

AZOTE URÉIQUE ET ACTIVITÉ BACTÉRIENNE IN VITRO AU NIVEAU DU RUMEN (1)

I. — EFFET DE L'URÉE SUR LA DIGESTION DES GLUCIDES D'UNE PAILLE DE BLÉ ET D'UNE FARINE DE LUZERNE DÉSHYDRATÉE

PAR

S. Z. ZELTER et **Françoise LEROY** (2)

Laboratoire de Recherches de Zootechnie
Institut National Agronomique, Paris.

INTRODUCTION

On sait que la salive du ruminant renferme normalement de l'urée, qui serait selon McDONALD (1) indispensable à une utilisation digestive convenable des fourrages grossiers, en particulier lorsque ceux-ci constituent le régime exclusif. Mais WEINSTEIN et McDONALD (2) ainsi que BELASCO (3) plus récemment, affirment que des doses élevées d'urée inhiberaient l'activité bactérienne dans le rumen.

Les travaux de CHALMERS et coll. (4-5) sont particulièrement convaincants : chez le ruminant, l'efficacité d'une source azotée est d'autant plus grande que sa résistance à la désamination bactérienne dans la panse est plus élevée. Cette constatation se trouve corroborée par PHILLIPSON (6) selon lequel l'utilisation de la caséine administrée au mouton directement dans le duodénum est nettement meilleure que lorsque cette substance est introduite dans le rumen.

Ces faits et le rôle fondamental attribué à la flore bactérienne des réservoirs gastriques du ruminant dans la dégradation du bol alimentaire nous ont conduits à rechercher (3) de plus amples informations concernant le point suivant :

— dans quelle mesure l'addition de doses variables d'un corps azoté simple tel que l'urée est-elle susceptible d'améliorer ou non, compara-

(1) Travail effectué avec le concours financier de l'Office national industriel de l'Azote.

(2) Avec la collaboration technique de M. NAVILLE et Ch. DUMAY.

(3) Communication au 4^{ème} Congrès international de Nutrition, Paris Juillet 1957, p. 89.

tivement à d'autres sources azotées plus complexes, la dégradation digestive des constituants membranaires de fourrages soit très pauvres soit relativement riches en protides, c'est-à-dire de stimuler ou d'inhiber l'activité bactérienne au niveau du rumen.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

La technique du rumen artificiel a été employée. Des essais préliminaires sur la cinétique du processus digestif *in vitro* en milieu de panse nous ont conduits à adopter pour l'établissement du bilan de chaque épreuve une durée de 48 heures ; dans ces essais 23 g de matière sèche de deux farines de luzerne déshydratée ont été utilisés comme substrat. Leurs résultats (tableau I) montrent que la dislocation des membranes végétales et des glucides atteint son maximum après une vingtaine d'heures d'incubation et plafonne ensuite quelle que soit la durée de celle-ci, mais 32 heures au moins sont nécessaires pour stabiliser dans le milieu les concentrations en acides gras volatils. Ce qui rend parfaitement admissible la validité de bilans d'activité bactérienne établis au bout de 48 heures d'incubation.

Pour assurer une reproductibilité satisfaisante des résultats, nous avons utilisé un inoculum provenant d'un lot homogène de moutons de race Wurtemberg, nourris exclusivement avec un foin de luzerne de même provenance. Pour chaque essai, deux sujets ont été abattus 15 heures après le dernier repas ; le contenu de panse a été utilisé aussitôt, après filtration sur six épaisseurs de mousseline. En règle générale 250 cc d'inoculum ainsi préparé et 200 cc de salive artificielle composée selon la formule de MCDUGALL (7) ont servi à ensemercer environ 23 g de matière sèche de substrat.

Les critères adoptés pour apprécier l'effet des traitements sur l'activité bactérienne *in vitro* sont : cellulolyse, taux de disparition de glucides réducteurs totaux après hydrolyse, uréolyse, apparition de NH_3 , d'acides gras volatils et lactique.

