

## MÉTABOLISME DE LA FLORE INTESTINALE DU PORC

### INFLUENCE DE LA CHLORTÉTRACYCLINE SUR LE CATABOLISME DU GLUCOSE

M. C. MICHEL

Avec la collaboration technique de Simone BOCHE

*Service de Biochimie et de Nutrition,*

*Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas.*

---

### SOMMAIRE

1. In vitro, la flore microbienne complexe isolée du tractus gastro intestinal du porc fermente le glucose avec production d'acides organiques. La flore stomacale produit notamment de l'acide lactique pendant toute la fermentation. La flore de l'intestin grêle produit d'abord de l'acide lactique, pendant la phase de latence et le début de la phase exponentielle. Cette substance est ensuite dégradée en acides volatils.
2. La chlortétracycline, à la dose de 20 mcg/ml, inhibe ce catabolisme. La dégradation du glucose est ralentie, ainsi que celle de l'acide lactique formé.
3. Cette inhibition est corrélative d'un ralentissement important de la synthèse des protéines microbiennes, et d'une diminution beaucoup plus faible de celle des dérivés nucléiques, pendant la phase de croissance.
4. La fermentation du glucose par différentes souches de lacto-bacilles homofermentaires, isolées de la flore intestinale du porc, est également inhibée par la chlortétracycline.
5. L'épargne d'énergie, observée in vivo chez le porc et due à la chlortétracycline, peut être au moins partiellement, la conséquence de l'inhibition de la fermentation du glucose par la flore microbienne intestinale sous l'influence de l'antibiotique.

---

### INTRODUCTION

Dans les précédentes notes, nous avons montré que la flore intestinale du porc est capable de cataboliser les acides aminés (FRANÇOIS et MICHEL 1955) (MICHEL et FRANÇOIS 1955) (MICHEL et FRANÇOIS, 1956), ainsi que la choline (MICHEL 1956). et que divers antibiotiques, en particulier les tétracyclines, inhibent ce catabolisme. L'action inhibitrice n'est pas limitée au catabolisme des substances azotées. En effet, d'autres auteurs ont montré que le métabolisme énergétique de flores complexes (SIEBURTH et al 1954) ou d'espèces isolées (SHAHANI 1956), est inhibé par les tétracyclines.

Dans l'estomac et l'intestin grêle du porc se trouvent des lactobacilles en flore dominante (BRIGGS et al 1954-1955 — LARSON et HILL 1953-1955; RAIBAUD et al.

1957 — *a-b-c*) ; ces microorganismes catabolisent rapidement les glucides solubles présents dans cette partie du tractus intestinal.

Le présent travail a pour but d'étudier *in-vitro* l'influence de la chlortétracycline sur le catabolisme du glucose par la flore complexe de l'intestin du porc et par diverses souches de lactobacilles isolés de cette flore.

## MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Dès l'abatage de l'animal, le contenu de l'estomac, de l'intestin grêle et du caecum est prélevé. Après homogénéisation, des parties aliquotes sont diluées au 1/10 dans du sérum physiologique. La suspension est filtrée sur gaze, puis on laisse sédimenter les fines particules alimentaires. La suspension décantée est centrifugée 20 minutes à 6 000 g. Le culot microbien est lavé (sérum physiologique) recentrifugé et finalement repris par un volume de sérum correspondant à la moitié du volume de départ.

Cette suspension microbienne est utilisée comme inoculum. La densité d'ensemencement est de 0,1 à 10 g/litre (poids sec) suivant le but poursuivi. L'incubation a lieu à 37° C dans un bouillon de composition suivante :

Extrait de viande 5 g — peptone 3 g — les produits biochimiques utilisés sont de la marque DIFCO et les sels minéraux de la marque R. P. — autolysat de levure 10 g — glucose 16 g — eau q. s. 1 000 ml. On tamponne par CO<sub>3</sub> Ca (10 g), si cela s'avère nécessaire. Après le temps de culture requis — de 1 à 22 heures — les corps microbiens sont séparés par centrifugation.

L'analyse de ces derniers et du surnageant est effectuée par les méthodes suivantes :

1° Azote et phosphore total après minéralisation par Kjeldahl puis dosage de N d'après CONWAY (1950) et de P d'après LOWRY (1946).

