

dominant; microflora. Their presence is more irregular from the 2nd week and, after weaning they disappear from the small gut and show a level between 10^2 and $10^4/g$ in the cæcum and colon. The *Clostridia* only appear after weaning and exclusively in the cæcum and colon ($10^3-10^5/g$).

Although this study is still incomplete it can already be concluded that the rabbit has a very original microflora because of its dominating strict anaerobic character, the absence of *Lactobacilli*, and the low population density in the stomach despite the coprophagy.

URÉOLYSE PAR DIFFÉRENTES BACTÉRIES « IN VITRO » ET « IN VIVO » DANS LE TUBE DIGESTIF DE RATS « GNOTOXÉNIQUES ». INFLUENCE DE L'IMMUNISATION

Marie-Christiane MOREAU, R. DUCLUZEAU et P. RAIBAUD

*Laboratoire d'Écologie microbienne,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78350 Jouy en Josas*

Le rat axénique excrète dans ses fèces environ 40 mg d'urée pour 100 g de fèces fraîches alors qu'on ne trouve pas d'urée dans les fèces d'animaux holoxéniques. Nous avons donc cherché à savoir quelles étaient les souches bactériennes présentes dans le tube digestif des holoxéniques qui sont responsables de cette uréolyse. Par ailleurs, nous avons essayé de modifier cette activité uréolytique par des moyens immunologiques.

1° On a isolé du tube digestif de rats holoxéniques une souche de *Lactobacillus* et une souche d'*Actinobacillus* qui sont uréolytiques *in vitro*. On ensemence le tube digestif de rats axéniques avec chacune de ces 2 souches, et on suit la cinétique d'hydrolyse de l'urée dans leurs fèces.

Chez le rat monoxénique hébergeant l'*Actinobacillus*, l'uréolyse débute dans les fèces en même temps qu'apparaissent les premières bactéries, soit 6 heures après l'ensemencement de la souche et elle est totale 4 heures plus tard, alors que la population bactérienne a atteint son maximum, soit $5 \cdot 10^8$ bactéries/g de fèces fraîches.

Chez le rat monoxénique hébergeant le *Lactobacillus*, les premières bactéries apparaissent 6 heures après l'ensemencement, la population atteint son maximum, soit 10^9 bactéries/g de fèces fraîches, 2 heures plus tard, mais l'uréolyse ne débute que 12 heures après l'ensemencement pour atteindre son maximum 9 heures plus tard.

Le dosage de l'urée dans les différents compartiments du tube digestif des deux types de rats monoxéniques montre qu'il reste toujours de l'urée dans l'estomac et l'intestin grêle, alors que l'uréolyse devient totale à partir du cæcum.

In vitro, l'hydrolyse de l'urée s'observe seulement à la fin de la croissance chez le *Lactobacillus*, alors qu'elle commence dès le début de la croissance chez l'*Actinobacillus*. Les pH optimum d'action des uréases de ces 2 bactéries sont très différentes : 6,0 pour l'uréase de l'*Actinobacillus* et 2,5 à 3,0 pour l'uréase du *Lactobacillus*. On peut penser que ces bactéries exercent leur effet uréolytique à des niveaux différents du tube digestif : estomac pour le *Lactobacillus* et cæcum pour l'*Actinobacillus*.

2° Des rats porteurs d'une monoflore de *Lactobacillus* uréolytiques sont immunisés avec différents types d'antigènes. Si on les vaccine avec une suspension des mêmes bactéries qu'ils hébergent, ou avec un extrait protéique total de ces bactéries, on peut observer l'apparition dans les fèces et le cæcum des animaux d'une concentration d'urée qui est, dans certains cas,

identique à celle trouvée chez les axéniques. Par contre, si l'antigène est constitué par un extrait protéique total provenant d'un mutant non uréolytique de la même souche de *Lactobacillus*, on n'observe pas d'apparition d'urée dans les fèces. Le mécanisme de l'inhibition de l'uréolyse est donc bien lié à l'immunisation par l'uréase. Enfin, si l'antigène est constitué par de l'uréase végétale, on observe une apparition d'urée dans les fèces beaucoup plus lente et plus réduite que dans le cas où l'antigène contient l'uréase du *Lactobacillus*.

Si on vaccine des animaux monoxéniques hébergeant l'*Actinobacillus* avec une suspension de ces mêmes bactéries, on n'observe pas d'apparition d'urée dans les fèces.

Dans aucun cas on n'a observé une modification du nombre des bactéries dans les fèces et le tube digestif après immunisation.

Ces premiers résultats indiquent qu'il est possible, par l'immunisation, d'inhiber *in vivo* l'activité enzymatique d'une population bactérienne du tube digestif sans faire varier la taille de celle-ci. Mais, pour une même activité enzymatique, cet effet inhibiteur dépend de la souche bactérienne considérée.

SUMMARY

UREOLYSIS BY VARIOUS BACTERIA *IN VITRO* AND *IN VIVO* IN THE DIGESTIVE TRACT OF « GNOTOXENIC » RATS : EFFECT OF IMMUNIZATION

The axenic rat excretes in its faeces about 40 mg of urea per 100 g of fresh faeces, while no urea is found in the faeces of holoxenic animals. We tried to find out which bacterial strains present in the digestive tract of holoxenics are responsible for ureolysis. Moreover, we tried to modify this ureolytic activity by immunological means.

