

ÉVALUATION QUANTITATIVE DES MICRO-ORGANISMES DU RUMEN PAR DOSAGE DE L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE

AUCUNE METHODE NE NOUS PERMET D'ÉVALUER AVEC PRÉCISION L'ENSEMBLE DES MICRO-ORGANISMES (BACTÉRIES ET PROTOZOAIRES) PRÉSENTS DANS LES CONTENUS de rumen (bactéries libres aussi bien que bactéries fixées). Nous avons mis au point une méthode utilisant la propriété des micro-organismes d'être plus riches en ADN que les aliments habituels des ruminants.

MATÉRIEL EXPERIMENTAL ET METHODES

Les aliments frais sont fixés par l'éthanol à 95 % (— 20° C) et conservés à — 15° C jusqu'au moment de l'analyse. Les aliments secs sont généralement analysés rapidement après l'échantillonnage et le broyage, ce qui ne justifie pas de précautions particulières pour leur conservation.

Les échantillons de contenus de rumen sont obtenus de la même façon, que les animaux soient abattus ou munis de fistules : on vide le rumen et on homogénéise le contenu dont on fixe une fraction représentative par l'éthanol à 95 % (— 20° C). On conserve à — 15° C. (Les prélèvements n'ont été faits sur vaches fistulées que pour la Luzerne et la Fétuque fraîche.)

Les bactéries et les protozoaires sont extraits par fermentation, sédimentation et centrifugation selon une méthode précédemment décrite (FAUCONNEAU et GAUSSERES (5)). Les micro-organismes séchés par lyophilisation sont conservés à + 2° C.

L'azote est déterminé par la méthode de Kjeldahl avec un catalyseur au sélénium et au cuivre.

*par G. Fauconneau
et B. Gausseres.*

Pour doser l'ADN, les échantillons frais ou secs sont soumis à une triple extraction avec de l'éthanol à 80 % (V/V) à 0° C, puis avec de l'acide trichloracétique à 10 % (V/V) et enfin avec un mélange de méthanol-chloroforme (IV/2V). Le résidu de ces extractions est hydrolysé par la soude 0,5 N à 37° C, qui transforme l'ARN en mono-ribonucléotides solubles. L'ADN est précipité par l'acide trichloracétique à 10 % (V/V) et hydrolysé par l'acide perchlorique 0,5 N à 80° C. Les bases puriques sont séparées par chromatographie sur colonne d'Amberlite IR 120 (élution par l'acide chlorhydrique). L'ADN est évalué par le double de la somme adénine + guanine, exprimé en micromoles.

RESULTATS ET METHODES

Les tableaux I et II donnent quelques résultats. Nous n'avons pas retenu l'ARN comme valeur de référence car les teneurs peuvent varier suivant l'état métabolique des organismes. En outre, quelquefois, il se produit des pertes au cours du traitement des échantillons (en particulier au cours du séchage).

Les rapports adénine/guanine que nous avons trouvés varient entre 1,24 et 1,52 pour les bactéries. Ces valeurs sont en agrément avec celles données par DAVIDSON (2) pour des cellules vivantes (sperme de bovins 1,29, germe de blé 1,20, levure 1,67). Cependant, pour les protozoaires, ces rapports atteignent des valeurs élevées situées entre 2,43 et 3,5.

Comme on le constate sur le tableau I, le rapport ARN/ADN a pour les bactéries et protozoaires les valeurs suivantes : avec une ration de foin et d'aliment concentré 1,9 et avec une ration de choux 2,6 et 2,5. La différence entre ces deux régimes peut être due à la présence de populations microbiennes différentes ou à des différences dans l'état métabolique des populations présentes dans le rumen. En effet, VENDRELY (7) a trouvé pour différentes souches d'*Escherichia Coli* des rapports ARN/ADN allant de 1,98 à 2,67. BOIVIN (1), pour une culture de colibacille S, 2,5 après cinq heures de culture et 2,0 après vingt heures. Dans nos expériences ce sont sans doute les changements de population qui sont responsables des variations car les micro-organismes que nous avons analysés ont été extraits à différentes heures après le repas de l'animal, puis mélangés.

