

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

II. — ESSAI DE DÉTERMINATION IN VITRO D'UN INDEX DE RÉTENTION BACTÉRIENNE

PAR

S. Z. ZELTER et Françoise LEROY (2)

Laboratoire de Recherches de Zootechnie
Institut National Agronomique, Paris.

INTRODUCTION

Les remarquables études *in vitro* de PEARSON et SMITH (1) ont les premières fait entrevoir la possibilité d'une synthèse bactérienne de protéines dans la panse à partir d'azote non différencié. Depuis, McDONALD (2) a démontré le passage dans le sang au niveau de cet organe, de l'ammoniac métabolique et la conversion de ce dernier dans le foie, en urée ; une faible fraction de celle-ci (un peu moins du huitième de N absorbé à l'état de NH_3) ferait retour par la voie salivaire dans les réservoirs gastriques où elle serait utilisée par la microflore. LEWIS (3) constate de son côté tout récemment chez le mouton l'absence d'ammoniac dans le sang périphérique (sauf état normal), ce qui rend plausible la thèse du stockage hépatique ; il relève le fait qu'en cas d'accroissement de la concentration en ammoniac dans le rumen, la perte d'urée par voie urinaire augmente, en même temps que s'élève sensiblement la quantité de N qui retourne par la salive dans le tractus gastrique.

Dans ces conditions et étant donnée l'extrême rapidité du processus uréolytique observé par nous expérimentalement, on pouvait se demander si, en fait, les microorganismes du rumen ne se trouvaient pas dans l'impossibilité matérielle d'utiliser correctement l'azote uréique, qui pour sa plus grosse part, serait ainsi perdu pour l'hôte animal. Nous avons, par conséquent, tenté d'évaluer la fraction d'azote uréique susceptible d'être retenue par la flore bactérienne de la panse aux fins de synthèse protéique.

(1) Recherche poursuivie avec le concours financier de l'O. N. I. A.

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

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

La méthode directe des bilans *in vivo* constituerait certes la technique idéale de mesure de la fraction N uréique utilisable par les ruminants ; mais elle n'est guère réalisable momentanément pour de nombreuses raisons : difficulté d'échantillonner correctement le contenu du rumen dont les concentrations en métabolites sont sujettes à des fluctuations continues ; impossibilité d'apprécier avec exactitude la vitesse du flux sanguin de la veine porte, le volume de l'excrétion salivaire et la réserve uréique rénale ; ignorance de l'amplitude de l'absorption de l'ammoniac à partir du rumen et du taux de sa conversion subséquente en urée. Cette méconnaissance actuelle des facteurs ci-dessus rend impossible l'établissement *in vivo* d'un bilan précis d'utilisation de l'azote ammoniacal. La simultanéité ou la succession très rapide des phénomènes d'hydrolyse, de resynthèse et d'absorption quasi immédiate au niveau de la panse de substances issues du catabolisme bactérien compliquent en outre singulièrement le problème.

La méthode indirecte de mesure, bien que ne reproduisant pas fidèlement les conditions physiologiques *in vivo*, permet néanmoins de recueillir des indications intéressantes qui aident à se faire une idée approximative du phénomène. Elle a été employée avec succès d'abord par PEARSON et SMITH (1), puis par Mc NAUGHT et coll. (4) qui ont adopté pour index de croissance bactérienne le taux de diminution de N non protéique dans du liquide pur de rumen après 4 heures d'incubation à 37-39°.

TABLEAU I
Évolution in vitro de l'uréolyse en milieu de rumen.