Les techniques analytiques suivantes ont été appliquées : la méthode de KURSCHNER et HOFFER (8) pour doser la cellulose vraie, et la cuprimétrie selon BERTRAND (9) pour la détermination des sucres réducteurs totaux après 4 heures d'hydrolyse à l'ébullition ; l'urée a été dosée pondéralement par précipitation au xanthidrol d'après la technique de Fosse modifiée par MESTREZAT et JANET (10) ; l'azote ammoniacal a été déterminé par microdiffusion à froid selon CONWAY (11), et l'acide lactique par colorimétrie à l'aide de la méthode BARKER et SUMMERSON (14) modifiée par BARNETT (15) et reposant sur la réaction de *p*-hydroxydiphényl.

TABLEAU I

Evolution dans le temps de la digestion in vitro en milieu de panse à 39°C des constituants du substrat de luzerne.

Temps de digestion en heures	pH		Constituants disparus en %		Constituants apparus en g									
	Exp. a	Exp. b	Cellulose K		Glucides réducteurs totaux après hydrolyse		Acide acétique		Acide propionique		Acide butyrique		Acide lactique	
			Exp. a	Exp. b	Exp. a	Exp. b	Exp. a	Exp. b	Exp. a	Exp. b	Exp. a	Exp. b	Exp. a	Exp. b
0,0'	7,2	7,2	0,0	0	0	0	0,659	0,435	0,069	0,128	0,024	0,057	0,0	0,0
2,30'	7,0	7,1	0,0	50,8	55,7	1,283	2,095	0,349	0,725	0,066	0,180	0,138	0,0	0,0
5,00'	6,9	6,8	8,0	62,9	55,0	1,810	2,348	0,512	1,329	0,157	0,365	0,181	0,0	0,0
8,00'	6,1	6,6	9,0	70,7	50,1	2,700	2,402	0,724	1,370	0,210	0,480	0,061	0,0	0,0
20,00'	5,6	6,3	29,4	69,1	68,6	3,660	3,908	1,273	1,636	0,410	0,383	0,0	0,0	0,0
32,00'	5,2	5,7	27,7	70,3	69,3	4,275	4,032	1,248	1,773	0,341	0,405	0,0	0,0	0,0
48,00'	5,2	5,7	29,9	76,2	69,5	4,130	4,010	1,450	1,880	0,441	0,353	0,0	0,0	0,0

Pour le dosage des acides gras volatils, nous avons eu recours à la technique de chromatographie de partage gaz-liquide préconisée par JAMES et MARTIN (12) et que nous avons légèrement modifiée, en nous inspirant de la technique d'ELSDEN (13) afin de mieux l'adapter à nos conditions expérimentales : la solution aqueuse d'acides gras volatils obtenue par distillation selon FRIEDMANN (16) est évaporée à sec ; le résidu est repris par quelques gouttes d'eau, puis additionné progressivement de sulfate acide de potassium anhydre finement broyé, jusqu'à acidification du contenu, signalée par un virage au rose ; il est élué rapidement à plusieurs reprises avec de petites quantités d'un mélange préparé avec 5 p. 100 de butanol et 95 p. 100 de chloroforme purifiés ; l'éluat est transvasé dans une fiole jaugée de 25 à 50 cc selon le cas. Suivant sa richesse en acides gras, on en prélève avec une micropipette 0,2 à 0,3 cc que l'on introduit dans le micromatras surmonté de la colonne à chromatographie, on plonge le tout dans un bain-marie dont la température est très légèrement en-dessous du point de distillation du chloroforme ; la suite des opérations est exécutée selon la méthode originale.