2° Le glucose (MENDEL 1954), l'acide lactique (BARKER et SUMMERSON 1941), les acides volatils (CONWAY 1950) sont dosés dans le surnageant.

3° Les corps microbiens, lavés à l'acide perchlorique 1 p. 100 à froid, afin d'éliminer le phosphore acido-soluble, sont analysés quant à leur teneur en P nucléique d'après OGUR et ROSEN (1950).

4° La cinétique de la formation d'acides organiques à partir du glucose par la flore est mesurée directement à l'électrode de verre, à 37° C, dans l'intervalle de temps pendant lequel la réaction est linéaire (de 15 à 30 minutes).

## RÉSULTATS

Dans des essais préliminaires, nous avons observé que l'estomac et l'intestin grêle du porc contiennent d'une manière constante des glucides solubles (de 1 à 10 g par litre de contenu), des acides organiques et particulièrement de l'acide lactique. Or, la nature des substances résultant du catabolisme des glucides par voie microbienne dépend des espèces qui constituent la flore et des conditions physico-chimiques du milieu de fermentation. Dans l'estomac on observe la présence d'une flore de lactobacilles pratiquement pure et un pH acide (environ 3,7) (RAIBAUD et al 1957). En revanche l'intestin grêle contient une flore complexe dans laquelle les entérobactéries sont largement représentées. Le pH de ce milieu reste toujours proche de la neutralité.

### 1. — Influence de la chlortétracycline sur la cinétique d'acidification.

*In-vitro*, la flore microbienne intestinale dégrade rapidement le glucose, ainsi qu'en témoignent les données suivantes ; ces essais sont représentatifs d'une série de mesures.

La figure 1 montre que la flore stomacale, cultivée en milieu non tamponné,

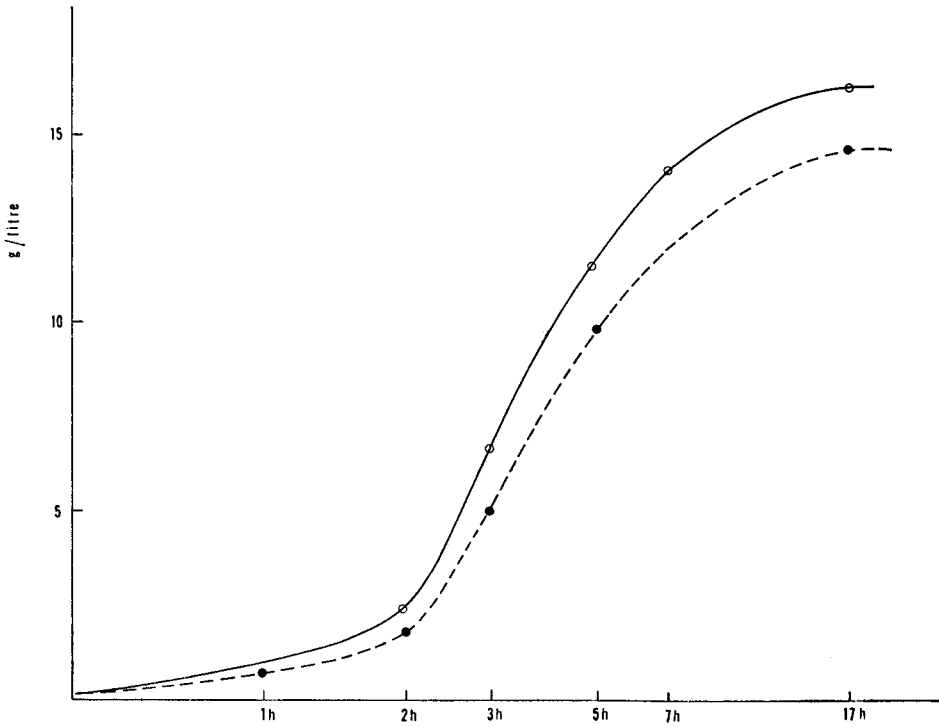


FIG. 1 — Dégradation du glucose et formation d'acide lactique en milieu non tamponné  
(flore de l'estomac du porc)

