

MÉTABOLISME DU RAT « GERM-FREE »

TENEURS DES CONTENUS DIGESTIFS EN CERTAINS COMPOSÉS AZOTÉS,
EN SODIUM ET EN POTASSIUM
TENEURS DE QUELQUES TISSUS EN ACIDES NUCLÉIQUES

Étiennette COMBE, Éliane PENOT, H. CHARLIER et E. SACQUET
Avec la collaboration technique de Jeanine WAGNER et Noëlle BOURGEOUX

*Laboratoire d'Étude des Métabolismes,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)
Centre de Sélection des Animaux de Laboratoire,
Centre national de la Recherche scientifique, Gif-sur-Yvette (Seine-et-Oise),*

SOMMAIRE

Cette étude menée comparativement chez des rats *germ-free* et chez différentes sortes de rats témoins comporte les déterminations :

1° des teneurs en acides aminés libres, urée, ammoniacque, azote, sodium et potassium des contenus de cæcum ;

2° des quantités d'acides nucléiques (ADN, ARN) et des ribonucléotides acido-solubles de certains tissus : intestin, foie, carcasse.

Nous avons pu ainsi vérifier le développement du cæcum, principale caractéristique morphologique des *germ-free* ; et observer dans le cæcum de ces animaux, une teneur deux fois plus élevée d'azote soluble, une quantité très supérieure d'acides aminés libres et la présence d'urée, absente chez les témoins. Ces résultats conduisent à rechercher pourquoi l'excrétion fécale azotée est supérieure chez les *germ-free* et quelles sont les origines de ces composés.

La modification la plus importante, due à l'absence de microbes, porte sur les tissus en contact avec les contenus digestifs, le nombre total de μ moles d'ADN du tissu intestinal des rats *germ-free* est inférieur de 20 p. 100 à celui des rats traditionnels recevant un régime à base de farine de poisson.

INTRODUCTION

Les rats *germ-free* vivant dans un milieu bactériologiquement stérile ont un tube digestif ne contenant aucun microbe.

Leurs caractéristiques morphologiques principales portent sur des modifications des tissus et des organes qui, dans le cas des animaux traditionnels, sont particu-

lièrement en contact avec les bactéries. Ainsi les villosités intestinales des animaux *germ-free* adultes gardent un aspect non ramifié qui ne se rencontre que chez le nouveau-né des animaux traditionnels (GORDON H. A., 1961). Le cæcum est beaucoup plus volumineux chez le rat *germ-free* comme l'a noté GUSTAFSON, alors que le tissu lymphoïde est moins développé et que les lymphocytes sont moins nombreux.

Les animaux *germ-free* constituent un matériel précieux pour l'étude des phénomènes d'utilisation digestive, puisque se trouvent éliminées les bactéries du tube digestif qui interviennent normalement dans la synthèse et la dégradation des substances nutritives.

Nous avons abordé l'étude de l'état métabolique du rat *germ-free* par des mesures globales (mesure de bilans comportant l'analyse des carcasses, mesure des consommations et quelques mesures d'excréta). Nous avons effectué ensuite des analyses plus fines sur des contenus de cæcum et sur certains tissus (parois de l'intestin, foie, carcasse).

Les teneurs en acides nucléiques et en nucléotides acido-solubles nous permettent d'apprécier l'état métabolique de ces tissus. La quantité d'acide désoxyribonucléique (ADN) d'un tissu est proportionnelle au nombre de noyaux (DAVIDSON, 1950, DURAND et al., 1965) si le taux de polyploidie est constant. Les acides ribonucléiques (RNA) nous renseignent sur l'activité de synthèse protéique des cellules.

Les teneurs en nucléotides acido-solubles nous renseignent sur la présence des coenzymes et des précurseurs d'acides nucléiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL

Nous avons étudié comparativement des rats *germ-free* provenant de l'élevage du C. N. R. S. (Gif-sur-Yvette) et des rats témoins recevant leur alimentation *ad libitum*. Tous les lots sont constitués de rats mâles, suivis au cours de leur période de croissance.

Rats Lobund « germ-free »

Ils descendent des rats importés en juin 1960, du Lobund Institute à l'état *germ-free*. L'état *germ-free* est caractérisé par l'absence rigoureuse de micro-organismes vivants décelables. Ceci est réalisé dans les isolateurs de Reyniers maintenus bactériologiquement stériles. Ces appareils sont stérilisés par la vapeur sous pression, le vide permet d'éliminer l'humidité résiduelle à la fin de la stérilisation ; l'air est filtré sur laine de verre après avoir été amené à 40 p. 100 d'humidité et 21,1°C. Les aliments et tous les objets introduits dans l'appareil sont également stérilisés.

Différents lots de rats *germ-free* mâles, ont été utilisés, au cours de ces études :

— le premier lot (A) était constitué de 6 rats installés dans des cages individuelles dès le sevrage. On a mesuré quotidiennement leur consommation et leur croissance pondérale pendant 50 jours. On les a sacrifiés à l'âge de 71 jours et on a procédé à diverses analyses sur l'ensemble des carcasses et sur certains organes. Les expériences et les différentes analyses sont résumées dans le tableau 1.

— le second lot (B) était constitué de 12 rats groupés deux par deux dans les cages dès le sevrage. On a quotidiennement mesuré leur consommation et leur croissance pondérale pendant 30 jours. Ils ont été sacrifiés à l'âge de 67 jours ;

— on a étudié par la suite deux autres lots de rats *germ-free* : lot (C) = 6 individus et lot (D) = 10 individus, afin de compléter les résultats relatifs aux contenus de cæcum et aux tissus de l'intestin.

Rats témoins

On a disposé de plusieurs sortes de témoins :

Rats Lobund « conventionnalisés », nés et sevrés à l'état *germ-free*, mais vivant dans un milieu non aseptique. La flore digestive de ces animaux leur a été inoculée par ingestion de suspension de matières fécales de rats traditionnels.

