les témoins). Si l'on tient compte de la réduction alimentaire qui provoque une diminution de l'ARN, cette absence de différence entre lots expérimentaux traités au B.H.T. et lots témoins signifie en fait que le B.H.T. par son action propre, a augmenté l'ARN.

Les deux données, apparemment contradictoire, montrent par conséquent que la quantité d'ARN hépatique de rats arrivés à un même stade de croissance est augmentée par l'ingestion de B.H.T.

Quoi qu'il en soit, il ressort des présents résultats que les grandes lignes du métabolisme des protéines et des acides nucléiques semblent rester normales dans la cellule hépatique ; la capacité de synthèse et l'activité cellulaire paraissent maintenues à un niveau fonctionnel ainsi que le montrent les valeurs des rapports ARN/ADN et protéines/ADN.

ADN : Les résultats des lots traités montrent une tendance du B.H.T à augmenter le contenu hépatique en ADN ; il faut néanmoins souligner que cet accroissement n'apparaît significativement que dans le lot ingérant le régime à faible taux protéique.

Il s'agit bien ici aussi d'un effet propre du B.H.T. puisque la sous-alimentation a une action dépressive sur l'ADN hépatique (DURAND et coll. (2)).

Ces nouveaux résultats sont en accord avec ceux de KERR et coll. (cités dans (10)) qui observant une stimulation d'incorporation de thymidine radioactive dans le foie des rats qui ont ingéré du B.H.T. Mais peut-être ne s'agit-il là que d'un phénomène de renouvellement ?

Par ailleurs PASCAL (11) enregistre aussi une augmentation de 17 p.100 de l'ADN hépatique chez des rats traités pendant dix jours avec 300 mg/j/kg de B.H.T.

Par contre PASCAL, DURAND et PENOT (12), observent une diminution du capital hépatique en ADN pour une concentration de 0,5 p.100 de B.H.T. dans le régime. Les auteurs soulignent toutefois qu'il conviendrait de savoir quelle est la part de l'effet de la sous-alimentation et celle d'une action éventuelle propre au B.H.T. Remarquons aussi qu'une telle divergence peut-être due à des conditions d'expérience différentes (âge, poids à l'abattage différents entre lots expérimentaux et lots restreints).

Il faut notamment insister sur l'intérêt de comparer les quantités d'acides nucléiques du foie entre des lots d'animaux arrivés à un même stade

de la croissance. Il n'en demeure pas moins que DURAND (3), utilisant un tel protocole, conclut (dans les limites de ses conditions expérimentales) que l'effet direct de 0,4 p.100 de B.H.T. sur la quantité d'ADN hépatique du rat mâle adulte, est nul ; de l'avis même de l'auteur il se peut que la durée de l'expérience soit trop brève (28 j) pour qu'une action éventuelle du B.H.T. puisse se manifester. De plus il s'adresse à des rats déjà adultes de 500 g qui reçoivent un régime à 13-15 p.100 de protéines.

Dans ces conditions, il n'est pas surprenant que l'action du B.H.T. sur l'ADN n'apparaisse pas ; en effet, dans l'expérience présente l'augmentation d'ADN provoquée par 0,2 p.100 de B.H.T. pendant 48 jours n'est pas significative pour les régimes à 13 et 18 p.100 de protéines.

D'un autre côté, les du régime provoquent, lorsque le taux s'élève, une augmentation du poids du foie et de l'ADN hépatique. Par contre, elles ne semblent pas agir sur la concentration en ADN, ainsi qu'en témoignent les valeurs constants du rapport poids frais/ADN dans les lots témoins, ce qui signifie que l'hypertrophie hépatique induite par un enrichissement du régime en protéines est essentiellement d'origine hyperplasique.

3. Hyperplasie et hypertrophie cellulaires

Il s'agit de savoir dans quelle mesure interviennent l'augmentation du nombre des cellules et/ou l'augmentation de la taille des cellules, dans l'hypertrophie hépatique provoquée par l'ingestion de 0,2 p.100 de B.H.T.

La comparaison des augmentations de la quantité totale en ADN et du rapport poids frais/ADN montre que l'importance de la part prise par chacun de ces deux processus, varie en fonction du pourcentage en protéines du régime.

En effet, l'augmentation relative de l'ADN total sous l'effet du B.H.T. paraît d'autant plus forte que le taux protéique du régime est faible ; inversement l'hypertrophie cellulaire semble prendre une part accrue avec les régimes

à taux protéique élevé. Cependant, à la différence de l'augmentation de l'ADN, cette hypertrophie semble se manifester de manière constante et significative, ainsi que le montrent les valeurs du rapport poids frais/ADN dans les lots traités au B.H.T.,

Ce dernier point est donc en accord avec de précédents résultats qui indiquent une amplification de 30 p.100 de la taille des cellules du foie d'animaux soumis à l'ingestion de B.H.T. (KERR et coll.).

Il conviendrait toutefois de rester prudent quant à l'interprétation des comparaisons faites vis à vis des lots restreints. En effet, il apparaît dans les résultats des divergences quant à l'incidence de la sous-alimentation sur la quantité et la concentration en acides nucléiques hépatiques.