Sur le résidu dégraissé de l'extraction à l'acide trichloracétique nous avons déterminé une teneur en azote qui est essentiellement de l'azote protéique. Si nous admettons 51,5 pour valeur moyenne du rapport ADN/N pour l'ensemble des micro-organismes (bactéries et protozoaires), nous pou-

TABLEAU 1
LES ACIDES NUCLEIQUES DES ALIMENTS ET MICRO-ORGANISMES
DES RUMINANTS

	<i>N 0/00</i> <i>de résidu *</i>	$\frac{ADN_{\mu moles/g}}{N\ 0/00} \times 100$	$\frac{ARN_{\mu moles/g}}{N\ 0/00} \times 100$
ALIMENTS :			
Luzerne fraîche, limbes	5,81	17,8	
» » »	5,81	19,2	
» » tiges	1,56	12,4	
» » »	1,65	20,4	
» » très jeune	4,27	14,8	77,3
Luzerne sèche	1,43	15,7	34,9
Débris et plantes adventices de Luzerne	1,19	6,5	
Ray-grass frais	2,76	13,5	
Fétuque (limbes)	2,16	17,8	38,9
Ensilage	1,13	5,5	16,6
Aliment concentré	1,61	3,1	26,4
MICRO-ORGANISMES :			
<i>Bactéries</i> provenant d'un régime de :			
— Foin et aliment concentré	7,17	66,5	129,0
— Choux	9,67	48,6	128,4
— Ray-grass	10,17	55,6	
<i>Protozoaires</i> provenant d'un régime de :			
— Foin et aliment concentré	5,86	51,7	106,1
— Choux	9,11	40,8	
— Ray-grass	9,26	49,1	

TABLEAU II
ADN, AZOTE PROTEIQUE, AZOTE MICROBIEN
DANS LES CONTENUS DE RUMEN DE BOVINS RECEVANT DIFFERENTS REGIMES

<i>Régimes</i>	<i>Temps après le repas</i>	<i>N 0/00 de de résidu *</i>	<i>ADN μmoles/g</i>	<i>ADN μmoles N 0/00 x100</i>	<i>Protéines microbiennes % de protéines totales du contenu</i>
Ray-grass 10 (floraison - digestibil. M.O. = 78 matières azotées = 18,6 % M.S.)	0 h.	3,74	14,2	38,0	65
	3 h.	3,44	11,3	32,8	51
	5 h.	3,86	15,9	41,2	73
	13 h.	3,48	12,6	36,1	59
	Moyenne		3,63	13,5	37,2
Farine de Luzerne et aliment concen- tré, broyés et agglomérés (85 % de Luzerne à 19,4 % de M.A. et 15 % d'aliment concen- tré composé d'Orge et minéraux)	3 h.	2,26	7,7	34,0	57
Foin de Luzerne (valeur moyenne) (digestibilité M.O. = 56 - matières azotées 19,6 % M.S.)	3 h.	2,35	7,4	31,5	45
Luzerne fraîche :					
1) <i>premier cycle de croissance</i> :					
- début floraison (digestibilité M.O. = 71 - mat. azotées = 23,6 % M.S.)	3 h.	3,00	10,7	35,7	54
- pleine floraison (digestibilité M.O. = 61 - mat. azotées = 17,3 % M.S.)	3 h.	1,87	4,6	24,6	26
2) <i>second cycle de croissance</i> (digestibilité M.O. = 62 - mat. azotées = 20,1 % M.S.)	3 h.	2,29	7,9	34,5	52
3) <i>troisième cycle de croissance</i> .. (digestibilité M.O. = 75 - mat. azotées = 21,8 % M.S.)	3 h.	2,18	6,2	28,4	36
Fétuque fraîche :					
<i>premier cycle de croissance</i> (digestibilité M.O. = 75 - mat. azotées = 17,3 % M.S.)	3 h.	2,05	2,7	13,5	

(*) Résidu dégraissé et sec de l'extraction à l'acide trichloracétique.

vons évaluer le pourcentage d'azote protéique provenant des micro-organismes, connaissant le rapport pour les aliments et les contenus de rumen correspondants.

