

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA DÉGRADATION DES GLUCIDES DANS LE JABOT DU COQ

I. — MISE EN ÉVIDENCE ET DOSAGE DES STÉRÉOISOMÈRES D ET L-LACTATES

Odette IVOREC-SZYLIT et M. SZYLIT

*Station de Recherches avicoles
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)
Laboratoire de Biologie physico-chimique
Faculté des Sciences, Orsay (Seine-et-Oise)*

SOMMAIRE

Nous avons étudié la cinétique de formation de l'acide lactique dans le jabot du coq. Les deux formes énantiomorphes des sels de cet acide existent dans cet organe en quantités voisines. Leurs concentrations augmentent exponentiellement pendant et après le repas, tandis que le pH du contenu du jabot s'abaisse simultanément. Des expériences de digestion *in vivo* et *in vitro* suggèrent le rôle d'une flore bactérienne responsable de cette dégradation. Cette dégradation est inhibée par les antibiotiques. La flore microbienne, présente dans le jabot, est absente dans l'aliment.

Les travaux de BOLTON (1962) ont montré que les glucides sont dégradés dans le jabot des oiseaux avec formation d'acide lactique. Nous avons entrepris un travail dans le but de déterminer si le jabot, en tant qu'organe ayant ses activités enzymatiques propres, ou de sa flore bactérienne, est à l'origine de l'apparition de l'acide lactique. Nous avons également tenu compte du rôle éventuel des enzymes de l'aliment.

L'étude de la configuration de l'acide lactique nous permet de résoudre en partie ce problème. On sait en effet que les tissus des animaux supérieurs ne forment que l'isomère L, contrairement aux bactéries qui peuvent produire les antipodes D et L. Nous avons donc fait appel à des méthodes de dosages enzymatiques : elles sont les seules à discriminer l'acide lactique L (+) de son isomère lévogyre. En outre leur grande sensibilité nous permet de travailler avec quelques grammes de contenu de jabot et de suivre aisément l'évolution de la production d'acide lactique au cours du temps sur un même animal.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Deux séries d'expériences ont été effectuées :

— Les unes sont poursuivies sur des coqs adultes élevés en cage individuelle et entraînés à consommer pendant 5 h un seul repas par jour. La composition du régime est donné dans le tableau 1 ; il renferme 35,5 p. 100 d'amidon et 4,9 p. 100 de sucres libres.

TABLEAU I

Composition de l'aliment
(en pour 100)

Blé	12,5
Avoine	7,0
Mais	45,0
Son de blé	3,0
Tourteau d'arachide	2,0
Tourteau de soja cuit	8,0
Farine de luzerne déshydratée	6,0
Farine de poisson	4,0
Levure	2,0
Phosphate bicalcique	1,5
Calcimarine (90 % de CO ₃ Ca)	8,0
Sel vétérinaire	0,5
Complément vitaminique et minéral (*)	0,5

(*) Le complément vitaminique et minéral a la composition suivante pour 100 g d'aliment :

Vitamine A	800 000 UI
Vitamine D ₃	100 000 UI
Riboflavine	0,3 g
Iodure de potassium stabilisé	0,1 g
Sulfate de manganèse, 4H ₂ O	35,0 g
B.H.T	12,5 g
Acétate d' α -tocophérol	4,0 g
Avoine broyée q. s. p.	500,0 g

L'aliment est extrait par tubage de chacun des animaux tous les 2 jours. Ces prélèvements ont lieu au milieu et à la fin du repas puis toutes les heures consécutives au repas pendant 3 heures. L'acide lactique est dosé dans ces échantillons.

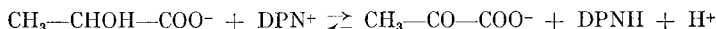
— D'autres expériences sont poursuivies *in vitro* : on étudie l'influence du contenu de jabot prélevé avant ou pendant le repas sur la digestion de l'aliment dans des conditions définies de température et d'humidification.

Dosage de l'acide lactique

Le contenu du jabot est broyé et homogénéisé (Ultra Turrax) dans une solution tampon de triéthanolamine (TEA)-HCl M/10 à pH 9,5 à raison d'environ un ml par gramme de matière fraîche. La fraction non soluble est éliminée après centrifugation. L'échantillon est déprotéinisé par relavage au sulfate d'ammonium à 80 p. 100 de saturation. Après centrifugation, l'acide lactique est dosé dans le surnageant.

