

## ÉVALUATION QUANTITATIVE, A L'AIDE DE SA TENEUR EN ACIDES NUCLÉIQUES, DE LA POPULATION MICROBIENNE DU TUBE DIGESTIF DES RUMINANTS

I. — MÉTHODE ET APPLICATION AUX CONTENUS DE RUMEN  
DE BOVINS RECEVANT DIFFÉRENTS RÉGIMES

B. GAUSSERES, G. FAUCONNEAU

avec la collaboration technique de Éliane PKNOR et Madeleine FORIGNON.

*Laboratoire d'Étude des Métabolismes*  
*Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)*

---

### SOMMAIRE

Nous avons cherché une méthode d'analyse des acides nucléiques pouvant s'appliquer à la fois aux aliments, aux microorganismes et aux contenus du tube digestif des ruminants. Cette méthode qui permet de déterminer, dans les contenus digestifs, la part d'azote protéique revenant aux microorganismes a été utilisée d'une façon systématique pour étudier des contenus de rumen provenant d'animaux soumis à différents régimes.

---

### INTRODUCTION

Il est maintenant bien établi que la ration est profondément remaniée, tant du point de vue chimique que physique, durant son séjour dans le rumen. Une part importante des matières azotées ingérées y est transformée en chaînes carbonées, ammoniac et protéines microbiennes. Pour suivre la production et l'évolution de ces différentes fractions, il faut disposer de méthodes de dosage spécifiques.

L'évaluation de la quantité de microorganismes présents dans le rumen a retenu l'attention de très nombreux auteurs. On peut classer les méthodes préconisées en deux grands groupes :

— des méthodes d'estimation directe, les plus courantes, utilisant le comptage sous microscope (BAKER et HARRISS, 1947 ; GALL et *al.*, 1949 ; Mc NAUGHT et *al.* 1950 ; MOIR et SOMERS, 1957, ou la centrifugation différentielle (HEALD, 1951 ;

FAUCONNEAU et GAUSSERES, 1961). Ces méthodes ont l'inconvénient de ne pas tenir compte des microorganismes fixés sur, ou dans, les particules alimentaires (bactéries cellulolytiques en particulier) et de négliger parfois aussi certains protozoaires très sensibles aux traitements auxquels sont soumis les échantillons.

— des méthodes d'estimation indirecte. L'une de ces méthodes, proposée par Mc DONALD (1954), utilise la propriété des protéines de microorganismes d'être riches en lysine (7 à 9 p. 100) comparées aux protéines de certains aliments tels que les céréales (3 p. 100 environ). Cette technique n'est malheureusement possible que si l'on utilise des rations artificielles très différentes des rations classiques. WELLER, GRAY et PILGRIM (1958) dosent l'acide  $\alpha$ - $\epsilon$  diaminopimélique, acide aminé spécifique des enveloppes bactériennes. Or, l'acide  $\alpha$ - $\epsilon$  diaminopimélique n'entre finalement que pour moins de 1 p. 100 dans la protéine bactérienne ce qui en rend le dosage difficile et imprécis ; de plus il est absent dans les protozoaires.

Comme les bactéries et les protozoaires sont particulièrement riches en acides nucléiques, par comparaison aux aliments habituels du ruminant, nous avons pensé que l'on pourrait utiliser cette caractéristique pour évaluer la quantité de microorganismes présents dans les contenus digestifs.

## MATÉRIEL, EXPÉRIMENTAL, ET MÉTHODES

Les aliments frais sont fixés dans l'éthanol à 95° (— 20°C) et conservés en chambre froide à — 15°C jusqu'au moment où ils sont soumis à l'analyse. Les aliments secs sont généralement traités rapidement après l'échantillonnage et le broyage, ce qui ne justifie pas de précautions particulières pour la conservation.

Les échantillons de contenus de rumen sont obtenus de la même façon, que les animaux soient munis de fistules ou abattus : après vidange du rumen et homogénéisation à la main, une portion représentative du contenu est fixée immédiatement dans environ quatre fois son volume d'éthanol à 95° (— 20°C) et conservée en chambre froide à — 15°C.

Les bactéries et protozoaires sont extraits par fermentation, sédimentation et centrifugation fractionnée selon une méthode mise au point au laboratoire et précédemment décrite (G. FAUCONNEAU et B. GAUSSERES, 1961). Les microorganismes séchés par lyophilisation sont conservés à + 2°C.

Les régimes alimentaires utilisés étant assez nombreux et différents, nous donnerons leurs caractéristiques dans le paragraphe consacré aux résultats (tabl. 4 et 7). Les mesures de digestibilité sur moutons et les analyses correspondantes ont été effectuées par la Station de Recherches sur l'Élevage des Ruminants. En effet, tous les animaux appartenaient à cette Station et étaient utilisés parallèlement à d'autres fins expérimentales.

### *Analyses chimiques*

L'azote a été déterminé par la méthode de Kjeldahl.

Nous avons cherché une méthode d'analyse des acides nucléiques pouvant s'appliquer à la fois aux aliments, aux microorganismes et aux contenus de rumen. Dans un premier temps, on élimine les composés solubles (schéma I) successivement dans l'éthanol, l'acide trichloracétique (A.T.C.) et le méthanol chloroforme ; puis par une double hydrolyse (schéma II) on sépare les constituants de l'ARN (hydrolyse sodique) de ceux de l'ADN (hydrolyse perchlorique).

Cette double hydrolyse dans des conditions un peu différentes avait déjà été utilisée par SCHMIDT et THANNHAUSER (1945).

L'ensemble des traitements résumés dans le schéma I s'effectuent à une température voisine de 0°C.

