

Z Verco 742

RAPPORT DE STAGE ; OCTOBRE 1976: OCTOBRE 1977

Présenté par :

Mr. N'DIAGA M'BAYE (1)

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU ROLE NUTRITIONNEL DU ZINC
CHEZ LES RUMINANTS : EFFET SUR LE METABOLISME DU RUMEN

Travail réalisé à :

la Station de Recherches de Nutrition

Institut National de la Recherche Agronomique

Centre National de Recherche Zootechniques

78350 JOUY-en-JOSAS

(1) Docteur Vétérinaire. Laboratoire National de l'Elevage
et de Recherches Vétérinaires. B.P. 2057 DAKAR-THANN
SENEGAL

Notre stage à la Station de Recherches de Nutrition de Jouy-en-Josa a été profitable à plus d'un titre. En effet, ce séjour nous aura permis de faire une bibliographie qui, sur le plan théorique, nous a beaucoup appris sur les divers métabolismes au niveau du rumen et sur les oligo-éléments en général et le zinc en particulier.

Sur le plan pratique, nos connaissances ont été grandement enrichies, car en plus des incubations in vitro, nous avons pu apprendre divers dosages (N total ; NH_3 , urée, cellulose, minéraux, etc..) qui nous seront d'une grande utilité dans le cadre du Laboratoire de Nutrition de l'ISRA-Hann.

Nous profitons de la rédaction de ce rapport pour remercier tout le personnel du Laboratoire des Minéraux de la Station de Recherches de Nutrition de Jouy, de leur gentillesse de tous les instants et de leur disponibilité à mon égard.

Je remercie Monsieur GUEGUEN de m'avoir accueilli dans son Laboratoire, qu'il soit assuré que le meilleur profit sera tiré de mon séjour,

Je remercie aussi Madame DURAND, en espérant un jour, être animé de la même passion pour la recherche qu'elle garde en elle.

Que Mademoiselle DUMAY et Monsieur BEAUMATIN soient assurés de ma gratitude.

En fin je souhaite que mon passage à Jouy soit le début d'une fructueuse coopération scientifique entre nos deux Laboratoires.

INTRODUCTION

Les **oligo-éléments** ou "**traces-éléments**" sont des minéraux présents dans les tissus animaux et végétaux, à des doses **très** faibles. Ils font souvent **partie de systèmes** enzymatiques et éventuellement d'hormones ou de vitamines. Ils se distinguent en **celà** des **macro-éléments** qui entrent dans des structures.

Les **faibles** teneurs **des organismes** et des aliments ont pendant **long-temps** constitué un **frein** au **développement** des recherches sur l'importance et le **rôle** de ces éléments. Mais grâce à la mise au point de **nouvelles techniques** d'analyse en particulier la spectrophotométrie d'absorption atomique des **progrès** notables sont **enregistrés**.

Ainsi, on **s'est rendu** compte que des **carences revêtant** souvent des formes graves pouvaient exister aussi bien chez **l'Homme** que chez les animaux. Après le fer et l'iode, le cuivre, le zinc, le **manganèse**, le cobalt et le sélénium sont venus s'ajouter à la liste des **oligo-éléments** indispensables à un équilibre physiologique.

Chez les ruminants, différentes formes de carences ont **été** décrites.

Pour le fer, la carence est rare, sinon exceptionnelle. On estime que 25 ppm de fer suffisent à l'entretien et au développement d'agneaux nourris avec un régime partiellement purifié (LAWLOR et al., 1965); un défaut d'apport se traduit **généralement** par des signes **d'anémie**, accompagnés **d'inappétence** et de retard de croissance.

Pour le cuivre, le **défait** d'apport est responsable de **l'ataxie** enzootique ou "**swayback**" (UNDERWOOD, 1971 ; LAMAND, 1972).

La **carence** ^{en} **manganèse** a toujours des conséquences graves chez les ruminants, car en plus des troubles osseux, on rencontre souvent une baisse de la fécondité (BROCHART, 1971).

Pour le cobalt, les besoins sont faibles, **0,1 mg/kg MS**, mais la carence peut exister et se traduit par un défaut de **synthèse** de la vitamine B12 par la **microflore** du rumen avec pour conséquence : une diminution de l'appétit et une chute des productions,

La carence en sélénium est responsable de syndrome "**myopathie-dyspnée**" décrit par LAMAND (1970). Cet auteur a mis au point une prophylaxie

chez le veau et propose 0,1 mg/kg MS. Ce taux peut aussi limiter divers effets défavorables de 1 a carence en **vitamine E**.

En ce qui concerne le zinc, on a décrit des carences aussi bien chez l'Homme que chez l'animal.

PRASSAD et al (1963) ont découvert en Egypte des formes de **nannisme** et d'hypogonadisme liées à une carence en zinc. Ces **mêmes** affections sont **retrouvées** en Iran sur des populations se nourrissant presque exclusivement de protéines d'origine végétale (RONAGHY et al., 1969).

Chez les animaux et les ruminants en particulier, la parakératose est l'un des **symptômes** les plus fréquents (TUCKER et SALMDN, 1955 ; LEGG et SEARS, 1960).

Ces exemples montrent l'importance que peut **revêtir** les **oligo-éléments** dans l'alimentation aussi bien des humains que des animaux, **De nombreux** travaux ont permis de préciser leurs **différentes** fonctions **métaboliques**. Il faut, cependant, ajouter que pour les ruminants le **problème** se complique par la présence dans le rumen de micro-organismes dont les besoins nutritionnels sont souvent mal connus. Le métabolisme bactérien au niveau du rumen **revêt** une importance économique considérable. Il permet à l'animal de rentabiliser des rations riches en cellulose et en azote non protéique. On peut **donc** réserver **aux** monogastriques les aliments plus nobles,

Actuellement, les normes établies pour les ruminants sont encore empiriques car on ne **connaît** pas avec précision l'influence des oligo-éléments sur la croissance de la micropopulation (stimulation ou inhibition). Ceci nous a amené à **nous** intéresser au zinc et à son influence sur la **dégradation de la cellulose et l'utilisation de l'urée** dans le rumen.

Dans la **première** partie de ce mémoire, nous présenterons les principales **données** bibliographiques sur le rôle du zinc chez les ruminants et les effets **d'une** carence d'une part, et, d'autre part, son influence sur quelques métabolismes au niveau du rumen : cellulolyse, **uréolyse** et **protéosynthèse**. Dans une **deuxième** partie, nous décrirons une expérimentation à laquelle nous avons participé et en discuterons les résultats.

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Rôle du zinc et effets d'une carence-

En 1971, UNDERWOOD et SELZE ont fait des revues détaillées des **connaissances** sur le **zinc**. **Leurs travaux** nous ont permis de faire le point avant **d'entreprendre** notre étude.

Déjà en 1869, RAULIN montrait que le zinc est indispensable à la croissance **de l'Aspergillus niger**. Ensuite, BRICKNER (cité par UNDERWOOD)

donne les premières indications sur la fonction du zinc chez les animaux. Après les travaux de TODD (1934), de KEILIN et MANN (1939) montrent que le zinc est un constituant de l'anhydrase carbonique ; viennent ensuite les travaux de TUCKER et SALMON (1955) sur le porc, de O'DELL (1958) sur le poulet, de LEGG et SEARS (1958) sur le ruminant et enfin de PRASSAD (1963) et RONAGHY (1969) sur les humains.

Tous les travaux ont contribué à préciser le rôle du zinc dans l'organisme. Cependant, le tour de la question est loin d'être fait et des inconnus demeurent.

Nous allons après une étude clinique rapide de la carence en zinc rappeler les besoins chez les ruminants.

1. Etude clinique

1.1. *Etiologie*

Parmi les causes pouvant entraîner une carence en zinc, on distingue des facteurs liés aux apports alimentaires responsables de la carence primaire, et des facteurs tenant à l'animal et provoquant la carence secondaire.

1.1.1. La carence primaire est due à des facteurs susceptibles de modifier la teneur des fourrages. Généralement, on estime que les fourrages contiennent 15 à 40 mg de zinc/kg MS, or la limite de carence se situe à 45 mg/kg MS (LAMAND, 1973).

Ce déficit est lié au sol et à la plante, Pour le zinc, les sols sont en général suffisamment pourvus, mais la fertilisation et l'intensification fourragère peuvent avoir des effets néfastes sur l'assimilation des oligo-éléments par les plantes.

La richesse d'une plante est fonction de l'espèce, de la partie considérée et du stade végétatif. Les légumineuses sont souvent plus riches que les graminées. Les feuilles sont mieux que les tiges et au cours de la maturation, la teneur diminue régulièrement jusqu'à la floraison (KERGUELEN, 1960). Les foin récoltés tardivement, séchés dans de mauvaises conditions sont pauvres.

En dehors de ces effets purement agronomiques, on peut assister à un développement de carence par une erreur de calcul dans la mise au point d'un complément minéral. Il peut aussi arriver que les apports soient satisfaisants, mais des perturbations métaboliques provoquent une mauvaise utilisation du zinc, ce qui entraîne la carence secondaire.

1.1.2. La carence secondaire

Différents facteurs capables de modifier la digestibilité et la retention du zinc peuvent provoquer des signes de carence.

On sait, en effet, (LAMAND et DEMARQUILLY, 1975) qu'il existe une corrélation entre le coefficient d'utilisation digestive (CUD) du zinc et ceux de la matière organique et de la matière sèche. Ces auteurs pensent que pour cet élément, la qualité de l'aliment influe plus que sa teneur.

D'autrepart, les contaminations par la terre font baisser le CUD, à des valeurs négatives malgré l'augmentation de la teneur de la ration.

La présentation physique de l'aliment peut aussi influencer sur l'utilisation digestive du zinc. On sait, en particulier, que le broyage fait baisser le CUD (PERIGAUD et al., 1972). LAMAND (1975) pense qu'une accélération du transit intestinal serait responsable de cette baisse observée.

HELLWEGE (1971) a observé sur des enfants une excrétion excessive et une mauvaise absorption du zinc par suite de troubles gastro-intestinaux dus à une modification de l'intégrité de la muqueuse.

Enfin, il existe des facteurs qui modifient l'utilisation du zinc en entrant en compétition avec lui au niveau des sites d'absorption ou de stockage. Il s'agit essentiellement de minéraux et de vitamines.

1.2. Symptômes et lésions

Les signes cliniques observés diffèrent peu d'une espèce à l'autre. Il existe néanmoins une variation dans la sensibilité à telle ou telle manifestation de la carence. Depuis les signes aigus jusqu'aux signes chroniques, on peut rencontrer toutes les formes. Chez l'Homme, l'un des premiers symptômes est le retard de croissance (HAMBIDGE et al., 1972), qui est suivi de la perte d'appétit, mais les choses peuvent être plus graves et aller jusqu'au nanisme et à l'hypogonadisme (PRASSAD et al., 1963 ; RONAGHY et al., 1969). Dans les formes aiguës des lésions dermiques sont observées.

Chez les animaux, on retrouve à peu près la même chose: l'inappétence, les troubles osseux et la dermite.

Ces symptômes ont été décrits par CHESTERS et al. (1970) chez le rat ; J.K. MILLER (1960), BLACKMON (1967) et W.J. MILLER (1970) chez les bovins au cours de carences expérimentales: Ils ont en plus observé une inflammation et une rougeur de la bouche et du muffle, un oedème du boulet, de l'alopécie accompagnée de lésions de parakératose et d'hyperkératose.

Les pertes économiques sont considérables, car en plus de la baisse de l'indice de consommation, on assiste à une diminution de la fertilité et à une sensibilité plus grande aux diverses infections.

1.3. *Diagnostic et pronostic*

Le diagnostic d'une carence en zinc sera à la fois clinique et expérimental.

Le diagnostic clinique est basé sur l'observation de l'alopecie, des dermites associées à un arrêt de la croissance, il est indispensable de le poser pour mieux orienter les analyses éventuelles du laboratoire,

On peut, en effet, doser le zinc dans les aliments, dans le sang, dans le foie et les poils.