On a utilisé un lot de 6 rats *Lobund « conventionnalisés »* (lot E) installés dans des cages individuelles identiques à celles utilisées pour les rats *germ-free*. Les animaux ont été sevrés à 21 jours, leur croissance pondérale et leur consommation ont été suivies pendant 35 jours, puis on les a sacrifiés. On a effectué différentes mesures et analyses (tabl. 1).

TABLEAU I

Schéma des expériences

Rats mâles différentes catégories	Régime	Nombre d'animaux et désignation des lots	Conditions en fin d'expérience		Mesures et analyses effectuées
			Age en jours	Poids vif moyen (g)	
<i>Lobund germ-free</i>	S	6 A	71	214	1-3-4
		12 B	67	278	1-3-4
		6 C		240	5
		10 D	62	226	3-4-5
<i>Lobund conventionnalisés</i>	S	6 E	63	229	1
		5 F	62	236	4-3-5
<i>Témoins traditionnels</i>	S	3 G	56	195	2
	P	8 H	52	193	3-4
		5 I	70	282	1-3-4

1 : Mesure de consommation et de croissance, analyse carcasse (bilan).

2 : Bilan classique Ingéré-Excrété.

Ingéré

3 : Acides nucléiques carcasse.

4 : Acides nucléiques, Foie
et nucléotides) Intestin

5 : Analyse contenu cœcum.

Régime S = Régime stérilisé.

Régime P = Régime à base de protéines de farine de poisson.

Afin de préciser et compléter les résultats obtenus au cours des premières analyses on a utilisé un deuxième lot de 5 rats « conventionnalisés » (lot F).

Rats albinos « traditionnels », élevés dans la raterie du C. N. R. Z. Ces rats ont reçu le même aliment stérilisé que les rats *germ-free* et les « conventionnalisés » après avoir été sevrés à 21 jours puis placés en cages à bilans. Au bout d'une semaine (considérée comme période pré-expérimentale) on a effectué les mesures d'ingestats, d'excrétats et de croissance chaque jour pendant quatre semaines. Les résultats ne sont donnés que pour un groupe (lot G) de 3 rats, les autres individus ayant été éliminés par suite de leur mauvaise croissance consécutive à un refroidissement.

Un autre lot recevait un régime à base de farine de poisson ; 8 individus furent sacrifiés à l'âge de 52 jours (lot H) et 5 à l'âge de 70 jours (lot I).

MÉTHODES

a) *Prélèvements*

On prélève l'intestin sous anesthésie après ligature de ses extrémités (au niveau du pylore et de l'entrée du cæcum) et injection d'acide trichloracétique (ATC) 10 p. 100 à 0°C. On rince la lumière intestinale à l'ATC, puis l'intestin est congelé dans l'azote liquide. (Les intestins de tous les rats d'un même lot sont tous traités ainsi, les opérations et les analyses suivantes portent sur l'ensemble des intestins d'un même lot).

Le cæcum ligaturé à ses deux extrémités est pesé, son contenu est fixé dans l'éthanol 95 p. 100 bouillant, puis immédiatement refroidi. Les contenus des cæcums d'un même lot de rats seront analysés ensemble.

Le foie est prélevé, rincé à l'ATC et jeté immédiatement dans l'azote liquide. Les foies d'un même lot sont traités ensemble par la suite. Les carcasses sont également congelées.

b) *Analyses*

Les méthodes d'analyse des acides nucléiques (ADN, ARN) et des nucléotides acido-solubles sont décrites par DURAND *et al.* (1965).

Nous avons effectué par ailleurs des analyses de contenu de cæcum en ce qui concerne différentes fractions azotées, les acides aminés libres ainsi que le sodium et le potassium.

Les contenus de cæcums sont soumis à trois extractions successives à l'éthanol 80 p. 100 (3 broyages et 3 centrifugations) à 0°-2°C. Ensuite on détermine dans celui-ci :

- l'azote total par la méthode Kjeldahl,
- l'azote ammoniacal à l'aide de l'appareil Parnas Wagner à pH 9 à 100°C,
- l'azote uréique par transformation en ammoniacque grâce à l'uréase,
- les acides aminés par chromatographie quantitative sur papier (FAUCONNEAU et PION, 1962),
- le sodium et potassium au photomètre de flamme Eppendorf.

RÉSULTATS

I. *Aliments et consommation*

Nous utilisons deux régimes dont les compositions sont décrites dans les tableaux 2 et 2 bis.

L'aliment stérilisé est présenté sous forme de cylindre (hauteur 8 cm, diamètre 34 mm) pesant en moyenne 100 g. Les mangeoires sont équipées d'un petit plateau qui permet de réduire de 5,4 à 1,2 p. 100 les pertes par gaspillage.

Les quantités consommées et les croissances pondérales sont rapportées dans le tableau 3.

Pour les différents lots recevant le régime stérilisé, les croissances moyennes varient de 4 à 5,5 g par jour dans la période observée.

L'azote fixé dans la carcasse peut être calculé :

— par l'analyse corporelle des animaux en fin d'expérience et déduction de l'azote contenu dans les animaux en début d'expérience, calculé en fonction de leur poids à cette date (RÉRAT *et al.*, 1962) ;

— par la méthode des bilans (N ingéré-N excrété pendant toute la période expérimentale).

TABLEAU 2

Composition centésimale des aliments utilisés

S = Aliment stérilisé à 120° pendant 30 minutes :

Caséine	20	Levure.....	2
Huile de maïs	5	Poudre de foie	2
Crème de riz	58	Méthionine	0,3
Poudre de cellulose.....	5	Mélange minéral vitaminique	4

Les animaux reçoivent de plus les vitamines B₁ et C dans l'eau de boisson : 800 cc d'eau de boisson contiennent 2 cc d'une solution vitaminique (100 mg B₁ et 200 mg C dans 50 cc d'eau).

P = Aliment à base de farine de poisson :

Farine de poisson de Norvège ..	22	Agar agar	2
Amidon de maïs	42	Mélange minéral Orsborne Mendel..	3
Sucre cristallisé	21	Mélange vitaminique.....	1
Huile d'arachide (+ Vit. A et D)	8		

A 100 g du mélange on ajoute 500 cc d'eau et 5 cc d'une solution aqueuse de choline à 20 % ainsi que 5 cc d'une solution de biotine à 40 mg/l.