Ainsi, nous trouvons (tableau II) pour la plupart des régimes que le pourcentage moyen d'azote protéique présent sous forme de micro-organismes varie de 51 % (Ray-grass frais) à 26 % (fin du premier cycle de croissance de la Luzerne). Quelques valeurs avec le régime de Fétuque fraîche ne sont pas calculables. Nous avons, dans ce dernier cas, des rapports ADN/N pour les contenus de rumen qui sont égaux ou légèrement supérieurs à ceux de l'aliment. Du point de vue analytique, ce phénomène peut être dû à une dépolymérisation de l'ADN qui n'est plus alors dosé par la méthode utilisée. Du point de vue nutritionnel, il est difficile de dire exactement pourquoi ce phénomène, qui peut avoir quelque importance avec les autres rations, est aussi important avec la Fétuque. Une étude microscopique, faite par N. VODOVAR sur des contenus de rumen provenant d'une vache fistulée consommant du foin de Luzerne, a montré qu'après éclatement des cellules les noyaux sont libérés dans la phase aqueuse et « physiquement » dégradés. Il reste à savoir quelle est la raison de cette dégradation et s'il y a une évolution chimique parallèlement à cette évolution morphologique (dépolymérisation plus ou moins importante). Le travail de Y. NAKAO et K. OGATA (6) permet de le penser.

Si nous considérons les résultats de la cinétique effectuée avec le régime de Ray-grass frais (tableau II), nous remarquons qu'après le repas (entre cinq heures et neuf heures) en dépit de la dilution produite par l'arrivée dans le rumen des aliments frais, il y a une augmentation importante de la microflore. Ensuite, il y a une diminution jusqu'à une valeur moyenne relativement constante. Ceci peut être dû à l'autolyse des micro-organismes se produisant après la phase de multiplication active. Les faibles pourcentages trouvés avec certaines rations sont peut-être la conséquence de l'échantillonnage effectué trois heures après le repas. Reportant ces valeurs dans des cinétiques telles que celle effectuée avec le Ray-grass, nous trouverions des chiffres d'au moins 50 % pour le taux de conversion de l'azote alimentaire en azote microbien.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux de Mc DONALD (3), qui estimait que le pourcentage de transformation dans le rumen était de 90 % pour la caséine et 40 % pour la zéine du maïs, et à ceux de WELLER et al. (8) qui a évalué à 61-82 % l'azote végétal transformé en azote microbien.

Il faut remarquer que nos chiffres, compte tenu des réserves faites sur le dosage de l'ADN, donnent des valeurs minima. En outre, à cause de notre méthode de prélèvement qui nous fournit des aliments à différents stades de la digestion, nous pouvons penser que la fraction quittant le rumen contient davantage de micro-organismes qu'il paraît ici. La quantité d'azote alimentaire qui n'est pas transformée dans le rumen devrait, dans ces conditions, être très faible.

G. FAUCONNEAU et B. GAUSSERES.
Avec la collaboration technique de Eliane PENOT,
et Madeleine FOREIGNON.

*Laboratoire des Métabolismes,
Centre National de Recherches Zootechniques,
Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise) France.*

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) BOIVIN (A.), in CHARGAFF (E.), DAVIDSON (J.-N.) (1955) : « The nucleic acids », *New-York Academic Press inc.*, 2, 14.
- (2) DAVIDSON (J.-N.) (1960) : « La biochimie des acides nucléiques », Paris, Dunod Editeur, 60-62.
- (3) Mc DONALD (I.-W.) (1954) : *Biochem. J.*, 56, 120-125 .
- (4) Mc DONALD (I.-W.), HALL (R.-J.) (1957) : *Biochem. J.*, 67, 400-405.
- (5) FAUCONNEAU (G.), GAUSSERES (B.) (1961) : *VIII Internationaler Tierzucht-Kongress Hamburg*, 32-34.
- (6) NAKAO (Y.), OGATA (K.) (1963) : *Agric. Biol. Chem.*, 27, 116-120, 199-206, 292-300, 491-517.
- (7) VENDRELY (R.) (1946) : « Un symposium sur les protéines », Paris, Masson et Cie, p. 165.
- (8) WELLER (R.-A.), GRAY (F.-V.), PILGRIM (A.-F.) (1958) : *Brit. J. Nutr.*, 12, 421-429.