A. *Dosage de l'acide L (+) lactique* : KUBOWITZ, OTT (1943).

L'acide L (+) lactique est oxydé par le diphosphopyridine nucléotide oxydé (DPN⁺) en présence de lactico-déshydrogénase extraite du muscle du lapin (LDH ; Bœhringer-Sœhne) suivant l'équation :



Dans des conditions définies de température, de pH et de concentration en DPN⁺, la vitesse de réduction du coenzyme ne dépend que de la concentration initiale du substrat, celle de l'enzyme étant fixée.

Le DPNH est mesuré spectrophotométriquement à 3400 Å. Nous établissons la courbe des vitesses initiales mesurées à 20°, pour différentes concentrations connues de substrat en utilisant la représentation de LINEWEAVER-BURK (1934). La concentration en L lactate de nos échantillons s'obtient par interpolation de la courbe après avoir déterminé la vitesse initiale dans des conditions identiques.

La cuve de mesure contient :

16 μ-moles de DPN, 4 H₂O (Boehringer-Sœhne),
0,25 à 3,75 μ-moles de L lactate de calcium 4,1/3H₂O (Calbochem),
230 μ-moles de TEA à pH 9,5 (Prolabo),
dans 2,2 ml d'eau bidistillée.

L'oxydation du substrat est déclenchée en ajoutant 0,7 γ de LDH en solution dans 0,05 ml de tampon. L'accroissement de densité optique à 3400 Å est mesuré toutes les 10 secondes pendant 1 minute et demie. On adopte pour chaque valeur de la concentration la moyenne de deux déterminations effectuées avec deux volumes différents d'échantillon. Ces concentrations calculées en lactate de calcium sont exprimées en équivalent « acide lactique ».

B. *Dosage de l'acide D (→) lactique*

La concentration en sels correspondant à cet acide est mesurée avec la lactico-déshydrogénase de levure de boulangerie cultivée en anaérobiose stricte. LABEYRIE, SŁOMINSKI et NASLIN (1959) ont montré que le ferricyanure de potassium oxyde spécifiquement les sels dextrogyres de l'acide lactique en pyruvate en présence de cet enzyme. L'oxydation est complète, molécule à molécule, et ne fait pas intervenir de constante d'équilibre comme dans le cas de la détermination de l'acide L lactique.

La disparition du ferricyanure (en excès par rapport à la quantité de lactate supposée dans l'échantillon) est suivie au spectrophotomètre à 4200 Å jusqu'à ce que la vitesse de variation de la densité optique devienne constante et très faible.

Le nombre de molécules de ferricyanure disparues ϵ (mole⁻¹.cm²) = 1045 à 4200 Å nous permet de calculer la concentration en acide lactique de nos échantillons (ferricyanure/acide lactique = 2).

Conditions expérimentales :

Dans une cuve de 1 cm de traversée optique on introduit :

3 μ-moles de ferricyanure de K (Prolabo RP),
230 μ-moles d'un mélange de phosphates à pH 7,3 (Prolabo RP),
0,2 ml de préparation enzymatique.

La réaction est déclenchée par addition de l'échantillon. Le volume total est égal à 2,3 ml. Chaque concentration indiquée est la moyenne de 2 à 3 déterminations effectuées avec des volumes différents d'échantillon (0,01 à 0,07 ml).

Nous nous sommes assurés que les échantillons ne contiennent pas d'inhibiteur de ces 2 enzymes. De plus nous avons vérifié la stéréospécificité stricte des 2 lactico-déshydrogénases dont nous disposons.

RÉSULTATS

a) *Expérience in vivo*

Après avoir mis en évidence l'existence des deux formes énantiomorphes de l'acide lactique, nous avons étudié la cinétique d'apparition de ces corps. Les concentrations du D et du L lactate au début du repas sont celles dosées dans l'aliment.

Les valeurs des concentrations en lactate de chacun des 4 coqs en fonction du temps sont représentées dans la figure 1 (courbes 1A et 1B). L'évolution parallèle des deux isomères est frappante : de plus, les concentrations observées sont très voisines.

L'augmentation des concentrations en acide lactique est accompagnée d'une baisse sensible du pH (de 6,1 à 4,3) du contenu digestif (fig. 2).