TABLEAU 2 (bis)

Teneur en acides aminés des régimes germ-free et témoins
(g pour 16 g N)

Acides aminés	Régime farine de poisson témoin	Régime stérilisé germ-free
Acide aspartique	9,05	7,4
Thréonine	4,3	3,8
Sérine	4,0	5,2
Acide glutamique.....	13,0	20,85
Proline	4,1	9,15
Glycine	6,25	2,8
Alanine.....	6,45	3,75
Valine	5,75	7,0
Méthionine.....	2,9	3,35
Cystine	0,95	0,75
Méthionine + Cystine	3,8	4,10
Isoleucine	4,7	5,25
Leucine	7,4	9,2
Tyrosine	3,05	5,1
Phénylalanine	4,0	5,45
Lysine	8,05	6,9
Histidine	2,2	2,8
Arginine	5,4	4,5
Matière azotée	16 %	22,4 %

Le coefficient d'utilisation de l'azote (N fixé/N ingéré) est égal à 32 et 33 pour les *germ-free* et 32 pour les « conventionnalisés ».

Pour les rats traditionnels le rapport est de 37 avec le régime poisson et 38,5 avec le régime stérilisé. La signification des résultats est étudiée dans la discussion.

2. Composition corporelle

Les résultats relatifs à la composition globale de la carcasse sont rapportés dans le tableau 4.

Nous avons noté le développement du tractus digestif beaucoup plus important chez les *germ-free*, que chez les différents témoins.

TABLEAU 3

Nombre et catégorie d'animaux	Régime farine de poisson	Régime stérilisé			
	Témoins traditionnels 5	Témoins traditionnels 3	<i>Lobund</i> « conventionnalisés » 6	<i>Lobund germ-free</i> 6	<i>Lobund germ-free</i> 12
Nombre de jours d'expérience	42	28	35	43	30
Poids moyen au début d'expérience	66	60,8	44,2	39,7	113
Poids moyen à l'abattage	282	195	229,0	214,0	278
Gain de poids moyen au cours de la période expérimentale	216	134,2	184,8	174,3	165
Croissance moyenne journalière . . .	5,1	4,8	5,3	4,05	5,5
Matière sèche ingérée (g par animal)	493	396	460	420	480
$\frac{\text{Gain de poids}}{\text{Matière sèche ingérée}}$	0,437	0,338	0,420	0,415	0,344
N ingéré par animal	19,7	16,2*	18,6	16,7	18,8
N fixé dans la carcasse	7,32	6,21	5,23	5,38	6,19
$\frac{\text{N fixé}}{\text{N ingéré}} \times 100$	37	38,5	32	32	33

* Résultats obtenus par la méthode des bilans (Ingesta-Excreta).

Le poids carcasse exprimé en p. 100 du poids vif oscille entre les valeurs 78 et 86 pour les *germ-free* alors que pour les témoins traditionnels il est supérieur à 90. On obtient des valeurs intermédiaires pour les témoins « conventionnalisés » : 87,6 et 90,8.

Le développement du cæcum chez le *germ-free* est particulièrement important. Les résultats relatifs au poids de cæcum plein et vide de rats *germ-free* et de rats « conventionnalisés » sont donnés dans le tableau 5. En moyenne le poids de cæcum

d'un rat *germ-free* est 5 à 6 fois plus important que celui d'un rat « *conventionnalisé* » âgé de 70 jours environ.

Les compositions brutes de carcasses sont comparables ; les carcasses des *germ-free* semblent avoir une teneur en matières minérales légèrement plus élevée (3,5 et 3,7) que chez les témoins (3,1 et 3,4), mais il faut tenir compte du poids de carcasse respectif.

TABLEAU 4
Composition de carcasse

Différentes catégories	Rats <i>Lobund germ-free</i>			Témoins <i>Lobund conventionnalisés</i>		Témoins traditionnels	
	A	D	B	E	F	H	I
Lots							
Age à l'abattage (j).....	71	63	67	63	62	52	70
Poids moyen vif	214	235	278	229	243	193	282
Poids moyen carcasses	180	185	239	208	213	174	258
Poids carcasses en % poids vif	84,1	78,7	86	90,8	87,6	90,3	91,5
Matière sèche en % poids frais	34,6		36,5	34,5		33,6	38,8
N × 6,25 en % poids frais	19,1	22,4	21,0	17,7	21,9	18,4	19,25
Matière grasse en % poids frais	12,4		11,8	13,7		11,9	16,2
Matières minérales.....	3,5		3,7	3,1			3,4

TABLEAU 5
Importance relative des cæcums des rats germ-free et des rats conventionnalisés

	Nombre de mesures	$\frac{\text{Poids contenu cæcums}}{\text{Poids carcasses}} \times 100$	S_m des contenus
Rats <i>germ-free</i>	10	8,5	1
Rats « <i>conventionnalisés</i> »	5	1,3	0,19

3. Étude des contenus

Nous avons trouvé que les teneurs en azote des fèces de *germ-free* étaient plus élevées que celles des fèces des animaux ordinaires recevant la même alimentation (54,5 mg N/g matière sèche chez les *germ-free* et 44 mg N/g matière sèche chez les témoins).

Dans l'étude du contenu du caecum nous avons analysé différentes formes d'azote ainsi que le sodium et le potassium. Les résultats sont rapportés sur le tableau 6, exprimés d'une part par animal et d'autre part pour 100 g de contenu frais.