L'examen de la ration est obligatoire. Il est nécessaire de savoir s'il existe un complément minéral et de vérifier sa composition, en évitant les contaminations, surtout par la terre.

Pour les analyses proprement dites, il est intéressant de demander à la fois le zinc, le cuivre et le manganèse, analysés à partir d'un même prélèvement et d'une même prise d'essais.

Le dosage plasmatique peut être effectué dans de bonnes conditions en évitant les contaminations et l'hémolyse.

BROCHART (1975) pense que le dosage dans les poils est possible et permet de diagnostiquer une carence profonde, néanmoins pour les échantillons inconnus, l'interprétation est difficile.

Les teneurs généralement rencontrées sont :

- pour les aliments : 15 à 40 mg/kg MS (LAMAND, 1971)
- pour le plasma : 80 à 120 mg/100 ml avec des valeurs de 150 mg lors de contamination ou de 80 mg au moins lors d'une inflammation
- pour les poils : 115 mg/g.

Enfin, il faudra compléter le diagnostic clinique et expérimental par un diagnostic différentiel. On peut, en effet, confondre la carence en zinc et une intoxication chronique par le sélénium ou par le thallium, à une avitaminose A, à une infestation parasitaire ou à une photosensibilisation.

Pour l'intoxication par le sélénium, la difficulté de la démarche et les douleurs articulaires sont assez spécifiques.

Pour le thallium, la dyspnée, les convulsions et parfois la cécité sont assez caractéristiques.

L'avitaminose A est caractérisée par la xérophtalmie.

Lors des gales ou de phtiriose, le prurit est toujours important,

Enfin, il n'y a que les parties du corps dépigmentées qui sont atteintes lors d'une photosensibilisation.

Le pronostic n'est pas grave lorsque le diagnostic est posé assez tôt. Une complémentation rétablit rapidement les différentes fonctions perturbées.

1.4. *Traitement*

Avant d'envisager le traitement, il faut tenir compte du fait qu'il est coûteux en main d'oeuvre et reste fugace.. 11 existe malgré tout des possibilités, à savoir : la supplémentation de la ration, les solutions buvables et les formes injectables.

BLACKMON et al (1967) obtiennent avec un apport de 260 ppm de Zn une disparition des symptômes en quatre jours.

J.K. MILLER et W.J. MILLER (1964) ont obtenu les mêmes résultats avec 250 ppm.

OTT et al (1965) ont, en diminuant la dose et en la portant à 100 ppm, traité des veaux et des agneaux ; alors que MILLS (1965) avait obtenu des résultats plus lents avec 20 ppm.

LAMAND (1971) a utilisé une solution buvable apportant 4 g de $\text{SO}_4 \text{ Zn}$ pendant dix jours à des bovins adultes et a observé une régression des symptômes. Cet auteur a mis au point des suspensions injectables à effet retard permettant d'apporter 600 mg de Zn à un bovin adulte. La rémanence du produit est de deux mois et demi environ.

Ces résultats sont certes encourageants, mais il faut dire que la voie la plus sûre reste la prophylaxie, malgré les incertitudes liées à la connaissance imparfaite des besoins des animaux.

2. Couverture des besoins : prophylaxie

La prophylaxie consiste à assurer la couverture des besoins de l'animal en zinc. Nous rappellerons quelques moyens à mettre en oeuvre pour prévenir une carence en cet élément.

2.1. *Prophylaxie par apport direct aux animaux*

LAMAND (1975) propose pour une vache à haute production laitière et ingérant 12 kg de MS par jour, le mode de calcul suivant :

* teneur moyenne	25 mg/kg MS
* besoins	50 mg/kg MS
* déficit à couvrir	300 mg/j

soit pour un complément minéral distribué à des bovins à raison de 100 g/j : 1,2 g de $\text{SO}_4 \text{ Zn}$, 7 H_2O par jour. Le complément peut être distribué soit à l'auge en mélange avec les aliments, soit au pâturage sous forme de pierre à lécher, en s'assurant évidemment que la composition du bloc permet de couvrir le déficit en oligo-éléments.

2.2. *Prophylaxie par enrichissement des fourrages sur pied*

Il s'agit d'apporter le zinc directement au sol ou à la plante en pulvérisation. L'apport de 25 à 50 kg de $\text{SO}_4 \text{ Zn}$ en couverture sur la prairie

en fin d'hiver peut être suffisant, en outre il n'y a pas de risques de toxicité pour les animaux (PLRIGAUD et al., 1975). Ces mêmes auteurs pensent que la pulvérisation foliaire permet aussi un enrichissement convenable de la prairie quatre à dix jours après l'intervention. Les oxydes semblent donner de meilleurs résultats, les sels solubles étant lessivés par les pluies.

Cette étude clinique permet de mesurer l'importance du zinc dans l'alimentation des animaux. D'autre part, on a pu voir qu'il est possible d'intervenir sur l'animal pour éviter une carence, mais on ne connaît pas encore tous les processus métaboliques qui nécessitent la participation du zinc. Dans les chapitres qui suivent, nous essayerons de donner un aperçu sur quelques métabolismes du rumen et sur le rôle du zinc à ces différents niveaux.

3. Métabolisme au niveau du rumen

1. Cellulolyse

1.1. *Schéma de dégradation*

La cellulose constitue une part importante de la ration des ruminants et représente souvent la seule source d'énergie. Au niveau du rumen les bactéries et protozoaires possèdent un équipement enzymatique qui leur permet de dégrader la cellulose en acides gras volatils (AGV) qui sont absorbés à travers la paroi du rumen et apportent à l'animal hôte les nutriments énergétiques nécessaires au fonctionnement des divers appareils.

Le schéma de dégradation est donné à la page suivante,

1.2, *Bactéries responsables de la cellulolyse*

On classe les bactéries suivant l'activité qu'elles exercent au niveau du rumen (HUNGATE, 1966). On distingue ainsi, les bactéries amilolytiques, les protéolytiques, les lipolytiques, les cellulolytiques, etc... Pour l'énumération, on utilise généralement trois méthodes .

- . le comptage direct
- . la densité optique
- . la méthode des cultures

Les bactéries cellulolytiques sont largement représentées et les espèces le plus souvent rencontrées sont : *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flave-faciens* et *Butyrivibrio fibrisolvens* (BRYANT, 1959, 1965, 1973 ; HUNGATE, 1950, 1956 ; KISTNER, 1965 ; cités par PRINS, 1975).

1.3. CELLULASE

KITTS et UNDERKOFFEK (1954, cités par STANLEY, 1959) ont étudié l'activité cellulolytique du jus de rumen. La même année CONCHIE (cité par

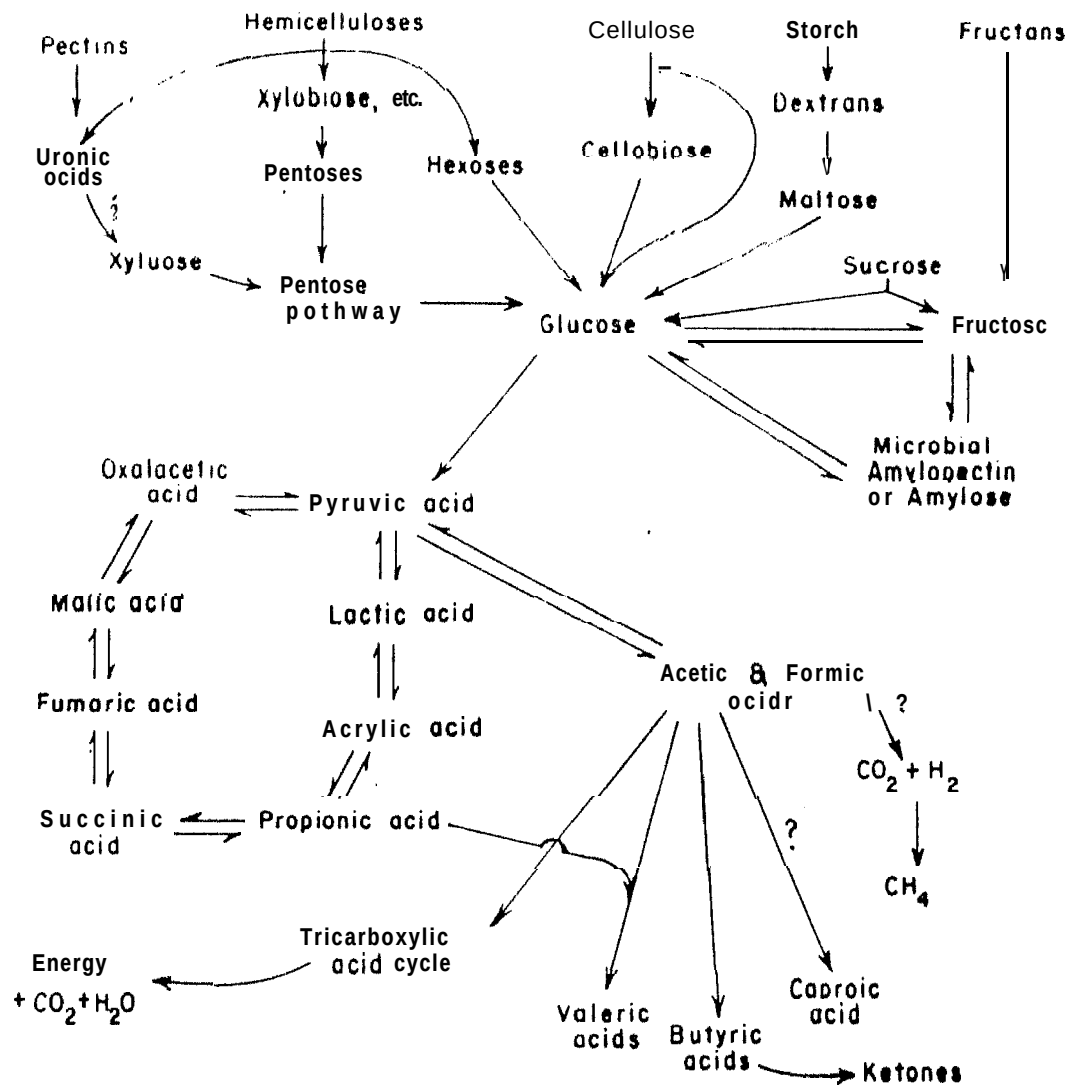


Figure 12-1. Commonly accepted metabolic pathways of carbohydrate metabolism in the rumen.

STANLEY, 1959) a retrouvé une activité β -glucosidasique sur une préparation de microorganismes de rumen de mouton.

Par la suite, de nombreux travaux ont permis de préciser l'activité cellulolytique des microbes du rumen. On a ainsi isolé et localisé l'enzyme responsable de cette hydrolyse de la cellulose.

La centrifugation à grande vitesse a permis de préciser que les bactéries et protozoaires sont bien responsables de la cellulolyse (STANLEY, 1959 ; PRINS, 1975) d'une part, et que, d'autre part, l'enzyme est extracellulaire (KING, 1956 cité par HUNGATE, 1966).

LEATHERWOOD (1969, 1973 cités par PRINS, 1975) a étudié le mécanisme d'action de la cellulase et a émis l'hypothèse que l'enzyme est constituée de deux entités :

- un facteur C1 responsable de l'affinité pour la molécule de cellulose ;
- un facteur Cx, actif et assurant l'hydrolyse,

L'efficacité de l'enzyme dépend de la nature du substrat, c'est-à-dire de la longueur de la chaîne de cellulose, et de sa concentration dans le milieu (FESTENSTEIN, 1959).

Le pH d'activité optimum se situe vers 7 (STEWART C.S., 1977).

En ce qui concerne les minéraux, leur rôle a été peu étudié in vivo. KING (1959) pense que le fer et le cobalt activent la cellulase. In vitro, les oligo-éléments peuvent être soit inhibiteurs, soit activateurs. Pour l'influence particulière du zinc, nous y reviendrons.

2. Uréolyse

2.1. Mise en évidence

L'hydrolyse de l'urée dans le rumen n'est possible que grâce à l'existence d'une enzyme. PEARSON et SMITH (1943) par des expériences in vivo et in vitro ont montré la réalité de cette enzyme et émis l'hypothèse qu'elle est élaborée par les microorganismes.

