

# Supplémentation en vitamine C et métabolisme phosphocalcique chez le porc en croissance

Isabelle DENIS (1), Colette COLIN (1), Herminie LACROIX (1), E. ZÉRATH (2), A. POINTILLART (1)

(1) I.N.R.A., L.N.S.A., Équipe nutrition minérale et métabolisme osseux - 78352 Jouy-en-Josas Cedex

(2) Institut de Médecine Aérospatiale du Service de Santé des Armées, Centre d'Enseignement et de Recherche de Médecine Aéronautique, Département de Physiologie gravitationnelle - BP 73, 91223 Brétigny-sur-Orge Cedex

## Supplémentation en vitamine C et métabolisme phosphocalcique chez le porc en croissance

Les effets dose-dépendants de la vitamine C sur des ostéoblastes porcins en culture nous ont conduit à évaluer l'impact d'une supplémentation en vitamine C sur le métabolisme osseux in vivo. Vingt et un porcs de 10 kg ont été répartis en 3 lots recevant un aliment de base (témoins) ou supplémenté par 500 (lot 500) ou 1000 mg vitamine C/kg aliment (lot 1000), pendant 4 mois. La vitamine C plasmatique des porcs des lots 500 et 1000 était significativement ( $p < 0,05$ ) supérieure à celle des témoins, tout au long de l'expérience. Les mesures histomorphométriques réalisées sur l'os spongieux des métacarpiens, ont mis en évidence une forte réduction de la formation osseuse chez les porcs des lots 500 et 1000 (surfaces ostéoblastiques et ostéoïdes : de -30 à -46% vs témoins,  $p < 0,01$ ) aboutissant à une raréfaction osseuse (volume trabéculaire osseux : -24% vs témoins,  $p < 0,01$ ), sans modification de la résorption (surfaces ostéoclastiques ns vs témoins). Les mesures osseuses globales (poids, résistance à la rupture, contenu minéral) effectuées sur les métatarsiens et tibias entiers, de même que les marqueurs plasmatiques du remodelage osseux (activité phosphatase alcaline et PICP pour la formation, et hydroxyproline pour la résorption) et les bilans phosphocalciques n'ont, par contre, révélé aucune différence significative entre les témoins et les supplémentés. Ces résultats indiquent un effet néfaste de la supplémentation en vitamine C sur la formation osseuse chez le porc en croissance, mais qui ne semble pas se répercuter sur l'ensemble de la masse osseuse.

## Vitamin C supplementation and bone metabolism in growing pigs

The dose-dependent effects of vitamin C we observed on porcine osteoblasts in vitro led us to investigate the effect of vitamin C supplementation on bone metabolism in vivo. Three groups of seven young pigs (10 kg BW) were given no vitamin C supplement (controls) or 500 or 1000 mg vitamin C / kg diet for 4 months. The plasma vitamin C concentrations were significantly ( $p < 0,05$ ) higher in the supplemented pigs (500 or 1000 mg/kg) than in the controls throughout the experiment. Histomorphometric data, obtained on trabecular metacarpal bone, showed a strong decrease in bone formation (osteoblastic and osteoid surfaces : from -30 to -46% vs controls,  $p < 0.01$ ), which resulted in a reduced trabecular bone volume (-24% vs controls,  $p < 0.01$ ) despite resorption was not altered (osteoclastic surfaces similar to controls), in 500 and 1000 mg/kg supplemented pigs. In contrast, the weight, mineral content and bending moment of the whole tibias and metatarsals, as well as plasmatic markers of bone remodeling (alkaline phosphatase activity and carboxyterminal propeptide of collagen type I for bone formation and hydroxyproline for resorption), and Ca and P balance data were not affected by vitamin C supplementation. This suggests that the inhibition of bone formation was limited to the trabecular bone. The results indicates that high amounts of vitamin C did not alter the overall bone mass but had deleterious effects on trabecular bone formation in young growing pigs.