TABLEAU 6

Influence de l'état germ-free sur les teneurs en sodium, potassium, azote et diverses fractions azotées de l'extrait alcoolique de contenu de caecum

Catégorie et nombre d'animaux		Poids moyen		Mode d'expression (mg) des résultats	Azote soluble				Na	K
		Carcasse	Cæcum		N. total	N. ammoniacal	N. uréique	Somme acides aminés		
Rats Témoins <i>conventionnalisés</i>	5	206,4	2,74	pour 100 g de contenu	220	22,3	0	2,7	407,2	773,8
				par animal	6,02	0,612	0	0,074	11,16	21,2
Rats <i>germ-free</i>	10	184,39	14,07	pour 100 g de contenu	417,1	2,25	19,5	131,7	655,17	154,8
				par animal	58,8	0,31	2,7	18,2	92,22	21,65
	6	197,8	17,4	par animal	453,7	3,82	26	244,9	391,11	122,55
					79,16	0,66	4,5	42,4	68,25	21,38

Des différences très importantes apparaissent entre rat *germ-free* et rat « *conventionnalisé* » :

— il y a environ 10 fois plus d'azote total soluble par animal chez les *germ-free* que chez les témoins « *conventionnalisés* » ;

— exprimé pour 100 g de contenu, nous trouvons 41,7 et 55,4 mg d'urée chez les *germ-free* et aucune trace d'urée dans les cæcums des « *conventionnalisés* » ;

— par animal il y a autant d'ammoniaque chez les *germ-free* que chez les « *conventionnalisés* » alors que pour 100 g de contenu il y en a 10 fois moins chez les *germ-free* ;

— les teneurs en acides aminés libres sont données dans le tableau 6 *bis*. Pour chacun des modes d'expression (% de la somme des acides aminés et, par gramme de contenu frais) on a ajouté en parallèle les teneurs en acides aminés libres dans le plasma de sang de rat (SWENDSEN et al., 1962). On remarque qu'il y a beaucoup plus d'acides aminés libres dans le contenu de cæcum des *germ-free* (18 à 42 mg par animal) que dans celui des témoins (0,074 mg par animal), et qu'ils sont constitués par une proportion beaucoup plus importante (4 fois) d'acides aminés essentiels ;

— il y a autant de potassium dans les contenus de cæcum de *germ-free* que dans ceux de « *conventionnalisé* » mais il y en a 4 et 5 fois moins chez les *germ-free*, exprimé en mg pour 100 g de contenu ;

TABLEAU 6 (bis)

	Acides aminés γ/g du contenu frais				Acides aminés % de la somme			
	Témoins (5)	<i>Germ-free</i> (6)	<i>Germ-free</i> (10)	Acides aminés du plasma	Témoins (5)	<i>Germ-free</i> (6)	<i>Germ-free</i> (10)	Acides aminés libres du plasma
Acide aspartique	3,3	72,25	41,4	7,7	12,1	2,95	3,15	2,0
Acide glutamique	9,0	331,15	171,7	27,8 (+ ci- trulline)	33,0	13,5	13,05	7,3
Sérine	3,0	267,8	159,5	59,1	11,05	10,9	12,1	16,6
Glycine	1,9	127,6	59,9	18,1	6,8	5,2	4,55	4,8
Asparagine		128,6	77,4	(98,7 + gluta- mine)		5,25	5,87	(avec glutamine)
Lysine		119,9	44,1	50,6		4,9	3,35	13,4
Thréonine		161,1	86,4	6,1		6,6	6,6	1,6
Alanine	3,0	137,7	81,3	38,7	11,05	5,6	6,2	10,2
Glutamine.....	3,6	111,3	82,6	(avec asparagine)	13,1	4,5	6,3	26,0
Valine		180,4	90,8	10,9		7,3	6,9	2,9
Leucine + Iso- leucine + Phé- nylalanine	3,4	471,6	228,7	20,4	12,55	19,25	17,3	5,4
Proline		73,7	15,15	14,5		3,0	1,15	3,8
Histidine - argi- nine		102	54	14,1		4,15	4,10	3,7
Citrulline.....		35	20,5	(avec acide glu- tamique)		1,45	1,55	(voir acide glu- tamique)
Méthionine		65,35	44	4,5		2,65	3,35	1,2
Tyrosine		25,15	44,8	7,4		1	3,40	1,95
Σ indispensables	3,4	1 015	525	109	12	41	40	29
Somme	27,2	2 449	1 317	378				

TABLEAU 7

Intestin

Age à l'abattage (j)	Rats <i>germ-free</i>			Rats « <i>convention-</i> <i>nalisés</i> »	Rats <i>traditionnels</i> régime poisson	
	71	63	67	67	52	70
Nombre d'animaux	6	5	9	4	8	5
Poids moyen vif	214	235	278	243	193	282
P \bar{m} carcasse	181	185	239	213	174	258
P \bar{m} intestin frais	6,82	6,73	9,68	7,83	9,2	9,1
P \bar{m} cæcum	17,6	14,08	17,4	2,7		
Poids frais en % poids vif	3,18	2,97	3,48	3,32	4,77	3,22
Poids sec en % poids vif	0,34	0,32	0,35	0,33	0,46	0,35
ARN μ mole/g sec dégraissé ...	114,2	105,5	124,6	111,6	133	121,2
ARN μ mole total de l'organe .	84,5	77,0	122,1	86,0	117	118,0
ADN μ mole/g sec dégraissé ...	95,2	93,0	90,1	100,9	112,9	109
ADN μ mole total de l'organe .	70,4	67,9	88,3	77,7	99,3	106,2
ARN/ADN	1,2	1,13	1,38	1,10	1,2	1,1
$\frac{\text{Poids sec de l'organe}}{\mu\text{mole ADN}} \times 10^3$	10,5	10,7	11,1	9,9	8,9	9,1
$\frac{\text{Matière azotée}}{\mu\text{mole ADN}}$	8,9	9,7	9,3	8,9	7,5	7,8
UDP — Sucre + UDP — AG (μ moles/g sec)	2,1	1,71	1,96		2,16	2,09
Uridine-dérivés (μ moles/g sec).	4,31	3,96	4,33		4,67	4,57
Guanosine (μ moles/g sec)	1,775	1,48	1,625		2,515	2,40
Adénosine (μ moles/g sec)	10,49	9,20	9,86		12,71	13,45
ADN (μ moles/g sec)	1,29	9,90	1,19		1,39	1,19
Cytidine (μ moles/g sec)	0,677	0,597	0,714		0,794	0,471
Nucléotides totaux (μ moles/g sec)	19,5	16,8	18,5		23,0	23,0
Nucléotides totaux (μ moles/ADN)	0,204	0,180	0,205		0,203	0,211

— les quantités de sodium par animal sont 6 à 8 fois plus élevées chez les *germ-free* mais exprimées en mg pour 100 g de contenu elles sont équivalentes.