GIBBONS et al (1957) ont pu, grâce à des centrifugations différentielles, isoler une importante fraction bactérienne responsable de cette hydrolyse de l'urée. Quelques années après, JONES et al (1964 a) par des techniques de sédimentation ou de centrifugation, ont montré que l'uréase est intracellulaire. BRENT (1967) a d'ailleurs émis la même hypothèse.

Il convient cependant d'être prudent car les espèces bactériennes possédant une uréase sont nombreuses et il n'est pas sûr que l'enzyme a la même localisation ou la même nature partout. D'ailleurs REITHEL (1971) signale que l'uréase de *Sarcina ureae* est une exoenzyme. Néanmoins, depuis les travaux

de MAHADEVAN (1976), la lumière commence à être faite. L'auteur a, en effet, extrait et purifié l'enzyme. Et il est intéressant de savoir qu'en dépit du grand nombre de bactéries capables de produire l'uréase, cette dernière a la même mobilité électrophorétique et le même poids moléculaire dans chacune de ces essais. Mais il n'est pas évident qu'il s'agit de la seule enzyme qui existe et qui soit capable d'hydrolyser l'urée,

2.2. *Nature des bactéries uréolytiques*

La plupart des auteurs qui se sont intéressés au rôle et à la nature des microorganismes capables de produire l'uréase sont d'accord pour dire qu'il s'agit de bactéries. Mais, comme le rappelle COOK (1976), il n'y a aucune preuve qui permette d'affirmer que ces bactéries sont nombreuses dans le rumen ou que l'une d'elles a la plus forte activité. L'activité du rumen serait la somme de petites activités de nombreuses espèces bactériennes. Certaines de ces bactéries ont été isolées et leurs caractères étudiés.

Ainsi, GIBBONS et al (1960) ont étudié une anaérobie stricte à partir du jus de rumen de bovin, et l'ont classée dans la famille des Lactobacillaceae et dans le genre Lactibacillus.

SLYTER (1968), à partir du jus de rumen de bovins nourris avec un régime synthétique, a isolé des streptocoques et des lactobacilles capables de produire l'uréase.

COOK (1976) a isolé sur différents milieux des bactéries possédant cette propriété et appartenant aux genres Lactobacillus casei Var. casei et Klebsiella aerogenes.

Chez les monogastriques, RAIBAUD et al (1962) ont retrouvé des uréases produites par les Lactobacilles, des Actinobacilles et Staphylocoques. Ils ont cependant remarqué que certaines espèces ne sont actives que lorsqu'elles se développent in vivo. Ils pensent que la propriété d'hydrolyser l'urée est plus un caractère de souche que de type.

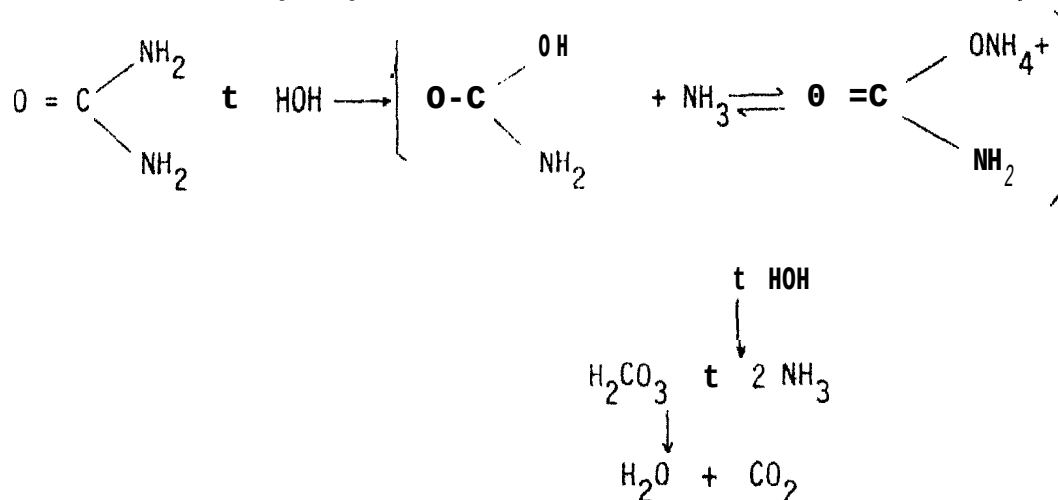
Il apparaît que les espèces le plus souvent rencontrées dans l'étude des bactéries uréolytiques sont : les lactobacilles, les streptocoques et les staphylocoques. Mais il est certain qu'il doit en exister d'autres.

2.3. *Activité de l'enzyme*

L'Union Internationale des Biochimistes recommande d'exprimer l'activité de l'uréase en millilitre de jus de rumen ou de milieu de culture (U.I.) capable d'hydrolyser 0,5 μ M d'urée et de libérer 1 μ M d' NH_3 en une minute à 38°C. Mais pour des études sur les ruminants, nous pensons qu'il est prudent de l'exprimer en grammes d'urée hydrolysés pour 100 ml de jus de rumen par heure., ceci présente l'avantage de tenir compte de l'activité

totale du rumen sans distinction dans la nature de l'enzyme ou des espèces microbiennes intervenant.

L'hydrolyse de l'urée se ferait en deux étapes (REITHEL, 1971) :



L'intermédiaire serait donc le carbamate sur lequel l'enzyme se fixe pour former le complexe carbamoyl : $\text{H}_2\text{N} - \text{C}(\text{O}) - \text{Enz}$.

L'enzyme posséderait trois sites : un groupe histidine, un groupe ammonium et un groupe sulfhydryl. Mais seuls les deux derniers seraient actifs et participeraient à la formation du complexe carbamoyl,

2.4, Facteurs d'activité de l'uréase

De nombreux travaux ont été effectués en vue de déterminer les facteurs pouvant influencer l'hydrolyse de l'urée, le but étant de trouver les moyens de retarder sa dégradation dans le rumen afin de permettre une meilleure utilisation de l' NH_3 produit d'une part et, d'autre part d'éviter les risques d'intoxication par une absorption trop importante de l' NH_3 . Parmi les facteurs pouvant agir sur l'uréase, on peut citer : les agents biologiques, physiques et chimiques.

a. les facteurs biologiques :

L'injection d'un extrait cristallisé d'uréase d'origine végétale peut induire la formation d'anticorps anti-uréases (HARBERS et al, 1965 ; GLIMP et TILLMAN, 1965, cités par JOURNET, 1975).

Ces anticorps sont retrouvés dans la salive et la bile (SIDHU et al., 1968).

Ces travaux méritent d'être entrepris avec des uréases bactériennes surtout maintenant que l'on sait qu'il n'y a pas de grandes différences physico-chimiques entre l'uréase bactérienne et le "Jack bean" (S. MAHADEVAN et al., 1976).

b. les facteurs **physiques** :

L'hydrolyse de l'urée par le contenu du rumen est favorisé par une température comprise entre 39°C et 41°C et des pH se situant entre 7 et 9 (PEAKSON et SMITH, 1943). Si pour la température le rumen satisfait à cette condition, pour le pH, le régime est primordial. Il est d'ailleurs important de ne pas atteindre un pH aussi élevé car les risques d'intoxication à l' NH_3 se trouveraient augmentés (BAKTLEY et al., 1976). Mais d'autre part, il n'est pas établi qu'un pH_{acide} soit compatible avec un métabolisme normal dans le rumen et on ne connaît pas exactement le rôle du pH sur l'uréolyse in vivo.

Enfin divers procédés technologiques ont été utilisés afin de retarder l'hydrolyse de l'urée (JOURNET, 1975).

c. les facteurs chimiques :

- les antibiotiques, sulfamides et autres produits :

in vitro : la hacitracine et le sulfate de néomycine ralentissent la dégradation de l'urée (LOPER, 1967).

De même la sulfaméthazine agit dans le même sens ; cependant, son action est moins sensible,

Ces effets ne sont pas retrouvés in vivo (LOPER, 1967 ; JOURNET, 1975).

D'autres produits comme les dérivés des quinones ou de l'acide barbiturique se sont révélés capables d'inhiber l'ukase (PEARSON et SMITH, 1943 ; HARBERS, 1962).

- l'acide acetohydroxamique (A.H.A.) et dérivés

in vitro : l'hydrolyse de l'urée est réduite de 50 p.100 en présence de 11 à 15 ug d'A.H.A. par ml de milieu (BRENT, 1971), alors que l'utilisation de la cellulose est stimulée (MOORE et al., 1968).

in vivo : l'A.H.A. et ses dérivés se sont révélés efficaces pour prévenir une intoxication à l' NH_3 (BAINTNER et al., 1964). En France, l'Alimentation Equilibrée de Commeny (A.E.C.) produit un dérivé de l'A.H.A., le HS 40 capable de réduire l'hydrolyse de l'urée dans l'intestin des monogastriques (MICHEL et JOURNET, cités par JOURNET, 1975).

- l'effet des minéraux sera étudié dans un autre chapitre, avec l'intervention du zinc.

3. Utilisation de l' NH_3 pour la protéosynthèse bactérienne

3.1. Généralités

L' NH_3 issue de la dégradation de l'urée peut avoir trois destinées : une partie est utilisée par les bactéries pour la synthèse de leurs constituants cellulaires, une autre peut traverser la paroi du rumen et pénétrer par la veine porte dans la circulation sanguine ; enfin la dernière peut

quitter le rumen par la voie digestive.

L' NH_3 , qui diffuse à travers le rumen arrive au foie où se produit un recyclage en urée dont une partie est éliminée par l'urine, alors que l'autre revient au rumen par la voie salivaire. HUNGAYE (1969) estime que cette voie apporte à l'animal 1,5 g d'N par jour.

La synthèse de protéines microbiennes se fait par des mécanismes d'amination et de transamination à partir de l'acide glutamique et des corps cétoniques issus du métabolisme glucidique. Ces réactions sont possibles grâce à la présence de glutamine-déshydrogénase et sont catalysées par le NAD ou le NADP.

L'efficacité de la protéosynthèse dépend de la présence dans le régime d'une source d'énergie rapidement assimilable par les bactéries et de minéraux qui ont un rôle métabolique important.

3.2. Rôle de l'énergie

La dégradation des glucides fournit l'énergie nécessaire à la synthèse de protéines microbiennes. On estime qu'un YATP égal 10,5 est une valeur courante (YATP = quantité de cellules produites en g par mole d'ATP, d'après BUTTERY, 1975).

Dans le rumen, les microorganismes produisent de grandes quantités d'AGV à courte chaîne, principalement, l'acide acétique (70 %), l'acide propionique (20 %) et l'acide butyrique (10 %) (ANNISON et ARMSTRONG, 1970).

Cette production d'AGV abaisse le pH du rumen et diminue les fuites d' NH_3 . Elle permet donc une meilleure synthèse protéique (COMBE et al., 1960). Cependant, si une petite quantité de glucide rapidement fermentescible est nécessaire, un taux élevé peut avoir un effet dépressif sur la digestion de la cellulose, bien qu'il accroisse l'utilisation de l'urée (ARIAS, 1951).

3.3. Rôle du soufre

L'action du soufre semble se traduire par une amélioration de la protéosynthèse. HUME et al (1970 c) ont montré qu'un régime contenant 0,61 g de S/jour permet la synthèse de 82 g de protéines microbiennes, Si on porte ce taux à 1,95 g, la production quotidienne de protéines atteint 24 g. Il est cependant un seuil qu'il ne faut pas franchir, car au-delà, la digestibilité de certains oligo-éléments est perturbée.

BRAY et HEMSLEY (1969) proposent un rapport N/S = 10 pour obtenir une bonne utilisation de l'NPN.

4. Rôle du zinc sur les divers métabolismes étudiés

4.1. Zinc et activité enzymatique

Les travaux de KEILIN et MANN (1939) soulignent l'importance du zinc comme cofacteur de l'anhydrase carbonique, enzyme essentielle dans le transport et l'élimination du CO_2 .