## INTRODUCTION

Un certain nombre de données expérimentales suggère l'implication de la vitamine C dans le métabolisme phosphocalcique mais son rôle exact reste à déterminer. In vitro la vitamine C est un facteur de différenciation des ostéoblastes, indispensable à la formation de nodules de minéralisation. In vivo, la carence en vitamine C (expérimentée chez le cobaye ou chez des rats et porcs mutants incapables de synthétiser la vitamine C) entraîne un défaut de formation osseuse se traduisant par une diminution du contenu en calcium et en collagène de l'os, de la densité minérale, du volume trabéculaire osseux, de la formation endochondrale. Mais il n'existe que très peu de faits expérimentaux montrant l'impact d'une supplémentation en vitamine C sur le métabolisme osseux chez les espèces non dépendantes, ou au delà de la simple prévention de la carence chez l'homme. Les travaux de WEISER et al. (1992) chez le poulet ont montré une élévation du calcitriol plasmatique, de la CaBP duodénale et de la résistance à la rupture des tibias avec un régime enrichi en vitamine C. Des travaux très anciens suggèrent également un effet stimulant de la vitamine C sur l'absorption et la rétention du calcium et du phosphore (BOURNE, 1972).

Le porc, comme pratiquement toutes les espèces animales, synthétise la vitamine C dès la naissance et n'en a donc théoriquement pas besoin dans sa ration alimentaire. Néanmoins, l'intérêt zootechnique d'une supplémentation en vitamine C chez le porc a fait l'objet de nombreux travaux et quelques uns ont montré un effet positif sur la croissance pondérale (en particulier chez le porcelet), l'efficacité alimentaire, la résistance au stress, la masse et la coloration musculaires (BROWN, 1984 ; MOUROT et al., 1992).

Nous avons montré que la vitamine C stimulait, de façon dose-dépendante, l'activité phosphatase alcaline et la synthèse de collagène d'ostéoblastes porcins en culture. Inversement, la vitamine C pouvait inhiber la différenciation de ces cellules dans certaines conditions de culture (DENIS et al., 1994). Ces résultats nous ont conduit à vérifier in vivo les effets importants observés in vitro, et donc à essayer d'évaluer l'action de la vitamine C sur le remodelage osseux. Nous avons mesuré l'impact de deux niveaux de supplémentation en vitamine C (500 et 1000 mg/kg aliment) pendant 4 mois sur le métabolisme phosphocalcique de jeunes porcs, les mesures expérimentales incluant des paramètres osseux (poids, minéralisation, résistance à la rupture, histomorphométrie), des paramètres plasmatiques (Ca, P, calcitriol, phosphatase alcaline, PICP, hydroxyproline) et des bilans phosphocalciques.

## 1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.1. Animaux et aliment

Vingt et un porcs mâles castrés Large White âgés de 47 jours et pesant  $9,7 \pm 0,1$  kg ont été répartis en 3 lots: le

lot témoin recevant un aliment sans supplément en vitamine C, et les lots 500 et 1000 recevant respectivement 500 et 1000 mg de vitamine C/kg d'aliment. Les animaux ont été nourris de façon appariée. L'essai a duré 4 mois à l'issue desquels les animaux ont été abattus pour permettre les différents prélèvements osseux.

L'aliment était composé de 36% de blé, 37% de maïs, 17% de tourteau de soja, 5% de riz (pour prévenir les problèmes de diarrhée liée au fort apport en vitamine C) et d'un CMV. Il contenait environ 3300 Kcal d'énergie digestible/kg, 17% de protéines, 1% de calcium, 0,66% de phosphore.

### 1.2. Paramètres plasmatiques

La vitamine C plasmatique a été mesurée tout au long de l'expérience sur des prélèvements sanguins dans la veine cave antérieure.