Études biochimiques des tissus.

Nous comparons les résultats trouvés pour les *germ-free* à ceux trouvés pour les rats *traditionnels* soumis au même régime stérilisé et à ceux trouvés pour les rats *traditionnels* soumis au régime à base de farine de poisson. Pour ces derniers en effet, DURAND *et al.* (1965) ont effectué une étude systématique des teneurs en acides nucléiques de certains tissus au cours de la croissance. L'étude des teneurs en nucléotides acido-solubles a également été entreprise, mais les analyses sont laborieuses et les résultats actuels sont moins nets que pour les acides nucléiques.

Intestin. — Voir tableau 7.

Il y a 20 à 30 p. 100 de moins d'ADN total dans l'intestin des *germ-free* que dans celui des témoins *traditionnels*. La différence est moins grande entre l'intestin des *germ-free* et celui des rats « *conventionnalisés* ».

Exprimées en μ moles par gramme sec dégraissé, les teneurs en ADN sont plus faibles dans les intestins des rats *germ-free* que dans ceux des témoins *traditionnels*. La différence est de 5 à 10 p. 100 si on compare l'ADN de l'intestin *germ-free* à celui des témoins « *conventionnalisés* » (lot F) ; elle atteint 20 p. 100 si on compare l'ADN de l'intestin des *germ-free* à celui des témoins *traditionnels* recevant le régime poisson (lots N et I).

Le rapport matière azotée/ADN est plus grand chez les *germ-free* que chez les témoins. La différence est assez faible entre *germ-free* et témoins du lot G (9,3 contre 8,9 à poids de carcasse comparable), elle est plus marquée entre *germ-free* et témoins des lots H et I (9,3 contre 7,6).

Exprimés par gramme sec dégraissé, il y a moins de nucléotides acido-solubles dans l'intestin des *germ-free* que dans celui des témoins *traditionnels* recevant le régime de poisson (17 à 19,5 μ moles/g sec dégraissé pour les *germ-free* et 23 μ moles/g sec dégraissé pour les témoins). La différence porte surtout sur les composés de l'adénosine et de la guanosine. Rapportée à l'ADN, la somme des nucléotides acido-solubles est identique chez les *germ-free* et chez les témoins *traditionnels*. Cependant pour les *germ-free*, la somme des composés « guanosine dérivés » rapportée à l'ADN est supérieure à celle trouvée pour les témoins et la somme des composés « uridine dérivés » et NAD. (nicotinamide-P-P-ribose-adénine) rapportée à l'ADN est inférieure à la somme correspondante trouvée chez les témoins.

Foie. — Les résultats sont donnés dans le tableau 8.

Le poids moyen de foie frais exprimé en p. 100 du poids vif chez les *germ-free* est légèrement plus faible que chez les animaux témoins *traditionnels*. Si on exprime le poids de foie sec par rapport à la carcasse, la différence disparaît, compte tenu des variations des différents lots.

Le nombre total de μ moles d'ADN des foies de rats *germ-free* est inférieur de 6 à 10 p. 100 à celui des foies de rats témoins ; en outre, le rapport ADN/g sec est plus petit chez les *germ-free*.

Rapporté au poids de résidu de foie sec dégraissé, il y a moins de nucléotides acido-solubles totaux chez les *germ-free* (39,1 μ moles dans le lot de *germ-free* de poids

de carcasse moyen 239 g) que chez les témoins (39,6 μ moles/g sec pour les témoins de poids de carcasse moyen 258 g).

Les nucléotides totaux rapportés à l'ADN sont identiques chez les *germ-free* et chez les témoins, mais il y a davantage d' « Uridine-dérivés » (UDP sucre et UDP — A. G.), d' « Adénosine-dérivés » et de NAD chez les *germ-free*. En revanche, ces derniers contiennent moins de « cytidine dérivés » et de « guanosine-dérivés » que les témoins.

TABLEAU 8

Foie

	Rats <i>germ-free</i>			Rats témoins « traditionnels » (régime poisson)	
P \bar{m} carcasse	181	185	239	174	258
P \bar{m} foie frais	9,35	8,94	12,2	9,4	12,98
P \bar{m} foie sec	1,92	1,7	2,23	1,74	2,42
Foie frais en % poids vif	4,36	3,95	4,39	4,9	4,59
Foie sec % carcasse	1,06	0,91	0,93		0,93
ARN μ mole/g sec dégraissé	99,5	99,9	98,4	121,0	100,6
ARN μ mole total de l'organe	191,2	169,8	219,4	211	250,5
ADN μ mole/g sec dégraissé	28,35	29,5	27,3	33,0	29,15
ADN μ mole total de l'organe	54,4	50,15	60,8	57,0	72,6
ARN/ADN	3,5	3,4	3,6	3,7	3,45
$\frac{\text{Poids frais de l'organe}}{\mu\text{mole d'ADN}} \times 10^3$	171,8	177,9	200,6	164,9	177,8
$\frac{\text{Poids sec de l'organe}}{\mu\text{mole ADN}} \times 10^3$	35,3	33,8	36,7	30,5	34,1
Matière azotée μ mole ADN	28,8	28,7	30,4	25	29,7
UDP — Sucre + UDP — AG (μ moles/ADN $\times 10^3$)	165,7		179,6	137,2	155,0
Σ U (μ moles/ADN $\times 10^3$)	248		326,5	306	259
Σ G (μ moles/ADN $\times 10^3$)	97,7		98,2	105,15	95,36
Σ A (μ moles/ADN $\times 10^3$)	57,1		65,2	54,84	60,7
NAD (μ moles/ADN $\times 10^3$)	136,8		145,1	125,4	126,9
Σ C (μ moles/ADN $\times 10^3$)	13,0		18,7	18,5	13,7
Nucléotides totaux (μ moles/ADN) .	1,25		1,43	1,26	1,36

Carcasse. — Les résultats sont résumés dans le tableau 9. Les études de DURAND et al. montrent que la teneur en ADN des carcasses est fonction de l'âge, donc du poids de celles-ci. Ceci nous permet de dire que les teneurs en ADN des carcasses des rats *germ-free* sont inférieures de 5 p. 100 environ à celles des rats témoins des lots H et I. Cette différence diminue à 4 p. 100 si on compare les carcasses des rats *germ-free* à celles des témoins du lot G.

