

## Article original

# Dégradation et prélèvement de peptides de caséines marqués au $^{14}\text{C}$ par des bactéries mixtes du rumen

Anne Lambert\*, François Lucas, Gérard Blanchart

Laboratoire de sciences animales, École nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires, 2 avenue de la Forêt-de-Haye, 54500 Vandœuvre, France

(Reçu le 7 octobre 1997 ; accepté le 16 janvier 1998)

**Abstract – Breakdown and uptake of  $^{14}\text{C}$ -labelled casein peptides by mixed rumen bacteria.** This work studied the *in vitro* degradation by mixed rumen bacteria of various  $^{14}\text{C}$ -labelled fractions of casein peptides, of known molecular size, added to a total unlabelled casein hydrolysate. Size exclusion HPLC was used in order to segregate the casein peptides according to their molecular weights. Radioactivity associated with the bacteria increased over time. The way  $^{14}\text{C}$  was incorporated into the bacteria depended on the size of the labelled peptides initially added. Small peptides (1 to 2 kDa) were very rapidly assimilated, whereas radioactivity coming from larger peptides (5 to 10 kDa) tended to accumulate far more slowly in the bacterial pellet. The disappearance rates of the radioactivity differed between the fractions. The longest peptides disappeared more quickly than the medium-sized ones, which in turn were hydrolysed more rapidly than the smallest ones. Here, the uptake of small peptides seems to be the limiting step of the peptides utilization by bacteria. © Inra/Elsevier, Paris

### proteolysis / rumen bacteria/ peptide / molecular weight

**Résumé –** Ce travail vise à améliorer la compréhension de l'effet de la taille des peptides sur leur utilisation. Nous avons suivi la dégradation *in vitro* par un inoculum de bactéries mixtes du rumen, de différentes fractions peptidiques de caséines marquées au  $^{14}\text{C}$  en présence d'un hydrolysat complet de peptides de caséines non-marquées. La perméation sur gel a été utilisée afin de séparer les peptides de caséines, avant et après incubation, en fonction de leur taille. La radioactivité associée aux bactéries augmente au cours du temps mais de manière différente selon la taille des peptides marqués initialement ajoutés. Les peptides de faible poids moléculaire (1 à 2 kDa) sont assimilables très rapidement par les bactéries. En revanche, la radioactivité provenant des peptides de haut poids moléculaire (5 à 10 kDa) s'accumule beaucoup plus lentement dans le culot bactérien. Les taux de disparition de la radioactivité diffèrent aussi pour chaque fraction. Les peptides les plus longs disparaissent plus rapidement que les moyens, eux-mêmes hydrolysés plus rapidement que les petits. Dans

---

\* Correspondance et tirés à part

ce travail, le prélèvement des peptides de poids moléculaire compris entre 1 000 et 2 000 Da semble constituer l'étape limitante de l'utilisation des peptides par les bactéries. © Inra/Elsevier, Paris

## protéolyse / bactéries du rumen / peptide / poids moléculaire

### 1. INTRODUCTION

L'hydrolyse des protéines par les microorganismes du rumen libère des peptides qui sont eux-mêmes dégradés en tri- et dipeptides et en acides aminés libres.

De nombreuses études suggèrent que le prélèvement et le métabolisme des peptides par les microorganismes ruminants, notamment les bactéries, sont des étapes déterminantes de la régulation du flux d'azote dans le tube digestif des ruminants [4, 16, 21].

Les mécanismes conduisant à la production, l'accumulation et l'utilisation des peptides par les bactéries restent mal compris.

Des études sur l'utilisation des peptides par les microorganismes du rumen sont menées depuis les années soixante. Elles donnent des indications sur l'accumulation des peptides [3] et sur les activités peptidasiques des microorganismes [19, 20]. Certaines comparent l'efficacité pour la croissance microbienne des peptides et des acides aminés libres [1, 6, 7, 23]. L'influence de différents facteurs sur ces variables a été testée, et principalement celle de la taille des peptides [23]. Cependant, les études successives donnent des résultats contradictoires. Copper et Ling [6] ont montré que plus les peptides sont longs, plus leur utilisation par les bactéries est efficace. Ce résultat tendrait à confirmer la conclusion de Pittman et Bryant [14] pour lesquels *P. ruminicola* n'utiliserait le carbone des peptides que lorsqu'ils comptent au moins cinq acides aminés. Au contraire, Chen et al. [4] concluent de leurs essais que les peptides

sont utilisés d'autant plus lentement qu'ils sont plus longs. Plus récemment, Wallace [18] aussi bien qu'Armstead et Ling [2] n'ont pas réussi à établir de relation entre la différence de vitesse de disparition des peptides et leur taille. Les contradictions apparentes entre les diverses études peuvent être dues à des différences entre les conditions d'expérience. Elles peuvent aussi provenir d'une imprécision dans les termes employés pour décrire le devenir des peptides.