A. — Action de doses croissantes d'urée

Afin de savoir si l'adjonction d'urée exerçait une action quelconque sur la dégradation bactérienne des fourrages, deux substrats totalement différents ont été utilisés :

— l'un pauvre, une paille de blé dont la matière sèche dosait 0,54 p. 100 de N total, 39,7 p. 100 de cellulose Kurschner, et 35,1 p. 100 de glucides réducteurs totaux ;

— l'autre riche, une farine de luzerne déshydratée d'excellente qualité et dont la matière sèche renfermait respectivement 4,99 p. 100, 10,2 p. 100 et 19,6 p. 100.

L'urée ajoutée à ces substrats a été expérimentée suivant le cas aux taux de 0-2-3-4 ou 5 p. 100. Dans chaque épreuve, le substrat non additionné d'urée (0 p. 100 d'urée) servait de témoin positif et le mélange inoculum-salive constituait le témoin négatif.

Substrat et urée ont été mis en incubation pendant 48 heures dans un appareil décrit dans une publication antérieure (18), en présence de liquide de panse et de salive tampon, après saturation du milieu en CO₂.

Résultats et Interprétation

Il importe d'abord de signaler qu'aucun des milieux d'expérience ne renfermait d'acide lactique décelable.

Les tableaux II et III mettent en évidence la réaction *in vitro* de l'activité bactérienne à un apport de doses croissantes d'urée, réaction que reflète l'intensité de la digestion des fourrages expérimentés.

TABLEAU II

*Bilan de l'activité bactérienne
sous l'effet des doses croissantes d'urée.*

Taux d'urée ajoutée au substrat (10)	Substances disparues en %			Substances apparues g				
	Uréolyse	Cellulose K	Glucides réducteurs totaux	NH ₃ en mg.	Acides gras volatils en grammes			
					Acétique	Propion.	Butyrique	Totaux
a) Substrat riche : farine de luzerne déshydratée (moyennes des expériences 4 et 5)								
0	—	42,2	78,2	62	2,70	1,35	0,40	4,45
2	85,4	51,6	80,6	285	2,72	1,57	0,53	4,82
3	96,9	49,6	83,4	374	2,99	1,56	0,49	5,04
4	97,8	49,2	86,5	471	2,96	1,41	0,43	4,80
5	98,9	41,8	85,3	576	2,81	1,31	0,38	4,50
b) Substrat pauvre : paille de blé (moyennes des expériences 7 et 8)								
0	—	24,3	32,8	0	1,91	1,11	0,33	3,35
2	96,6	31,4	35,5	114	2,55	1,23	0,33	4,11
3	94,5	38,7	41,2	227	2,32	1,11	0,25	3,68
4	93,4	36,3	39,4	297	1,87	1,28	0,31	3,46
5	92,9	30,0	39,9	448	2,23	0,86	0,19	3,28

TABLEAU III

*Effet comparé par rapport au témoin non traité,
de l'addition de doses croissantes d'urée.
(Résultats exprimés en p. 100 du témoin positif.)*

Taux d'urée ajoutée au substrat (%)	a) Substrat riche : luzerne			b) Substrat pauvre : paille de blé		
	Disparu		Apparu	Disparu		Apparu
	Cellulose K	Glucides réduc- teurs totaux	Acides gras volatils totaux	Cellulose K	Glucides réduc- teurs totaux	Acides gras volatils totaux
0 (témoin)	100	100	100	100	100	100
2	122,0	103,0	108,3	129,1	108,2	128,8
3	117,6	106,5	113,2	159,2	125,6	112,0
4	116,5	110,6	108,0	149,1	120,0	103,4
5	99,1	109,0	101,1	123,3	121,8	98,0

Il se dégage des données ci-dessus qu'en milieu de rumen artificiel :

— la conversion de l'urée en ammoniac est quasi totale (85,4 à 98,9 p. 100) ; (une expérience préalable a montré que le processus uréolytique est très rapide *in vitro* : 61 à 74 p. 100 après 2 h. 1/2, 85 à 96 p. 100 après 8 heures d'incubation) ; l'ammoniac libéré croît proportionnellement aux doses d'urée introduite et la nature du substrat ne paraît pas

modifier l'uréolyse. Connaissant la rapidité du passage de cet ammoniac dans le circuit sanguin, des toxicoses sont à craindre chez l'animal par suite d'une ingestion de doses massives d'urée susceptible d'entraîner une élévation brutale du taux de ce métabolite au-dessus du seuil de tolérance physiologique (19) ;