Le zinc est aussi un constituant de la carboxypeptidase pancréatique (VALLEE et NEVRATH, 1950). Une carence en zinc peut baisser l'activité de cette enzyme de 40 à 75 p.100 (MILLS et al, 1967 b).

La phosphatase alcaline fut aussi reconnue comme une zinc métal-enzyme (PLOCKE et al., 1962) chez *Escherichia coli*. Cette activité fut retrouvée chez le dindon (STARCHER et al, 1963, cités par SELZE, 1973.) et chez le veau carencé en zinc, on a noté une baisse de son efficacité (W.J. MILLER et al., 1965 b).

Le zinc peut aussi se lier au NAD pour former l'alcool-déshydrogénase (J.F. RIORDAN et al., 1971). Cette enzyme a été isolée chez l'Homme (von WARBURG et al., 1964) et chez le cheval (DRUM et al., 1967).

Outre l'anhydrase carbonique, la carboxypeptidase, la phosphatase alcaline et l'alcool déshydrogénase, plus de vingt zinc métal-enzymes ont été découvertes. La part que le zinc occupe dans ces différents systèmes lui fait jouer un rôle important dans l'organisme animal.

Chez les ruminants, il semble qu'il existe une action du zinc sur les cellulases et les uréases, mais les travaux effectués jusqu'à présent ne permettent pas de dire à quel niveau se situe cette intervention. Est-ce sur les enzymes ou sur les microorganismes qui les produisent ? Dans les chapitres qui suivent, nous traiterons le rôle du zinc,

4.2. Zinc et activité du rumen

4.2.1. effet sur la cellulolyse

L'effet du zinc sur la cellulolyse dépend des doses . présentes, Pour certains auteurs, cet élément est un stimulant, pour d'autres il serait inhibiteur. Quelques travaux sur le rôle du zinc sont résumés dans le tableau de la page 15 . Il apparaît qu'il y a une grande diversité dans les résultats, et MARTINEZ (1972) pense que les différences tiennent aux régimes d'une part et, d'autre part, aux interactions existant entre les oligoéléments.

4.2.2, effet sur l'uréolyse et la protéosynthèse

L'effet du zinc sur les uréases a été très peu étudié. Parmi les travaux connus, on peut citer ceux de SHAW (1954) qui a étudié le rôle des métaux sur l'activité des uréases d'origine végétale. Il a trouvé

Effets du zinc sur l'activité cellulolytique in vitro

(doses exprimées en mg/L de milieu d'incubation)

Auteurs	Nature de l'inoculum	Critères étudiés	Effet stimulant	Effet inhibiteur
LITTLE et al.(1958)	suspension lavée	Digestion de la cellulose	7,5	
HUBBERT et al. (1958)	"	"	pas d'effet observé	5
MARTINEZ et al. (1970)	"	"	5-7	20-30
SALA, cité par MARTINEZ (1970)	jus filtré dilué	"	pas d'effet observé	non déterminé
WOODS, cité par MARTINEZ (1970)	jus filtré	"	pas d'effet observé	50

que la plus part des cations peuvent modifier l'activité spécifique de l'enzyme.

Pour ce qui concerne les uréases bactériennes, les seuls travaux que nous avons recensés sont ceux de Mc. NAUGHT (1950) JONES (1965), COOK (1976), MAHADEVAN (1976). Leurs résultats sont résumés à la page suivante :

Pour JONES, l'effet stimulant ou inhibiteur, dépend de la vitesse avec laquelle l'élément traverse la paroi de la bactérie. Concernant le zinc cet auteur pense que des doses allant de 0,5 à 10 mg/L peuvent stimuler l'activité des uréases. COOK, lui a trouvé un effet favorable avec 3-4 mg/l. MAHADEVAN, par contre trouve un effet inhibiteur de 93 % avec 1,3 mg/100 ml et de 100 % avec 1,3 mg/100 ml.

Cette étude bibliographique nous aura permis d'aborder le zinc sous deux aspects : clinique et nutritionnel. Nous avons pu nous rendre compte de l'importance de cet élément chez les animaux en général et chez les ruminants en particulier. Les travaux menés en vue d'accroître les connaissances sur le zinc, permettent de prévenir et de guérir les troubles dues à une carence en cet élément, mais n'ont pas apporté toute la lumière sur ses rôles métaboliques. Il n'est que de voir le peu d'étude réalisé sur le rôle du zinc sur les uréases. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à cet élément et à son influence sur la digestion de la cellulose et l'utilisation de l'urée chez les ruminants.

Effet des minéraux sur l'utilisation de l'NPN

Minéraux	Auteurs	Critères étudiés	Nature de l'inoculum	Effet stimulant	Effet inhibiteur
Cu	McNAUGHT (1950)	protéosynthèse croissance bactérienne. dégradation des protéines	jus filtre <i>jus filtré centrifugé</i>		50 mg/l
	JONES (1965)	uréolyse	suspension lavée de jus de rumen	non déterminé	1000 mg/l
	COOK (1976)	uréolyse	culture de bactéries	pas d'effet significatif observé	à toutes concentrations
Co	McNAUGHT (1950)	protéosynthèse	jus filtré		10 mg/l
	JONES (1965)	uréolyse	suspension lavée	-doses non déterminées	5 mg/l
	COOK (1976)				
Mo Fe Zn	McNAUGHT	protéosynthèse	jus filtré		5 mg/l
	"	"	"		1000 mg/l
	JONES (1965)	uréolyse	suspension lavée	0,8 - 10 mg/l	
	MAHADEVAN (1976)	uréolyse	suspension lavée		0,13-1,3
	COOK (1976)	uréolyse	culture de bactéries	3-4 mg/l	
	ZHEREBSOV et NABIEV (1970)	protéosynthèse	<u>in vivo</u>	125 mg/l	500 mg/l

II - / TRAVAUX PERSONNELS

A./ OBJECTIFS

Notre travail fait suite à celui effectuée par A. KUMARESAN (1976) au laboratoire de Nutrition du C.N.K.Z. de JOUY-en-Josas.

Mr. KUMARESAN, dans le cadre d'une thèse a étudié les " Interactions " entre le zinc et les micro-organismes du Rumen chez le mouton recevant de l'urée comme source unique d'azote.

Pour effectuer son travail, il a eu à mettre au point un " régime purifié " sans protéine contenant de l'urée comme source d'azote.

Ceci lui a permis outre l'étude du métabolisme de ce régime de rechercher le taux de zinc permettant d'assurer une croissance optimum de la micropopulation du rumen pour l'utilisation de l'urée.

Cette méthode permet surtout de faire varier les doses de zinc afin de disposer de plusieurs milieux pour les incubations In Vitro et pour les études In Vivo ; et de mesurer la protéosynthèse microbienne sans interférence des protéines alimentaires,

Ainsi, A. KUMARESAN a pu montrer que le zinc est peu soluble dans le rumen, plus de 60 % du zinc total étant fixés à la fraction "résidus alimentaires + protozoaires" pour tous les régimes ; 16 % à 20 % sont liés aux bactéries tandis que 9 % à 17 % (pour les régimes riches) sont à l'état soluble.

D'autre part, la comparaison de deux régimes pauvres en zinc (10 p.p.m.) et riche (60 p.p.m.) a permis de voir qu'avec le régime pauvre s'il y a une inappétence, il n'y a pas réduction de l'intensité de la protéosynthèse bactérienne. Avec le régime riche (60 p.p.m.) une inhibition partielle des uréases microbiennes fut observée.

Si cet effet se vérifiait, il serait intéressant de pouvoir retarder l'uréolyse en élevant la teneur en zinc du régime. Cependant, le zinc pourrait avoir un effet inhibiteur sur l'activité cellulolytique.

Notre travail a donc pour but de vérifier l'effet du zinc sur l'activité uréasique du contenu du rumen d'une part et d'autre part de préciser l'influence du taux de zinc de l'aliment sur la protéosynthèse et l'activité cellulolytique des microbes du rumen.

B./ DISPOSITIF EXPERIMENTAL

1) Matériel Animal

Le travail est effectué sur cinq moutons de race Ile - de - France âgés de **plus de** deux ans, munis de canules de rumen depuis l'âge d'un an.

2) Régimes expérimentaux

Nous avons utilisé l'aliment purifié mis au point par KUMARESAN et avons constitué à partir de cet aliment de base trois régimes :

- 10 ppm de zinc
- 100 ppm de zinc
- 200 ppm de zinc

L'aliment est ainsi constitué :

- Amidon de maïs 37,9 %
- Cellulose colmacel 26,0 %
- Cérélose 23,9 %
- Urée (46 % N) 4,0 %
- Complément minéral 5,0 %
- Chlorure de choline 0,1 %
- Polyéthylène-glycol (PEG) 1,0 %
- Huile de maïs 3,0 %
- Vitamine A (50.000 U.I/g) 8,0 g % kg
- Vitamine D₃ (100.000 U.I/g) 1,0 g % kg
- Vitamine B₁ ; 0,4 g % kg

Les animaux reçoivent 800 g d'aliment par jour en deux repas (8h et 16heurs).

3) Plan des essais

3.1) Cellulolyse

Inoculum	10	100
Taux de zinc de substrat	10	10
	60	60
	100	100
	200	200
	400	400
	1000	1000

3.2) Protéosynthèse microbienne

	I	II	III
Inoculum adapté à (en ppm de zinc)	10	100	200
Taux de zinc du substrat	10 60 100 200	100 200 400 1000	200 400 1000

C. / Modalités Expérimentales

1) Teneur en zinc des contenus du rumen

1.1) Mode de prélèvement

Les animaux sont prélevés au temps 0 avant le repas du matin.

Les prélèvements sont faits par la canule à l'aide de tuyau plastique branché sur une pompe aspirante dirigé manuellement dans tous les compartiments du rumen afin d'obtenir un échantillonnage à peu près homogène.

1.2) Fractionnement

Le but de l'opération est d'obtenir des échantillons du Jus Total d'une part et d'autre part du surnageant de jus filtré centrifugé contenant le zinc soluble.

Une partie du Jus Total bien agitée (25 g exactement pesés) est séchée sur bain de sable dans une capsule de silice tarée puis mise au four à 550°C afin d'effectuer un dosage du zinc dans le jus total.

250 g environ du jus total sont pressés à travers six épaisseurs de gaze pour obtenir le jus filtre débarrassé des particules alimentaires.