Dans le but d'améliorer la compréhension du rôle que peut jouer la taille d'un peptide dans sa dégradation et son prélèvement, nous avons réalisé des incubations *in vitro* de bactéries mixtes du rumen en présence de peptides de caséines marqués au  $^{14}\text{C}$ . En ajoutant à l'hydrolysats caséique total différentes fractions peptidiques marquées au  $^{14}\text{C}$ , caractérisées par leur poids moléculaire, nous avons étudié successivement le devenir de chacune de ces fractions au sein d'un mélange complexe de peptides.

### 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.1. Préparation des peptides caséiques marqués et non marqués

Les caséines de chèvres marquées au  $^{14}\text{C}$  ont été obtenues après introduction en une fois par une canule ruminale de  $^{14}\text{C}$ -glucose dissous dans 100 mL d'eau (5  $\mu\text{Ci/mL}$ ) dans le rumen d'une chèvre fistulée en lactation. La traite a été effectuée 6 h plus tard. Après écrémage du lait collecté, les caséines ont été précipitées en abaissant le pH à 4 avec HCl 1N. Le

culot caséique obtenu après centrifugation (1 000 g, 30 min) a été remis en suspension à pH 8 avec de la soude 1N. Ces trois opérations successives sont répétées trois fois de suite. Puis le culot caséique resuspendu est congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant d'être lyophilisé. Le marquage des caséines ainsi obtenues est de 1 040 dpm/mg.

Les peptides marqués et non marqués sont obtenus par hydrolyse de caséines de lait de chèvre durant 15 min par la pronase E à  $39^{\circ}\text{C}$ . (protéases XIV de *Streptomyces griseus*, Sigma) dans du tampon phosphate 0,1 M pH 6,8 (1 mg de pronase dans 5 mL pour 100 mg de caséines). La réaction est arrêtée par précipitation des protéines avec de l'acide perchlorique (5 % en concentration finale) et passage une demi-heure dans un bain de glace à  $0^{\circ}\text{C}$ . Après une centrifugation de 20 min à 28 000 g, le surnageant est additionné de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1,5 mol de  $\text{K}^+$  pour 1 mol de  $\text{ClO}_4^-$ ) pour neutraliser la solution. Les cristaux de  $\text{KClO}_4$  sont éliminés par une deuxième centrifugation. Les solutions de peptides non marqués sont lyophilisées directement. Les peptides marqués sont fractionnés par HPLC. La colonne utilisée est une colonne semi-préparative du type BIO-SEP-SEC-S-2000 qui sépare les peptides en fonction de leur poids moléculaire. Chaque séparation est pratiquée sur un volume d'injection de 5 mL. Trois classes de peptides sont ainsi isolées : les classes A, B, C respectivement de poids moléculaire compris entre 10 000 et 5 000, entre 5 000 et 2 000 et entre 2 000 et 1 000 Da. Pour chacune de ces classes, il a été collecté respectivement 21,9, 6,3, 23,5 et 30,6 mg de peptides par injection et 30 injections ont été réalisées en tout. Une quatrième fraction D sera prise en compte lors du suivi de la répartition de la radioactivité après culture. Elle correspond aux peptides de poids moléculaires inférieurs à 1 000 Da. Les radioactivités spécifiques des fractions A, B et C sont respectivement de 130, 1 125 et 2 064 dpm/mg.

## 2.2. Conditions de culture

Les cultures sont réalisées dans des tubes de Hungate en conditions anaérobies avec le milieu décrit par Russell et al. [16]. Les sources de glucides sont constituées par du glucose (2,5 g/L), du cellobiose (2,5 g/L) et de l'amidon soluble (0,5 g/L). Ce milieu de culture a été jugé de bonne qualité après des essais de cul-

ture ayant donné des activités fermentaires satisfaisantes [9, 10].

Dans chaque tube de 10 mL, on mélange :

- 8 mL de milieu de culture préalablement avec du  $\text{Na}_2\text{S}$ , 9H<sub>2</sub>O (0,5g/L),
- 0,5 mL de peptides non marqués, de manière à obtenir une concentration de 50 mg pour 10 mL.
- 0,5 mL de la solution de l'une des fractions marquées, de manière à obtenir une concentration de 4 mg pour 10 mL.
- 1 mL d'une suspension bactérienne.

Cette technique nous permet de suivre tour à tour le devenir de chacune des fractions peptidiques, lorsqu'elles sont incubées dans l'ensemble de l'hydrolysate de caséine.

Deux cultures successives sont réalisées à partir de populations bactériennes prélevées sur des animaux différents. L'inoculum utilisé est constitué de bactéries provenant du rumen de chèvres nourries quotidiennement avec 500 g de luzerne déshydratée distribuée en deux repas et du foin à volonté. Le prélèvement est effectué 1 h après le repas du matin. Le jus de rumen est filtré sur trois épaisseurs de gaze avant d'être centrifugé 20 min à 150 g afin d'éliminer les particules alimentaires ruminales et les protozoaires. Le surnageant est ensuite centrifugé 30 min à 6 000 g et le culot bactérien obtenu est repris dans du milieu de culture sans peptides. Les bactéries provenant de 500 mL de jus de rumen sont reprises dans 50 mL de milieu.

Cette suspension de bactéries est ajoutée au milieu de culture de telle manière que la concentration finale en bactéries avant incubation soit du même ordre que celle initialement rencontrée dans le jus de rumen prélevé.

