

AUTEURS

Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie, 1961, 69 (1).

1

Reçu le 30 janvier 1961.

FERMENTATION DE LA CELLULOSE ET ABSORPTION D'ACIDES GRAS VOLATILS AU NIVEAU DU CÆCUM DU LAPIN

PAR

Andrée COOLS et Charles JEUNIAUX

(Institut Léon Fredericq, Biochimie; Université de Liège)

Depuis les travaux de ELSDEN (1945), de BARCROFT, McANALLY et PHILLIPSON (1944), de GRAY et PILGRIM (1951, *a* et *b*) etc., on possède les arguments expérimentaux permettant de comprendre le mécanisme de la digestion de la cellulose chez les mammifères ruminants. La dégradation enzymatique de la cellulose par les cellulases d'origine bactérienne est suivie de la fermentation des produits d'hydrolyse en anhydride carbonique et en acides gras volatils, parmi lesquels dominent les acides acétique, propionique et butyrique. Cette dégradation de la cellulose ne se réalise pas seulement dans les poches stomacales, mais elle se répète dans le cœcum et le côlon. A ces différents niveaux, les acides gras sont absorbés rapidement à travers l'épithélium : le sang veineux drainant ces organes est beaucoup plus riche en acides gras volatils que le sang veineux drainant la caillette ou l'intestin grêle.

Cette augmentation de la teneur en acides gras volatils du sang veineux a été observée également par BARCROFT, McANALLY et PHILLIPSON (1944) pour le côlon du cheval, et du porc, et pour le cœcum du lapin. Par analogie avec les phénomènes observés chez les ruminants, ces auteurs ont suggéré l'existence d'une fermentation de la cellulose dans le cœcum et le côlon de ces mammifères.

A notre connaissance, la digestion de la cellulose chez les mammifères non ruminants (à l'exclusion du cas particulier de certains Marsupiaux) ⁽¹⁾ n'a pas fait l'objet de travaux plus

⁽¹⁾ Il faut citer les intéressants travaux de MOIR, SOMERS, SHARMAN et WARING (1954) et de CALABY (1958) sur la fermentation de la cellulose dans l'estomac et le cœcum du marsupial *Setonix brachurus*.

récents. Le but de ce travail est d'apporter une confirmation à l'hypothèse de BARCROFT *et al.* (*l. c.*) en ce qui concerne la digestion et la fermentation de la cellulose dans le cæcum du lapin.

1. — Méthodes

a) Mesure de l'activité cellulolytique.

L'activité cellulolytique des contenus cœcaux est mesurée par dosage de la quantité de sucres réducteurs libérés au cours de l'incubation à 37° C. en présence de carboxyméthylcellulose⁽¹⁾ comme substrat, en milieu tamponné de pH 5.5 (acide citrique-Na₂HPO₄, conc. finale : 0.1 M). On ajoute deux gouttes de toluol comme antiseptique. On prélève 1 ml. du milieu réactionnel au moment de la mise en incubation et après des temps déterminés. La déprotéinisation de chaque prise d'essai est assurée par adsorption des protéines sur gel d'hydroxyde de zinc, obtenu extemporanément par mélange de deux volumes égaux de Ba(OH)₂ 0.3 M et de ZnSO₄ 0.3 M. Les sucres réducteurs de la solution déprotéinisée sont dosés par la méthode colorimétrique de SOMOGYI (1952). Les résultats sont exprimés en micromolécules-grammes (μ moles) de glucose par ml. de milieu réactionnel. Un témoin sans substrat est conduit parallèlement aux tests enzymatiques.

b) Dosage des acides gras volatils.

Nous avons utilisé la méthode de McANALLY (1944) légèrement modifiée, consistant à distiller les acides gras volatils, après acidification et précipitation des protéines. Ces deux opérations sont réalisées par addition, à un volume de solution étudiée, de cinq volumes d'une solution à 2.5 vol. % d'acide sulfurique saturée en MgSO₄. Après filtration sur papier, on ajoute au filtrat une quantité d'eau égale aux 4/6 de son volume, et on distille les acides volatils par entraînement à la vapeur d'eau. Le distillat est recueilli en deux fractions successives de 50 ml. On en chasse l'anhydride carbonique en y faisant barboter pendant 5 minutes de l'oxygène dépourvu de CO₂. On dose les

⁽¹⁾ L'utilisation de carboxyméthylcellulose comme substrat pour l'étude des cellulases a été justifiée par REESE, SIU et LEVINSON (1950), par HOLDEN et TRACEY (1950), etc.

acides distillés par absence de phénolphthaleïne dans le barbotage d'oxygène.