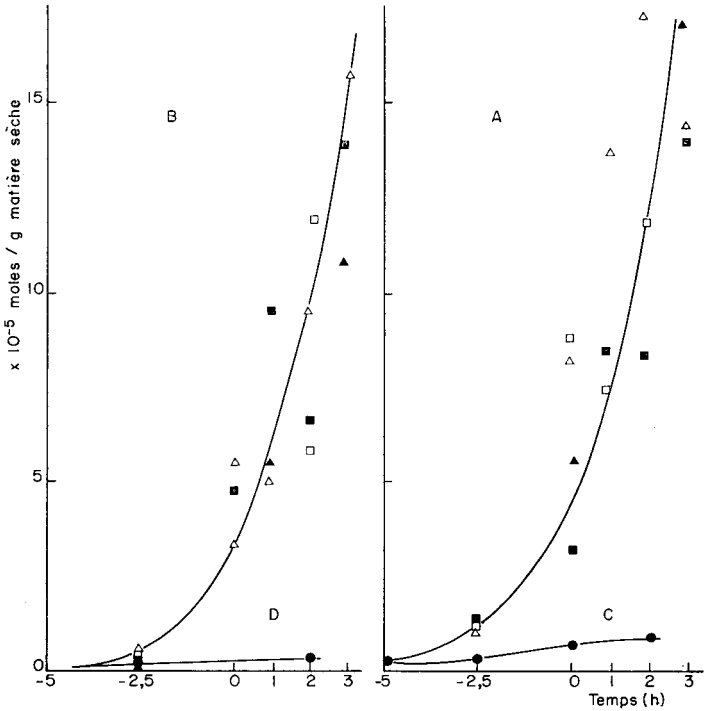


FIG. 1. — Expérience *in vivo*. Cinétique de l'apparition des acides D et L lactiques dans le jabot de 4 coqs (courbe des valeurs moyennes)

— Le temps négatif (— 5 à 0) représente la durée du repas.
— Chaque point différent caractérise un animal.

A : acide D lactique dans le contenu du jabot.
B : acide L lactique dans le contenu du jabot.
C : acide D lactique de l'aliment incubé *in vitro*.
D : acide L lactique de l'aliment incubé *in vitro*.

b) Expériences *in vitro*

Pour étudier le rôle de la flore du jabot, nous avons dosé les formes D et L, dans l'aliment incubé *in vitro* à 40° en anaérobiose et dans des conditions d'humidification analogues à celles de l'aliment dans le jabot (70 p. 100 en eau). Les dosages révèlent une vitesse d'apparition de l'acide extrêmement lente. Il est donc net que le jabot joue un rôle essentiel dans la dégradation des glucides alimentaires (fig. 1, courbes 1C et 1D).

L'existence de quantités voisines de D et L, lactates dans le contenu de jabot ne permet pas de conclure à une même origine des deux stéréoisomères. Nous avons

effectué d'autres expériences pour savoir si le jabot intervient par sa flore bactérienne ou s'il faut en outre envisager une activité enzymatique de ses tissus responsable de l'apparition du L lactate. Les résultats de ces expériences sont représentés dans la figure 3.

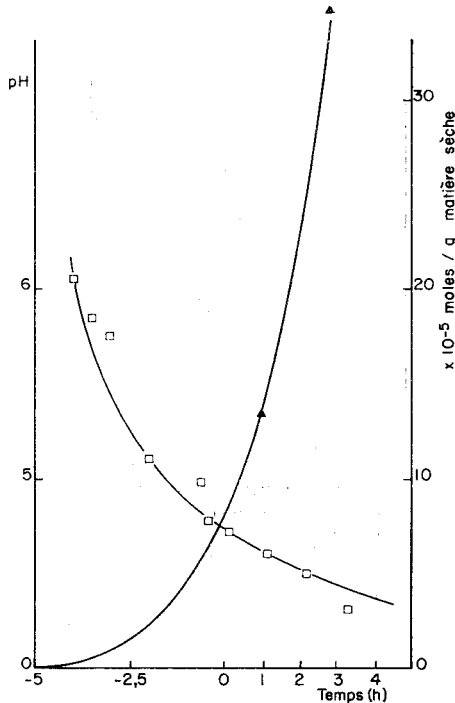


FIG. 2. — Expérience *in vivo*. Évolution cinétique du pH et de l'acide lactique dans le jabot du coq (moyenne de 4 animaux).

□ = pH
 ▲ = acide lactique. (L + D)

Les contenus des 4 jabots prélevés au milieu du repas, lorsque la concentration en acide lactique est négligeable, sont incubés dans des tubes à essais et analysés dans les mêmes conditions que précédemment. Les concentrations en D et L lactates augmentent nettement au cours du temps et sont peu différentes entre elles. Le résultat est analogue (courbe 3b) à celui observé lors de la digestion *in vivo*.