Pour chaque fraction marquée, 6 durées d'incubation sont retenues : 0, 30, 60, 90, 120 et 300 min. Par culture, et pour chaque fraction et chaque temps, deux incubations sont réalisées dans deux tubes de 10 mL.

À la fin de chaque incubation, les bactéries sont séparées du surnageant par centrifugation 20 min à 9 000 g. Les surnageants des deux tubes correspondant au même temps et à la même fraction radioactive sont regroupés et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les culots bactériens sont rincés deux fois dans 10 mL d'une solution de  $\text{NaCl}$  0,9 % (p/v) et regroupés avant d'être placés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. Méthodes d'analyses

La croissance bactérienne est suivie par la mesure de la densité optique à 660 nm. 0,5 mL du milieu contenant encore les bactéries est prélevé et dilué par 1,5 mL de milieu de culture sans cellule avant d'être lu sur le spectrophotomètre. Des numérations de bactéries viables aux temps 0, 1 et 5 h des cultures ont été réalisées par dilution puis culture dans du milieu MGA [11].

L'azote total du surnageant est mesuré par la technique de Kjeldahl. L'ammoniac est dosé sur les surnageants grâce à une électrode spécifique Orion 95-12.

La radioactivité totale du surnageant, la radioactivité totale associée aux bactéries ainsi que les radioactivités des différentes fractions peptidiques des surnageants, séparées par HPLC sont mesurées grâce à un compteur  $\beta$  à scintillation liquide. Le liquide de scintillation utilisé est du Ready Safe (Beckman) à raison de 1 mL d'échantillon pour 10 mL de liquide de scintillation. Une courbe de quenching a été réalisée avec du jus de rumen à différentes dilutions.

## 3. RESULTATS

### 3.1. Croissance bactérienne et conditions de fermentation

La croissance bactérienne estimée par l'évolution de la densité optique est représentée *figure 1A*. La croissance bactérienne est identique dans les deux séries d'incubation. Cette croissance n'est sensible que durant la première demi-heure. Ensuite, la densité optique se stabilise. En moyenne 3,25 mg/mL de matière sèche ont été produits par les bactéries en 5 h.

Les numérations bactériennes montrent globalement une augmentation du nombre de bactéries viables au cours du temps. Mais, alors que les mesures de DO montrent une forte augmentation du nombre de corps bactériens totaux au cours de la première demi-heure, puis une stagnation, le nombre de bactéries viables croît sur-

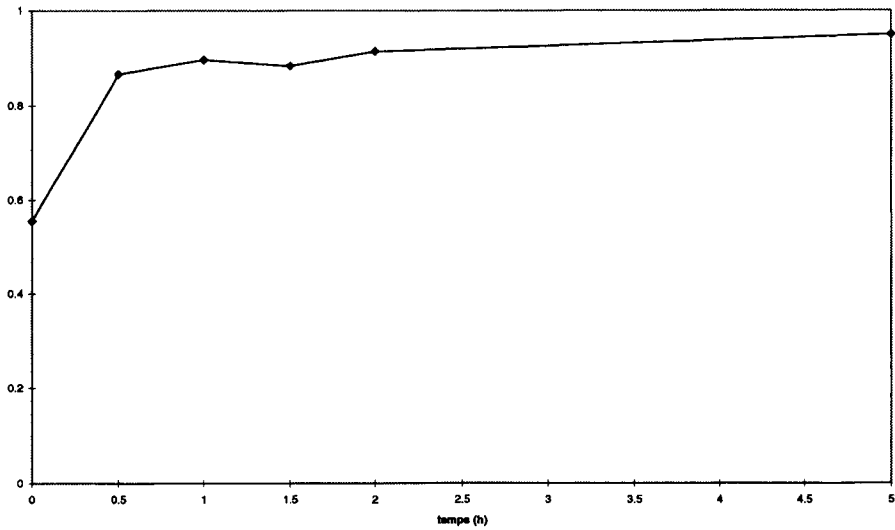
tout entre 1 et 5 h. Il passe de  $1,78 \cdot 10^8$  à  $1,92 \cdot 10^8$  en une heure et atteint  $3,75 \cdot 10^8$  bactéries viables par millilitre en moyenne.

La diminution de la teneur en azote du milieu (*figure 1B*) permet d'évaluer la consommation azotée des bactéries. Comme pour la densité optique, l'essentiel de l'évolution se fait dans la première demi-heure. La quantité d'azote total du surnageant passe de 7,2 à 5,0 mg d'azote par tube. Le rapport entre cette baisse de concentration et la production de matière sèche microbienne donne une estimation de la teneur en azote de la matière sèche microbienne produite au cours des 5 h d'incubation d'environ 6,8 %. Ceci concorde avec les teneurs en azote de la matière sèche habituellement rencontrées chez les bactéries [5, 12, 17].