Durée de la digestion in vitro (en heures)	Substrat synthétique (cérélose, papier filtre, amidon de pomme de terre, cendres de farine de luzerne) + 1,28 g d'urée		Substrat naturel (farine de luzerne deshydratée) + 1 g d'urée.	
	Uréolyse %	NH ₃ retrouvé (mg)	Uréolyse %	NH ₃ retrouvé (mg)
2,30'	74,4	0,518	61,1	0,225
5,00'	76,2	0,520	80,2	0,348
8,00'	85,5	0,546	96,4	0,380
24,00'	85,3	0,484	95,3	0,387

Nos recherches préliminaires sur la cinétique de l'uréolyse (tableau I) nous ont cependant prouvé que, pour être quasi complète en milieu de rumen artificiel, celle-ci exige au moins 8 heures, mais la stabilisation des autres produits du catabolisme bactérien du substrat en demandent environ 32 (voir mémoire I) ; le délai de 4 heures admis par les auteurs précités, nous a dès lors paru insuffisant pour mesurer *in*

vitro le taux de rétention bactérienne de N uréique, et nous avons trouvé raisonnable d'adopter pour nos épreuves une durée de 48 heures.

Au cours de nos 8 expériences réalisées par la technique de rumen artificiel, des doses variables d'urée (0, 2, 3, 4 ou 5 p. 100) ont été incorporées dans trois substrats distincts :

1° Un mélange synthétique (23,75 g) totalement exempt d'azote et constitué comme suit : cérélose — 18,7 p. 100, amidon de pomme de terre — 36,7 p. 100, rognures de papier filtre — 26,7 p. 100, cendres de farine de luzerne déshydratée (calcinée à 550°C) — 12,6 p. 100, sulfate de sodium (10 H₂O) — 5,3 p. 100.

2° Une paille de blé (25 g) dont la matière sèche dosait 0,54 d'azote Kjeldahl.

3° Une farine de luzerne déshydratée (25 g) dont la matière sèche renfermait 4,99 p. 100 de N Kjeldahl.

Ces milieux ont été additionnés d'inoculum de panse de mouton et de salive tampon et maintenus pendant 48 heures dans l'incubateur à 39°C (pour les détails de la technique, voir mémoire I). Chaque expérience comportait un milieu témoin contenant le même substrat non additionné d'urée, qui servait de terme de comparaison et permettait de corriger les résultats enregistrés en présence d'urée. Nous avons dosé dans les divers milieux N uréique introduit, N uréique résiduel et N ammoniacal retrouvés en fin d'épreuve (pour les techniques analytiques voir mémoire I).

Nous avons admis conventionnellement que la différence entre l'azote uréique disparu et celui retrouvé à l'état ammoniacal dans le milieu représente la fraction retenue par les microorganismes du rumen ; et nous avons essayé de calculer à l'aide des 2 formules ci-après, l'index de rétention bactérienne de N uréique :

1° Index (en p. 100) de rétention bactérienne brute =

$$\frac{\left(\begin{array}{c} \text{N uréique} \\ \text{introduit} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{N uréique} \\ \text{résiduel} \end{array} - \begin{array}{c} \text{N uréique} \\ \text{résiduel témoin} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{N ammoniacal} \\ \text{retrouvé} \end{array} - \begin{array}{c} \text{N ammoniacal} \\ \text{retrouvé témoin} \end{array} \right)}{\text{N uréique introduit.}} \times 100$$

2° Index (en p. 100) de rétention bactérienne nette =

$$\frac{\left(\begin{array}{c} \text{N uréique} \\ \text{introduit} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{N uréique} \\ \text{résiduel} \end{array} - \begin{array}{c} \text{N uréique} \\ \text{résiduel témoin} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{c} \text{N ammoniacal} \\ \text{retrouvé} \end{array} - \begin{array}{c} \text{N ammoniacal} \\ \text{retrouvé témoin} \end{array} \right)}{\text{N uréique disparu.}} \times 100$$

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de nos calculs effectués selon les formules indiquées plus haut sont rapportés dans le tableau II.