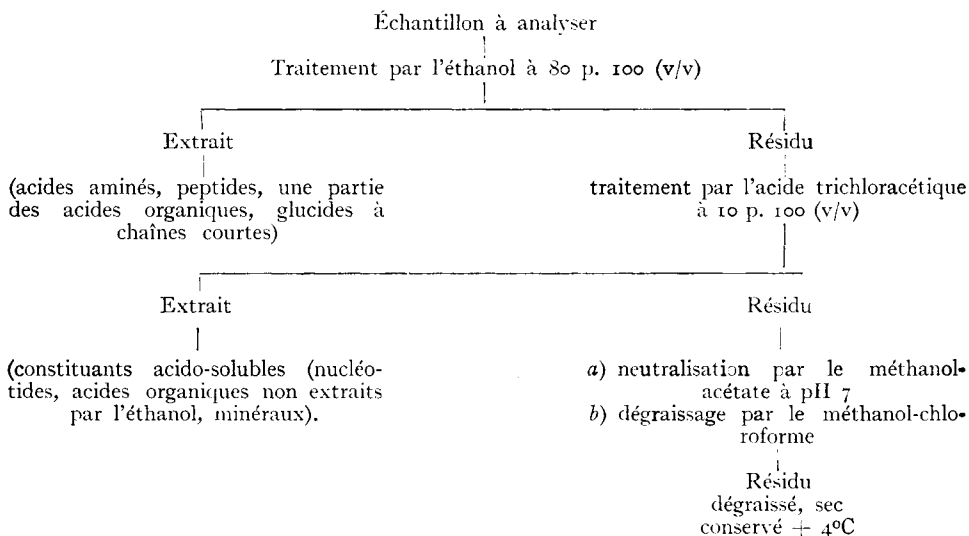
Le produit brut (aliments ou contenus de rumen déjà conservés dans l'éthanol), ou finement broyé (aliments secs) est soumis à trois extractions successives, chacune par quatre à cinq fois son volume d'éthanol à 80 p. 100 (v/v), par passage au broyeur Turmix (trois périodes d'une minute pour chaque extraction). On filtre sur Büchner et on traite le résidu immédiatement par l'acide

trichloracétique 10 p. 100 (v/v) qui élimine en particulier les esters phosphoriques libres. On opère pour cette extraction en milieu acide comme pour l'extraction alcoolique, excepté qu'après chaque passage dans le broyeur on centrifuge 15 minutes à 2 500 g (centrifugeuse Jouan G 57R refroidie). On recueille le surnageant sur filtre plissé Durieu (n° 4B). Pour éviter une hydrolyse prématurée des acides nucléiques, on neutralise immédiatement le culot par une solution de méthanol-acétate de sodium à pH 7 (680 g d'acétate de sodium RP pour 5 l de méthanol pur ; quelques gouttes d'ammoniaque permettant d'amener le pH à 7). On homogénéise le culot pendant 30 secondes dans un broyeur Turmix avec cinq fois environ son volume de méthanol-acétate. On centrifuge puis on décante. On dégraisse alors le culot par 10 volumes d'un mélange méthanol-chloroforme (1 v/2 v) ajusté à pH 7 à l'aide de quelques gouttes d'ammoniaque. La mise en suspension s'effectue comme précédemment. On agite pendant une heure, on centrifuge et on décante, on remet en suspension et on agite pendant 15 heures. On remet alors le culot en suspension (broyeur Turmix) dans l'alcool absolu, on filtre sur Büchner et on lave quelques minutes à l'alcool absolu puis à l'éther (BILLAUT 65°B).

## SCHÉMA I.

*Extraction des composés solubles*

(toutes les opérations sont effectuées à 0° + 2°C)



Le résidu de cette série d'extractions, séché et broyé au broyeur à billes Dangoumau est conservé à + 4°C. Il contient essentiellement les acides nucléiques et les protéines.

*Dosage de l'ARN*

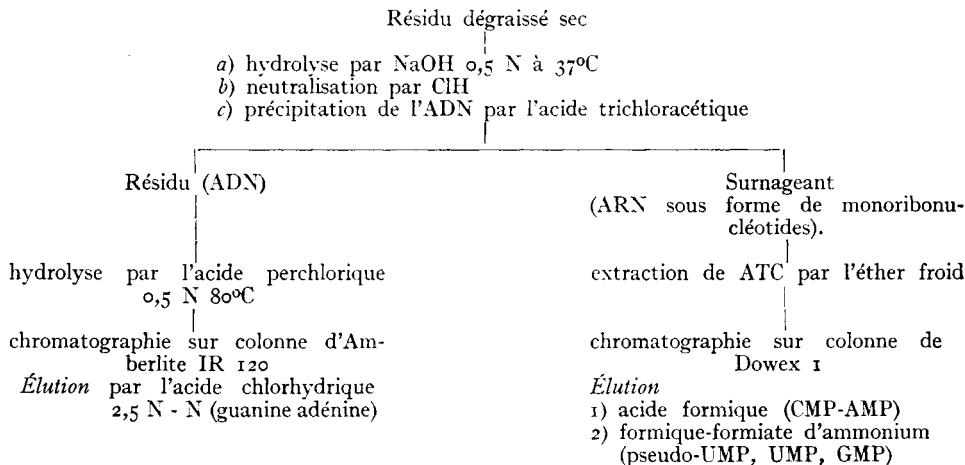
L'hydrolyse sodique transforme l'ARN en mononucléotides acido-solubles. L'ADN plus stable reste polymérisé et est précipité par l'acide trichloracétique froid. On agite 2 g environ de résidu de l'extraction précédente (dans le cas où l'on traite un contenu de rumen) dans 50 ml de soude 0,5 N au bain-marie à 37°C pendant 20 heures. On neutralise par l'acide chlorhydrique. On refroidit aux environs de 0°C et on précipite l'ADN par l'acide trichloracétique à 40 p. 100 (v/v) ajouté en quantités suffisantes pour atteindre une concentration finale de 10 p. 100. On laisse en contact à 0°-2°C pendant 30 minutes puis on centrifuge 15 minutes à 2 900 T/m (centrifugeuse MSE refroidie). On filtre sur filtre plissé Durieu (n° 1B). On lave le culot deux fois par l'acide trichloracétique 10 p. 100 froid en remettant en suspension et en centrifugeant. On lave le culot par l'acide perchlorique 0,5 N à 0°C pour entraîner le T.C.A. On centrifuge. Des trois surnageants précédents, mélangés, on extrait l'acide par de l'éther froid (- 20°C) jusqu'à obtention d'un pH voisin de 3. On filtre sur filtre plissé Durieu.