Une partie de ce jus filtré est centrifugé. Le zinc est dosé sur le surnageant obtenu,

PHOTO 1

ALIMENTS DISTRIBUES

FIBRES PLASTIQUES

GRANULES D'ALIMENT
PURIFIE

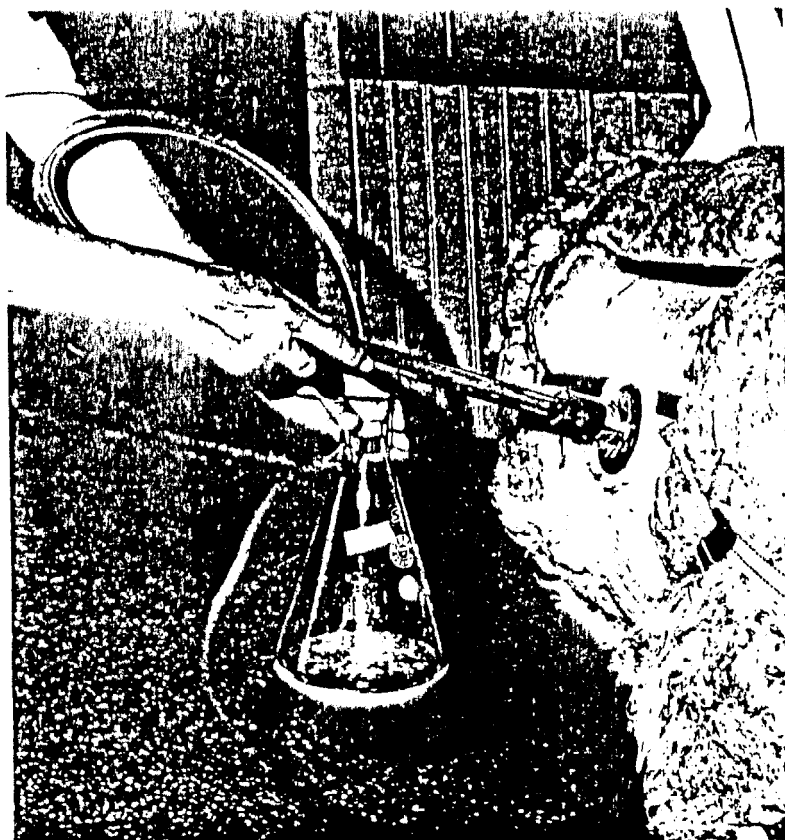
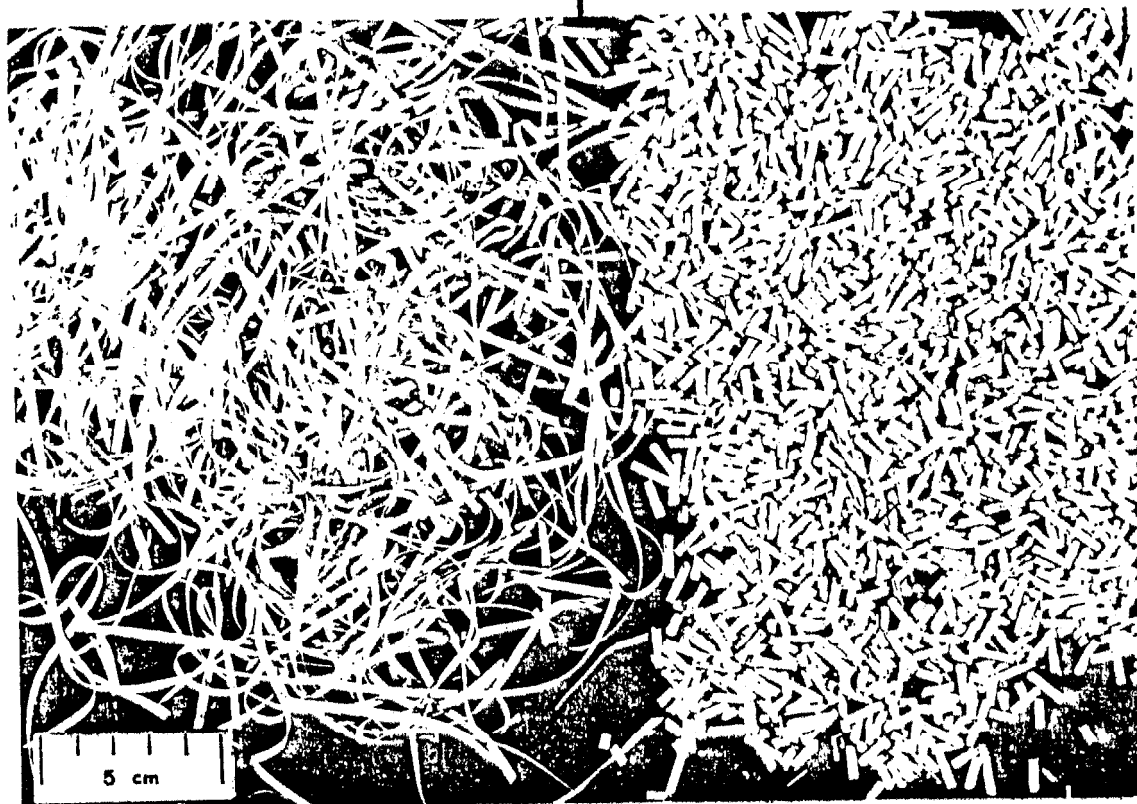


PHOTO 2

POMPAGE DE CONTENU TOTAL

Tableau 4 . Récapitulation des essais effectués.

REGIME Maïs • Manioc • Urée (M)	REGIME P U R 1 F 1 E (P)			
	Taux de Zn de Régime (ppm)			
	115	35	10	60
Etude in vitm de la composition minérale du milieu de dilution	Etude in vitm de la composition minérale du milieu de dilution			
		Influence in vitro de l'addition de Zn sur l'utilisation de l'urée		
			Métabolisme au niveau du rumen in vitro in vivo	Métabolisme au niveau du rumen in vitro in vivo
	Répartition du zinc dans les différentes fractions du contenu de rumen	Répartition du zinc dans les différentes fractions du contenu de rumen	Répartition du zinc dans les différentes fractions du contenu de rumen	Répartition du zinc dans les différentes fractions du contenu de rumen
			Digestibilité	Digestibilité
			Teneur en zinc du plasma	Teneur en zinc du plasma

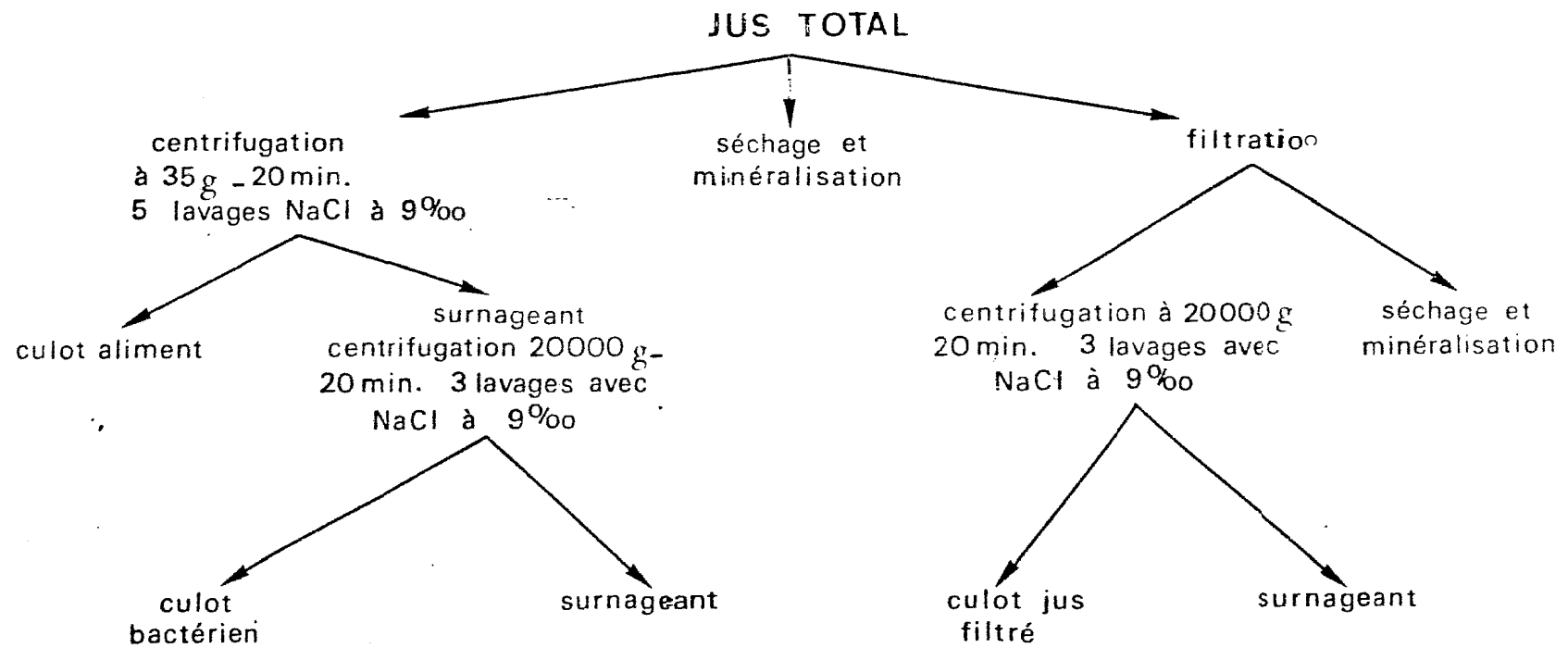


Figure 1 SCHEMA DU FRACTIONNEMENT DU CONTENU DE RUMEN

2) Incubation in vitro : Etude de l'influence du zinc sur le métabolisme des micro-organisme in vitro.

Cette technique cherche à reproduire in vitro les fermentations ayant lieu au niveau du rumen. Elle consiste à incuber un aliment en présence du contenu du rumen (inoculum) prélevé sur les moutons adaptés aux différents régimes,

L'expérimentation in vitro, est effectuée au moins deux fois avec chaque régime : deux journées non consécutives,

2.1) Méthode de prélèvement de l'inoculum

La technique est identique à celle du fractionnement. Afin d'avoir un jus de rumen représentatif, un échantillon moyen proportionnel est réalisé sur les moutons recevant le même régime, le facteur animal étant ainsi partiellement supprimé

Après le pompage, les inoculum transportés en bouteilles thermos à température voisine de celle du rumen, sont immédiatement utilisés.

2.2) Méthodes d'incubation

a) Etude de la cellulolyse en présence de jus total filtré

On incube 1g de substrat + 20 ml de salive artificielle et 20 ml de jus de rumen filtré sur gaze. Le tout est saturé de CO₂ et bouché. On laissera une ouverture pour la fuite des gaz. L'agitation est permanente et l'incubation dure 24h.

b) Etude de l'utilisation de l'urée en présence du contenu total du rumen

Le dispositif adopté est représenté sur la photo de la page suivante. Un erlenmeyer de 500 ml dont le bouchon étanche est muni de trois tubules :

- * L'une permet le passage bulle à bulle d'un courant CO₂ qui assure l'anaérobiose et un léger brassage du milieu.
 - * La deuxième fermée hermétiquement par une pince de MOHR sert au prélèvement de l'échantillon au fins d'analyse.
 - * Enfin un microréfrigérant à reflux sur la sortie de gaz permet d'éviter les pertes en substances volatiles.
- Les erlenmeyers sont alimentés individuellement en CO₂, ce qui évite un entraînement d'un flacon à l'autre par le courant de gaz,

Aux 10 grammes de substrat exactement pesés, introduits dans l'erlenmeyer, sont ajoutés 200 ml de salive artificielle dont la composition est donnée ci-après et 200 ml de jus de rumen total ou filtré sur gaze.

Les fioles une fois bouchées et agitées, sont immergées dans un bain-marie thermostatique à une température de 39°C (+ou- 5). Les branchements pour barbotage de CO₂ et circulation d'eau des microréfrigérants sont immédiatement effectués. Les essais in vitro sont faits en triple.

Les prélèvements pour analyses sont faits d'heure en heure jusqu'à 5 :

COMPOSITION CHIMIQUE DE LA SALIVE ARTIFICIELLE
(M. TAMPON : TISSERAND et ZELTER, 1965)

NaCl	0,470 g/litre
KCl	0,450 g/l
MgCl ₂ anhydre	0,047 g/l
CaCl ₂ anhydre	0,055 g/l
NaHCO ₃	9,240 g/l
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	7,125 g/l

c) Etude de l'utilisation de l'urée par les
bactéries du rumen isolées, broyées ou non

Le but est de vérifier que les uréases bactériennes sont endocellulaires et de voir si le zinc est oui ou non capable d'inhiber l'activité de l'enzyme.

c-1) Préparation du culot bactérien (intact ou broyé)

La méthode utilisée s'inspire de celle de BRENT et al. (1971).

Elle consiste à filtrer 200 g de jus de rumen que l'on centrifuge ensuite à 22.000 g pour obtenir un culot contenant les bactéries. La centrifugation se fait à 0°C et pendant 15 minutes. Le culot est remis en suspension dans 100 ml de salive artificielle. 35 ml de la suspension seront gardés sous froid (-4°C) en vue d'un broyage au "vibro-gen" sous courant froid,

La technique de broyage est celle des microbilles de verre, le temps de l'opération pouvant varier entre 5 mn et 10 mn.

Après le broyage, on filtre sur "Buchner" et on lave avec 35 ml de salive. Le filtrat obtenu constituera l'inoculum contenant l'uréase. Une partie du centrifugat remis en suspension

et constituera la fraction "Bactéries non broyées".

c-2) Incubation

On fait l'incubation dans des tubes à essais. La température sera de $39^{\circ}\text{C} \pm 5$. L'inoculum sera soit la suspension de bactéries broyées, soit celle des bactéries non broyées. On prend 10 ml; le substrat est constitué par une solution d'urée à 1 g par 50 ml, dont on prendra 0,5 ml.