TABLEAU 9

Carcasse

	Rats <i>germ-free</i>			Rats témoins <i>traditionnels</i>		
	A	D	B	Régime stérilisé G	Régime poisson H I	
Différents lots						
Poids moyen carcasses (g)	180	185	239	213	174	258
ARN μ mole/g sec dégraissé....	20,9	21,2	15,6	19,5	26,3	20,0
ARN μ mole total	782	902	814	896	925	963
ADN μ mole/g sec dégraissé....	20,25	17,1	15,25	17,2	21,1	18,15
ADN total μ mole	758	728	795	792	742	875
ARN/ADN	1,03	1,23	1,02	1,13	1,25	1,1
Poids frais mg/ μ mole ADN ...	239	254	314	307	235	295
Poids sec mg/ μ mole ADN	49,4	58,4	65,5	58,0	47,4	55,0
Matière azotée μ mole ADN	44,5	52,2	59,7	53,2	43,2	50,42

Matière azotée = N \times 6,25.

Le rapport, matière azotée/ADN, calculé pour les carcasses des rats *germ-free* est supérieur de 20 p. 100 environ à celui des carcasses des rats témoins des lots H et I, mais cette différence tombe à 15 p. 100 si on utilise comme témoin le lot G.

DISCUSSION

Malgré les difficultés de mesure sur les animaux *germ-free*, les premières expériences (lots A et E puis lots G et I) nous ont permis d'étudier la croissance et le comportement nutritionnel des animaux en mesurant quotidiennement leur croissance et leur consommation. Les mesures ont été effectuées dans les isolateurs grâce à une balance Roberval.

De plus nous avons mesuré la consommation individuelle totale des animaux des lots A, E, G, I (les animaux du lot B n'étant pas en cage individuelle) au cours de la période expérimentale par pesée de l'aliment au début et à la fin de l'expérience. Les résultats trouvés sont légèrement supérieurs (1 à 2 p. 100) aux quantités réellement consommées du fait du gaspillage.

La matière sèche de l'aliment enfermé dans des boîtes d'aluminium, n'a varié que de 1 p. 100 au cours de la période expérimentale. Par contre, les pellets consommés par les témoins « *conventionnalisés* » n'ont pas été stockés en boîtes et ont perdu 3 à 4 p. 100 de leur poids au cours de l'expérience ; nous avons dû effectuer une correction pour le calcul de la matière sèche et de l'azote ingérés dans ce cas.

Les quantités consommées sont très variables suivant les individus comme le montre le tableau suivant :

Différents lots	G	E	A	B
Moyennes des quantités consommées (g)	415	456	458	552
Nombre de mesures	3	6	6	6
S_m		11	7.9	6,7
Valeurs extrêmes	378 453	320 530	386 513	527 586

Malgré l'imprécision des mesures effectuées, les études de bilan nous montrent que le rapport N fixé/N ingéré est inférieur chez les rats *germ-free* à celui trouvé pour les témoins *traditionnels*. En effet, quelle que soit la période de croissance observée (de 40 à 214 g au lieu de 113 à 278 g), le rapport N fixé/N ingéré \times 100 varie de 32 à 33 pour les rats *germ-free* alors qu'il atteint 37 et 38,5 pour les rats témoins *traditionnels* (période de croissance de 60 à 195 g et de 66 à 282 g). Le lot de témoins « *conventionnalisés* » présente un rapport voisin de celui des rats *germ-free* ce qui pourrait indiquer une action caractéristique de sa flore et (ou) de l'état *germ-free* par lequel il est passé.

Les analyses des carcasses nous montrent peu de différences entre rats *germ-free* et rats *traditionnels*. Les matières minérales sont plus fortes pour les rats *germ-free* (3,54 et 3,7) que pour les témoins (3,1 et 3,4). En revanche, si on compare les poids de carcasse et les poids vifs, il ressort que les viscères ont une importance plus grande (15 à 21 p. 100) chez les rats *germ-free* que chez les témoins « *conventionnalisés* » ou *traditionnels* (8 à 10 p. 100). Ceci est surtout dû au développement caractéristique du cœcum chez les rats *germ-free* (tabl. 5). Notons que les variations individuelles de la taille du cœcum sont importantes : $S_m = 1$ pour les *germ-free* et 0,19 pour les « *conventionnalisés* ».

Étude du contenu du cœcum

Plusieurs auteurs ont rapporté des résultats relatifs à l'azote fécal de rats *germ-free* comparativement aux teneurs correspondantes chez les animaux témoins :

— LEVENSON et TENNANT (1963) donnent des résultats de bilan azoté quotidien

moyen (mg). L'excrétion fécale d'azote des rats *germ-free* atteint le double de celle des rats témoins, à tous les niveaux d'ingestion protéique (2,3 quand les rats sont à jeun, 2, 1 et 2,2 pour des ingérés azotés moyens et élevés).

— HOET *et al.* (1964) ont confirmé ces résultats : chez les rats *germ-free* l'excrétion fécale d'azote rapportée à l'ingesta, est 2 fois plus forte que chez les témoins.

— LUCKEY (1963) trouve des différences moins fortes : l'excrétion fécale d'azote est 1,4 fois plus importante chez les rats *germ-free* que chez leurs témoins.