On mesure l'absorption d'une dilution adéquate au spectrophotomètre Jobin et Yvon à 260-265-290-310  $m\mu$  dans des cuves en quartz de 1 cm d'épaisseur. La densité optique pondérée à 260  $m\mu$  permet de calculer la quantité de solution à passer sur une colonne d'un type donné. Nous utilisons des colonnes cylindriques se terminant par une partie conique immédiatement avant le robinet. Leur hauteur utile est de 25-30 cm et leur diamètre intérieur 16 mm (volume utile 50-55 ml). Une telle colonne permet de fractionner une quantité de substances correspondant à environ 2 000 de densité optique pondérée, à 260  $m\mu$ , avec une résine Dowex 1  $\times$  8,200-400 mesch sous forme formiate de sodium. L'élution se fait par deux systèmes de gradients exponentiels donnés par le tableau ci-dessous :

Flacon mélangeur		Éluats successifs	Élués
1 <sup>er</sup> système	500 ml d'eau	a) eau 500 ml b) HCOOH 0,75 N 450 ml c) HCOOH 1,5 N 350 ml	CMP* AMP*
2 <sup>e</sup> système	500 ml — formiate 0,2 M — HCOOH 0,06 M pH 4,5	a) HCOOH 0,15 N 500 ml Formiate 0,5 N b) Formiate NH <sub>4</sub> 2 M 500 ml pH 6,5	pseudo UMP UMP* GMP*

\* CMP = cytidine monophosphate.  
AMP = adénine monophosphate.  
UMP = uridine monophosphate.  
GMP = guanosine monophosphate.

#### SCHÉMA II. — Extraction des composés nucléiques



Les éluats sont recueillis par fractions de 10 ml et le développement des nucléotides est suivi par spectrophotométrie dans l'ultraviolet. Les coefficients d'extinction molaire adoptés sont les suivants :

CMP	à 278 $m\mu$	13 à pH 1
AMP	à 260 $m\mu$	14,6 pH 2
Pseudo-UMP	à 260 $m\mu$	8,5 pH 4,25
UMP	à 260 $m\mu$	9,9 pH 4,25
MPG	à 260 $m\mu$	11,6 pH 6,35

*Dosage de l'ADN*

Le culot après hydrolyse de l'ARN est hydrolysé au bain-marie bouillant pendant 75 minutes avec 50 ml d'acide perchlorique 0,5 N. Seules les bases puriques (adénine et guanine) sont libérées. L'ADN sera évalué par cette somme adénine + guanine. L'hydrolyse est bloquée à froid. On centrifuge 10 minutes à 3 000 g (centrifugeuse MSE refroidie) et on lave deux fois le culot avec environ 30 ml d'acide perchlorique 0,5 N. Les surnageants sont rassemblés dans une fiole jaugée et on ajuste leur volume.

Le fractionnement des bases se fait sur résine échangeur de cations Amberlite IR 120 sous forme H<sup>+</sup>. Les colonnes cylindriques sont de hauteur utile 30 cm ; diamètre intérieur 9 à 10 mm (volume utile 25 ml). L'élution se fait par un gradient linéaire d'acide chlorhydrique (0,75 N - 6 N). L'éluat est recueilli par fractions de 10 ml. On mesure l'absorption des éluats en lumière ultraviolette à 250-260-275-290-320 m $\mu$ . Les coefficients d'extinction moléculaires adoptés sont 11,05 à 250 m $\mu$  pour la guanine dans HCl 2,5 N et 11,7 à 260 m $\mu$  pour l'adénine dans HCl 3,7 N.

## RÉSULTATS

L'ensemble de nos résultats sont exprimés en micromoles de base par gramme de résidu sec dégraissé (résultat des extractions du schéma I). Les bases puriques sont seules analysées dans l'ADN. Dans certains cas le nombre de micromoles ainsi exprimé a été ramené à la teneur en azote de ce même résidu.

Le tableau 1 fait état de l'influence de la durée de l'hydrolyse perchlorique sur la libération des bases puriques. Les deux valeurs ARN mentionnées viennent du fait que les échantillons ont été traités en double. Nous avons finalement adopté un temps d'hydrolyse de 1 h 15, temps au-delà duquel la quantité de substances interférant au moment de la lecture en lumière ultraviolette augmente, diminuant la précision. Ce même tableau montre l'influence du séchage, au four à circulation d'air à 70°C, sur la récupération ultérieure des acides nucléiques. Dans tous les cas le séchage provoque une diminution de l'ARN due sans doute à l'action des ribonucléases qui présentent une résistance remarquable à la chaleur (DAVIDSON, 1960) et continuent donc à agir au cours du séchage. Sur l'un des échantillons de contenu de rumen on constate également une diminution de l'ADN (50 p. 100) après dessiccation. Il est probable qu'il se produit une sédimentation dans le plateau de séchage. Les particules les plus fines (noyaux libres notamment) collent au fond et il est difficile de récupérer quantitativement l'échantillon sec. L'ensemble de ces résultats nous a conduit à éviter la dessiccation et à choisir l'éthanol froid comme agent de fixation.