Dans une troisième expérience, nous lavons le jabot de deux animaux à jeun depuis 19 heures. Nous nous servons de cette eau recueillie par tubage pour humidifier l'aliment. Cet aliment est incubé *in vitro* : les dosages sur 2 échantillons révèlent là encore des vitesses d'apparition de même ordre pour les deux isomères.

Les résultats sont très différents de ceux obtenus en faisant incubé l'aliment avec de l'eau : courbe 3a, identique à 1C et 1D.

Ces résultats nous suggèrent une dégradation d'origine bactérienne des glucides. Cette hypothèse est vérifiée indirectement par l'emploi d'antibiotiques dans les conditions suivantes : l'eau recueillie après lavage du jabot d'un animal à jeun est séparée en deux parties. Chacune est utilisée pour humidifier l'aliment comme

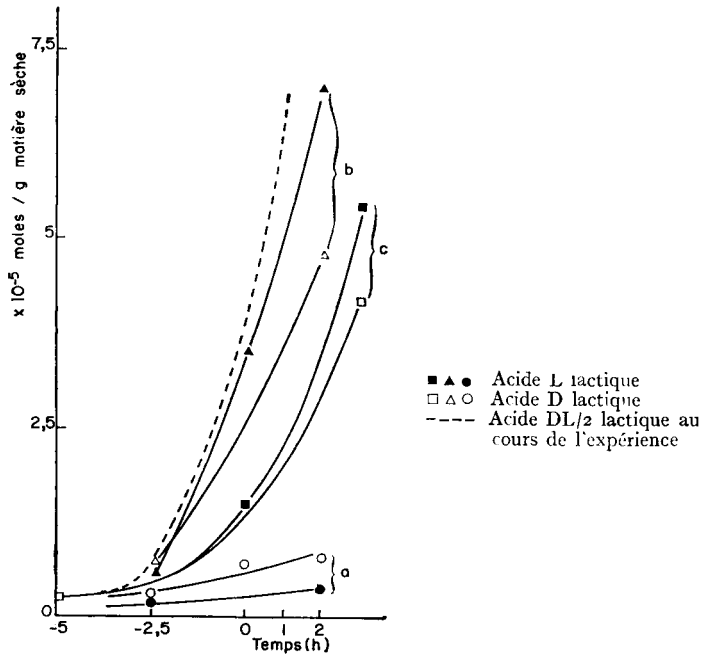


FIG. 3. — *Expérience in vitro. Évolution cinétique des acides D et L lactiques dans l'aliment incubé.*
 a) Aliment mélangé à de l'eau ordinaire.
 b) Aliment extrait du jabot.
 c) Aliment mélangé à de l'eau extraite du jabot d'un animal à jeun.

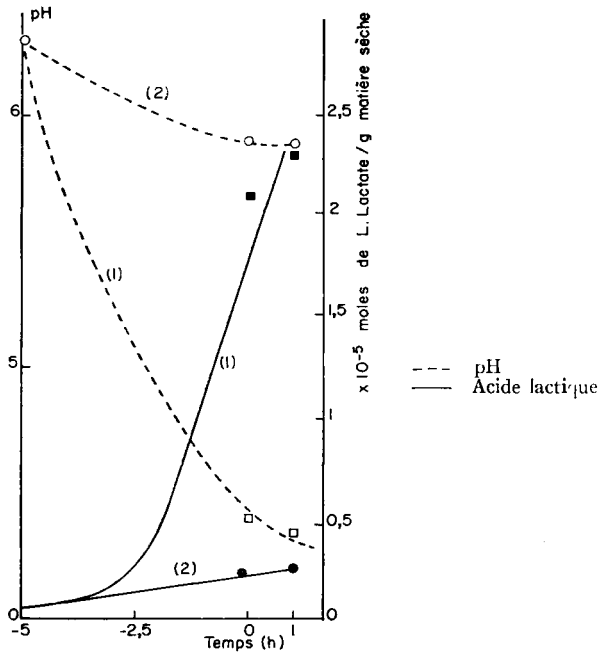


FIG. 4. — *Expérience in vitro. Évolution cinétique du pH et de l'acide L-lactique dans l'aliment humidifié par l'eau extraite du jabot.*
 1. Aliment seul.
 2. Aliment additionné d'antibiotiques.

précédemment (exp. n° 3) mais dans un cas nous ajoutons de la pénicilline à raison de 10 000 unités par gramme.

Nous dosons le L-lactate et mesurons le pH à différents temps : les résultats figurent dans le graphique 4. La présence de pénicilline inhibe la formation de l'acide lactique et le pH est très peu modifié. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus avec l'aliment incubé avec de l'eau n'ayant pas eu de contact avec le jabot.