○ Glucose dégradé ● Acide lactique formé

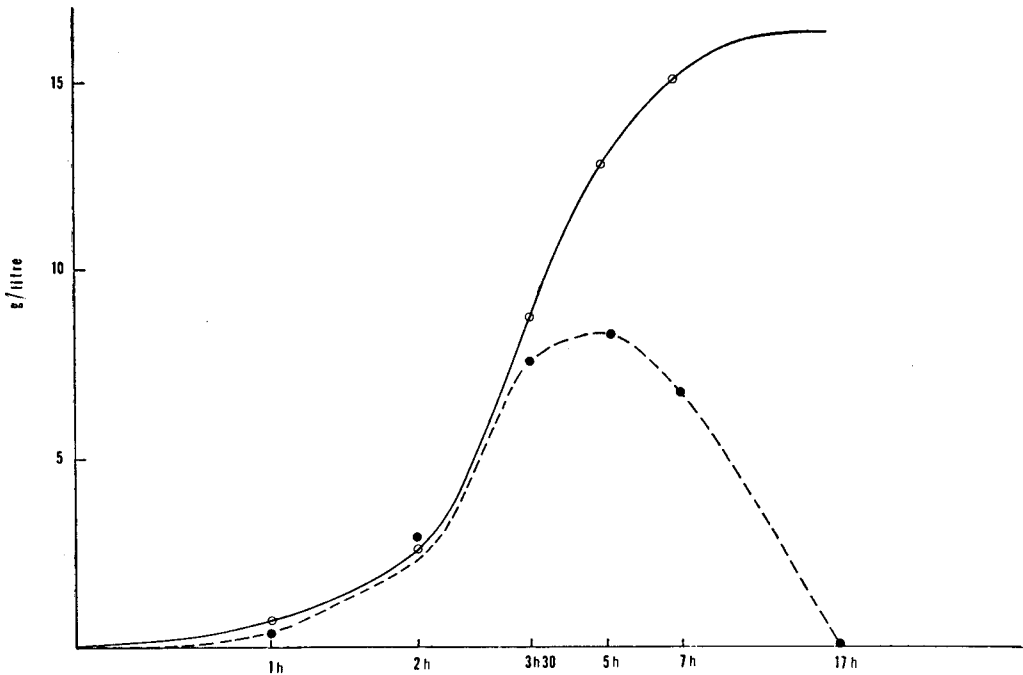


FIG. 2 — Dégradation et formation d'acide lactique en milieu tamponné  
(Flore de l'intestin grêle du porc)

○ glucose dégradé ● Acide lactique formé

dégrade le glucose avec formation presque exclusive d'acide lactique (90,5 p. 100 du glucose catabolisé). Le pH obtenu est identique à celui du contenu stomacal d'où a été isolée la flore (3,7).

La flore de l'intestin grêle, cultivée sur milieu tamponné, présente le même type de fermentation pendant la phase exponentielle (3 h). L'acide lactique est ensuite dégradé (fig. 2). A la fin de la fermentation (17 h), la quantité d'acides volatils dans le milieu de culture, exprimée en acide acétique, est de 8,01 g/l, ce qui correspond à l'utilisation de 50 p. 100 du glucose.

La chlortétracycline, à la dose de 20 mg/ml, modifie la cinétique de la réaction d'acidification. La durée de la phase de latence, pendant lequel le glucose est dégradé à vitesse faible, est très nettement augmentée. Dans l'exemple indiqué, cette durée