Le tableau 2 rassemble quelques résultats de teneurs en acides nucléiques de quelques aliments, de bactéries et de protozoaires. On constate les différences importantes puisqu'on a pour les aliments des valeurs de l'ordre de 7,5 à 10 (exprimées en micromoles de bases par g de résidu ramenées à la teneur en azote de ce même résidu) pour les aliments frais, 1,5 pour les aliments concentrés à base de céréales, 2 à 3 pour les ensilages ; alors que pour les bactéries et protozoaires les valeurs se situent entre 20 et 30. Les bactéries semblent plus riches en ADN que les protozoaires avec 28,5 de moyenne contre 23,5 de moyenne. Il semble également qu'il y ait de légères différences entre régimes, mais nos analyses ne sont pas assez nombreuses pour que ces différences puissent être prises en considération.

TABLEAU I

*Influence du temps d'hydrolyse et du séchage des échantillons  
sur la récupération des acides nucléiques*

Échantillons	Temps de l'hydrolyse perchlorique (en heures)	adénine + guanine $\mu$ moles/g de résidu	ARN $\mu$ moles/g de résidu
Foin de luzerne	1,30	1,1	5,2
	3	1,1	4,8
Aliment concentré	1,30	0,2	4,2
	3	0,2	4,4
Foin + aliment concentré (mélange I) (mélange des deux précédents tel qu'il était distribué)	1,30	0,6	4,8
	3	0,6	5,0
Contenu de rumen (régime foin + aliment concentré mélange II)	1,30	1,9	
	3	1,8	
Contenu de rumen — séché au four 70°C (régime foin + aliment concentré mélange I)	1,30	1,8	5,0
	3	1,8	5,5
	1,30	3,5	19,7
	3	3,5	19,5
Contenu de rumen — séché au four 70°C (régime ensilage)	1,30	4,5	15,6
	1,30	4,5	19,6

(<sup>1</sup>) Résidu = Résidu sec dégraissé de l'extraction A.T.C. (voir schéma I).

Si l'on compare les résultats du tableau 2 à ceux du tableau 3, on remarque leur grande variabilité pour les contenus de rumen avec différents régimes, contrairement à ce que l'on a sur végétaux et microorganismes. Deux éléments semblent importants dans le déterminisme du développement des microorganismes : la teneur en azote du fourrage et le pourcentage de concentré dans la ration. En effet, le Ray-grass frais et le foin de Luzerne ont des rapports (A + G)/N assez voisins (respectivement 16,5 — 18,6 et 15,7 en moyenne) alors qu'un aliment riche en aliment concentré (35 p. 100) a un rapport de 12,5. D'autre part, les quatre aliments broyés agglomérés qui présentent des taux azotés et des pourcentages d'aliment concentré variables, montrent une chute du rapport (A + G)/N quand la teneur en azote diminue (sauf si l'on compare les deux régimes à 35 p. 100 d'aliment concentré) et quand la proportion d'aliment concentré augmente. La cinétique effectuée après un repas de ray-grass frais ne donne pas de variations très significatives. Il semble toutefois qu'il y ait une légère diminution après le repas, due sans doute à un effet de dilution, suivie d'une légère augmentation. On retrouve le même phénomène pour les teneurs en azote

protéique du contenu. Les caractéristiques des aliments et régimes distribués correspondant aux analyses du tableau 3 sont rassemblés dans le tableau 4.

TABLEAU 2

*Teneurs en acides nucléiques des aliments et des microorganismes de Bovins*

	N ‰ de résidu	$\frac{(A + G)** \text{ } \mu\text{moles/g}}{N \text{ } \%$ $\times 100$	$\frac{\text{ARN } \mu\text{moles/g}}{N \text{ } \%$ $\times 100$
<i>Aliments</i>			
Luzerne fraîche — limbes.....	58,1	8,9	
Luzerne fraîche — limbes.....	58,1	9,6	
Luzerne fraîche — tiges.....	15,6	6,2	
Luzerne fraîche — tiges.....	16,5	10,2	
Luzerne fraîche (très jeune).....	42,7	7,4	77,3
Foin de Luzerne.....	14,3	7,8	34,9
Organes parasités et plantes adventices de Luzerne.....	11,9	3,2	
Ray-grass frais.....	27,6	6,7	
Fétuque fraîche — limbes.....	21,6	8,9	38,9
Ensilage.....	11,3	2,7	16,6
Aliment concentré.....	16,1	1,5	26,4
<i>Microorganismes</i> (obtenus avec différents régimes)			
<i>Bactéries :</i>			
Foin + aliment concentré.....	71,7	33,2	129,0
Choux.....	96,7	24,3	128,4
Ray-grass.....	101,7	27,8	
<i>Protozoaires :</i>			
Foin + aliment concentré.....	58,6	25,8	106,1
Choux.....	91,1	20,4	104,4
Ray-grass.....	92,6	24,5	

\* Résidu = Résidu dégraissé de l'extraction A.T.C. (voir schéma I).

\*\* A = adénine.

G = guanine.

A la suite de ces premiers résultats, nous avons essayé de suivre, par la même méthode, les variations des taux de microorganismes dans des contenus de rumen de vaches fistulées recevant : pour l'une, uniquement de la Luzerne fraîche pendant trois cycles de végétation ; pour l'autre, uniquement de la Fétuque fraîche pendant le premier cycle de végétation. Avec la Luzerne (tabl. 5) on a des moyennes du rapport (A + G)/N, de 17,8 au début du premier cycle, 12,3 à la fin du premier cycle, 17,2 au deuxième cycle et 14,3 au troisième cycle. Pour la Fétuque (tabl. 6), les valeurs des rapports sont très faibles oscillant entre 4,5 et 9,1. Le tableau 7 donne la digestibilité et la composition chimique de la Luzerne et de la Fétuque aux dates correspondant aux prélèvements.