Nos résultats sont également de cet ordre puisque nous trouvons 30 p. 100 de plus d'azote fécal rapporté à la matière sèche des excréta, chez les rats *germ-free* que chez les témoins *traditionnels* recevant le même régime stérilisé.

Ces résultats sont de prime abord surprenants : en effet, l'azote fécal des rats ayant une flore intestinale banale est dû, pour la moitié, à l'azote fécal bactérien, or cette fraction d'azote n'existe pas chez les rats *germ-free*.

Nous avons ainsi été amenés à étudier différentes formes d'azote, non pas dans les fèces, mais au niveau du cæcum où l'on peut considérer que la digestion enzymatique des protéines alimentaires est terminée. Dans les contenus de cæcum des *germ-free* nous avons trouvé des concentrations d'azote soluble deux fois plus élevées que dans ceux des témoins *traditionnels*. Une partie de cette différence est due à l'azote de l'urée et à celui des acides aminés libres que l'on trouve en beaucoup plus grande quantité chez les *germ-free* alors que chez ces animaux les concentrations en azote ammoniacal sont 5 à 10 fois plus faibles.

Les quantités importantes d'urée dosées dans le cæcum des rats *germ-free* sont à rapprocher des résultats de P. HOET *et al.* (1964) qui trouvent 13,2 mg d'urée par gramme de fèces chez les rats *germ-free* et n'en trouvent pas chez les témoins. L'urée constitue l'étape finale du métabolisme des acides aminés chez les mammifères : elle ne peut être dégradée que par les bactéries du tube digestif (KORNBERG et DAVIES, 1954). LEVENSON *et al.* ont confirmé ces résultats en utilisant de l'urée marquée chez des animaux *germ-free*.

L'urée retrouvée dans le cæcum des *germ-free* pourrait provenir du métabolisme général, elle pourrait également provenir de l'activité propre du tube digestif.

Bien que la précision des méthodes de dosage utilisées pour la chromatographie quantitative de la plupart des acides aminés ne soit que de 10 à 15 p. 100 (la somme histidine-arginine est l'une des quantités connue avec le moins de précision ± 20 p. 100), elle est suffisante, en raison des grandes différences observées. Exprimés par 100 g de contenu, nos résultats varient du simple au double entre les deux séries *germ-free*. Ces échantillons ont été prélevés à des dates distinctes mais cependant ils ont été traités de façon pratiquement identique. Nous devons remarquer que dans le lot où l'on trouve quantitativement plus de glutamine on trouve moins d' NH_3 , de plus la somme acide glutamique + glutamine exprimés en p. 100 de la somme totale des acides aminés est moins différente entre les deux lots (18 p. 100 et 19 p. 100) que les résultats correspondants de glutamine (4,5 et 6,3).

En revanche, il y a une bonne concordance entre les quantités d'acides aminés libres calculées en pour cent de leur somme dans les deux lots *germ-free*, en particulier on trouve : 41,4 p. 100 et 40 p. 100 d'acides aminés libres indispensables pour les *germ-free* contre 12 p. 100 pour les témoins *traditionnels*.

Les proportions d'acides aminés libres trouvés dans le plasma par SWENDSEN *et al.* (1962) sont très différentes (28,9 p. 100). D'ailleurs la répartition des acides

aminés libres de l'extrait alcoolique de cæcum de rat *germ-free* est assez voisine de celle d'un hydrolysate de protéines animales, sauf en ce qui concerne la lysine et la sérine.

Ces composés azotés pourraient provenir, soit des produits d'hydrolyse de protéines (résidus alimentaires, desquamations et enzymes digestives), soit des produits de sécrétion (sucs digestifs) et de filtration en provenance du plasma sanguin.

La concentration en azote ammoniacal est plus faible dans le contenu de cæcum de *germ-free* comme nous l'avons confirmé; nous pouvons supposer que sa concentration dans le sang porte doit également être plus faible. Les résultats de K. WARREN et W. NEWTON (1959) sur des cobayes *germ-free* montrent qu'il y a quatre fois moins d'ammoniaque dans le sang porte des *germ-free* que dans celui des témoins.

Les concentrations en potassium trouvées dans les contenus de cæcum de rats *germ-free* sont également plus faibles que celles trouvées chez les témoins. Les concentrations en sodium sont identiques dans les contenus de cæcum de rats *germ-free* et dans ceux des témoins. Ces résultats pourraient être l'illustration du passage de certains métabolites à travers les parois du cæcum des rats *germ-free*.

Étude des tissus

Foie.

Le foie présente cette particularité d'une polyploïdie assez élevée, qui augmente au moins jusqu'à un certain âge (ENESCO, 1962); le nombre de μ moles d'ADN ne peut donc être utilisé comme un indicateur du nombre de noyaux qu'à partir d'un certain âge.

Intestin.

Les teneurs en ADN/g sec dégraissé, plus faible dans la paroi intestinale des *germ-free* (20 p. 100), est à rapprocher des résultats d'ABRAMS (1963) faisant état d'un renouvellement plus lent des cellules intestinales et de ceux de GORDON et al. (1961) qui ont montré que la surface de l'épithélium intestinal des *germ-free* est inférieure à celle des témoins correspondants. On peut se demander quelle est la part de l'état *germ-free* et celle du régime dans ce phénomène: les rats « conventionnalisés » recevant le régime stérilisé et les rats soumis à un régime à base de gluten (par DURAND et al.) ont des intestins contenant des concentrations très voisines d'ADN (100,9 μ moles/g sec dégraissé pour ceux recevant le régime gluten).

Si comme l'a montré ENESCO, il y a peu de polyploïdie dans le tissu intestinal, nous pouvons exprimer nos résultats ainsi: l'intestin du rat *germ-free* a moins de cellules (20 p. 100 de moins d'ADN total) mais elles seraient plus grandes si on se réfère au rapport Matière azotée/ADN plus important de 15 p. 100 chez les *germ-free*.