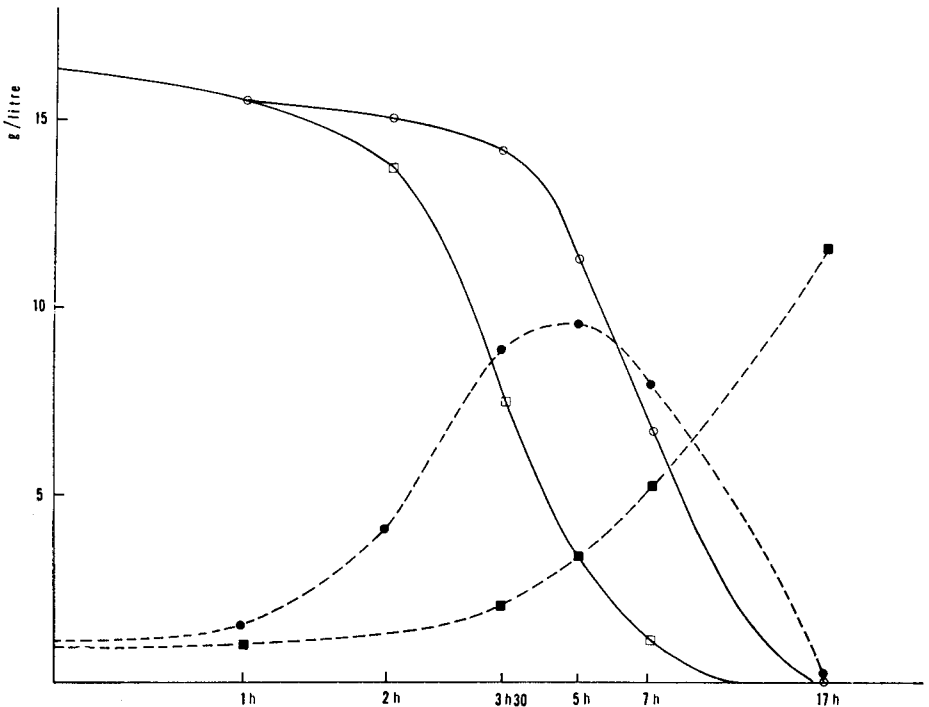


FIG. 3 — Dégradation du glucose et formation d'acide lactique en milieu tamponné (Flore de l'intestin grêle du porc)  
 □ glucose restant (témoin)      ○ glucose restant (chlortétracycline 30 mcg/cm<sup>3</sup>)  
 ● Acide lactique formé (témoin)      ■ Acide lactique formé (chlortétracycline 20 mcg/cm<sup>3</sup>)

est approximativement quadruplée (4 heures au lieu de 1 heure). Au bout de 4 heures d'incubation, l'épargne du glucose est de l'ordre de 75 p. 100. Cette inhibition du catabolisme microbien s'étend aussi à l'acide lactique formé, dont la dégradation est ralentie. La figure 3 résume ces observations.

## 2. — Influence de la chlortétracycline sur le catabolisme glucidique et la croissance microbienne

La flore complexe de l'intestin grêleensemencée à raison de 10 mg/l (poids sec) est incubée 16 heures à 37°C (le résultat est résumé dans le tableau 1).

TABLEAU I

*Influence de la chlortétracycline sur la synthèse microbienne.  
Incubation 16 h à 37°C.*

Chlortétracycline (mcg/ml) .....	0	5	10	20	40
Glucose consommé (g/litre) .....	12,2	11,1	10,75	9,6	7,7
Azote total microbien formé (mg/litre).....	118,0	109,0	107,3	109,0	98,0
Phosphore total microbien (mg/litre) .....	36,8	36,4	36,4	36,4	31,8
Phosphore nucléique (mg/litre) .....	28,3	25,1	24,6	24,3	21,2
Azote microbien synthétisé (mg) par g de glucose consommé .....	9,85	9,84	10,0	11,35	12,71
Phosphore microbien incorporé (mg) par g de glucose consommé .....	3,04	3,28	3,39	3,79	4,14
Phosphore nucléique synthétisé (mg) par g de glucose consommé .....	2,34	2,26	2,28	2,53	2,77

Ces résultats indiquent que l'antibiotique inhibe notablement la dégradation du glucose à partir de 20 mcg/ml. La croissance microbienne limite est peu modifiée jusqu'à 40 mcg/ml, ainsi que les valeurs respectives des différents constituants cellulaires. En revanche, la quantité des substances microbiennes synthétisées rapportée au poids de glucose consommé est plus élevée en présence de l'antibiotique.

Au cours de la croissance, les vitesses d'assimilation du phosphore et de l'azote du milieu sont modifiées par l'antibiotique, le tableau 2 indique les variations du rapport P/N au cours de la croissance.

TABLEAU 2

*Valeur du rapport :  $\frac{\text{phosphore}}{\text{azote}}$  microbien au cours de la croissance.*

	Durée d'incubation							
	0	30 mm	1 h	2 h	4 h	6 h	7 h	23 h
$\frac{P}{N} \times 100$ (T) .....	24,2	57	53,5	49	37	30	27	25,5
(C) .....	24,8	58,4	57	57	48	45	38,5	27

T : Témoin.