C'est ainsi que la différence entre les poids des foies des lots I_1 et I_2 semble essentiellement à une diminution du nombre des cellules, alors que celle observée entre les lots III_2 et III_1 provient surtout d'une diminution de la taille des cellules. Faut-il voir là une influence du taux protéique et de la modification du rapport énergie/protéines des régimes sur l'action de la restriction alimentaire ? L'interprétation de tels écarts est rendue difficile par le fait qu'on s'adresse à des animaux restreints ayant un comportement alimentaire perturbé.

Il n'en reste pas moins que ces variations risquent d'entraîner des erreurs d'interprétation sur l'action du B.H.T. si on ne prend pas garde de maintenir des comparaisons vis à vis de lots témoins.

Quoi qu'il en soit, il ressort des résultats que le B.H.T. peut agir à la fois en augmentant le nombre des hépatocytes et en amplifiant leur taille. Cependant, alors que ce dernier processus paraît constant, le premier ne serait mis en jeu que dans des circonstances nutritionnelles bien précises. On peut suggérer ainsi une certaine compétition entre l'hyperplasie hépatique

provoquée par les protéines du régime et celle induite par le B.H.T. si le régime est équilibré, l'action des protéines semblerait l'emporter, le B.H.T. ne provoquant alors qu'une augmentation de la taille des cellules. Par contre, le B.H.T. induirait également une certaine hyperplasie lorsque le taux en protéines du régime devient insuffisant. On peut donc y voir là aussi une influence de la modification du rapport énergie.protéines.

On pourrait ainsi concevoir une action hyperplasique du B.H.T. qui ne s'exercerait que dans les cas de carence ou de subcarence protéique accompagnée d'un apport suffisant ou excédentaire d'énergie.

4. Signification physiologique de l'hypertrophie hépatique.

Une augmentation modérée (5 p.100) du taux protéique dans la ration des rats en croissance produit sensiblement le même effet sur l'ADN hépatique que l'addition de 0,2 p.100 de B.H.T. à un régime subcarence en acides aminés essentiels (régimes à 8 p.100 de protéines).

Ce point, paraît donc renforcer les hypothèses qui tendent à dissocier le B.H.T. d'un agent hépatotoxique.

C'est ce que font ressortir notamment GOLBERG et GILBERT (7) pour qui le B.H.T. induirait plutôt une "hypertrophie fonctionnelle".

Sur la base d'études enzymatiques, ces auteurs notent en effet une relation entre, d'une part l'hypertrophie hépatique, et d'autre part la stimulation de l'activité de plusieurs enzymes qui métabolisent certaines drogues dans les microsomes. C'est ainsi que la B.H.T. oxydase est très fortement stimulée par l'ingestion de B.H.T. ; cependant, l'augmentation d'activité de cette enzyme précéderait dans le temps l'apparition de l'hypertrophie hépatique. Il y aurait induction d'une synthèse "de novo" de la protéine enzyme par le B.H.T.

D'un autre côté ces résultats sont à rapprocher de ceux de LANE et LIEBER (10) qui constatent un accroissement marqué du réticulum endoplasmique

hépatique sous l'influence du B.H.T.

On trouvera dans la revue d'ensemble de PASCAL et TERROINE (10) la liste des arguments relatifs à une éventuelle toxicité du B.H.T. et basés sur des études structurales et enzymatiques du foie. Toutefois, les résultats actuels ne permettent pas de conclure définitivement. L'action comparée des protéines du régime et du B.H.T. sur l'hypertrophie du foie de rat, étudiée dans ce travail, apporte cependant des indications nouvelles.

D'autres travaux semblent par conséquent s'imposer pour essayer de préciser encore davantage le mode d'action du B.H.T. au niveau cellulaire et la signification physiologique de l'hypertrophie hépatique qu'il provoque.

REMERCIEMENTS :

Je tiens à remercier Monsieur DURAND, Chargé de recherches à l'INRA, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a proposé le sujet de ce rapport, réalisé sous sa constante direction.

REFERENCES.

1. BROWN W.D., JOHNSON A.R., O'HALLORAN M.W. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1959, 37, 533.
2. DURAND G., FAUCONNEAU G., PENOT E., Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 1969, 2, 55.
3. DURAND G. Complément à la réunion du groupe Lipides, Nutrition. 28 janv. 1970.
4. FRA WLEY J.P., KOHN F.E. CALANDRA J.C., Food Cosmet. Toxicol., 1965, 3, 377.
5. FEUER G., GAUNT I.F. GOLBERG L., FAIRWEATHER F.A., Food Cosmet. Toxicol., 1965, 3, 457.
6. GAUNT I.P., GILBERT D., Food Cosmet. Toxicol., 1965, 3, 445.
7. GILBERT D., GOLBERG L., Food Cosmet. Toxicol., 1965, 3, 417.
8. GONTZEAL., BISTRICEANU E., DRAGHICESCO M., MANEA M., Arch. Sci. Physiol., 1968, 22, 397.
9. LORLETTE C., RAULIN J., Ann., Nut. Alim., 1968, 22, 93.
10. PASCAL G., TERROINE T., Ann. Nut. Alim., 1969, 23, 15.
11. PASCAL G., Ann. Nut. Alim. 1969, 23, 73.
12. PASCAL G., DURAND G., PENOT E., Arch. Sci. Physiol., 1970, 24, 37.
13. PASCAL G., TERROINE T., sous presse.