Cette méthode présente l'avantage d'être plus rapide que l'acide acétique et de 90 % de précision, et elle ne contient pas de phénolphthaleïne systématiquement.

2. — Mise en évidence de l'activité cellulolytique

L'activité cellulolytique des contenus cœcaux est mesurée par dosage de la quantité de sucres réducteurs libérés au cours de l'incubation à 37° C. en présence de carboxyméthylcellulose comme substrat, en milieu tamponné de pH 5.5 (acide citrique-Na₂HPO₄, conc. finale : 0.1 M). On ajoute deux gouttes de toluol comme antiseptique. On prélève 1 ml. du milieu réactionnel au moment de la mise en incubation et après des temps déterminés. La déprotéinisation de chaque prise d'essai est assurée par adsorption des protéines sur gel d'hydroxyde de zinc, obtenu extemporanément par mélange de deux volumes égaux de Ba(OH)₂ 0.3 M et de ZnSO₄ 0.3 M. Les sucres réducteurs de la solution déprotéinisée sont dosés par la méthode colorimétrique de SOMOGYI (1952). Les résultats sont exprimés en micromolécules-grammes (μ moles) de glucose par ml. de milieu réactionnel. Un témoin sans substrat est conduit parallèlement aux tests enzymatiques.

Les résultats, présentés au cours de l'incubation, montrent que l'activité cellulolytique est beaucoup plus importante dans les contenus du cæcum que dans les contenus du cœcum et dans les contenus cœcaux.

3. — Fermentation des sucres dans le cœcum et dans les contenus cœcaux

a) Méthodes.

Le contenu cœcal est prélevé et dilué 3 fois par volume d'eau. Une centrifugation à 2.000 tours/min. sépare les débris cellulosaques et les bactéries intestinales des surnageants. Ceux-ci sont dilués 200 ml. ; on y ajoute 10 ml. de

ter une confirmation à ce qui concerne la digestion dans le cæcum du lapin.

La concentration des sucre réducteurs libérés au cours de la digestion dans le cæcum par la carboxyméthylcellulose (1) est mesurée par la méthode colorimétrique de BROWN (1948). Les deux gouttes de toluol utilisées pour la détermination du pH 5.5 (acide citrique) sont ajoutées au milieu réactionnel dans l'ordre indiqué. Après des temps déterminés, la précision de l'essai est assurée par l'ajout de 10 ml. de chlorure d'oxyde de zinc, obtenu par la méthode de BROWN (1948). Les deux volumes égaux de sucre réducteurs de la méthode colorimétrique sont exprimés en microsugars et mesurés par ml. de milieu de réaction. La méthode est conduite parallèlement à celle de l'acide acétique.

ANALLY (1944) a démontré que les acides gras volatils, les acides gras et les protéines. Ces deux méthodes sont appliquées à un volume de solution équivalente à 2.5 vol. % d'acide acétique. La concentration sur papier, on ajoute 4/6 de son volume, puis 1/6 de son volume, et ainsi de suite jusqu'à la vapeur d'acide acétique. Les fractions successives de sucre sont alors mesurées en y faisant barboter de l'acide acétique dans l'eau de CO₂. On dose les acides gras volatils et les acides gras et les protéines.

Le substrat pour l'étude des acides gras volatils (1950), par HOLDEN et TRACEY

acides distillés par titration au moyen de NaOH 0.01 N, en présence de phénolphthaleine comme indicateur, sans interruption du barbotage d'oxygène.

Cette méthode permet une récupération de 83 % de l'acide acétique et de 90 % de l'acide propionique, lorsque l'échantillon ne contient pas plus de 50 μ -moles d'acide. Nous avons donc systématiquement dilué les échantillons.