La calcémie, phosphatémie, hydroxyprolinémie (indicateur de la résorption osseuse) et le calcitriol (1,25 dihydroxyvitamine D3, métabolite actif de la vitamine D) ont été mesurées sur des prélèvements de sang à l'abattage, ainsi que l'activité phosphatase alcaline (ALP) et le propeptide carboxyterminal du collagène de type I (PICP, reflétant la synthèse du collagène osseux), marqueurs de la formation osseuse.

### 1.3. Paramètres osseux

Le poids et la résistance à la rupture (estimée par le moment de flexion à partir du test de flexion 3 points) ont été déterminés sur les tibias et les métatarsiens III et IV ainsi que la densité apparente sur les tibias et la teneur en cendres (poids total des cendres, cendres rapportées à la matière sèche ou au volume osseux) sur les métatarsiens.

Les mesures histomorphométriques réalisées au niveau de l'os spongieux (métaphyse distale) des métacarpiens gauches ont permis de déterminer les paramètres suivants :

- volume trabéculaire osseux (VTO), volume occupé par du tissu osseux dans un volume donné (schématiquement rapport «plein/creux» de l'os spongieux)
- épaisseur des travées (ET), épaisseur moyenne des travées osseuses
- les surfaces ostéoïdes (SO), pourcentage de la surface osseuse représenté par de l'ostéoïde (matrice osseuse venant d'être synthétisée par les ostéoblastes et non encore minéralisée)
- l'épaisseur ostéoïde (EO), épaisseur moyenne des liserés ostéoïdes
- les surfaces ostéoblastiques (SOB), pourcentage de la surface osseuse occupée par des ostéoblastes actifs
- les surfaces ostéoclastiques (SOC), pourcentage de la surface osseuse occupée par des ostéoclastes actifs

## 1.4. Bilans phosphocalciques

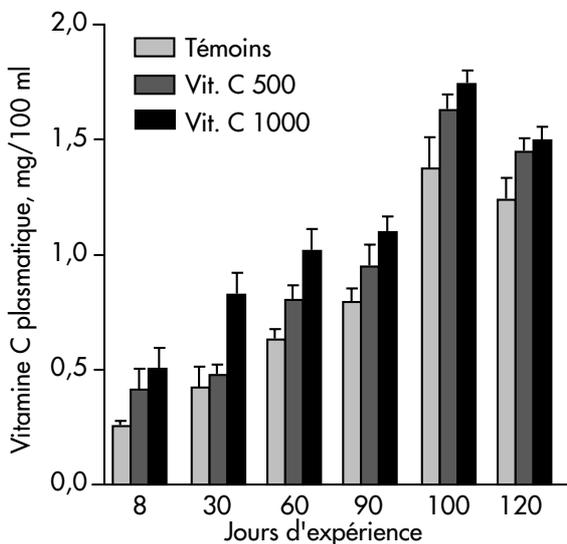
L'absorption et la rétention apparentes du calcium et du phosphore ont été évaluées pendant les 14 derniers jours de l'expérience : 6 porcs témoins et 6 porcs du lot 1000 ont été mis en cages individuelles pour pouvoir déterminer les quantités de calcium et phosphore ingérées et excrétées dans les fécès et les urines. L'hydroxyproline urinaire (marqueur de la résorption osseuse) a été mesurée au cours de ces bilans.

## 2. RÉSULTATS

### 2.1. Concentrations plasmatiques de vitamine C (figure 1)

Les concentrations plasmatiques de vitamine C ont augmenté ( $p < 0,001$ ) au cours du temps pour les porcs des trois lots. La supplémentation en vitamine C (500 ou 1000 mg/kg aliment) entraînait une élévation, significative sur la durée totale de l'expérience ( $p < 0,05$  vs témoins) des concentrations plasmatiques en vitamine C. Il n'y avait par contre pas de différence significative des concentrations plasmatiques en vitamine C entre les porcs des 2 lots supplémentés (500 et 1000), même si les porcs recevant la plus forte supplémentation (lot 1000) avaient, tout au long de l'expérience, les concentrations plasmatiques les plus élevées.