CONCLUSION

Complétant les travaux antérieurs relatifs à l'excrétion azotée fécale accrue chez les rats *germ-free* nous avons montré que, au niveau du cæcum, la fraction azotée soluble était responsable en partie de cette augmentation. Nous avons montré

en outre, que dans cette fraction azotée des *germ-free*, les acides aminés libres augmentent considérablement et l'urée apparaît en quantité importante.

De plus, nous avons trouvé des grandes différences dans l'état métabolique de l'intestin. Cet organe aurait sa structure modifiée : la quantité d'ADN total est plus faible et sa concentration est inférieure à celle trouvée dans l'intestin des rats témoins. Ce phénomène semble exister, plus faiblement, au niveau du foie et peut être de la carcasse.

Reçu pour publication en décembre 1964.

REMERCIEMENTS

Nous remercions particulièrement G. DURAND dont nous avons utilisé les résultats d'analyses relatifs aux tissus de rats traditionnels recevant le régime à base de farine de poisson, ainsi que R. PION qui a bien voulu se charger de l'analyse des acides aminés des aliments.

SUMMARY

METABOLISM IN « GERM-FREE » RATS. SOME NITROGENOUS COMPOUNDS, SODIUM AND POTASSIUM IN THE CONTENTS OF THE DIGESTIVE TRACT. NUCLEIC ACID IN SOME TISSUES

With « germ-free » rats it is possible to study metabolism in the animal itself, and not the combined metabolism of the host animal and its symbiotic flora.

The study of the metabolism of the « germ-free » rat has been approached through general measurements of growth and of balance. More detailed analyses have then been made of intestinal contents and of some tissues. The scheme of these studies is shown in table 1.

The main results show that :

The sterilized feed to which the rats had access completely satisfied their requirements for amino acids (table 2 bis).

Growth of « germ-free » rats was as good as that of controls and reached about 5 g per day (table 3). In spite of the lack of precision of the balance methods, the coefficient of utilization of nitrogen was lower for « germ-free » rats than for rats reared in the normal way, though it was close to that for animals which had been born and weaned in « germ-free » conditions and then maintained in the normal way.

Comparing the concentrations of different compounds in the contents of the cecum of « germ-free » rats with those of controls,

(a) there was twice as much soluble N ;

(b) there was 50 to 100 times as much free amino acids and the proportion of essential amino acids was high (tables 6 and 7) ;

(c) there was a great deal of urea and very little ammonia N.

The origin of the different nitrogenous compounds is considered. Biochemical analysis of the intestine shows that there was 5 to 10 per cent less total deoxyribonucleic acid (DNA) (table 7) in that of the « germ-free » rats than in the normal controls. The concentration of DNA per g dry tissue was also less, by 10 per cent compared with rats weaned « germ-free » then kept normally and by 20 per cent compared with normal controls.

Differences in analyses of liver and carcass were found also, but these were less marked (tables 8 and 9).

The significance of the results is discussed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABRAMS G. D., 1963. Communication au « Symposium on recent advances in germ-free animal experimentation ». *Anim. Meetg, Amer. Inst. Biol. Sci.*
- COLUMBUS A., WAGNER J., ROJAHN J., 1958. Der Bakterielle Stickstoffanteil des Darmverluststickstoffes. *Archiv. Tierernährung*, **8**, 249-254.
- DAVIDSON J. N., LESLIE E. I., 1950 A. Nucleic acids in relation to tissue growth. *Exp. Cell. Res.*, **1**, 127-34.
- DURAND G., FAUCONNEAU G., PENOT E., 1965. Étude biochimique de la croissance de l'intestin grêle du foie et de la carcasse du rat ; rôle respectif de la multiplication et du grandissement cellulaires. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, sous presse.
- FAUCONNEAU G., PION R., 1962. L'utilisation de diverses méthodes de dosage des acides aminés dans les études nutritionnelles. Intérêt et limites de la chromatographie quantitative sur papier. *Cahiers Alimentation équilibrée*, n° 4, 111-118.
- ENESCO M., LENBLOD C. P., 1962. Increase in cell number as a factor in the growth of the organs and tissues of the young male Rat. *J. Embryol. Exp. morph.*, **10**, 530-562.
- GLIMSTEDT G., 1936. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, suppl., **30**, 1-295.
- GORDON H. A., BRUCKNER-KARDOSS E., 1961. Effect of normal microbial flora on intestinal surface area. *Ann. J. Physiol.*, **201**, 175-178.
- GUSTAFSON B. E., 1946-1947. Germ-free rearing of rats. Preliminary report. *Acta Anat.*, **2**, 376-391.
- HOET P., EYSSEN H., ÉVRARD E., *communication personnelle.*
- KORNBERG H. L., DAVIES R. E., WOOD D. R., 1954. Gastric urease activity in the cat. *Biochim. J.*, **56**, 355-363.
- LEVENSON S. M., CROWLEY L. V., HOROWITZ R. E., MALM O. J., 1959. The metabolism of carbon labeled urea in the germ-free Rat. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2061-2062.
- LEVENSON S. M., TENNANT B., 1963. Some metabolic and nutritional studies with germ-free animals. *Fed. Proc.*, **22**, 109-119.
- LUCKEY Th. D., 1963. *Germ-free life and gnotobiology*. Academic Press. New York and London.
- MICKELSEN O., 1962. Nutrition germ-free animal Research. *Ann. Rev. Biochem.*, **31**, 515-548.
- RÉRAT A., FÉVRIER C., HENRY Y., LOUGNON J., 1964. Évolution de la composition corporelle chez le Rat blanc en croissance. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **4**, 35-47
- SWENDSEN M. E., HICKSON J. B., FRIEDRICH B. W., 1962. Effect on nonessential nitrogen supplement on growth and on the aminoacid content in plasma and muscle of weanling Rats Fed a lowprotein diet. *J. Nutrition*, **78**, 115-119.
- WARREN K., NEWTON W., 1959. Portal and peripheral blood ammonia concentrations in germ-free and conventional guinea pigs. *Amer. J. Physiol.*, **197**, 717-720.
- Germ-free vertebrates, 1959, present status. *Ann. New York Acad. Sci.*, **78**, 1400.