Les prélèvements se font aux temps 1, 2 et 3 h. L'agitation est permanente et les échantillons sont recueillis dans des tubes contenant du chlorure mercurique et on opère le dosage de l'urée.

2-3) Les substrats et la composition du milieu

Nous avons utilisé comme substrat, les aliments synthétiques distribués journallement aux animaux, préalablement broyés, pour l'étude des activités uréolytiques et cellulolytiques du rumen.

Mais par la suite nous avons été amené à reconstituer les régimes à partir de leurs divers constituants, pour l'étude de la cellulolyse, et à incuber, en plus de la cellulose pure,

Pour l'activité des bactéries isolées, nous avons utilisé comme substrat, une solution d'urée à 1 g / 50 ml.

A partir des régimes à 10, 100 et 200 ppm de zinc, nous avons constitué différents milieux en apportant du zinc en surcharge, sous forme de sulfate. Nous avons ainsi eu des milieux d'incubation à : 10, 60, 100, 200, 400, et 1000 ppm de zinc,

2-4) Les critères retenus

a) Cellulolyse

Aux temps 0 et 24 heures, on dose la cellulose. La différence entre la quantité introduite et la quantité résiduelle représente la consommation de la cellulose,

b) Utilisation de l'urée par le contenu total du rumen.

Aux temps 0, 1, 2, 3 et 5 un prélèvement est effectué après agitation de la fiole et l'échantillon est pressé sur six épaisseurs de gaze au dessus d'un flacon contenant quelques gouttes de chlorure mercurique qui bloque les fermentations. Sur le filtrat obtenu, les dosages suivants sont faits :

- Mesure du pH immédiatement après le prélèvement.
- Dosage de l' N-NH_3
- Dosage de l'urée
- Détermination des acides gras volatils (AGV) dans certains cas.

On calcule la consommation de l' N-NH_3 et de l' N-urée par la microflore en faisant la différence entre l' N-NH_3 et l' N-urée introduits et l' N-NH_3 et l' N-urée résiduels aux différents temps.

c) Activité uréolytique du culot bactérien

Les prélèvements se font à 1, 2 et 3 heures.

On opère un dosage d'urée.

C./ METHODES ANALYTIQUES

1) pH : est mesuré sitôt le prélèvement à l'aide d'un pH-mètre à l'électrode combiné.

2) N-NH_3 :

L'ammoniac est dosé par la méthode de Berthelot adaptée à l'auto-analyseur qui permet des analyses en série avec un risque d'erreur inférieur à 5 %. Cette méthode est basée sur la réaction de l'ammoniac en milieu alcalin avec le phénol et l'hypochlorite de Na. Le produit formé a une coloration bleue dont le pouvoir d'absorption est maximum à 625 nm.

Le contenu du rumen est d'abord débarrassé des protéines par précipitation de celle-ci dans de l'acide trichloracétique (ATC) à 2,5 % puis centrifugé juste avant analyse.

La solution obtenue est introduite dans le circuit de l'appareil et portée jusqu'au bain-marie à 95°C où l'ammoniac réagit avec le phénol et l'hypochlorite introduits au même débit. La solution colorée est alors dirigée vers un colorimètre.

La gamme de dosage se situe entre 0,5 et 10 mg d' N-NH_3 / 100ml.

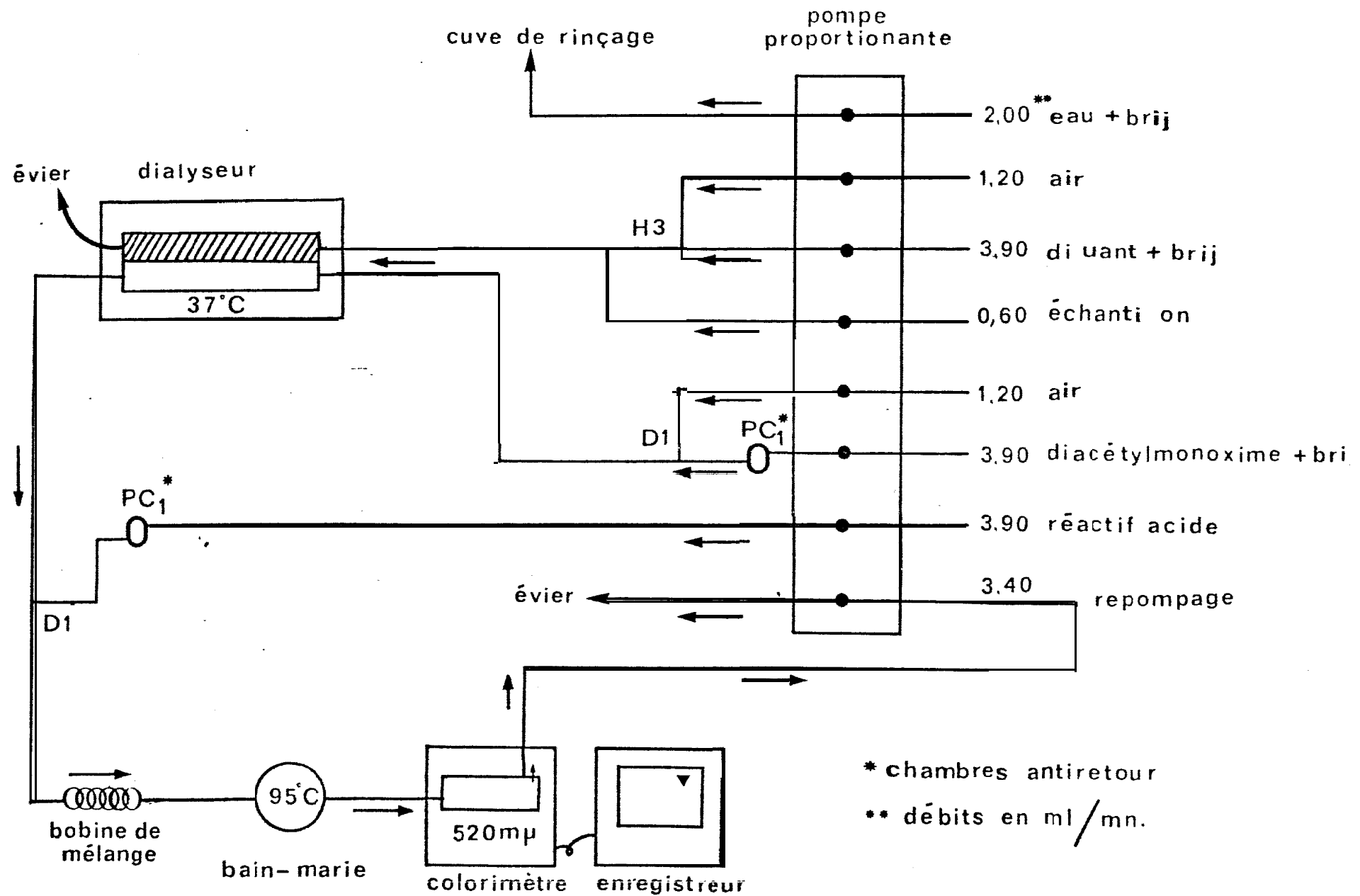
3) L'N-Urée

L'urée est dosée par la méthode technique légèrement modifiée et appliquée à l'auto-analyseur. Cette méthode est basée sur la réaction directe de l'urée avec le diacétylmonoxime, en présence de thiosemcarbazide et milieu acide.

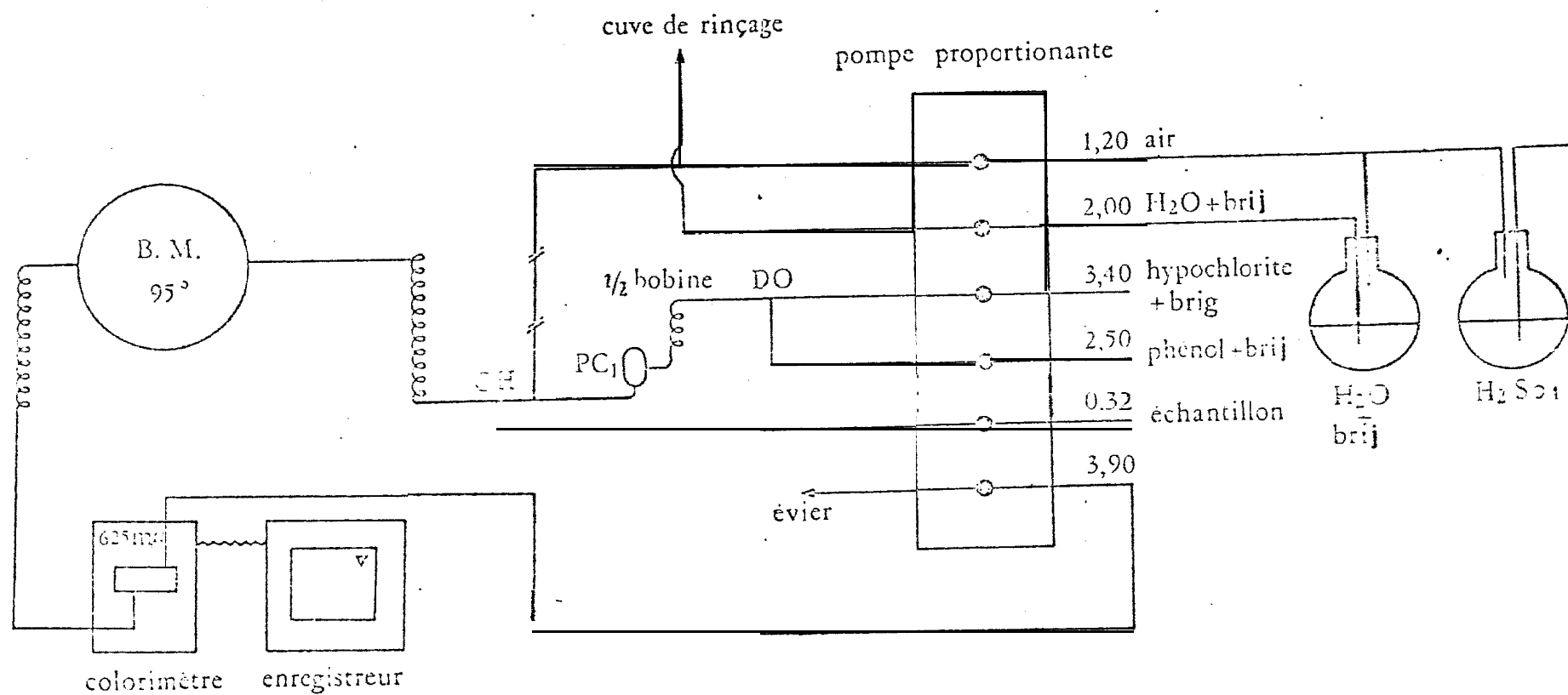
Le thiosemcarbazide permet d'intensifier la coloration rose dont le pic d'absorption se mesure à 520 nm.

Le liquide à analyser est introduit dans le circuit de l'auto-analyseur et subit une opération de dialyse contre la

SCHEMA DU DOSAGE DE L'URÉE A L'AUTOANALYSEUR



SCHEMA DU DOSAGE DE L'AMMONIAQUE A L'AUTOANALYSEUR



80

solution de diacétylmonoxine. Celle-ci après addition du réactif acide est dirigée sur le bain-marie à 95°C puis vers le colorimètre.

4) A.G.V.

La méthode utilisée est celle de la chromatographie en phase gazeuse. 2 ml de jus filtré additionnés d'un étalon **interne** : acide isobutyrique ou aldéhyde salicylique à raison de 1mg/ml, de solution sont acidifiés à pH=2 et centrifugés à 20.000 g pendant 20 minutes.

Une injection de 0,1 ml environ est faite sur colonne de verre VARIAN 1200 contenant 10 % S.P. 1200, 1 % d'acide phosphorique sur chromosorb 80 % W.A.W.