Figure 1 - Concentrations plasmatiques en vitamine C



Anova 2 facteurs : effet de la supplémentation  $p < 0,001$ .  
Effet du temps  $p < 0,001$ .  
Supplémentés vs témoins  $p < 0,05$  (Newman-Keuls).

### 2.2. Performances (tableau 1)

La supplémentation en vitamine C (500 ou 1000 mg/kg) n'a pas eu d'effet sur les performances générales. Les GMQ moyens, l'indice de consommation et le poids à l'abattage étaient similaires pour les porcs des trois lots.

Tableau 1 - Performances (1)

	Témoins	Vit.C 500	Vit.C 1000
Poids vif abattage, kg	81,4 ± 1,5	79,7 ± 1,7	81,5 ± 2,2
GMQ, g/j	590 ± 12	580 ± 13	590 ± 20
IC	2,57 ± 0,05	2,59 ± 0,03	2,58 ± 0,08

(1) Moyenne ± écart-type de la moyenne. Pas de différences significatives entre les lots.

### 2.3. Paramètres plasmatiques (tableau 2)

La supplémentation en vitamine C (500 ou 1000 mg/kg aliment) n'a pas eu d'effet sur la calcémie ou sur la phosphatémie, ni sur la concentration plasmatique du calcitriol. L'hydroxyproline, l'activité phosphatase alcaline et PICP plasmatiques étaient similaires chez les porcs des trois lots.

La concentration urinaire d'hydroxyproline n'était pas modifiée par la supplémentation en vitamine C (0,55 ± 0,1 mg/m mole créatinine chez les témoins, 0,60 ± 0,05 mg/m mole créatinine chez les porcs du lot 1000). Les valeurs plasmatiques et urinaires de l'hydroxyproline étaient fortement corrélées ( $r = 0,89$  ;  $p < 0,01$ ) et semblent donc constituer deux indicateurs équivalents de la résorption osseuse.

Tableau 2 - Paramètres plasmatiques à l'abattage (1)

	Témoins	Vit.C 500	Vit.C 1000
Ca, mg/100ml	9,0 ± 0,3	9,2 ± 0,2	9,1 ± 0,2
P, mg/100ml	8,5 ± 0,3	8,2 ± 0,2	8,4 ± 0,3
Calcitriol, pg/ml	35 ± 3	38 ± 2	35 ± 2
PICP, mg/l	2,8 ± 0,2	2,4 ± 0,1	2,6 ± 0,2
Phosphatase alcaline, UI/l	46 ± 5	54 ± 6	47 ± 3
Hydroxyproline, mg/100ml	4,3 ± 0,3	4,6 ± 0,2	4,1 ± 0,3

(1) Moyenne ± écart-type de la moyenne. Pas de différences significatives entre les lots.

### 2.4. Paramètres osseux

La supplémentation en vitamine C (500 ou 100 mg/kg aliment) n'a pas eu d'effet sur le poids des os, ni sur leur moment de flexion. Le contenu minéral (cendres totales, cendres/matière sèche, cendres/volume, mesurées sur l'os entier) des métatarsiens, de même que la densité des tibias étaient similaires chez les porcs des trois lots (tableau 3, p.266).

La supplémentation en vitamine C a, par contre, affecté notablement les paramètres histomorphométriques mesurés au niveau de l'os spongieux des métatarsiens, et dans des proportions similaires pour les deux niveaux de supplémentation (aucune différence significative entre les lots 500 et 1000) (tableau 4, p.266). Les porcs supplémentés (lots 500