Si l'on considère avec PEARSON et SMITH la diminution de l'azote non protéique en présence de liquide de panse comme preuve de synthèse importante de protéine bactérienne (1) nos propres données expé-

TABLEAU II

Index de rétention bactérienne d'azote uréique (Exp. 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10)

Expérience N°	Durée en heures	Substrat (25 g.)	Pourcentage d'urée introduite	N uréique introduit mgs.	N uréique résiduel mgr.	Uréolyse %	N uréique disponib. mg.	N ammoniacal apparu mg.	Rétention bactérienne	
									Brute %	Nette %
2 b.....	48	Synthétique	5	581	46,3	92,03	534,6	370,6	28,24	30,69
3 a.....	48	Synthétique	3	348,6	88,1	74,73	260,5	182,3	22,43	30,02
3 b.....	48	Synthétique	4	404,8	83,4	82,06	381,4	271,8	23,58	28,74
Moyenne						82,94			24,75 ± 1,78	29,82 ± 0,58
4 a.....	48	f. de luzerne	2	232,4	29,3	87,39	203,1	160,6	18,54	21,22
4 b.....	48	f. de luzerne	3	308,6	0	100,00	348,6	255,0	26,85	26,85
4 c.....	48	f. de luzerne	4	464,8	5,6	98,80	459,2	310,0	32,09	32,49
4 d.....	48	f. de luzerne	5	581,0	3,3	99,43	577,7	418,0	27,48	27,64
5 a.....	48	f. de luzerne	3	348,6	38,3	89,01	310,3	266,0	12,71	14,28
5 b.....	48	f. de luzerne	4	404,8	31,8	93,16	433,0	302,3	15,21	16,32
5 c.....	48	f. de luzerne	5	581,0	41,8	95,58	535,3	420,8	23,15	24,22
Moyenne						94,77			22,29 ± 2,67	23,29 ± 2,45
7 a.....	48	paille de blé	2	232,4	2,4	98,97	230,0	154,8	32,30	32,60
7 b.....	48	paille de blé	3	348,6	26,1	92,51	322,5	248,7	21,17	22,88
7 c.....	48	paille de blé	4	464,8	37,9	91,85	426,9	292,3	28,96	31,53
7 d.....	48	paille de blé	5	581,0	56,1	90,34	524,9	416,7	18,62	20,61
8 a.....	48	paille de blé	2	232,4	0	100	232,4	152,8	34,25	34,25
8 b.....	48	paille de blé	3	348,6	0	100	348,6	245,0	29,72	29,72
8 c.....	48	paille de blé	4	464,8	4,7	98,99	460,1	315,8	31,05	31,36
8 d.....	48	paille de blé	5	581,0	7,0	98,79	574,0	440,2	23,03	23,31
9 a.....	48	paille de blé	3	348,6	43,0	87,66	305,6	235,1	20,22	23,00
10 a.....	48	paille de blé	3	348,6	3,5	99,00	345,1	255,7	25,65	25,91
Moyenne						95,81			26,50 ± 1,74	27,52 ± 1,56
Moyenne générale						93,51			24,76 ± 1,32	26,38 ± 1,24

rimentales, corrigées d'après le résultat obtenu avec un témoin identique exempt d'urée, permettent de présumer que la totalité de l'azote uréique catabolisé et non réapparu à l'état d'ammoniac, a effectivement été utilisé aux fins de croissance et de prolifération bactérienne. La constatation que l'introduction d'urée dans ces milieux a fortement activé la catabolisation glucidique du substrat et que cette activation a été d'autant plus forte que ce dernier était déficient en azote (voir tableaux du mémoire I), constitue d'ailleurs un argument en faveur de notre supposition.