La température de la colonne est de 80°C, celle de l'injecteur 110°C, celle du détecteur 115°C.

Les calculs sont faits d'après le rapport de la surface des pics de chaque acide sur la surface du pic de l'étalon interne puis par référence à la courbe d'étalonnage faite à partir des solutions standards contenant des quantités croissantes de chaque acide et une quantité fixe de 1 mg/ ml d'étalon interne

5) ZINC

Un échantillon représentatif du produit à analyser (exactement pesé) reste après séchage à l'étuve à 103°C, minéralisé au four à 550°C, puis pesé pour obtenir le poids des matières minérales de l'échantillon. La silice contenue dans le résidu d'incinération est insolubilisée par l'acide chlorydrique à sec sur tain de sable, puis repris à l'acide nitrique à 10 % pour solubilisation des minéraux. Le dosage du zinc est effectué sur la solution obtenue après filtration, par spectrophotométrie d'absorption atomique à l'aide d'un spectrophotomètre IL 151 dans une flamme air-acétylène.

Le principe de la méthode est le suivant : La solution est pulvérisée dans la flamme, créant ainsi un nuage d'atomes. La flamme est traversée par un faisceau d'un rayonnement émis par une lampe à cathode creuse et ayant le spectre du zinc. Les atomes de zinc ont la propriété d'absorber certaines radiations du spectre du zinc et notamment la raie dite de résonance. L'absorption de cette raie sera proportionnelle à la concentration en atomes de zinc de la flamme, et donc de la teneur en zinc de la solution pulvérisée à débit constant.

La loi de Beer-Lambert s'applique à cette absorption comme en spectrophotométrie moléculaire.

Les lectures effectuées sur galvanomètre sont comparées à celle obtenues à l'aide de solutions étalons contenant de 0,5 à 1 ppm de zinc.

6) Cellulose

a) La méthode de dosage est celle de Van SOEST (ADF) .

Le principe consiste à purifier le proàuit à analyser avec un détergent, il reste alors :

Lignine + Cellulose + Matières Minérales.

On dissout alors la cellulose par l' H_2SO_4 et on filtre. On détermine alors le poids de la Lignine + Matières minérales et par différence, on obtient la cellulose,

b) Les réactifs

- Le détergent est un mélange de : Céthyl-triméthyl ammonium bromide (CTAB) et d'acide sulfurique (H_2SO_4 , 1N) soit, 200 g de CTAB pour un litre de H_2SO_4 , 1N .
- Acétone R.P. incolore et ne laissant pas de résidus à l'évaporation.

c) Mode Opératoire .

Il s'agit d'abord de purifier l'échantillon à analyser afin d'obtenir l'ADF = Lignine + Cellulose + Matières minérales + un peu d'N et éventuellement de l'amiante.

Le produit de l'incubation est donc centrifugé à 500 g pendant 10 à 15 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot repris avec 100 ml de CTAB + H_2SO_4 . La suspension est portée à l'ébullition une heure à partir du début.

On filtre ensuite sur creuset de verre fritté, avec un faible vide, en prenant soin de casser les fibres sur le creuset avec un agitateur en verre. On lave avec de l'eau à 90°C et on rince à l'acétone jusqu'à ce que le filtrat ne soit plus coloré,

On sèche à l'étude à 100°C huit heures ou la nuit. On pèse ainsi la lignine + Matières minérales, par différence on obtient la cellulose résiduelle.

Effet du zinc par la cellulolyse

Nature de l'aliment	Teneur en zinc du jus	Teneur en zinc du milieu	Cellulose dégradé en % de l'incubé	Observations
Aliment entier	10 ppm	10	39,8 $\pm$ 2,2	(a)
		60	39,2 $\pm$ 1,9	(a)
		100	38,8 $\pm$ 0,3	(a)
		200	38,6 $\pm$ 1,9	(a)
		400	35,9 $\pm$ 3,2	(b) = (a) = $P^* < 0,05$
	100 ppm	60	40,7 $\pm$ 3,0	(a)
		100	40,5 $\pm$ 2,1	(a)
		200	38,0 $\pm$ 2,8	(a)
		400	33,7 $\pm$ 3,3	(b) $\neq$ (a) = $P^* < 0,05$
		1000	34,2 $\pm$ 1,1	(b) $\neq$ (a)
Aliment reconstitué	100 ppm	10	22,0 $\pm$ 0,3	(a)
		60	23,7 $\pm$ 2,8	(a)
		100	20,7 $\pm$ 1,1	(a)
		200	20,6 $\pm$ 0,9	(a)
		400	21,0 $\pm$ 1,0	(a)
		1000	17,3 $\pm$ 0,7	(b) $\neq$ (a) = $P^{**} < 0,01$
Cellulose pure	100 ppm	10	75,7 $\pm$ 0,9	(a)
		60	74,8 $\pm$ 0,9	(a)
		100	74,9 $\pm$ 1,0	(a)
		200	71,9 $\pm$ 2,0	(a)
		400	71,7 $\pm$ 1,3	(b) $\neq$ (a) = $P^* < 0,05$
		1000	62,0 $\pm$ 3,0	(c) $\neq$ (a) = $P^{**} < 0,01$

NS = non significatif
S = significatif
HS = hautement significatif

a $\neq$ b $\neq$ c

(b $\neq$ c) $P^* < 0,05$

1. RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Influence de la teneur en zinc précoce sur sa répartition dans le contenu du rumen.

Nous avons effectué des fractionnements avec les régimes 10 et 100 ppm et avons observé la répartition suivante :

		Aliment 10 ppm	Aliment 100 ppm
Jus total	mg/kg de contenu frais	3	13,8
Surnageant	mg/kg de contenu frais	0,57	1,28
Jus total	% Zn contenu frais	19	9,3

Au pH du rumen, il semble que le zinc est peu soluble dans le milieu, La plus grande partie reste liée aux aliments ou est précipitée.

Nos résultats diffèrent de ceux rencontrés dans la bibliographie.

MARTINEZ (1972) trouve 0,16 mg/litre et ZHEREBTSON et al (1970) 0,10 mg/litre ces auteurs ayant travaillé sur des bovins. KUMARESAN, sur du jus de mouton, trouve quant à lui 2,4 à 4,6 contre 0,57 et 1,28 dans notre cas. On remarquera que toutes ces valeurs sont comprises entre 5 et 20 p.100 du zinc du Jus total:

- 10 p.100 pour KUMARESAN
- 5,9 p.100 et 4,9 p.100 pour BRENNER avec des régimes pauvres ou riches. Les différences semblent tenir aux origines des jus (bovins pour BRENNER et aux teneurs en matières sèches de ces jus, Quoi qu'il en soit, il n'y a que peu de zinc disponible pour l'animal hôte. Le zinc est en grande partie complexe sous forme de sulfure ou lié aux aliments, ou encore fixé par les microorganismes.

2. Influence du zinc sur le métabolisme des microorganismes "in vitro"

2.1. Effet du zinc sur la cellulolyse : incubation de longue durée

L'étude de la digestion de la cellulose, par la microflore, révèle que, la cellulose pure est mieux digérée que lorsqu'elle est incorporée dans l'aliment ou amenée en mélange avec les autres éléments. La dégradation de la cellulose pure est supérieure à 50 p.100 quelle que soit la teneur du milieu en zinc. Elle n'est que de 30 à 49 p.100 dans l'aliment entier et n'est plus que de 17 à 23 p.100 dans l'aliment reconstitué.

Cette étude a permis d'observer une inhibition partielle de la cellulolyse par l'incorporation de zinc dans le milieu d'incubation (voir tableau 8.33.)

A partir de 400 ppm, soit 0,9 mg p.100 ml, l'inhibition est partout observée

Effet du zinc par la cellulolyse

Nature de l'aliment	Teneur en zinc du jus	Teneur en zinc du milieu	Cellulose dégradée en % de l'incubé	Observations
Aliment entier	10 ppm	10	39,8 ± 2,2	(a)
		60	39,2 ± 1,9	(a)
		100	38,8 ± 0,3	(a)
		200	38,6 ± 1,9	(a)
		400	35,9 ± 3,2	(b) ≠ (a) = P* < 0,05
	100 ppm	10	40,7 ± 3,0	(a)
		60	40,5 ± 2,1	(a)
		200	38,0 ± 2,8	(a)
		400	33,7 ± 3,3	(b) ≠ (a) = P* < 0,05
		1000	34,2 ± 1,1	(b) ≠ (a)
Aliment reconstitué	100 ppm	10	22,0 ± 0,3	(a)
		60	23,7 ± 2,8	(a)
		100	20,7 ± 1,1	(a)
		200	20,6 ± 0,9	(a)
		400	21,0 ± 1,0	(a)
		1000	17,3 ± 0,7	(b) ≠ (a) = P** < 0,01
Cellulose pure	100 ppm	10	75,7 ± 0,9	(a)
		60	74,8 ± 0,9	(a)
		100	74,9 ± 1,0	(a)
		200	71,9 ± 2,0	(a)
		400	71,7 ± 1,3	(b) ≠ (a) = P* < 0,05
		1000	62,0 ± 3,0	(c) ≠ (a) = P** < 0,01

NS = non significatif
 S = significatif
 HS = hautement significatif

a ≠ b ≠ c

(b ≠ c) P* < 0,05

et devient hautement significative ($P < 0,01$) à 1000 ppm soit 2,4 mg p.100 quand on incube de la cellulose pure.

Nos résultats ne diffèrent pas de ceux rencontrés dans la littérature, En effet, HUBBERT et al (1958) trouvent que 0,5 mg de Zn p.100 ml inhibe la cellulolyse ; MARTINEZ trouve une inhibition avec 2 à 3 mg p.100 ml, tandis que WOODS, cité par MARTINEZ (1970) freine la dégradation avec une dose de 5 mg p.100 ml.

Les différences tiennent à la nature des inoculum : suspension lavée pour HUBBERT et MARTINEZ ; jus filtré pour WOODS et nous.

2.2. INCUBATION DE COURTE DUREE

2.2.1. Evolution du pH

Nous avons étudié le pH avec les régimes 10, 100 et 200 ppm. En apportant du zinc, nous avons constitué plusieurs milieux :

- 10 ppm : aliment sans surcharge

60 ppm : soit 0,1387 mg/100 ml

100 ppm : soit 0,2523 mg/100 ml

200 ppm : soit 0,4797 mg/100 ml

200 ppm

sous forme d'acétate : soit 0,497 mg/100 ml

400 ppm : soit 0,99 mg/100 ml

1000 ppm : soit 2,46 mg/100 ml

Au cours des essais I, II et III, nous n'avons pas observé un effet de la dose sur l'évolution du pH, alors que KUMARESAN remarquait qu'avec un régime pauvre le pH s'abaissait moins rapidement. Cependant entre deux essais, il y a une évolution due certainement à une modification de la population du rumen, les animaux étant adaptés à des régimes variables. En particulier, entre les essais I et III, le pH qui atteint en moyenne 5,8 à 5 heures dans I est de 5,5 à 3 heures dans III.

2.2.2. Influence, du zinc par l'uréolyse et la protéosynthèse bactérienne

Les différentes doses du zinc n'ont eu un effet ni sur l'hydrolyse de l'urée, ni sur la protéosynthèse bactérienne. Nous avons cependant observé un effet période au cours des trois essais réalisés. L'activité du jus de rumen est croissante quand on passe du régime 10 à 100 et 200 ppm. A 100 et 200 ppm, il n'y a pratiquement plus d'urée à 2 heures.

D'autre part, avec le régime 200, la conformation d' NH_3 est supérieure à 3 heures quelle que soit la surcharge en zinc. L'activité du rumen semble varier en fonction du temps, ceci étant sans doute lié à la variation de la micropopulation ; variation due à l'adaptation des animaux à des régimes différents.