**Tableau 3** - Paramètres osseux mesurés sur tibias et métatarsiens entiers (1)

	Témoins	Vit.C 500	Vit.C 1000
<b>Métatarsiens</b>			
Poids, g	24,1 ± 0,6	23,3 ± 0,7	23,9 ± 1,1
Cendres, g	6,7 ± 0,2	6,9 ± 0,3	6,6 ± 0,3
Cendres/matière sèche, %	44,3 ± 0,7	45,5 ± 0,2	45,2 ± 0,6
Cendres/volume, g/100 cm <sup>3</sup>	33,1 ± 0,8	34,3 ± 0,7	33,5 ± 0,9
Moment de flexion, Nxm	10,2 ± 0,3	11,0 ± 0,6	10,9 ± 0,5
<b>Tibias</b>			
Poids, g	149 ± 4	145 ± 4	156 ± 6
Densité, g/cm <sup>3</sup>	1,27 ± 0,01	1,26 ± 0,02	1,24 ± 0,02
Moment de flexion, Nxm	60 ± 1	62 ± 3	65 ± 3

(1) Moyenne ± écart-type de la moyenne. Pas de différences significatives entre les lots.

**Tableau 4** - Paramètres histomorphométriques (os spongieux des métacarpiens) (1)

	Témoins	Vit.C 500	Vit.C 1000
<b>Volume trabéculaire osseux, %</b>	41,2 ± 2,2	30,8 ± 1,8 **	31,9 ± 1,8 **
<b>Épaisseur des travées, µm</b>	111 ± 5	96 ± 2 *	96 ± 5 *
<b>Surfaces ostéoblastiques, %</b>	30,8 ± 3	16,6 ± 1,7 **	21,6 ± 2 **
<b>Surfaces ostéoïdes, %</b>	28,8 ± 2,6	16 ± 1,4 **	19,6 ± 1,7 **
<b>Épaisseur ostéoïde, µm</b>	12,8 ± 0,8	13,1 ± 1,5	12,4 ± 1,4
<b>Surfaces ostéoclastiques, %</b>	7,14 ± 0,8	7,25 ± 0,15	7,57 ± 0,6

(1) Moyenne ± écart-type de la moyenne. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , versus témoins; pas de différences significatives entre Vit.C 500 et Vit.C 1000 (Newman-Keuls).

**Tableau 5** - Bilans phosphocalciques (1)

	Calcium		Phosphore	
	Témoins	Vit. C 1000	Témoins	Vit. C 1000
<b>Ingéré, g/j</b>	25,6 ± 0,0	25,7 ± 0,0	16,3 ± 0,0	16,3 ± 0,0
<b>Absorbé, g/j</b>	8,1 ± 0,5	8,5 ± 0,9	6,7 ± 0,1	6,8 ± 0,4
<b>Absorption, %</b>	32 ± 2	33 ± 4	42 ± 1	42 ± 3
<b>Urinaire, g/j</b>	0,25 ± 0,05	0,33 ± 0,03	1,2 ± 0,2	1,5 ± 0,1
<b>Retenu, g/j</b>	7,9 ± 0,5	8,2 ± 0,9	5,5 ± 0,2	5,4 ± 0,5
<b>Rétention, %</b>	31 ± 2	32 ± 4	34 ± 2	33 ± 3

(1) Moyenne ± écart type de la moyenne. Pas de différences significatives entre les lots.

### 3. DISCUSSION

Les fortes quantités de vitamine C utilisées dans cette expérience ont permis une augmentation des niveaux plasmatiques de cette vitamine chez les porcs supplémentés. Ceci confirme, en accord avec d'autres études (YEN et POND, 1981 ; NAKANO et al., 1983) qu'il est possible d'augmen-

ter le statut en vitamine C du porc par un apport alimentaire, bien qu'il synthétise sa propre vitamine C. L'absence de différence significative entre les concentrations plasmatiques en vitamine C des lots 500 et 1000 suggère que 500 mg de vitamine C/kg d'aliment représentait un niveau maximum de supplémentation « efficace ». L'augmentation des concentrations plasmatiques de vitamine C au cours du temps (tous