Ceci étant admis, il se dégage des résultats du tableau II quelques faits importants :

— Les quantités d'ammoniac formé en milieu de rumen croissent proportionnellement aux doses d'urée introduite ; or, les recherches de ANNICOLAS et coll. (5) concomitantes aux nôtres, montrent en particulier que, dans certaines conditions nutritionnelles, l'urée absorbée, même en faible quantité, pourrait exposer le ruminant à des troubles graves tels qu'une inhibition plus ou moins prolongée de la motricité de la panse. Cette libération massive d'ammoniac constitue donc un danger virtuel pour l'animal ;

— Le taux net de rétention bactérienne de N uréique est fonction des « disponibilités » du milieu en protides ; il est d'autant plus élevé que celui-ci contient peu ou point de formes azotées complexes ; l'index de rétention qui, avec un substrat totalement exempt d'azote (mélange synthétique) est de $29,82 \pm 0,58$, n'est que de $27,52 \pm 1,56$ dans le cas de celui extrêmement pauvre (paille de blé) et s'abaisse à $23,29 \pm 2,45$ en présence d'un autre relativement riche (farine de luzerne) ;

— Bien que la corrélation entre les doses d'urée et l'index de rétention paraisse faible, il semble néanmoins que l'utilisation maximale s'observerait pour des concentrations ne dépassant pas 4 p. 100 ; au taux de 5 p. 100, l'index a tendance à baisser sensiblement ; ce dernier fait est corroboré par la chute de l'activité bactérienne si l'on considère les résultats de la cellulolyse et de la glycolyse des mêmes milieux (voir mémoire I, tableaux II et III) ;

— Abstraction faite de la nature du substrat et de la dose d'urée ajoutée, l'index net moyen de rétention ressort à $26,4 \pm 1,24$; il serait donc relativement faible, bien qu'il ait été observé dans des conditions expérimentales plutôt favorables (puisque en l'absence du phénomène physiologique *in vivo* de l'absorption, les bactéries du rumen disposaient de l'intégralité de l'azote ammoniacal libéré par l'uréolyse) ; nos valeurs sont inférieures à celles obtenues également *in vitro* par Mc NAUGHT et coll. (6), qui estiment à 42 p. 100 la part de protéine bactérienne synthétisée dans le rumen à partir d'azote non différencié ; (remarquons que les milieux d'incubation utilisés par ces auteurs différaient nette-

ment des nôtres car ils étaient constitués de liquide pur de panse, additionné de 1 p. 100 de maltose et de 0,05 p. 100 d'urée). Signalons également la récente affirmation de LEWIS (3) selon laquelle les pertes en N ingéré peuvent atteindre 15 à 30 p. 100 lorsque la concentration en NH_3 dans le rumen est très élevée.

Les conditions peu physiologiques de nos recherches *in vitro* n'autorisent pas une transposition telle quelle *in vivo* de leurs résultats. Ceux-ci n'en constituent pas moins des valeurs indicatives fort plausibles si on les confronte avec les données rapportées dans deux autres publications (7-8) et observées *in vivo* sur des vaches en lactation et des bœufs de boucherie.

Dans leur ensemble, les faits que nous rapportons renforcent l'opinion que l'utilisation de l'urée en tant que source d'azote se fait chez le ruminant avec un gaspillage important, au point qu'il est permis de se demander si l'emploi de cette substance présente un quelconque intérêt dans des conditions normales d'élevage. En cela, nous nous écartons de l'avis beaucoup plus favorable formulé par d'autres auteurs (11, 12, 13, 14) qui ont évalué l'efficacité de l'urée par référence à la caséine ; or, on sait depuis peu (9) que cette dernière substance qui est fortement désaminée par la microflore du rumen perd ainsi une part appréciable de sa valeur biologique ; ce qui a pu contribuer, par conséquent, à fausser les conclusions des chercheurs en question.