TABLEAU 3  
Tenueurs en azote et en ADN des contenus de rumen de Bovins ayant reçu différents régimes. Étude cinétique après le repas

Régime	Date	Temps après le repas en heures	N o/100 de résidu *	Adénine + Guanine ( $\mu$ moles/g)	(A + G) N o/100	Adénine / Guanine
Ray-Grass frais	3-5-62	0	39,8	6,9	17,3	1,14
		3	33,7	4,9	14,6	0,96
		5	40,0	5,4	13,7	1,36
		9	41,4	8,1	19,7	1,21
		13	43,2	7,4	17,1	1,29
Moyenne		39,6	6,5	16,5	1,19	
Aliment A1 broyé et aggloméré (luzerne + céréales) (voir tabl. 4)	13-12-62	0	37,4	7,4	19,0	1,03
		3	34,4	5,6	16,4	1,22
		5	38,6	7,9	20,6	1,19
		13	34,8	6,3	18,0	1,11
		Moyenne		36,3	6,7	18,6
Aliment A2 broyé et aggloméré (luzerne + céréales + arachide) (voir tabl. 4)	10-12-63	3	22,6	3,8	17,0	1,12
		3	17,8	2,1	12,1	1,37
Aliment B1 broyé et aggloméré (luzerne + céréales + arachide) (voir tabl. 4)	13-12-62	3	27,4	3,7	13,4	1,06
		3	27,6	3,4	12,5	1,13
Aliment B2 broyé et aggloméré (luzerne + céréales + arachide) (voir tabl. 4)	10-12-62	3	27,6	3,4	12,5	1,13
		20-12-62	22,6	4,0	17,9	1,06
		21-12-62	22,2	3,5	16,1	1,07
		22-12-62	23,6	3,7	15,9	1,24
Foin de luzerne	22-12-62		25,8	3,5	13,6	1,23
			23,5	3,7	15,7	1,15
			23,5	3,7	15,7	1,15
Moyenne						

\* Résidu = Résidu dégraissé de l'extraction A.T.C. (voir schéma D).

\*\* A = Adénine.

G = Guanine.



TABLEAU 4

*Caractéristiques des régimes présentés dans le tableau 3*

	Digestibilité (CUD)		Analyses (exprimées en % de la matière sèche)			Observations
	Matière sèche	Matière organique	Matière minérales	Cellulose brute	Matières azotées totales	
Ray-grass frais . . . . .	78	82	14,3	18,6	18,6	Ray-grass IO récolté au stade début-épiaison du premier cycle de végétation
Luzerne A des aliments agglomérés A1 et A2 . .			10,3	27,6	19,4	Farine de luzerne
Luzerne B des aliments agglomérés B1 et B2 . .			9,6	28,5	17,7	Farine de luzerne
Aliment broyé et aggloméré A1	59	62	9	22,2	21,6	Luzerne A 85 % - orge 14 % minéraux 1 %
Aliment broyé et aggloméré A2	62	65	8,5	20,7	18,5	Luzerne A 65 % - orge 30 % minéraux 1 % - arachide 4 %
Aliment broyé et aggloméré B1	57	59	9,4	24,7	19,9	Luzerne B 85 % - orge 6 % minéraux 1 % - arachide 8 %
Aliment broyé et aggloméré B2	61	63	8,0	20,7	20,3	Luzerne B 65 % - orge 24 % minéraux 1 % - arachide 10 %
Foin de Luzerne . . . . .	55,8		9,8	29,2	19,6	

## DISCUSSION

Le tableau 1 fait état des teneurs en ARN de certains échantillons ; teneurs que nous n'avons plus mentionnées par la suite. Nous avons montré en effet, l'influence des traitements des échantillons sur leurs teneurs en ARN. Or, pour les foins en partitulier, il est difficile de savoir exactement à quel moment ont eu lieu les pertes et si elles ont été homogènes pour le lot utilisé. D'autre part, les teneurs en ARN sont susceptibles d'assez grandes variations en fonction de l'état métabolique des cellules. Pour l'ensemble de ces raisons, nous avons décidé de ne retenir que l'ADN comme élément de référence.

Les rapports Adénine/Guanine constatés dans nos analyses varient entre 1,24 et 1,52 pour les bactéries. Ces chiffres sont comparables à ceux cités par DAVIDSON (1960) pour des cellules vivantes de diverses origines (sperme de Bovins 1,29 ; germe de blé 1,20 ; levure 1,67). Par contre, pour les protozoaires, ce rapport atteint des valeurs très élevées situées entre 2,13 et 3,5.

Nous avons signalé dans les résultats la constance des valeurs  $(A + G)/N$  dans les végétaux frais ; du moins, semble-t-il, pour ceux (Graminées ou Légumineuses) qui sont cultivés comme fourrages. Il est possible que dans certains cas, des végétaux

TABLEAU 5

*Teneurs en azote et ADN des aliments et contenus de rumen  
d'une vache fistulée (n° 535) recevant de la Luzerne fraîche  
(prélèvements 3 heures après le début du repas)*

		Date de prélèvement	N % <sub>0</sub> de résidu*	Adénine + Guanine ( $\mu$ moles/g)	$\frac{A + G^{**}}{N} \mu$ moles/g $\times 100$ N % <sub>0</sub>
<i>Aliment : Luzerne</i>		24-5-63	38,4	3,7	8,4
		21-6-63	19,9	1,6	8,0
<i>Contenus de rumen</i>	1 <sup>er</sup> cycle de croissance	17-5-63	30,7	5,3	17,4
		24-5-63	29,3	5,3	18,3
		Moyenne	30,0	5,3	17,8
		31-5-63	21,4	2,1	10,1
	2 <sup>e</sup> cycle de croissance	7-6-63	16,4	2,2	13,8
		14-6-63	19,6	2,6	13,4
		21-6-63	17,5	2,1	11,9
		Moyenne	18,7	2,3	12,3
		17-7-63	22,9	3,6	15,9
		19-7-63	22,7	3,9	17,4
	3 <sup>e</sup> cycle de croissance	30-7-63	23,1	4,2	18,4
		Moyenne	22,9	3,9	17,2
		2-8-63	19,9	3,0	15,2
		24-9-63	23,1	3,2	13,9
	3 <sup>e</sup> cycle de croissance	30-9-63	22,5	3,1	13,9
Moyenne		21,8	3,1	14,3	

\* Résidu = résidu dégraissé de l'extraction A.T.C. (voir schéma I).