C : Chlortétracycline 20 mcg/ml.

La synthèse des dérivés azotés microbiens est également ralentie par l'antibiotique. Le tableau 3 indique la variation de la teneur en azote des culots microbiens isolés au cours de l'incubation (la quantité d'azote microbien de l'inoculum a été déduite).

Le processus de la phosphorylation, pendant les phases de latence et de croissance et surtout de déphosphorylation, pendant la phase d'autolyse, sont ralentis par l'antibiotique (Tableau 4).

TABLEAU 3

*Variation de la teneur en azote des corps microbiens au cours de la croissance.*

		Durée d'incubation					
		1 h	3 h	5 h	7 h	9 h	19 h
Azote microbien	T	-- 2	+ 170	+ 200	+ 225	+ 225	+ 220
	C	-- 4	-- 10	+ 82	+ 140	+ 190	+ 210

T : Témoin.

C : Chlortétracycline 20 mcg/ml.

TABLEAU 4

*Métabolisme du phosphore au cours de la glycolyse (Flore du caecum).*

		Durée d'incubation					
		0 h	1 h	2 h 50	5 h	7 h	23 h
Glucose consommé (g/litre)	T	0	7,4	16,44	18,97	20,8	20,5
	C	0	4,8	12,42	17,67	19,17	20,8
Phosphore minéral surnageant (mg/l)	T	112,0	71,0	27,9	36,8	92,0	201,0
	C	112,0	78,0	36,5	31,0	53,0	53,0
Extraits HC 104 microbiens	T	093,9	91,5	103,5	94,6	95,7	136,0
	C	086,4	86,6	92,8	85,6	89,8	147,0
Phosphore nucléique (mg/l).	T	160,0	213,0	249,0	259,0	223,0	78,5
	C	160,0	204,0	242,0	258,0	268,0	175,0
Phosphore nucléique synthétisé (mg) par gramme de glucose consommé.	T	...	7,45	5,4	5,24	autolyse	
	C	...	9,2	6,76	5,55	5,65	

T : Témoin.

C : Chlortétracycline 20 mcg/ml.

La flore du caecum, dont les propriétés sont très voisines de celles de l'intestin grêle, a été utilisée dans cet essai à la concentration de 10 g/l.

### 3. — *Catabolisme glucidique de microorganismes isolés de la flore intestinale*

On sait que les lactobacilles homofermentaires dégradent rapidement le glucose avec formation pratiquement quantitative d'acide lactique. Du fait de la présence de ces microorganismes, en flore dominante, dans l'estomac et l'intestin grêle du porc, on peut observer in-vivo une action fermentaire importante à l'égard des glucides, puisque des quantités notables d'acide lactique se trouvent dans ces parties du tractus digestif (MICHEL 1960). L'inhibition in-vitro, par la chlortétracycline, du catabolisme glucidique dû à la flore microbienne complexe, peut être le résultat d'un ralentissement du métabolisme des espèces des plus actives. En effet, la fermentation du glucose, mesurée directement au pH mètre dans diverses suspensions de lactobacilles homofermentaires isolées de la flore intestinale du porc, est inhibée par la chlortétracycline (Tableau 5).

TABLEAU 5

*Acidification d'un milieu de culture par diverses souches de bacilles lactiques homofermentaires.*

Valeurs exprimées en unités  $\text{pH} \times 1000$  par minute. Concentration microbienne 2 g/litre (poids sec).

N° des souches .....	9	4	2	11	10	3	8	7
Témoins .....	74	38	77	70	21	100	78	122
Chlortétracycline 20 mcg/cm <sup>3</sup> .	4	15	31	37	12	60	50	90
Pourcentage d'inhibition .....	94,6	60,5	59,7	46,2	42,8	40	35,9	26,2

D'autres souches microbiennes expérimentées telles que des lactobacilles hétérofermentaires, des colibacilles, présentent dans les mêmes conditions une activité fermentaire beaucoup plus faible que les lactobacilles homofermentaires. La médiane des coefficients d'acidification obtenus, pour 10 souches de chacune de ces espèces, a été de 10 au lieu de 75 pour les homofermentaires.