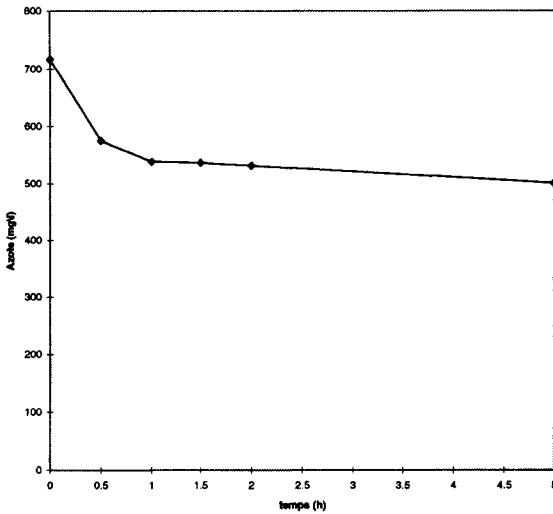
L'évolution de la concentration en ammoniac est décrite *figure 1C*. Cette concentration varie très faiblement même après 5 h. Seulement 0,76 mg d'azote par tube en moyenne est retrouvé finalement sous forme d'ammoniac.

### 3.2. Évolution de la proportion de radioactivité associée à la fraction bactérienne

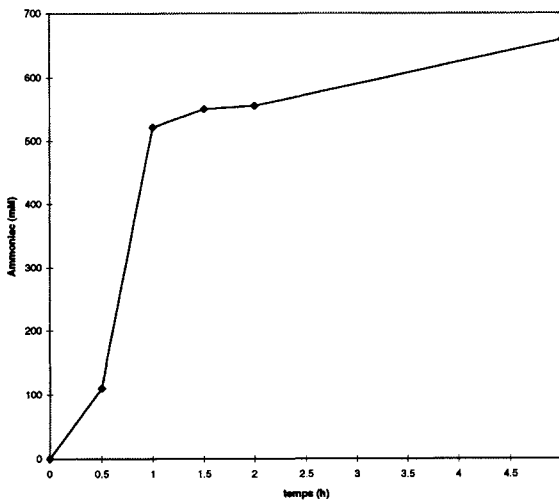
L'utilisation d'une fraction peptidique donnée, alors qu'elle est présente au sein d'un mélange complexe de peptides, a pu être suivie grâce aux mesures de radioactivité totale dans les surnageants et les culots bactériens. En effet, toute la radioactivité retrouvée dans un tube ne peut provenir que de la source de radioactivité initialement introduite dans le tube, c'est-à-dire de la fraction marquée ajoutée. De plus, cette fraction marquée a été introduite en très petite quantité par rapport à la quantité totale de peptides (4 mg/50 mg de peptides non marqués) afin de ne pas modifier de manière trop importante la répartition initiale des différentes fractions de l'hydrolysate caséique.



▲ **Figure 1A.** Évolution de la croissance microbienne estimée par la densité optique (valeurs moyennes sur les deux séries d'incubation).



◀ **Figure 1B.** Évolution de la concentration en azote total des surnageants en milligramme par litre (valeurs moyennes sur les deux séries d'incubation).



◀ **Figure 1C.** Évolution de la concentration en ammoniac (mM) (valeurs moyennes sur les deux séries d'incubation).

Le pourcentage de la radioactivité retrouvée dans le culot bactérien représente le pourcentage de la fraction peptidique marquée qui s'est associée aux bactéries. On peut considérer qu'il représente donc le pourcentage de la fraction totale, marquée et non marquée, associée aux bactéries puisque le marquage ne perturbe pas l'association avec les bactéries, ni d'ailleurs l'hydrolyse extra- comme intracellulaire.

La quantité de radioactivité associée aux bactéries rapportée à la quantité totale de radioactivité retrouvée augmente au cours du temps. Cependant, cette proportion reste faible, au maximum 6,8 % de la radioactivité totale retrouvée dans la fraction bactérienne.

Les cinétiques d'association de la radioactivité aux bactéries diffèrent entre les fractions peptidiques testées (*figure 2*). Après 5 h d'incubation, le pourcentage de la radioactivité provenant de la fraction C, la plus légère, fixée par les bactéries est plus élevé que celui provenant de la fraction B. La fraction A, la plus lourde, présente le taux d'association le plus faible et est en fait très mal utilisée par les bactéries.

### **3.3. Évolution de la répartition de la radioactivité entre les fractions peptidiques du surnageant et la fraction bactérienne**