### 2.5. Bilans phosphocalciques (tableau 5)

La supplémentation en vitamine C n'a pas eu d'effet sur l'absorption ni sur la rétention apparentes du calcium et du phosphore.

ter le statut en vitamine C du porc par un apport alimentaire, bien qu'il synthétise sa propre vitamine C. L'absence de différence significative entre les concentrations plasmatiques en vitamine C des lots 500 et 1000 suggère que 500 mg de vitamine C/kg d'aliment représentait un niveau maximum de supplémentation « efficace ». L'augmentation des concentrations plasmatiques de vitamine C au cours du temps (tous

lots confondus) a déjà été décrite chez le porc (BROWN, 1984), elle semble liée à l'augmentation de l'apport énergétique et, dans cette expérience, vraisemblablement à l'augmentation de l'ingéré (l'aliment de base contenait 116 mg de vitamine C/kg).

La supplémentation vitaminique C n'a pas eu d'effet sur la croissance des animaux ni sur l'efficacité alimentaire, et ce à aucun moment de l'essai. Les travaux sur ce point sont très contradictoires et s'il apparaît que, dans certaines conditions, la vitamine C améliore les performances (YEN et POND, 1981 ; CHIANG et al., 1985), rien ne permet de savoir si cet effet dépend de l'âge, de facteurs génétiques, alimentaires ou environnementaux.

Aucun des paramètres mesurés en relation avec le métabolisme phosphocalcique ne va dans le sens d'un effet positif de la supplémentation en vitamine C sur le métabolisme osseux. Et si la plupart des critères observés suggèrent que l'apport de vitamine C n'affectait pas globalement la masse osseuse, les données histomorphométriques indiquent au contraire un effet néfaste sur la formation osseuse au niveau de l'os spongieux avec les deux niveaux de supplémentation (500 et 1000). La forte diminution des surfaces ostéoblastiques et ostéoïdes (de 30 à 45%) chez les porcs supplémentés révèle un amoindrissement important de la formation osseuse lié à une réduction du nombre des ostéoblastes actifs. La supplémentation en vitamine C a donc eu un effet inhibiteur sur le recrutement des ostéoblastes, c'est à dire sur la multiplication et/ou la différenciation des précurseurs ostéoblastiques, au niveau de l'os spongieux. Nos travaux sur des cultures d'ostéoblastes de porc ont montré que, parallèlement à son action différenciatrice connue sur les ostéoblastes *in vitro*, la vitamine C exerçait également une action anti-différenciatrice sur des ostéoblastes en phase de prolifération, assimilables aux précurseurs ostéoblastiques (DENIS et al., 1994). La présente étude suggère donc qu'avec une supplémentation massive, les effets inhibiteurs de la vitamine C sur les cellules de la formation osseuse l'emportent sur les effets stimulants, tout au moins au niveau de l'os spongieux. Cette réduction de la formation chez les porcs supplémentés aboutissait à une raréfaction osseuse (diminution du VTO et de l'épaisseur des travées) sans que, comme l'indiquent les autres paramètres histomorphométriques (EO et SOC), ni le processus de minéralisation, ni la résorption osseuse n'aient été affectés. Il faut souligner que le niveau de la supplémentation en vitamine C (500 ou 1000 mg/kg aliment) ne modulait pas la diminution de la formation osseuse et du VTO, équivalents chez les porcs des lots 500 et 1000.

Ces modifications histologiques au niveau de l'os spongieux ne se sont pas répercutées sur le poids, la résistance à la rupture, ni la minéralisation (cendres totales ou rapportées à la matière sèche ou au volume) de l'os entier, similaires chez les porcs supplémentés et témoins. Il est possible que la vitamine C, compte tenu des effets antagonistes qu'elle exerce *in vitro*, n'ait entraîné que très lentement la diminution du pool ostéoblastique (à fortiori au niveau de l'os cortical où

le remodelage est beaucoup plus lent) aboutissant à une perte osseuse minime, peut-être limitée à l'os spongieux, et non répercutée au niveau des mesures globales, réalisées sur l'os entier où prédomine l'os cortical.