— la présence de N uréique exerce une action bénéfique notable sur l'activité de la microflore du rumen : la dégradation glucidique en

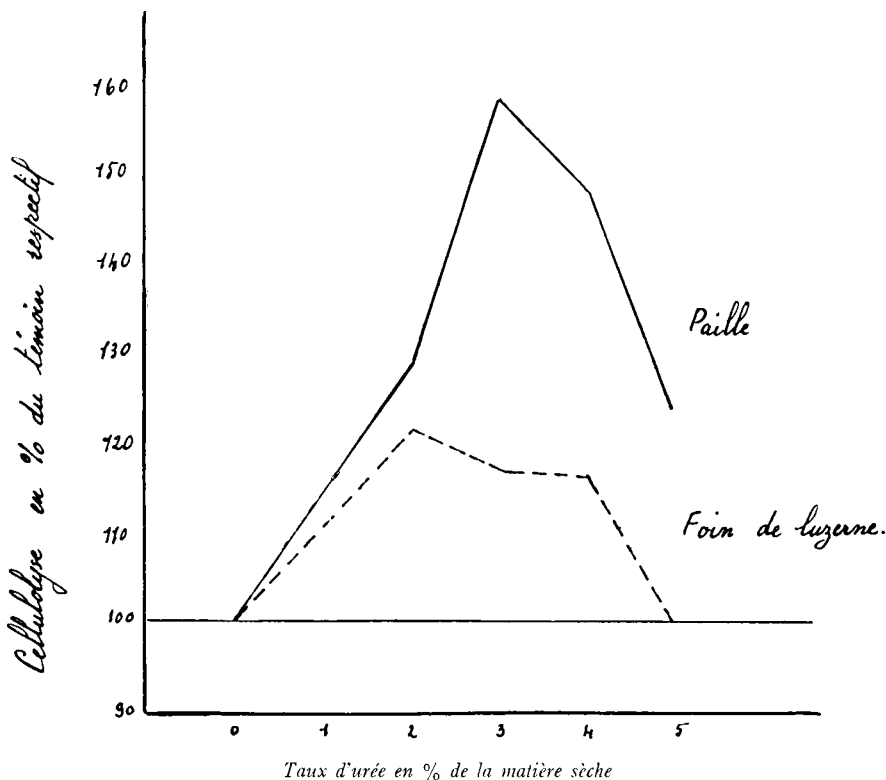


Fig. 1.

général et la cellulolytique en particulier est d'autant plus intense que le fourrage est pauvre en protides. L'effet maximum est observé pour des taux d'urée ne dépassant pas 2 p. 100 dans le cas du substrat riche en azote (farine de luzerne) et 3 p. 100 dans celui de substrat pauvre (paille de blé). Des taux supérieurs produisent un effet nettement dépressif (fig. 1). La formation d'acides gras volatils épouse la même allure que la dislocation glucidique ; mais le faciès fermentaire que traduit la répartition de ces acides n'est que fort peu modifié par la dose d'urée (tableau IV).

Ces phénomènes *in vitro* concernant l'effet inhibiteur sur l'activité

des bactéries du rumen exercé par des concentrations élevées d'urée sont par conséquent, en accord avec les suppositions de certains auteurs (2,3),

TABLEAU IV

Répartition centésimale des acides gras volatils individuels.