Il n'est cependant pas exclu que l'urée puisse devenir une source azotée intéressante pour le ruminant s'il devenait possible soit de contrôler efficacement par addition d'amidon, par exemple, le phénomène de l'absorption de l'ammoniac métabolique au niveau des réservoirs gastriques comme le suggèrent HEAD et ROOK (9) et le gaspillage d'azote par la voie urinaire (10) ; soit d'échelonner dans le temps le processus uréolytique à l'aide de procédés appropriés d'insolubilisation ; l'étude de cette dernière solution est actuellement envisagée par nous.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Il a été essayé de déterminer *in vitro* par la technique du rumen artificiel, un index de rétention bactérienne d'azote uréique. Trois substrats distincts ont été expérimentés : l'un exempt de N (milieu synthétique), un second pauvre (paille de blé) et un troisième riche (farine de luzerne déshydratée). Ces substrats ont été additionnés de doses variables d'urée (0, 2, 3, 4 et 5 p. 100). Après incubation pendant 48 heures à 39°C en présence de liqueur de panse, un bilan de N uréique disparu et de NH_3 retrouvé a été établi. Il a été admis par convention que la différence entre ces deux variables représentait la fraction de N uréique retenue par les microorganismes aux fins de synthèse d'azote protéique.

Il ressort des données *in vitro*, calculées d'après des formules conventionnelles et qui ne sont pas transposables telles quelles *in vivo*, que le taux maximum de rétention bactérienne s'observe pour des doses d'urée ne dépassant pas 4 p. 100 de la matière sèche du substrat. L'index net de rétention semble être fonction des « disponibilités » du milieu en formes azotées complexes : il est le plus élevé en l'absence de celles-ci ($29,82 \pm 0,58$), et décroît avec l'élévation de la teneur protidique des milieux : $27,52 \pm 1,56$ en présence de paille de blé et $23,29 \pm 2,45$ en celle de farine de luzerne déshydratée.

Dans leur ensemble, ces données expérimentales relativement faibles, qui ont une valeur indicative, confirment l'opinion que l'utilisation de l'azote uréique s'effectuerait chez le ruminant avec un énorme gaspillage ; il est, dès lors, permis de se demander si, dans des conditions normales, l'emploi de l'urée présente un réel intérêt en tant que source d'azote pour le polygastrique, sauf dans des cas spéciaux qu'il reste à préciser.

Reçu pour publication le 27 février 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) PEARSON (R. M.), SMITH (J. A. B.). — *Bioch. J.*, 1943, **37**, 142 et 186.
- (2) McDONALD (I. W.). — *Bioch. J.*, 1948, **42**, 584.
- (3) LEWIS (D.). — *J. Agric. Sci.*, 1957, **48**, 438.
- (4) McNAUGHT (M. C.), OWEN (E. C.), SMITH (J. A. B.). — *Bioch. J.*, 1950, **46**, 36.
- (5) ANNICOLAS (D.), LE BARS (H.), NUGUES (J.), SIMONNET (H.). — *Bull. Ac. Veter. France* 1956, 29, 225 ; 257 et 263.
- (6) McNAUGHT (M. C.), SMITH (J. A. B.), KON (K. M. et S. K.). — *Bioch. J.*, 1950, **46**, 32.
- (7) ZELTER (S. Z.), CHARLET-LERY (G.). — *Ann. de Zoot.*, 1958 (sous presse).
- (8) TISSERAND (J. L.), ROUSTAN (A.), ZELTER (S. Z.). — *Ann. de Zoot.*, 1958 (sous presse).
- (9) HEAD (M. J.), ROOK (J. A. F.). — *Proc. Nut. Soc.*, 1957, **16**, 25.
- (10) HEAD (M. J.). — *J. Agric. Sci.*, 1953, **43**, 281.
- (11) HARRIS (L. E.), MITCHELL (H. H.). — *J. Nutr.*, 1941, **22**, 167 et 183.
- (12) WATSON (C. J.), KENNEDY (J. W.), DAVIDSON (W. M.), ROBINSON (C. H.), MUIR (G. W.). — *Sci. Agric.*, 1949, **29**, 173.
- (13) JOHNSON (B. C.), HAMILTON (T. S.), MITCHELL (H. H.), ROBINSON (W. H.). — *J. Anim. Sci.*, 1942, **1**, 236.
- (14) HAMILTON (T. S.), ROBINSON (W. B.), JOHNSON (B. C.). — *J. Anim. Sci.*, 1948, **7**, 26.