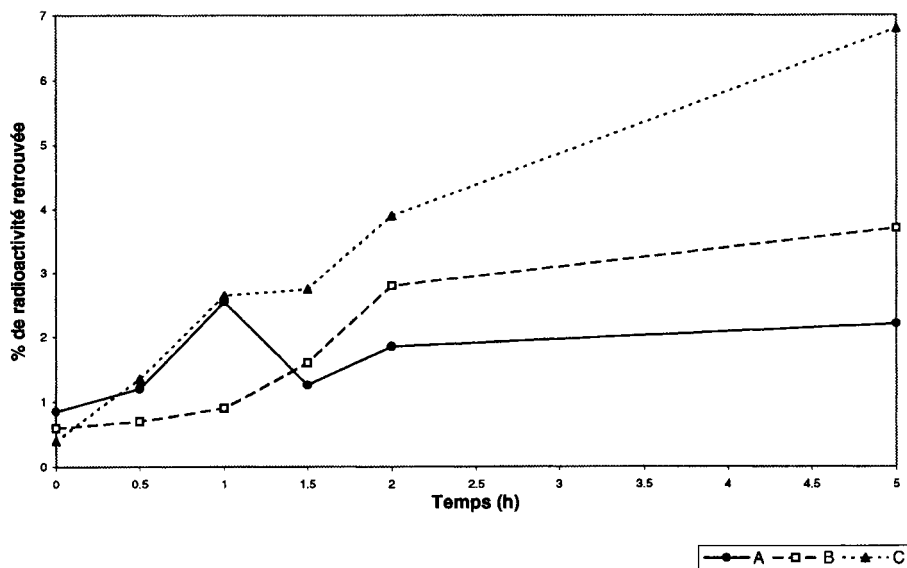
Afin de préciser les mécanismes qui déterminent la répartition entre la dégradation extracellulaire et le prélèvement des peptides par les bactéries, la proportion de la radioactivité retrouvée après incubation dans les différentes fractions peptidiques déjà définies a été calculée. En plus des trois fractions précédemment décrites, une quatrième fraction D a été prise en compte pour mettre en évidence une libération de peptides de moins de

1 000 Da. Les données sont exprimées en pourcentage de la radioactivité retrouvée dans l'ensemble des quatre fractions collectées et les bactéries (*figures 3, 4, 5*).

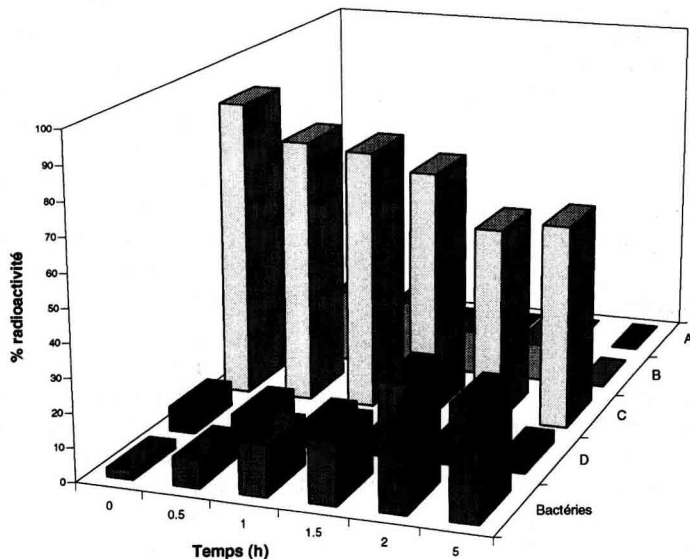
Lorsque la fraction C marquée est incubée, aucune radioactivité n'apparaît dans la fraction D (*figure 3*). Or, la fraction C est bien prélevée par les bactéries puisque, comme nous l'avons vu précédemment, le pourcentage de la radioactivité retrouvée associée aux bactéries augmente au cours du temps. Le passage de la radioactivité de la fraction C aux bactéries, bien qu'apparemment direct, ne se fait pas de manière totale durant les 5 h d'incubation. En effet, il reste toujours en moyenne autour de 60 % de la radioactivité dans cette fraction après 5 h.

Lorsque la fraction marquée introduite initialement est la fraction B, on observe une diminution de la part de la radioactivité dans cette fraction au profit de la fraction C et des bactéries (*figure 4*). En début d'incubation, la radioactivité a tendance à s'accumuler dans la fraction C et ne passe que faiblement au niveau des bactéries. Par la suite, le pourcentage de la radioactivité associée à la fraction C se stabilise alors que la proportion de radioactivité associée au culot bactérien augmente, surtout après 1,5 h. Après 5 h, on retrouve encore 28,5 % de la radioactivité au niveau de la fraction B. De même, 41,8 % de la radioactivité sont retrouvés dans la fraction C.

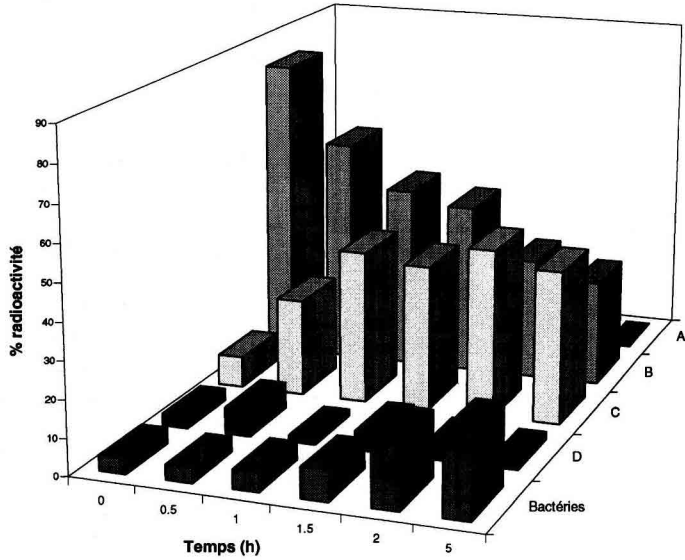
Les résultats obtenus après incubation de la fraction A marquée confirment ceux décrits pour la fraction B (*figure 5*). Les peptides de cette fraction sont dégradés en peptides de tailles inférieures. Les peptides de poids moléculaires compris entre 5 000 et 10 000 Da sont quasiment totalement hydrolysés en peptides de 2 000 à 5 000 Da. En effet, au bout de 5 h, la plus grande part de la radioactivité est retrouvée dans la fraction B (50,9 %) et très peu persiste dans la fraction A (9,5 %). Même après 5 h, très peu de radioactivité est