\*\* A = adénine.

G = guanine.

à structure particulière puissent présenter un rapport très différent. Nous avons en effet trouvé pour des plantes adventices d'une luzernière, une valeur du rapport  $(A + G)/N$  de 3,2. Il faut toutefois signaler que nous avons trié, avant analyse, les espèces constitutives de la prairie, les plantes adventices non fourragères et les débris divers (plantes parasitées en particulier). L'ensemble des plantes adventices et débris sont classés en « débris » que nous analysons séparément. Il est donc possible que cette faible valeur de 3,2 soit partiellement due à la présence de débris parasités. Y. NAKAO et K. OGATA (1962-1963) ont en effet montré qu'un certain nombre de champignons et de microorganismes possèdent des enzymes capables d'hydrolyser les acides nucléiques.

Si l'on se reporte au tableau 1, on constate que si l'on exprime l'ADN par le double de la somme adénine + guanine (DAVIDSON 1960) le rapport ARN/ADN présente pour les bactéries et les protozoaires Les valeurs moyennes suivantes : avec un régime de foin plus aliment concentré, respectivement 1,9 et 2,0 et avec un régime de Choux, respectivement 2,6 et 2,5. Cet écart entre les deux régimes peut être dû à la présence de populations différentes ou a une différence dans l'état métabolique des populations en cause. En effet VENDRELY (1946) a trouvé pour différentes

TABLEAU 6

*Teneurs en azote et ADN des aliments et contenus de rumen  
d'une vache fistulée (n° 8129) recevant de la Fétuque des prés fraîche  
(1<sup>er</sup> cycle de croissance)  
(prélèvements 3 heures après le début du repas)*

	Date	N ‰ de résidu*	Adénine + Guanine μ moles/g	$\frac{A + G^{**} \mu \text{ moles/g}}{N\text{‰}} \times 100$
Aliment : fétuque des prés	24/5/63	16,8	2,3	6,9
Contenus de rumen	10/5/63	31,5	2,0	6,5
	17/5/63	24,8	2,3	5,4
	24/5/63	21,0	0,9	4,5
	31/5/63	15,2	1,4	9,1
	7/6/63	19,2	1,7	8,9
	14/6/63	11,3	0,7	6,2

\* Résidu = Résidu dégraissé de l'extraction ATC (voir schéma I).

\*\* A = adénine

G = guanine

souches d'*Escherichia coli* des valeurs du rapport ARN/ADN allant de 1,98 à 2,67 et BOIVIN (1947) a constaté pour une culture de Colibacille S, des rapports de 2,5 après 5 heures de culture et 2,0 après 20 heures de culture. Il est probable que dans le cas qui nous préoccupe, les changements de population soient responsables de ces variations ; d'autant que les microorganismes que nous avons analysés ont été extraits à des temps variables après le repas et mélangés ensuite.

Sur les résidus dont nous avons extrait un certain nombre de produits solubles (schéma I) nous avons déterminé une teneur en azote qui est essentiellement de l'azote protéique. Si l'on admet une valeur moyenne de 25,7 du rapport (A + G)/N pour l'ensemble des bactéries et protozoaires, on peut calculer le pourcentage d'azote protéique provenant des microorganismes, connaissant les valeurs respectives de ce même rapport pour l'aliment et le contenu de rumen correspondant. C'est ce que nous avons essayé de faire pour l'ensemble des régimes que nous avons expérimentés (tabl. 8). Nous trouvons ainsi pour la plupart des régimes que les pourcentages moyens d'azote protéique sous forme d'azote des microorganismes, varient de 52

TABLEAU 7  
Caractéristiques de la Luzerne et de la Fétuque présentées aux tableaux 5 et 6.

	Dates	Variétés	Cycle de croissance	Stade de développement	Digestibilité de la matière organique	Analyses (exprimés en % de la M.S.)			
						Matières minérales	Cellulose brute	Matières azotées totales	
Luzerne	17-5-63	<i>Poitou</i>	1 <sup>er</sup> cycle	début stade boutons	74	12,3	23,5	24,5	
	stade boutons			68	11,4	27,1	22,7		
	boutons très gros		—	—	—	—	—	—	
			5 % de fleurs	65	10,3	33,4	17,3		
			70 % de fleurs	62	13,7	31,7	18,7		
	17-7-63		57	12,2	35,8	16,1			
	30-7-63	<i>Poitou</i>	2 <sup>me</sup> cycle	boutons (43 jours de croissance)	65	9,9	33,7	20,9	
				80 % de fleurs (57 jours de croissance)	60	10,0	35	19,3	
	Fétuque des prés	2-8-63 24-9-63 30-9-63	<i>Flandre Flandria</i>	3 <sup>me</sup> cycle	7 % de fleurs (70 à 80 jours de croissance)	62	14,0	28,7	21,8
					montaison	83	13,7	22,3	25,8
82						13,0	24,1	20,5	
14-6-63		1 <sup>er</sup> cycle	100 % épiaison floraison	50 % épiaison	80	9,5	26,9	17,4	
				74	9,3	29,2	14,3		
				67	9,5	35,1	13,5		
11,5	36,8	12,3							

TABLEAU 8

*Évaluation de l'azote protéique, des contenus de rumen, se trouvant sous forme microbienne  
(exprimé en % de l'azote protéique total)*