DISCUSSION

Nos résultats nous permettent de faire plusieurs observations :

La dégradation des glucides alimentaires en acides D et L lactiques n'a lieu que si les aliments ont été en contact directement ou indirectement avec le jabot et n'ont pas été additionnés d'antibiotiques.

Ces résultats ainsi que la forme exponentielle des courbes d'apparition de l'acide lactique en fonction du temps nous suggèrent l'existence d'une flore bactérienne dans le jabot, susceptible de synthétiser les deux formes de l'acide lactique. Nous ne pouvons cependant préciser si chaque isomère est produit par des bactéries différentes ou sous une forme racémique par une même bactérie.

Il semble que l'intervention enzymatique du jabot en dehors de sa flore bactérienne soit négligeable : en effet les concentrations des deux isomères sont toujours voisines entre elles dans les expériences de digestion *in vivo* et dans les expériences de digestion *in vitro*.

L'augmentation de l'acide lactique au cours du temps est cependant plus faible lors des digestions *in vitro* que dans le jabot lui-même pour un même intervalle de temps. Ceci est sans doute la conséquence de conditions expérimentales qui sont moins favorables au développement des micro organismes que celles du jabot.

Les travaux de SANTIAGO et REDEL (1960) sont en accord avec nos résultats. Ces derniers ont étudié la croissance bactérienne au cours du temps dans le jabot des volailles ; ils remarquent une multiplication intense des bactéries du genre *Lactobacillus* et des anaérobies pendant les trois premières heures qui suivent le début du repas puis une phase de croissance pendant les cinq heures suivantes.

D'autre part les expériences de BOLTON (1962) montrent également, bien que les animaux soient nourris pendant un temps beaucoup plus court, que l'acide lactique apparaît dans les contenus du jabot trois heures après le début du repas. Il semble donc que les sucres sont dégradés en acide lactique pendant la phase de croissance des micro organismes. Des expériences sont en cours afin de préciser le schéma de la dégradation bactérienne des glucides dans le jabot des volailles.

Reçu pour publication en mai 1965.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. M. IWATSUBO d'avoir obligeamment mis à notre disposition la D-lactico-déshydrogénase de la levure.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF BREAKDOWN OF CARBOHYDRATES IN THE CROP OF THE COCK
I. DEMONSTRATION AND ESTIMATION OF D AND L STEREOISOMERS OF LACTATE

In order to define the pattern of breakdown of carbohydrates in the crop of the cock the kinetics of the formation of lactic acid was studied. Enzymic methods were used which made it possible to distinguish between L-lactic acid and its levorotatory D-isomer.

Two series of experiments were done. One series was *in vivo* with adult cocks reared in individual cages and trained to eat for 5 hours a day. Feed was withdrawn by tube in the middle of the feeding period, at the end, and during the 3 hours after feeding.

The other series was *in vitro*: the influence of the digestive contents taken before or during the feeding period on digestion of the feed in controlled conditions of temperature and humidity was studied.

The following results were obtained:

1. The two enantiomorphic forms of the salts of lactic acid were present in similar amounts in the crop, and their concentrations increased exponentially during and after the feeding period (fig. 1). The pH of the contents of the crop fell as lactic increased (fig. 2).

2. The rate at which lactic acid appeared in the feed incubated *in vitro* was negligible. It increased greatly when the feed had been in contact with contents of the crop taken from a bird either fasting or fed (fig. 3).

3. The presence of antibiotics inhibited the formation of lactic acid (fig. 4).

The results suggest that the crop has a bacterial flora of its own, capable of synthesising the two forms of lactic acid. The effect of antibiotics shows that the microbial flora alone plays a role in the breakdown of carbohydrates.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BOLTON W., 1962. Digestion on the crop of the fowl. *Proc. Nutr. Soc.*, **21**, XXIV.
- KUBOWITZ F., OTT P., 1943. Isolierung und Kristallisation eine gerung Ferment aus Tumoren. *Biochem. Z.*, **314**, 94-117.
- LABEYRIE F., SLOMINSKI P. P., NASLIN L., 1959. Sur la différence de stéréospécificité entre la déshydrogénase lactique extraite de la levure anaérobie et celle extraite de la levure aérobie. *Biochem. Biophys. Acta*, **34**, 262-265.
- LINWEAVER H., BURK D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. amer. Chem. Soc.*, **56**, 658-666.
- SANTIAGO Y., REDEL, E., de, 1960. Contribucion al estudio de la microflora del contenido ingluvial de la gallina. *Archiv. Zootech.*, **9**, 210-238.