#### DISCUSSION

L'ensemble de ces résultats indique que la chlortétracycline, aux doses employées en alimentation animale, exerce in-vitro une nette action d'épargne à l'égard du catabolisme des glucides par la flore intestinale complexe du porc. Ceci se traduit non seulement par un ralentissement de la dégradation du glucose, mais également par l'inhibition de la dégradation de l'acide lactique formé. On observe en outre un meilleur rendement des synthèses microbiennes au cours de la croissance, lorsqu'on rapporte la quantité de substances microbiennes formées au poids de glucose dégradé. La durée d'accroissement de la période de latence est de l'ordre de 3 heures, dans des conditions de densité de germes, pH, etc... comparables à celles existant au niveau intestinal. Or, dans ce laps de temps, l'absorption intestinale des glucides continue à s'effectuer ; de ce fait, la compétition entre l'absorption et la fermentation par la flore pourrait être déplacée par l'antibiotique au bénéfice de l'absorption.

L'inhibition métabolique de la dégradation des glucides par la chlortétracycline peut avoir pour conséquence une épargne de l'énergie apportée par les aliments ingérés par l'animal. En effet, cette action a été constatée par NORDFELDT (1957), chez le porc. De même, des études métaboliques chez le rat, effectuées par CHAMPIGNY et JACQUOT (1958), ont montré une diminution significative des échanges respiratoires rapportées à l'unité de gain de poids. Enfin, SIEBURTH et al (1954), ont observé que la flore microbienne intestinale du poulet traité à la tétracycline présentait un métabolisme ralenti par rapport à celle de poulets témoins.

Au niveau du métabolisme microbien, une des manifestations de cette inhibition est l'accroissement de la durée de la phase de latence, pendant laquelle l'activité catabolique est faible. Pendant cette phase et au début de la phase logarithmique, la synthèse des dérivés nucléiques microbiens est peu ralentie, alors que celle des dérivés protéiques est bloquée. Ceci est en accord avec les travaux de GALE et FOLKES (1953), qui ont montré que la tétracycline, à dose subbactériostatique, inhibe la synthèse protéique chez *Staphylococcus aureus* sans inhiber la synthèse nucléique. Cette action est réver-

sible, puisque après un temps d'inhibition suffisant (de 8 à 16 heures), les quantités de corps microbiens obtenues sont peu différentes dans les deux cas, ainsi que leur composition. L'ensemble de ces faits expérimentaux permet de penser que l'épargne d'énergie produite par l'antibiotique serait due, au moins partiellement, à une inhibition des propriétés métaboliques de la flore microbienne intestinale. Des recherches sont entreprises pour vérifier ces résultats *in vivo*.

Reçu en mai 1960.

## SUMMARY

### METABOLISM OF THE INTESTINAL FLORA IN PIGS; THE EFFECT OF CHLORTETRACYCLINE ON GLUCOSE CATABOLISM

1. *In vitro*, the complex microbial flora isolated from the intestine of the pig ferments glucose with the production of organic acids. The flora of the stomach produces lactic acid (90 p. 100 of the degraded glucose). The flora of the small intestine produces lactic acid first during the latent phase and at the start of the exponential phase of growth. This substance is then broken down into volatile acids, which represent, at the end of the fermentation, 50 p. 100 of the glucose broken down.

2. Chlortetracycline, at a dose of 20 mcg/ml, inhibits this catabolism. The rate of breakdown of glucose and of the lactic acid formed falls off. The duration of the latent phase, during which the glucose is broken down slowly, is increased. At the end of 4 hours, a 75 p. 100 sparing of the glucose is observed.

3. This inhibition is correlated with a marked slowing down of the synthesis of microbial proteins, and a much smaller reduction in the synthesis of nucleic derivatives, during the growth phase. Maximum growth, obtained in 16 hours, is not appreciably modified by the antibiotic, and the latter brings about a sparing of the energy at the level of microbial metabolism. Indeed, the amount of the microbial substances synthesized (proteins, nucleoproteins), in relation to the weight of glucose broken down, is increased from 10 to 30 p. 100 by the antibiotic.

4. The fermentation of glucose by different strains of homofermentative lactobacilli, isolated from the intestinal flora of the pig, is also inhibited by chlortetracycline (from 26 to 94 p. 100 inhibition depending on the strains).