Régime	Date	Temps après le repas (en heures)	Pourcentage
Ray-grass frais (tableau 3)	3-5-1962	0	56
		3	42
		5	37
		9	68
		13	55
		Moyenne	52
	4-5-1962	0	65
		3	51
		5	73
		13	59
Moyenne	62		
Aliments broyés et agglomérés (tableau 3)	A 1 13-12-1962	3	57
	A 2 10-12-1962	3	33
	B 1 13-12-1962	3	35
	B 2 10-12-1962	3	34
Foin de Luzerne (tableau 3)	20-12-1962		56
	21-12-1962		46
	22-12-1962		45
	22-12-1962		32
	Moyenne		45
Luzerne fraîche (tableau 5)	17-5-1963	3	52
	24-5-1963	3	57
Moyenne		54	
1 <sup>er</sup> cycle de végétation	31-5-1963	3	19
	7-6-1963	3	33
	14-6-1963	3	30
	21-6-1963	3	22
	Moyenne		26
	2 <sup>e</sup> cycle de végétation	17-7-1963	3
19-7-1963		3	53
30-7-1963		3	59
Moyenne			52
3 <sup>e</sup> cycle de végétation	2-8-1963	3	41
	24-9-1963	3	33
	30-9-1963	3	33
	Moyenne		36

p. 100 (Ray-grass frais) à 26-33 p. 100 (troisième cycle de végétation de Luzerne et foin plus aliment concentré respectivement). Cependant, une valeur est particulièrement faible (19 p. 100) au milieu du premier cycle de végétation de la Luzerne et d'autres ne sont pas calculables avec le régime de Fétuque. Dans ce dernier cas, les valeurs du rapport  $(A + G)/N$  sont égales ou légèrement inférieures à celles que l'on a dans les aliments frais. Sur le plan analytique, ce phénomène pourrait être relié à une dépolymérisation de l'ADN qui ne serait plus dosable par la méthode utilisée. Sur le plan nutritionnel, il est difficile de dire exactement pourquoi ce phénomène, qui pourrait avoir une certaine importance avec les autres régimes, est particulièrement accusé avec le régime Fétuque. Une observation microscopique effectuée par N. VODOVAR sur les contenus de rumen d'une vache recevant du foin de Luzerne, ont montré qu'après éclatement des cellules végétales, les noyaux sont libérés dans la phase aqueuse et « physiquement » dégradés. Il reste à savoir, d'une part quels sont les facteurs de cette dégradation et d'autre part si parallèlement à cette évolution morphologique, il y a une évolution chimique (dépolymérisation plus ou moins importante). Les travaux de Y. NAKAO et K. OGATA (1962-1963) déjà cités, le suggèrent. Nous pensons donc essayer de mieux analyser ce phénomène *in vitro* et utiliser une autre méthode chimique qui nous permettrait de doser l'ADN même après sa dépolymérisation (thymine).

Si nous considérons les résultats de l'étude cinétique effectuée avec le régime de Ray-grass frais, nous remarquons l'effet de dilution produit par l'ingestion du repas ; phénomène que nous avons signalé plus haut. L'apport du repas dans le rumen provoque une diminution passive du pourcentage d'azote protéique se trouvant sous forme de microorganismes. Il semble que, parallèlement, cet apport alimentaire provoque une multiplication importante de la flore puisque entre 5 h et 9 h après le repas, 70 p. 100 environ des protéines sont des protéines microbiennes. Il est curieux de constater que par la suite le pourcentage diminue pour atteindre une valeur moyenne assez constante. On peut penser qu'après la phase de multiplication active, il se produit une autolyse assez importante. Ceci expliquerait les remontées des taux d'ammoniac que l'on constate souvent entre 8 h et 13 h après le repas. Des repas suffisamment rapprochés (sans l'être trop) accéléreraient le transit des corps microbiens au cours de la période de multiplication et avant l'autolyse. Ce phénomène expliquerait en partie que certaines rations soient plus efficaces, distribuées en un plus grand nombre de repas. La plupart des prélèvements de contenus de rumen ayant été effectués 3 h après le repas, il est possible que ce soit une des raisons pour lesquelles nous avons, pour de nombreux régimes, des proportions assez faibles. En plaçant ces valeurs dans le cadre de cinétiques comparables à celles effectuées avec le régime de Ray-grass, on trouvait des taux de conversion d'azote alimentaire en azote microbien majorés d'au moins 50 p. 100.

Les valeurs citées dans le tableau 7 sont à rapprocher de celles de Mc DONALD (1956-1957) qui évaluait à 90 p. 100 pour la caséine et à 40 p. 100 pour la zéine la part transformée au niveau du rumen, et de ceux de WELLER, GRAY et PILGRIM (1958) qui estiment que 61 p. 100 à 82 p. 100 de l'azote végétal est transformé en azote microbien. (Dans leur expérience les animaux recevaient du foin.)

Il faut noter que nos chiffres ne constituent que des minima compte tenu des réserves concernant la récupération de l'ADN. D'autre part, notre méthode d'échan-

tillonnage dans le rumen fait que nous prélevons en même temps des particules alimentaires ingérées depuis peu, des particules indigestibles provenant des repas précédents et des particules en voie de digestion. On peut penser que la fraction quittant le rumen contient une proportion de microorganismes beaucoup plus élevée. Cette détermination ne peut se faire que sur le contenu sortant du rumen ou éventuellement de la caillette. En effet, la présence d'une certaine quantité de microorganismes dans le rumen ne permet pas d'estimer leur transit ultérieur. Il faut connaître la « production » de microorganismes et « l'exportation » de cette production (si l'on veut déterminer avec précision la quantité d'azote alimentaire transformé en azote microbien) et sous quelle forme ces microorganismes sont utilisés par l'animal.