1. A strain of *Lactobacillus* and a strain of *Actinobacillus*, which were ureolytic *in vitro*, were isolated from the digestive tract of holoxenic rats. The digestive tract of axenic rats was implanted with each of these strains, and the hydrolysis kinetics of urea was followed in the faeces.

In the monoxenic rat carrying *Actinobacillus*, ureolysis in the faeces begins at the same time as the first bacteria appear, that is 6 hours after implantation of the strain, and it is total 4 hours later when the bacterial population reaches a maximum, *i.e.* $5 \cdot 10^8$ bacteria/g of fresh faeces.

In the monoxenic rat carrying *Lactobacillus*, the first bacteria appear 6 hours after implantation; the population reaches its maximum, that is 10^9 bacteria/g of fresh faeces, 2 hours later, but ureolysis only begins 12 hours after implantation and reaches a maximum 9 hours later.

The determination of urea in the different compartments of the digestive tract of two types of monoxenic rats shows that there is always urea in the stomach and small intestine, while ureolysis is total in the caecum.

Urea hydrolysis is seen *in vitro* only at the end of growth in *Lactobacillus*, while it starts at the beginning of growth in *Actinobacillus*. The optimum pH of urease action of these 2 bacteria is very different: 6.0 for *Actinobacillus* urease and 2.5, 3.0 for *Lactobacillus* urease. It may be that these bacteria exercise their ureolytic effect at various levels of the digestive tract: stomach for *Lactobacillus* and caecum for *Actinobacillus*.

2. Rats carrying anureolytic *Lactobacillus* monoflora were immunized with various kinds of antigens. If they were vaccinated with a suspension of the same bacteria they carried, or with a total protein extract of these bacteria, a concentration of urea appeared in the faeces and the caecum of these animals which, in some cases, was identical to that found in the axenics.

On the other hand, if the antigen was composed of a total protein extract from a non-ureolytic mutant of the same strain of *Lactobacillus*, urea did not appear in the faeces. The ureolysis inhibiting mechanism is thus linked to urease immunization. Finally, if the antigen was composed of a plant urease, urea appeared much more slowly and in smaller quantities than when the antigen contained *Lactobacillus* urease.

**PRODUCTION D'ACIDES GRAS VOLATILS
PAR DES BACTÉRIES ANAÉROBIES STRICTES
DANS LE TUBE DIGESTIF DE SOURIS « GNOTOXÉNIQUES ».
EFFET INHIBITEUR SUR « SHIGELLA FLEXNERI »**

M. RIOTTOT, R. DUCLUZEAU*, P. RAIBAUD*, A. PERROT** et M. C. MYNARD

*Groupe des Laboratoires de Gif sur Yvette,
C. N. R. S. 91 - Gif sur Yvette*

** Laboratoire d'Écologie microbienne,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78350 Jouy en Josas*

*** Institut A. Merieux, 254, rue Marcel Merieux,
69 Lyon (7^e)*

On a ensemencé dans le tube digestif de souris axéniques diverses souches de bactéries anaérobies strictes, productrices *in vitro* d'acides gras volatils (AGV), ou divers mélanges bactériens provenant de la microflore d'animaux holoxéniques. On a ensuite mesuré la production *in vivo* d'AGV dans le cæcum ou les fèces de ces animaux gnotoxéniques et on a étudié l'effet inhibiteur des AGV ainsi produits sur une couche de *Shigella flexneri*.

Nous avons constaté qu'il y a peu de relation entre la production d'AGV *in vitro* par des souches bactériennes et les concentrations d'AGV présentes dans le cæcum des animaux ensemencés avec des souches *in vivo*. Certaines souches seulement sont de bonnes productrices d'AGV et si l'on cumule dans un même animal des souches faibles productrices on n'additionne pas leurs productions. Des concentrations cæcales et fécales d'AGV du même ordre que celles que l'on mesure chez les holoxéniques, n'ont été obtenues qu'avec des gnotoxéniques hébergeant un mélange complexe de souches anaérobies strictes thermorésistantes non identifiées.

Chez ces animaux « gnotoxéniques », on observe en fonction du temps des variations énormes des concentrations cæcales et fécales d'AGV. Ces variations sont même supérieures à ce qu'elles sont chez les holoxéniques. La teneur maximum en AGV dans le cæcum d'animaux gnotoxéniques peut parfois s'observer plusieurs semaines après l'établissement des souches productrices et l'addition de lactose au régime n'influe pas sur la production de ces AGV.

Enfin, on peut affirmer que la corrélation entre la production d'AGV et l'élimination de *S. flexneri* est très faible. Cette souche est en effet éliminée très efficacement par une flore complexe avant toute production importante d'AGV dans le cæcum alors qu'une autre flore, forte productrice d'AGV quelques semaines après l'ensemencement, n'a qu'un effet antagoniste très limité.