2. — Mise en évidence de cellulase dans le contenu cæcal

L'activité cellulolytique a été mise en évidence dans deux extraits différents de contenu cæcal de lapins, nourris de foin et de son. Le premier extrait a été préparé par dilution d'un contenu cæcal au moyen de 6 volumes d'eau distillée. Pour la préparation du second extrait, le contenu cæcal a été récolté sous paraffine et dilué 6 fois par une solution de tampon KH₂PO₄-Na₂HPO₄ 0.05 M, de pH 6.5 (méthode préconisée par JOHNSON *et al.*, 1958, pour l'extraction des enzymes du rumen). Dans les deux cas, l'activité a été mesurée dans le liquide surnageant après centrifugation.

Les résultats, présentés dans le tableau 1, montrent, au cours de l'incubation à 37° C., une libération de sucre réducteur beaucoup plus importante en présence de carboxyméthylcellulose que dans les essais témoins. On peut en conclure que les contenus du cæcum de lapin renferment des enzymes cellulolytiques.

3. — Fermentation de la cellulose et production d'acides gras *in vitro* par le contenu cæcal

a) Méthodes.

Le contenu cæcal, recueilli sous paraffine, est homogénéisé et dilué 3 fois par de l'eau distillée ou un tampon de phosphates. Une centrifugation modérée en centrifuge réfrigérée (15 minutes à 2.000 tours/min.) permet d'éliminer la plus grande partie des débris cellulaires, tandis qu'une fraction importante des bactéries intestinales reste en suspension dans les liquides surnageants. Ceux-ci sont répartis en flacons d'Erlenmeyer de 200 ml.; on y ajoute un volume égal d'eau, de suspension

TABLEAU 1. — *Hydrolyse in vitro de la carboxyméthylcellulose par des extraits aqueux ou tamponnés de contenu cœcal de lapin*

Solution enzymatique	Durée d'incubation (37°)	Glucose libéré, en μ moles par ml. de milieu réactionnel (1)	
		Témoin sans substrat	Test enzymatique
Extrait aqueux de contenu cœcal ...	2 h.	0.01	0.40
	4 h.	0.28	1.45
Extrait tamponné de contenu cœcal ...	2 h.	0.06	0.98
	4 h.	0.30	1.08

(1) 2 ml. de solution enzymatique, 2 ml. d'eau distillée (témoin) ou de solution de carboxyméthylcellulose à 1 %; 2 ml. de tampon acide citrique-Na₂HPO₄ 0.3 M, pH 5.2; 2 gouttes de toluol.

colloïdale de cellulose (2) ou de solution de carboxyméthylcellulose, selon les cas. La phase gazeuse est constituée par de l'azote, et les flacons sont plongés dans un bain-marie thermostatique à 37° C.

Pour la mesure des acides gras volatils contenus dans les milieux réactionnels, les échantillons, prélevés au temps 0 et au cours de l'incubation, sont dilués 10 à 20 fois par de l'eau distillée, de telle sorte que la teneur en acides gras volatils soit comprise entre 20 et 50 μ moles (voir ci-dessus).

b) *Résultats.*

Le tableau 2 résume les résultats obtenus au cours de deux expériences différentes : dans le premier essai, on a employé

(2) La suspension colloïdale de cellulose est préparée à partir de cellulose pure (papier filtre), solubilisée dans de l'acide sulfurique concentré à 0° C., reprécipitée par dilution dans l'eau distillée, et lavée abondamment par centrifugations jusqu'à neutralisation.

une préparation distillée ; dans contenu cœcal KH₂PO₄-Na₂HPO₄

TABLEAU 2. —

Composition du réactionne

1. Contenu cœcal par eau distillée
 - a) + eau ...
 - b) + carboxyméthylcellulose (1 %)
 - c) + cellulose colloïdale (1 %)
2. Contenu cœcal par tampon I. Na₂HPO₄ :
 - a) + eau ...
 - b) + carboxyméthylcellulose (1 %)
 - c) + cellulose colloïdale (1 %)

(1) Milieu réactionnel substrat.

carboxyméthylcellulose par des
contenu cœcal de lapin

ose libérée, en μ moles par
de milieu réactionnel (1)

émoi substrat	Test enzymatique
0.01	0.40
0.28	1.45
0.06	0.98
0.30	1.08

stillée (témoin) ou de solution
acide citrique- Na_2HPO_4 0.3 M,

ion de carboxyméthyl-
cellulose est constituée par de
ns un bain-marie ther-

atils contenus dans les
prélevés au temps 0
10 à 20 fois par de l'eau
acides gras volatils soit
dessus).

tenus au cours de deux
er essai, on a employé

arée à partir de cellulose pure
concentré à 0° C., reprécipitée
ent par centrifugations jusqu'à

une préparation de contenu cœcal dilué deux fois par de l'eau distillée ; dans le second essai, on a utilisé une préparation de contenu cœcal dilué deux fois par une solution tampon de KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 0.05 M, de pH 6.5.