Taux d'urée ajoutée %	a) Substrat luzerne			b) Substrat paille de blé		
	Acide acétique	Acide propionique	Acide butyrique	Acide acétique	Acide propionique	Acide butyrique
0	60,6	30,4	9,0	56,9	33,2	9,9
2	56,5	32,6	10,9	61,9	30,0	8,1
3	59,4	30,9	9,7	63,0	30,5	6,5
4	61,8	29,4	8,8	53,5	37,5	9,0
5	62,4	29,2	8,4	67,7	26,4	5,9

B. — Action comparée de l'urée et de sources d'azote complexe.

Les faits ci-dessus nous ont incités à observer si l'adjonction de sources de N, plus complexes que l'urée avaient un effet analogue à celui de cette dernière sur la dégradation bactérienne des glucides membranaires et cytoplasmiques des fourrages grossiers.

TABLEAU V

Composition des milieux en comparaison.

Milieu	Substrat	Source de N	Compléments glucidiques		N total (mg)	Cellulose K (g.)	Glucides réduct. totaux (g.)
			Rognures de papier filtre (g.)	Amidon de pomme de terre (g.)			
a	25 g de paille	aucune.....	0,475	1,620	129,5	9,35	8,94
b	25 g de paille	urée (0,75 g).....	0,475	1,620	478,1	9,41	8,78
c	25 g de paille	t. d'arach. (4,65 g)..	0,116	0,452	477,8	9,44	9,31
d	25 g de paille	f. poisson (3,32 g)..	0,475	1,620	501,8	9,47	8,78
e	25 g de paille	levure sèche de distill. (5,23 g)....	0	0	477,3	9,37	8,96

Au cours de deux séries d'expériences, une comparaison a été effectuée dans ce dessein, selon la technique de digestion *in vitro* entre urée, tourteau d'arachide, farine de poisson et levure sèche de distillerie. Le substrat était constitué par 25 g de paille de blé ; les sources de N en comparaison y ont été ajoutées en quantités assurant dans les divers milieux une concentration d'azote équivalente à celle de 3 p. 100 d'urée, taux paraissant stimuler au maximum l'activité bactérienne. Ces milieux isoprotidiques qui différaient uniquement par la source de N introduite, ont été rendus également isoglucidiques au moyen d'une adjonction adéquate de rognures de papier filtre et d'amidon de pommes de

terre (tableau V). Chaque épreuve comportait comme déjà indiqué, un témoin positif (milieu de rumen et substrat non additionné de N) et un témoin négatif (milieu de rumen exempt de substrat et d'urée) d'après lequel ont été corrigés les résultats.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les tableaux VI et VII rapportent les résultats moyens de nos mesures.

Soulignons tout d'abord que ces données confirment notre précédent résultat (voir tableaux II et III) montrant que l'adjonction de N uréique (478 mg) à la paille de blé (*b*) améliore fortement le rendement de la dégradation bactérienne de la fraction glucidique de ce fourrage : par rapport au témoin non additionné de N (*a*), cette amélioration ressort à 46,8 p. 100 pour les constituants cellulosiques, 24 p. 100 pour les glucides réducteurs totaux et 24 p. 100 pour les acides gras volatils totaux. Il est intéressant d'y opposer l'accroissement de seulement 9 p. 100 du taux de la cellulolyse que procure l'addition d'une quantité identique d'azote, sous forme de tourteau d'arachide (*c*) de farine de poisson (*d*) ou de levure (*e*) (tableau VI). C'est donc bien l'azote uréique qui exerce un effet stimulant particulier sur l'activité des microorganismes de la panse. Cette action spécifique de l'urée paraît d'autant plus probable que les milieux *b* (urée) et *d* (farine de poisson) diffèrent entre eux exclusivement par l'origine de leur azote, tous les autres constituants y étant identiques et aux mêmes doses (paille de blé, amidon, papier filtre). Cependant, dans le cas de l'arachide (*c*) et de la levure (*a*), le taux de disparition des glucides réducteurs totaux est difficile à interpréter en raison de la nature vraisemblablement distincte de ces derniers apportés dans les milieux par les deux sources de N en question, et qui se sont ajoutés à ceux du substrat proprement dit.