5. The energy sparing at the animal metabolism level, observed *in vivo* in the pig and the rat under the influence of small ingested doses of chlortetracycline, may be, at least partially, the consequence of the inhibition of the fermentation of glucose by the intestinal microflora under the influence of the antibiotic.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARKER S. B., SUMMERSON W. H., 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.*, **138**, 535.
- BRIGGS C. A. E., WILLINGALE J. M., BRAUDE R., MITCHELL K. G., 1954. The normal intestinal flora of the pig. I. Bacteriological methods for quantitative studies. *Vet. Rec.*, **66**, 241.
- CHAMPIGNY O., JACQUOT R., 1958. Influence de l'auroéomycine sur les échanges respiratoires du rat blanc. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, **246**, 3520-34.
- CONWAY E. J., 1950. Microdiffusion analysis and volumetric error. *Crosby Lockwood, London*, 3<sup>rd</sup> éd.
- FRANÇOIS A., MICHEL M. C., 1955. Action de la pénicilline et de l'auroéomycine sur les propriétés désaminantes de la flore intestinale du porc. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, **240**, 124.
- GALE E. F., FOLKES J. P., 1953 (b). The assimilation of amino acids by bacteria. 15. Action of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in staphylococcus aureus. *Biochem. J.*, **53**, 493.
- LARSON N. L., HILL E. G., 1953-54. The effect of products obtained from streptomycetes aureofaciens fermentations on the growth and reproduction of swine. *Ann. Rep. Hormel Institut*, p. 55.
- LARSON N. L., HILL E. G., 1955. The intestinal microflora of young swine obtained by hysterectomy. Observations on chlortétracycline supplementation. *J. Anim. Sci.*, **14**, 674.
- LOWRY D. H., LOPEZ J. A., 1946. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.*, **162**, 421.
- MENDEL B., KEMP A., MYERS D. R., 1954. A colorimetric micromethod for the determination of glucose. *Biochem. J.*, **56**, 644.
- MICHEL M. C., FRANÇOIS A., 1955. Relation entre l'influence des antibiotiques sur la croissance du porc et l'inhibition des désaminases de la flore intestinale. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, **240**, 808.



- MICHEL M. C., FRANÇOIS A., 1956. Influence de la chlortétracycline sur les décarboxylases de la flore intestinale du porc. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, **242**, 1770.
- MICHEL M. C., 1956. Catabolisme de la choline par la flore intestinale du porc. Étude de quelques inhibiteurs. *C. R., Acad. Sci., Fr.*, **242**, 2883.
- MICHEL M. C., 1960. Activité métabolique de la flore totale isolée de l'intestin du porc. Rôle des différentes espèces microbiennes. *Sous presse*.
- NORDFELDT S., KIHLEN G., 1957. Studies of the influence of antibiotics upon the energy metabolism of young growing pigs. *Kgl. Lantbrukshögsk Ann.*, **23**, 1.
- OGUR M., ROSEN G. V., 1950. Nucleic acid of plant tissues. I. extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Biochem.*, **25**, 262.
- RAIBAUD P., CAULET M., MOCQUOT G., 1957 (a). Étude quantitative des lactobacilles et des coliformes dans le tube digestif du porc adulte. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, **244**, 683.
- RAIBAUD P., CAULET M., 1957 (b). Les lactobacilles dominants dans le tube digestif du porc. *C. R. Acad. Sci. Fr.*, **244**, 816.
- RAIBAUD P., CAULET M., 1957 (c). Les streptocoques dominants dans le tube digestif du porc adulte. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, **244**, 1291.
- SHAHANI K. M., 1956-57. Carbohydrate and pyruvate sensitive and oxy-resistant organisms. *Antibiot. Annu.*, **523**. *Med. encyclop. Inc New-York*.
- SIEBURTH J. M. N., JEZESKY J. J., HILL E. G., CARPENTER L. E., 1954. Some microbiological observations on the antibiotics fed chicks. *Poult Sci.*, **33**, 753.
- WILLINGALE J. M., BRIGGS C. A. F., 1955. The normal intestinal flora of the pig. 2. quantitative bacteriological studies. *J. Appl. Bactériol.*, **18**, 284.