TABLEAU 2. — *Fermentation de la cellulose par les contenus du cœcum de lapin*

Composition du milieu réactionnel (1)	Acides volatils, en μ moles/ml. de milieu réactionnel (1)				
	Teneur en acides volatils des échantillons			Production d'acides volatils après une incubation de :	
	0 h.	6 h.	12 h.	6 h.	12 h.
1. Contenu cœcal dilué par eau distillée :					
a) + eau.....	24.7	39.4	—	14.7	—
b) + carboxyméthyl-cellulose (1 %) ...	27.7	46.0	—	18.3	—
c) + cellulose colloïdale (1 %)	24.1	45.0	—	20.9	—
2. Contenu cœcal dilué par tampon KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 :					
a) + eau	5.6	10.1	15.7	4.5	10.1
b) + carboxyméthyl-cellulose (1 %) ...	4.9	12.5	18.0	7.6	13.1
c) + cellulose colloïdale (1 %)	5.9	16.3	21.9	10.4	16.0

(1) Milieu réactionnel : 1 volume de contenu cœcal + 1 volume d'eau ou de substrat.

On constate que :

- 1) incubé à 37° C. et à l'abri de l'oxygène, le milieu cœcal est le siège d'une fermentation bactérienne ayant pour résultat la production d'acides volatils.
- 2) l'addition, au contenu cœcal, de carboxyméthylcellulose ou de cellulose colloïdale entraîne une nette augmentation de la production d'acides gras volatils.

4. — Mise en évidence d'une absorption d'acides volatils au niveau du cœcum

a) *Prélèvement du sang.*

Les lapins ont été nourris de son et de foin avant l'expérience. On les opère sous narcose (nembutal). La veine mésentérique antérieure est dégagée à l'aide de pinces sur une longueur de 5 cm. environ. On la ligature en deux endroits différents, distants de 3 cm. ; on sectionne la veine en avant de la seconde ligature, et on introduit la portion dénudée dans un tube à essai étalonné à 10 ml. On desserre les ligatures pour récolter le sang, auquel on ajoute, au fur et à mesure de l'écoulement, du citrate sodique à 10 %. On peut recueillir facilement 2 à 3 échantillons de 10 ml. de sang veineux. On referme ensuite les ligatures, et on peut, de manière analogue, récolter le sang de l'artère carotide ou de l'artère mésentérique antérieure.

b) *Résultats.*

Le tableau 3 résume les résultats obtenus, au moyen de 3 animaux différents, alimentés de foin et de son. On voit que la teneur en acides volatils du sang artériel est peu élevée, tant au niveau de l'artère carotide qu'au niveau de l'artère mésentérique antérieure. Par contre, le sang veineux drainant le cœcum contient une quantité d'acides volatils 8 à 10 fois supérieure à celle du sang artériel des mêmes individus.

5. — Conclusions et résumé

1. — Le contenu cœcal du lapin renferme des enzymes cellulolytiques.
2. — La teneur en acides volatils des contenus cœcaux, pour des lapins alimentés de foin et de son, est élevée (de 20 à 150 μ moles par ml. de contenu).

TABLEAU 3. — *Acides*

Lapin n°	1
	2
	3

⁽¹⁾ Moyenne de 2 dosages
⁽²⁾ Moyenne de 3 dosages

3. — La teneur en acides volatils dans le sang artériel augmente au cours de l'écoulement dans la veine. Ce phénomène soit sous la forme d'un accroissement de la teneur soit sous la forme d'un accroissement de la teneur

4. — Chez le lapin, la teneur en acides volatils dans le sang de la veine mésentérique antérieure est élevée et 4 μ moles d'acides volatils correspond parfaitement à celle du sang artériel.