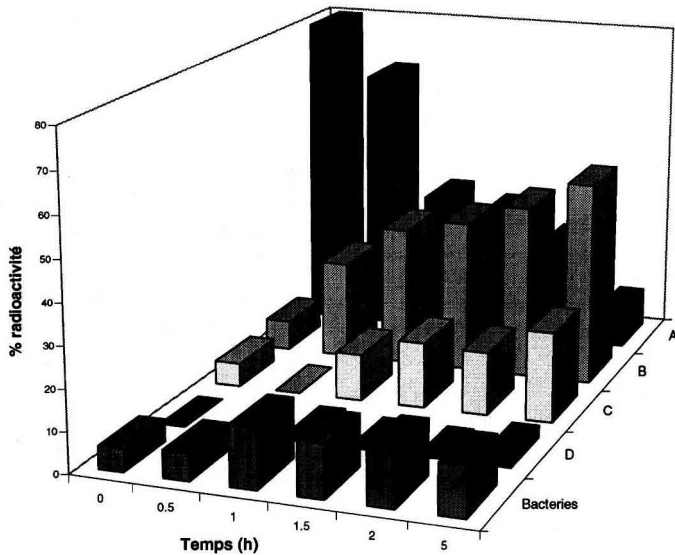
**Figure 2.** Évolution des pourcentages de la radioactivité retrouvée dans la fraction bactérienne après incubation des différentes fractions marquées (valeurs moyennes sur les deux séries d'incubation). Fraction A : 10 000 à 5 000 Da, Fraction B : 5 000 à 2 000 Da, Fraction C : 2 000 à 1 000 Da.



**Figure 3.** Évolution des pourcentages de la radioactivité retrouvée dans les différentes fractions après incubation de la fraction marquée C (valeurs moyennes sur les deux séries d'incubation). Les données sont exprimées en pourcentage de la radioactivité totale retrouvée. Axe des abscisses : temps d'incubation. Axe des ordonnées : fractions peptidiques du surnageant. A : 10 000 à 5 000 Da, B : 5 000 à 2 000 Da, C : 2 000 à 1 000 Da, D : < 1 000 Da.



**Figure 4.** Évolution des pourcentages de la radioactivité retrouvée dans les différentes fractions après incubation de la fraction marquée B (valeurs moyennes sur les deux séries d'incubation). Les données sont exprimées en pourcentage de la radioactivité totale retrouvée. Axe des abscisses : temps d'incubation. Axe des ordonnées : fractions peptidiques du surnageant. A : 10 000 à 5 000 Da, B : 5 000 à 2 000 Da, C : 2 000 à 1 000 Da, D : < 1 000 Da.



**Figure 5.** Évolution des pourcentages de la radioactivité retrouvée dans les différentes fractions après incubation de la fraction marquée A (valeurs moyennes sur les deux séries d'incubation). Les données sont exprimées en pourcentage de la radioactivité totale retrouvée. Axe des abscisses : temps d'incubation. Axe des ordonnées : fractions peptidiques du surnageant. A : 10 000 à 5 000 Da, B : 5 000 à 2 000 Da, C : 2 000 à 1 000 Da, D : < 1 000 Da.



associée aux bactéries. L'accumulation de la radioactivité provenant de l'hydrolyse de la fraction A est la plus forte dans les fractions de peptides les plus lourds et la moins marquée dans les corps bactériens.

#### 4. DISCUSSION

Par rapport à la simple lecture d'absorbance après séparation par HPLC, l'utilisation de peptides radioactifs permet de suivre non seulement l'évolution de la quantité de peptides d'une classe de poids moléculaires donnée, mais aussi le passage des peptides d'une classe de poids moléculaires à une autre, tout en travaillant avec un mélange complexe de peptides. Il faut toutefois noter que si le comptage de radioactivité nous donne une mesure du nombre de carbones radioactifs incorporés à une fraction donnée, il ne nous permet pas d'estimer la quantité d'azote correspondante, à moins de supposer que le rapport C/N soit constant quelle que soit la fraction peptidique considérée.