*Reçu pour publication en octobre 1964.*

### REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier R. JARRIGE et ses collaborateurs de la Station de Recherches sur l'Élevage des Ruminants, qui nous ont permis de mener à bien cette étude.

### SUMMARY

#### QUANTITATIVE EVALUATION OF THE MICROBIAL POPULATION OF THE DIGESTIVE TRACT OF RUMINANTS BY THEIR CONTENT OF NUCLEIC ACIDS

A method is described by which the nucleic acid content can be determined in the foods, digestive contents and digestive microorganisms of ruminants. Since the microorganisms and the normal foods of the ruminant have very different contents of deoxyribose nucleic acid this enables us to evaluate the proportion of protein nitrogen in the digestive contents ascribable to the microorganisms

*Principles of the method* : the samples, fresh or dried, are subjected to three extractions :

- a) extraction with 80 p. 100 ethanol (v/v at 0°C.)
- b) extraction with 10 p. 100 trichloroacetic acid (v/v)
- c) extraction with a methanol-chloroform mixture (1v/2v).

The residue from these three extractions is hydrolysed with 0.5 N oda at 37°C which dissolves the RNA in the form of monoribonucleotides. The DNA, precipitated by 10 p. 100 trichloroacetic acid (v/v) is hydrolysed by 0.5N perchloric acid at 80°C. The purine bases are separated chromatographically by an amberlite IR 120 column (elution with hydrochloric acid). The DNA is thus estimated by the sum of adenine + guanine (A + G).

#### *Results.*

1. The use of this method on foodstuffs and the contents do the rumen of animals subjected to different diets and then slaughtered has shown that the ratio (A + G)/N (N being the nitrogen content of the residue of the three extractions a, b and c) varies between 1.5 (concentrates) and 10 (fresh lucerne) for the foodstuffs; between 12 (diet of concentrates) and 20 (diet of fresh ryegrass) for the rumen contents ; and is of the order of 26 for the microorganisms.

2. Using the same method we followed the evolution of the rumen contents of two cows fitted with fistulas, the one receiving only fresh fescue during the first growth cycle and the other receiving fresh lucerne during three growth cycles. With the lucerne the mean values of the ratio (A + G)/1N were : 17.8 at the beginning of the first cycle, 12.3 at the end of the first cycle, 17.2 in the second and 14 in the third cycle. For the fescue, the values varied very little, between 5.5 and 9.1.

3. The results are discussed, particularly in relation to the low ratios found with the diets of fescue and of erne. The plucpercentage of protein nitrogen found in the form of microorganisms was calculated for the different diets. These values, which are minimum values, vary between 68 p. 100 (fresh ryegrass) and 30 p. 100 (fresh lucerne) at the end of the first cycle.

### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAKER F., HARRISS S. T., 1947-1948. Microbiol digestion in the rumen (and coecum), with special reference to the decomposition of structural cellulose. *Nutr. Abstr. Rev.*, **17**, 3-11.
- BOIVIN A., cité par CHARGAFF E., DAVIDSON J. N., 1955. *The nucleic acids.*, vol. II, 14. Academic press, inc. New York.
- BOYNE A. W., EADIE J. M., RAITT K., 1957. The development and testing of a method of counting rumen ciliate protozoa. *J. Gen. Microbiol.*, **17**, 414-123.
- DAVIDSON J. N., 1960. *La biochimie des acides nucléiques.* 60-62 Dunod Édité., Paris.
- MC DONALD I. W., 1954. The extent of conversion of food protein in the rumen of sheep. *Biochem. J.*, **56**, 120-125.
- MC DONALD I. W., HALL R. J., 1957. The conversion of casein into microbial proteins in the rumen. *Biochem. J.*, **67**, 400-405.
- FAUCONNEAU G., GAUSSERES B., 1961. Les bactéries et protozoaires libres du rumen. Variations avec le régime alimentaire et le repas. *Congrès de Hambourg*, p. 32-34.
- GALL L. S., BURROUGHS W., GERLAUGH P., EDDINGTON B. H., 1949. Rumen bacteria in cattle and sheep on practical farm rations. *J. Anim. Sci.*, **8**, 441-449.
- HEALD P. J., 1951. The estimation of glucose-containing substances in microorganisms from the rumen of sheep. *Brit. J. Nutr.*, **5**, 75-83.
- HEALD P. J., 1951. The assesment of glucose-containing substances in rumen microorganisms during a digestion cycle in sheep. *Brit. J. Nutr.*, **5**, 84-93.
- MOIR R. J., SOMERS M., 1957. Ruminant flora studies VIII. The influence of rate and method of feeding a ration upon its digestibility, upon ruminal function and upon the ruminal population. *Aust. J. Agric. Res.*, **8**, 253-265.
- MOIR R. J., SOMERS M., 1956. A factor influencing the protozoal population in sheep. *Nature*, **178**, 14721
- NAKAO Y., OGATA K., 1963. Degradation of nucleic acids and their related compounds by microbial enzymes. *Agric. Biol. Chem.*, **27**, 116-120, 199-206, 292-300, 491-517.
- MC NAUGHT M. L., SMITH J. A., HENRY K. M., KON S. K., 1950. The utilisation of non-protein nitrogen in the bovine rumen. V. The isolation and nutritive value of a preparation of dried rumen bacteria. *Biochem. J.*, **46**, 32-36.
- PURSER D. B., MOIR R. J., 1959. Ruminant flora studies in the sheep. IX. The effect of pH on the ciliate population of the rumen *in vivo*. *Aust. J. Agric. Res.*, **10**, 555-564.
- VENDRELY R., 1946. *Symposium sur les protéines*, p. 165. Masson et C<sup>ie</sup>, Paris.
- WELLER R. A., GRAY F. V., PILGRIM A. F., 1958. The conversion of plant nitrogen to microbial nitrogen in the rumen of the sheep. *Brit. J. Nutr.*, **12**, 421-429.