L'examen des concentrations des milieux en azote ammoniacal permet de relever un fait frappant concernant l'action de la source azotée sur l'ammoniogénèse en présence de liquide de panse : le pourcentage d'azote introduit et retrouvé sous forme de N ammoniacal en fin d'incubation, représente pour : l'urée 34,3 p. 100 ; l'arachide, 19,8 p. 100 ; la farine de poisson 2 p. 100 et la levure 2,8 p. 100. En défalquant dans le cas de l'arachide, l'azote provenant du substrat (paille de blé) qui n'a pas donné lieu à une libération d'ammoniac, on remarque que la désamination par les microorganismes du rumen des protides propres à ce produit est relativement intense puisqu'elle atteint en fait un niveau voisin de celui de l'urée (27,3 p. 100 contre 34,3 p. 100). Cette désamination protidique explique (17) la formation de quantités plus élevées d'acides gras volatils en présence d'azote d'arachide qu'en celle de N

TABLEAU VI

Influence de la source d'azote sur la digestion in vitro des glucides de paille de blé et sur l'ammoniogénèse par un inoculum de rumen de mouton

Milieu	Substrat	Substances disparues				Substances apparues					
		Source d'azote		Cellulolyse en %	Glucides réducteurs totaux en %	Acides gras volatils en g				Total	Acide lactique g
		N ammoniacal mg		Acétique	Propionique	Butyrique	Valériannique				
a	Paille	Aucune	18,6	40,4	2,05	1,08	0,35	0,03	3,51	0	
b	Paille	Urée	27,3	50,2	2,63	1,29	0,40	0,03	4,35	0	
c	Paille	t. d'arachide	20,3	46,9	2,61	1,60	0,70	0,12	5,03	0	
d	Paille	f. de poisson	20,2	47,3	2,26	1,24	0,40	0,03	3,99	0	
e	Paille	levure sèche de distillerie	20,4	44,2	2,40	1,78	0,59	0,0	4,17	0	

TABLEAU VII

Effet de la source d'azote sur la répartition des acides gras volatils formés (en % de l'acidité volatile totale)

Substrat	Source d'azote	Acétique	Propionique	Butyrique	Valériannique
Paille	Aucune	58,6	39,9	9,8	0,7
Paille	Urée	60,4	29,7	9,3	0,6
Paille	t. d'arachide	52,2	31,3	14,5	2,0
Paille	f. de poisson	56,4	31,5	11,5	0,6
Paille	levure	57,2	28,4	14,4	0,0

uréique (5,03 contre 4,35 g) malgré une cellulolyse et une glycolyse plus faibles (20,3 p. 100 contre 27,3 p. 100 et 46,9 p. 100 au lieu de 50,2 p. 100). Notre observation *in vitro* est en accord avec la constatation *in vivo* de CHALMERS et coll. (4-5) chez le mouton, montrant que le tourteau d'arachide subissant une forte désamination dans le rumen, son azote a, pour le ruminant, une valeur biologique amoindrie. En revanche, la farine de poisson et les levures dont les protides ne libèrent pour ainsi dire pas d'ammoniac en milieu de rumen (tableau VI) possèdent de ce fait une efficacité azotée supérieure à l'arachide, pour cette espèce animale.

Nos résultats suggèrent de plus que les « disponibilités actuelles » de la panse en N ammoniacal pourraient constituer un facteur important d'activité bactérienne et, par voie de conséquence, de dégradation digestive des membranes végétales de fourrages grossiers particulièrement pauvres en azote. En cela, notre supposition rejoint celle de BURROUGHS et coll. (20).

Notons enfin qu'en comparaison avec l'azote uréique, celui de l'arachide, de la farine de poisson ou de la levure exerce une action légèrement dépressive sur la formation d'acide acétique au profit de celle d'acide butyrique (tableau VI).