L'apparente contradiction entre les données sur la croissance bactérienne obtenue par la mesure de densité optique et le nombre de bactéries viables pourrait être en partie expliquée par l'hétérogénéité des souches présentes dans l'inoculum de bactéries mixtes d'origine. Au temps initial, les colonies obtenues lors des comptages sont de morphologies très variées alors qu'après 5 h, seuls quelques types de colonies prédominent. Les conditions de culture ont probablement sélectionné les espèces les mieux adaptées qui ont proliféré aux dépens des autres espèces initialement présentes. La stagnation du nombre de bactéries viables entre 1 et 5 h serait due à une forte mortalité d'une partie des souches bactériennes, compensée par une forte croissance d'autres souches plus adaptées. L'utilisation de souches pures aurait pu nous éviter ce biais en sélectionnant dès le départ un seul type de bac-

térie pour lequel nos conditions de culture auraient été spécialement adaptées. Ce type d'essai aurait totalement ignoré les interactions possibles entre les bactéries peptidolytiques et les autres.

L'ammoniac reste en concentration faible même après les incubations les plus longues. Ceci indique que les conditions de culture ont permis le maintien d'un équilibre entre fermentation des glucides et fermentation des protéines. Un élément a pourtant dû limiter la croissance d'une partie des souches bactériennes initialement présentes. A priori, l'azote ne semble pas avoir été cet élément puisque sa concentration reste relativement élevée dans les surnageants. En revanche, il n'est pas impossible qu'un manque d'énergie ait été responsable de ce phénomène.

Nous avons choisi de ne pas ajouter d'ammoniac au milieu de culture initial. Ce choix a été fait afin d'éviter qu'il ne nuise à l'activité protéolytique des bactéries déjà présentes comme il l'a été montré pour *Clostridium bif fermentans* [8]. En même temps, nous avons pris le risque de voir certaines bactéries dépendantes de  $\text{NH}_3$  disparaître de l'inoculum.

Le suivi de la répartition de la radioactivité entre les différentes classes de peptides et les bactéries nous a montré qu'il existait bien des flux de peptides entre les différentes classes. De plus, nous avons constaté qu'il existait une certaine influence de la longueur d'un peptide sur sa dégradation et son utilisation.

L'hydrolyse extracellulaire dépend de la taille du peptide concerné. Après 5 h, la quasi-totalité de la radioactivité (autour de 90 %) apportée par la fraction A a disparu de cette fraction et est passée dans les fractions C et B. Dans la même durée, 29 % de la radioactivité apportée par la fraction B reste encore au sein de cette fraction. La fraction C est elle-même dégradée de manière encore moins importante : cette fraction contient toujours 60 % de sa radioactivité initiale. Il semble donc

que la fraction contenant les peptides les plus grands soit hydrolysée de manière plus rapide par les enzymes bactériennes. Ceci va dans le même sens que les résultats obtenus par Wallace et al. [21] et confirme les conclusions de Depardon et al. [9, 10] selon lesquelles les peptides de poids moléculaires élevés (2 à 4 kDa) disparaissent rapidement au profit des peptides de poids moléculaires de moins de 500 Da dans les hydrolysats de caséine ou de protéines de soja.

Cela se traduit par une tendance à l'accumulation de la radioactivité dans les fractions de plus faibles poids moléculaires aux dépens des fractions plus lourdes. Ces conclusions se distinguent de celles de Chen et al. [4] qui observent in vivo une augmentation de la taille moyenne des peptides contenus dans le jus de rumen d'une vache entre 1 et 8 h après le repas. Il est probable que dans nos essais l'étape limitante de l'utilisation des peptides se situe au niveau de l'absorption des petits peptides alors qu'elle concernerait plutôt l'hydrolyse des grands peptides dans le cas des travaux de Chen et al.

Aucune radioactivité notable n'a jamais pu être mise en évidence dans des peptides de moins de 1 000 Da. Les peptides de poids moléculaires compris entre 2 000 et 1 000 Da semble être directement assimilables par les bactéries. Ceci corrobore les conclusions de Pittman et al. [15] qui montrent que des peptides de 2 000 Da peuvent être utilisés par *P. ruminicola*, bactérie protéolytique très active du rumen. Cependant, de nombreux auteurs, dont Westlake et Mackie [22] affirment que seuls des peptides plus petits (750 Da) peuvent être absorbés sans hydrolyse préalable par les bactéries. Dans notre cas, deux hypothèses peuvent être avancées. Premièrement, la réduction de la taille des peptides en dessous de 1 000 Da peut être moins rapide que le prélèvement des peptides de moins de 1 000 Da par les bactéries.

Ainsi, les peptides provenant de la dégradation de la fraction C ne feraient qu'un rapide passage dans la fraction D. La seconde hypothèse repose sur un passage direct des peptides de la fraction C vers les bactéries sans hydrolyse préalable ou, du moins, sans relargage vers le milieu extracellulaire des produits d'hydrolyse avant leur transport. Ceci dépend du type de transport des acides aminés peptidiques mis en œuvre par les bactéries du rumen [13]. Toutefois, quelle que soit l'hypothèse retenue, il semble que cette phase constitue l'étape limitante de l'utilisation des peptides par les bactéries.