L'inhibition de la formation osseuse au niveau de l'os spongieux ne s'est pas non plus répercutée sur les marqueurs plasmatiques de l'activité ostéoblastique (ALP et PICP), similaires chez les porcs supplémentés et témoins. Ceci suggère que cette inhibition, pourtant intense au niveau des mesures histologiques effectuées, ne concernait pas l'intégralité du squelette. Il est également possible (toujours en tenant compte de la double action de la vitamine C *in vitro*) qu'une stimulation de l'ALP et de la synthèse du collagène des ostéoblastes actifs (effet difficilement décelable par les mesures histologiques effectuées) ait compensé, au niveau des marqueurs plasmatiques, la diminution du nombre des ostéoblastes.

Ces résultats soulignent l'intérêt des mesures histomorphométriques qui peuvent révéler des altérations du remodelage osseux, imperceptibles au niveau des marqueurs plasmatiques et non encore répercutées sur la masse osseuse globale.

Concernant la résorption osseuse, tous les paramètres mesurés (hydroxyproline urinaire et plasmatique et SOC au niveau de l'os spongieux) indiquent que la supplémentation en vitamine C ne l'affectait pas.

Contrairement à ce que suggéraient les travaux de WEISER et al. (1992) chez le poulet, la supplémentation vitaminique C n'augmentait ni la concentration plasmatique du calcitriol, ni l'absorption intestinale du calcium. Les bilans montrent clairement que la supplémentation en vitamine C n'affectait pas non plus la rétention du calcium ni celle du phosphore, ce qui est en accord avec l'absence d'effet global sur le contenu minéral osseux.

## CONCLUSION

Cette expérience montre qu'une supplémentation en vitamine C de 4 mois, de 500 ou de 1000 mg/kg d'aliment, chez le porc en croissance, n'a aucun effet bénéfique sur le métabolisme phosphocalcique et conduit au contraire à une raréfaction osseuse au niveau de l'os spongieux en inhibant le processus de formation osseuse.

## REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée dans le cadre de l'AIP «Nutri-âge» dirigée par G. PASCAL.

Nous remercions J.C. BERNARDIN et D. BESNARD pour le soin des animaux et H. ROY pour la fabrication des aliments, ainsi que C. ANDRE et S.RENAULT (IMASSA-CERMA) pour les techniques histomorphométriques.

**RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- BOURNE G.H., 1972. The biochemistry and physiology of bone. Vol II. BOURNE G.H. ed. New York Academic Press, 231-279.
- BROWN R.G., 1984. Ascorbic acid in domestic animal proceedings . WEGGER I., TAGWERKER F.J., MOUSTGAARD J., eds. The royal Danish agricultural society, Copenhagen, 60-67.
- CHIANG S.H., PETTIGREW J.E., MOSER R.L., CORNELIUS S.G., MILLER K.P., HEEG T.R., 1985. Nutr. Report Int., 31, 573-581.
- DENIS I., POINTILLART A., LIEBERHERR M., 1994. Bone Miner., 25, 149-161.
- MOUROT J., AUMAÎTRE A., WALLET P., 1992. Ascorbic acid in domestic animals. Proceedings of the 2nd symposium. WENK C., FENSTER R., VOLKER L., eds. 176-185.
- NAKANO T., AHERNE F.X., THOMPSON J.R., 1983. Can. J. Anim. Sci., 63, 421-428.
- WEISER H., SCHLACHTER M., PROBST H.P., KORMANN A.W., 1992. Ascorbic acid in domestic animals. Proceedings of the 2nd symposium. WENK C., FENSTER R., VOLKER L., eds. 73-95.
- YEN J.T., POND W.G., 1981. J. Anim. Sci., 53, 1292-1296.