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

La technique de rumen artificiel nous a permis d'étudier l'effet de doses croissantes d'urée comparativement à d'autres sources de N (arachide, farine de poisson, levures sèches de distillerie) sur la dégradation bactérienne *in vitro* des glucides d'un fourrage riche (farine de luzerne déshydratée) ou pauvre (paille de blé) en protides.

Nos résultats montrent que :

— des doses d'urée ne dépassant pas 3 p. 100 de la matière sèche du substrat exercent une action spécifique positive d'autant plus remarquable sur la dislocation glucidique en milieu de rumen, que le fourrage est pauvre en azote ; des pourcentages plus élevés inhibent l'activité des microorganismes du rumen ;

— des sources d'azote plus complexes (arachide, farine de poisson levure) exercent un effet nettement moins bénéfique que l'azote uréique ;

— en milieu de panse, les protides d'arachide subissent une importante désamination bactérienne ; ce qui laisse supposer qu'en tant que source d'azote, l'efficacité de cet aliment est moindre chez le ruminant que celle de la farine de poisson et de la levure qui, dans les mêmes conditions ne libèrent, pour ainsi dire, pas d'ammoniac au niveau du rumen.

Reçu pour publication le 17 février 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) McDONALD (I. W.). — *Biochem. J.*, 1948, **42**, 584.
 - (2) WEINSTEN (Z.), McDONALD (A.). — *Science*, 1945, **101**, 44-45.
 - (3) BELASCO (I. J.). — *J. An. Sci.*, 1954, **13**, 739.
 - (4) CHALMERS (M. I.), SYNGE (R. L. M.). — *J. Agric. Sc.*, 1954, **44**, 263.
 - (5) CHALMERS (M. I.), CUTHBERSON (D. P.), SYNGE (R. L. M.). — *J. Agric. Sci.*, 1954, **44**, 254.
 - (6) PHILLIPSON (A. T.). — Cité par 5.
 - (7) MCDUGALL (E. J.). — *Biochem. J.*, 1948, **43**, 99.
 - (8) KURSCHNER (K.), HOFFER (A.). — *Tech. Chem. Papier Zelst. Fab.*, 1929, **26**, 125-139 et 1934, **31**, 14.
 - (9) BERTRAND (G.), THOMAS (P.). — Guide pour la manipulation de Chimie Biologique (Dunod éd.). Paris, 1919, p. 85.
 - (10) FOSSE, voir *Diagnostics biologiques et fonctionnels*, par FIESSINGER (N.), OLIVIER (H. R.), HERBAIN (M.) (édit. Maloine). Paris, 1949, p. 607.
 - (11) CONWAY (E. J.). — *Microdiffusion analysis and volumetric error* 3^e éd. 1950 (éd. Crossby, London).
 - (12) JAMES (A. T.), MARTIN (J. P.). — *Biochem J.*, 1951-52, **50**, 679.
 - (13) ELSDEN (S. R.). — *Biochem. J.*, 1946, **40**, 252.
 - (14) BARKER (S. B.), SOMMERSON (W. H.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, **138**, 535.
 - (15) BARNETT (A. J. G.). — *Biochem. J.*, 1951, **49**, n^o 4, 527.
 - (16) FRIEDMANN (T. E. J.). — *Biol. Chem.*, 1938, **123**, 165.
 - (17) EL SCHALZY (K.). — *Biochem. J.*, **51**, 640, 1952.
 - (18) FAUCONNEAU (G.), FRANÇOIS (A. C.), LEROY (A. M.), ZELTER (S. Z.). — *Ann. de Zootechnie* 1953, **2**, n^o 4, 275 (adressé pour publication le 1/1958).
 - (19) DINNING (J. S.), BRIGS (H. M.), GALLUP (W. D.), ORR (H. W.), BUTTLER (R.). — *Amer. J. of Physiology*, 1948, **153**, 41.
 - (20) BURROUGHS (W.), ARIOS (C.), DE PAUL (P.), GERLOUP, BETHKE (R. M.). — *J. Anim. Sci.*, 1951, **10**, n^o 3, 672.
-