La proportion de radioactivité retrouvée dans le culot augmente au cours du temps de manière différente selon la fraction marquée initialement incubée. Ici, le marquage du culot bactérien peut être dû soit à un transport vers l'intérieur de la cellule suivi d'un éventuel métabolisme intracellulaire, soit à une simple adsorption des peptides aux enveloppes cellulaires [6]. Nous avons constaté que plus un peptide est court, plus la radioactivité qu'il contient passe rapidement dans les corps bactériens. Au contraire, Copper et Ling [6] ont montré que, pour des peptides comprenant de 7 à 45 résidus, une diminution de leur taille entraînait une diminution de leur vitesse de prélèvement pour des temps inférieurs à 20 min. Dans le même laboratoire, des études ultérieures n'ont pas réussi à mettre en évidence de relation claire entre taille et vitesse d'incorporation aux corps bactériens [2].

Ainsi, plus un peptide est long, plus sa disparition sera rapide mais plus son incorporation à la fraction bactérienne sera lente du fait de la multiplication des étapes d'hydrolyse nécessaires.

## REFERENCES

- [1] Argyle J.L., Baldwin R.L., Effects of amino acids and peptides on rumen microbial growth yields, *J. Dairy Sci.* 72 (1989) 2017–2027.

- [2] Armstead I.P., Ling J.R., Variations in the uptake and metabolism of peptides by ruminal micro-organisms, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 3360–3366.
- [3] Chalupa W., Degradation of amino acids by the mixed ruminal microbial population, *J. Anim. Sci.* 43 (1976) 828–834.
- [4] Chen G., Russell J.B., Sniffen C.J., A procedure for measuring peptides in rumen fluid and evidence that peptide uptake can be a rate limiting step in ruminal protein degradation, *J. Dairy Sci.* 70 (1987) 1211–1219.
- [5] Clark J.H., Husmeyer T.H., Cameron M.R., Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fraction to the duodenum of dairy cows, *J. Dairy Sci.* 75 (1992) 2304–2323.
- [6] Copper P.B., Ling J.R., The uptake of peptides and amino acids by rumen bacteria, *Proc. Nutr. Soc.* 50 (1985) 345–355.
- [7] Cotta M.A., Russell J.B., Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture, *J. Dairy Sci.* 65 (1982) 226–234.
- [8] Debroas D., Blanchart G., Characteristics of extracellular protease formation by a rumen microorganism *Clostridium bifermentans* and its possible role in the hydrolysis of protein in the rumen, *Microbiol. Alim. Nutr.* 11 (1993) 101–109.
- [9] Depardon N., Debroas D., Blanchart G., Breakdown of peptides from a soya protein hydrolysate by rumen bacteria. Simultaneous study of enzyme activities and of two physico-chemical parameters: molecular weight and hydrophobicity, *J. Sci. Food Agric.* 68 (1995) 25–31.
- [10] Depardon N., Debroas D., Blanchart G., Breakdown of peptides from a casein hydrolysate by rumen bacteria. Simultaneous study of enzyme activities and of physicochemical parameters, *Reprod. Nutr. Dev.* (1996) 457–466.
- [11] Hobson P.N., Rumen bacteria, in : Norris J.R., Ribbon D.N. (éds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 3B, Academic Press, London, 1969, 133–149.
- [12] Hvelplund T., The influence of diet on nitrogen and amino acids content of mixed rumen bacteria, *Acta Agric. Scand.* 36 (1986) 325–331.
- [13] Payne J.W., Transport and utilization of peptides by bacteria, in : Payne J.W. (éd.), *Microorganisms and nitrogen sources*, John Wiley, New York, 1980, 211–256.
- [14] Pittman K.A., Bryant M.P., Peptides and other nitrogen sources for growth of *Bacteroides ruminicola*, *J. Bacteriol.* 88 (1964) 401–410.
- [15] Pittman K.A., Lakshamanan S., Bryant M.P., Oligopeptide uptake by *Bacteroides ruminicola* B<sub>1,4</sub>, *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (1967) 1566–1574.
- [16] Russell J.B., Sniffen C.J., VanSoest P.J., Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria, *J. Dairy Sci.* 66 (1983) 763–775.
- [17] Tanan K., Blanchart G., Poncet C., Robert J.C., Dumont G., Desarmenien E., Composition chimique des protozoaires et des bactéries libres du rumen de vaches, *Reprod. Nutr. Dev.* 43 (1994) 261.
- [18] Wallace R.J., Gel filtration studies of peptide metabolism by rumen micro-organisms, *J. Sci. Food Agri.* 58 (1992) 177–184.
- [19] Wallace R.J., MacKain N., Analysis of peptide metabolism by ruminal micro-organisms, *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1989) 2372–2376.
- [20] Wallace R.J., MacKain N., A comparison of methods for determining the concentration of extracellular peptides in rumen fluid of sheep, *J. Agri. Sci.* 114 (1990) 101–105.
- [21] Wallace R.J., Newbold C.J., MacKain N., Patterns of peptide metabolism by rumen microorganisms, in : Hoshino S., Onodera R., Minato H., Itabashi H. (éds.), *The Rumen Ecosystem. The Microbial Metabolism and its Regulation*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan, 1990, 43–49.
- [22] Westlake K., Mackie R.I., Peptide and amino acid transport in *Streptococcus bovis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34 (1990) 97–102.
- [23] Wright D.E., Metabolism of peptides by rumen micro-organisms, *Appl. Environ. Microbiol.* 15 (1967) 547–550.