5. — Ces résultats peuvent être comparés à ceux de CROFT, MCANALLY et STONE (1951) qui peuvent conclure que, chez le lapin, l'absorption des acides volatils s'accomplice au niveau de l'artère mésentérique antérieure par hydrolyse enzymatique et absorption par les cellules. La teneur en acides volatils dans le sang veineux drainant le cœcum est élevée et correspond à celle du sang artériel.

TABLEAU 3. — *Acides volatils dans le sang artériel et le sang veineux du lapin*

Lapin n°	Acides volatils, en μ -moles par ml. de sang		
	artère carotide	artère mésentérique antérieure	veine mésentérique antérieure
1	0.25 (1)	—	2.09 (1)
2	0.80 (1)	0.92 (2)	—
3	0.33 (2)	—	3.94 (2)

(1) Moyenne de 2 dosages.

(2) Moyenne de 3 dosages.

3. — La teneur en acides volatils des contenus cœaux augmente au cours de l'incubation *in vitro* à 37° C. et à l'abri de l'air. Ce phénomène est accéléré si on ajoute de la cellulose, soit sous la forme d'un dérivé soluble (carboxyméthylcellulose), soit sous la forme d'une suspension colloïdale.

4. — Chez le lapin nourri d'aliments riches en cellulose, le sang de la veine mésentérique antérieure contient entre 2 et 4 μ moles d'acides volatils par ml. de sang. Cette valeur correspond parfaitement à celle donnée par BARCROFT *et al.* (1944). Elle représente une teneur en acides volatils 8 à 10 fois supérieure à celle du sang artériel, chez le même animal.

5. — Ces résultats complètent et confirment ceux de BARCROFT, MCANALLY et PHILLIPSON (1944). Ils permettent de conclure que, chez le lapin, une digestion partielle de la cellulose s'accomplice au niveau du cæcum. Ce phénomène comporte une hydrolyse enzymatique de la cellulose par des enzymes cellulolytiques, vraisemblablement d'origine microbienne ; elle est suivie d'une fermentation bactérienne des produits d'hydrolyse, donnant naissance à des acides gras volatils. Ces acides volatils sont rapidement absorbés par la muqueuse du cæcum et passent dans le sang veineux de la veine mésentérique antérieure.

6. — Summary

Digestion of cellulose occurs in the cæcum of the rabbit, in a manner similar to that of rumen fermentation in ruminants. Cæcal contents exhibit cellulolytic properties. When incubated with extracts of cæcal contents, with the exclusion of oxygen, at 37° C., colloidal cellulose as well as carboxymethylcellulose are fermented into volatile fatty acids. These acids are easily absorbed by the cæcal epithelium, as attested by the fact that the amounts of volatile fatty acids in the blood of the mesenteric anterior vein are 8 to 10 times higher than in the blood of the mesenteric and carotid arteries.

BIBLIOGRAPHIE

- BARCROFT, J., MCANALLY, R. A. et PHILLIPSON, A. T. (1944). — *J. Exper. Biol.*, **20**, 120.
- CALABY, J. H. (1958). — *Austr. J. Biol. Sci.*, **11**, 572.
- ELSDEN, S. R. (1945). — *J. Exper. Biol.*, **22**, 51.
- GRAY, E. et PILGRIM, A. F. (1951). — *J. Exper. Biol.*, **28**, 74.
- GRAY, E. et PILGRIM, A. F. (1951). — *J. Exper. Biol.*, **28**, 83.
- HOLDEN, M. et TRACEY, M. V. (1950). — *Biochem. J.*, **47**, 407.
- JOHNSON, R. R., DEHORITY, B. A. et BENTLEY, O. E. (1958). — *J. Animal Science*, **17**, 841.
- MCANALLY, R. A. (1944). — *J. Exper. Biol.*, **20**, 130.
- MOIR, R. J., SOMERS, M., SHARMAN, G. et WARING, H. (1954). — *Nature*, **173**, 269.
- REESE, E. T., SIU, R. E. A. et LEVINSON, H. S. (1950). — *J. Bact.*, **59**, 485.
- SOMOGYI, M. (1952). — *J. biol. Chem.*, **195**, 20.

EXCE

Les EXCERPS
extensif d'extraits
immense de la r
20 sections qui
formant une do

PHYSIOLOG

Env

Nous désirons ve
pose pour la trad
Nous vous priom
recevez un relevé

119-123, Hereng
AMSTERDAM (H