Les expériences ont montré que le zinc même à dose élevée n'a pas altéré la capacité de protéosynthèse des microbes du rumen. Nos essais n'ont pas permis

de retrouver les résultats de KUMARESAN. Pourtant récemment MAHADEVAN et al (1976) ont montré un effet du zinc sur les uréases bactériennes du rumen. Nous avons alors pensé que l'absence d'effet du zinc dans nos essais pouvait être dû à la nature endocellulaire de l'uréase et à l'absence de pénétration du zinc à l'intérieur de la bactérie. Nous avons alors repris les essais en les réalisant avec des bactéries isolées intactes ou broyées.

2.2.3. Influence du zinc sur les uréases bactériennes

a) effet du broyage des bactéries

Nous avons observé que le broyage des bactéries leur fait perdre jusqu'à 50 p.100 de leur activité. MAHADEVAN (1976) et BRENT (1971) ont remarqué qu'une brève exposition de l'enzyme même à 4°C, lui fait perdre toute activité.

Aussi MAHADEVAN a utilisé un protecteur de l'enzyme le Dithiothréitol (DTT) et a pu conserver l'activité de l'enzyme 6 à 8 semaines à -20°C. Il semble que le DTT fixe les liaisons SH. Au moment de l'utilisation, on libère l'uréase par une dialyse.

Dans nos essais, la seule précaution consiste à travailler sous froid (fractionnement, broyage) jusqu'au moment de l'incubation.

D'autre part, nous avons aussi observé un effet du temps de broyage. Quand on opère pendant 5 minutes, on conserve 49 p.100 de l'activité de l'uréase, cependant qu'un broyage de 10 minutes ne garde plus que 38 p. 100 de cette activité.

b) effet du zinc sur les uréases

Sur les bactéries non broyées, on a observé un effet inhibiteur de 46 p.100 à 1 heure, mais 10 p. 100 seulement à 2 et 3 heures. Cependant, cette inhibition par une même dose (18,4 mg p.100 ml) n'est pas toujours retrouvée avec du jus de rumen des mêmes moutons. Ceci nous laisse croire qu'entre deux expériences, la population du rumen a pu varier.

Sur les bactéries broyées pendant 5 à 10 mn, l'inhibition des uréases par le zinc est observée. Avec la même dose que précédemment (18,4 mg/100 ml), on observe une inhibition de 62 p.100 à 1 heure et 70 p.100 à 3 heures pour un broyage de 5 minutes contre 64 et 63 p. 100 pour un broyage de 10 minutes.

Nos résultats ne diffèrent pas beaucoup de MAHADEVAN (1976) qui avec 1,3 mg p.100 ml obtient une inhibition de 93 p.100 et de 100 p.100 avec 13,07 mg p.100 ml.

Les différences observées entre bactéries broyées ou non s'expliquent si on admet comme JONES (1964) que les uréases sont endocellulaires et qu'il faut un temps de latence pour que l'inhibiteur, quel qu'il soit, puisse pénétrer dans la cellule. Le broyage permet par contre une libération de l'enzyme et une action directe du zinc.

**Evolution du pH en fonction de la concentration
en zinc**

ESSAI 1

Doses	0	1	2	3	5
10	7,00	6,66	6,43	6,19	5,83
60		6,66	6,44	6,19	5,83
100		6,66	6,45	6,18	5,80
200		6,66	6,43	6,19	5,80
200 (acétate)		6,66	6,48	6,22	5,86

ESSAI II

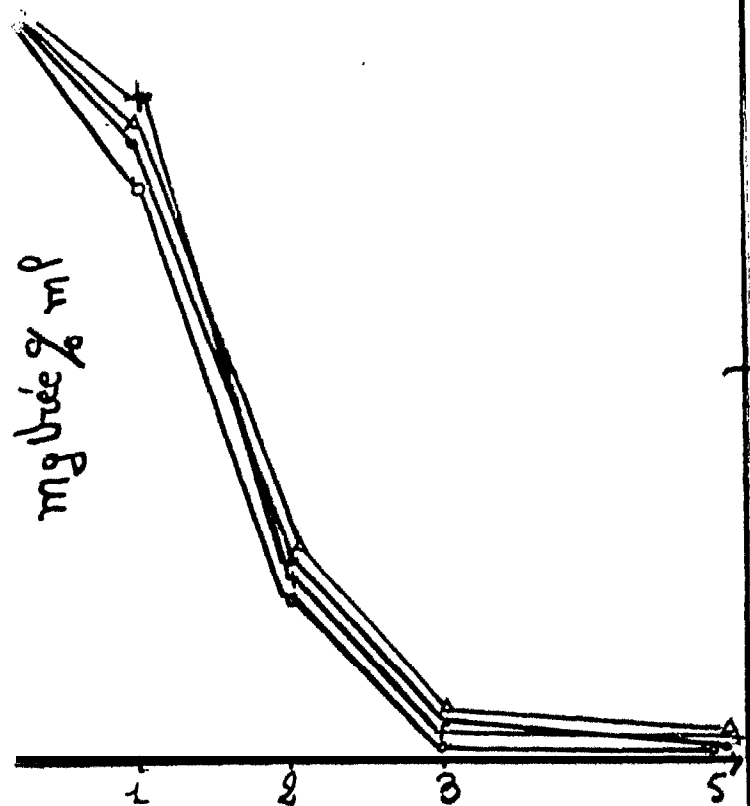
100	6,70	6,58	6,51	6,15	5,70
200		6,53	6,48	6,16	5,70
400		6,53	6,50	6,15	5,73
1000		6,55	6,52	6,18	5,73
1000 (soufre)		6,55	6,51	6,20	5,75

ESSAI III

100	6,92	6,60	6,15	5,52	5,46
200		6,61	6,13	5,54	5,43
400		6,61	6,16	5,55	5,45
1000		6,58	6,13	5,55	5,45

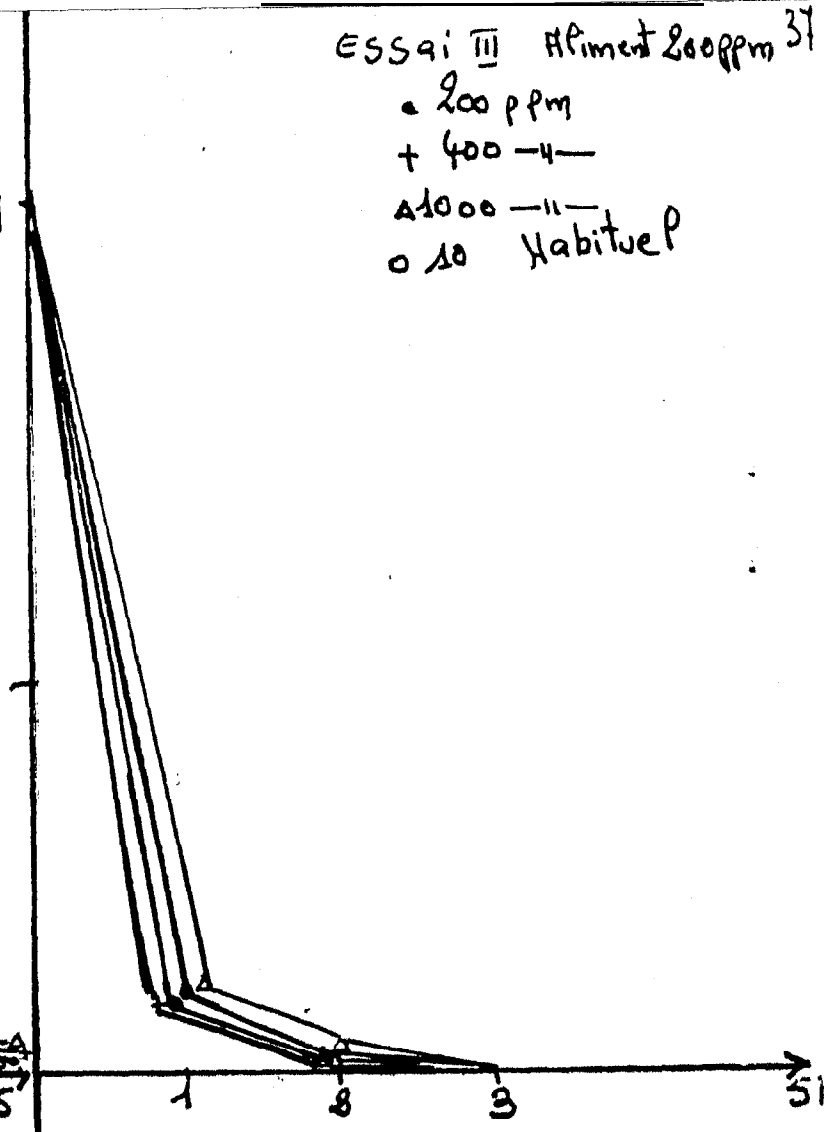
Essai I HPiment 10ppm

• 10 ppm
+ 40 - " -
Δ 100 - " -
○ 200 - " -



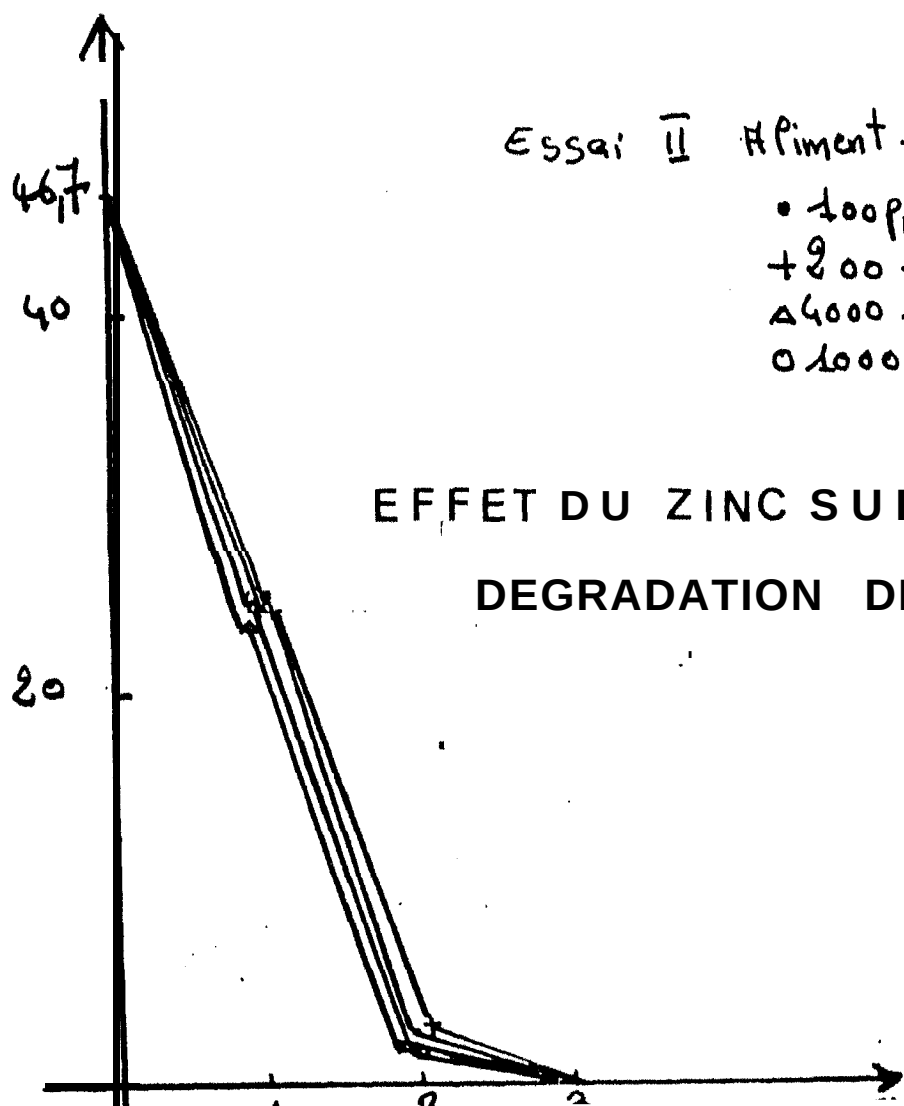
Essai III HPiment 200ppm 37

• 200 ppm
+ 400 - " -
Δ 1000 - " -
○ 10 Habitue P

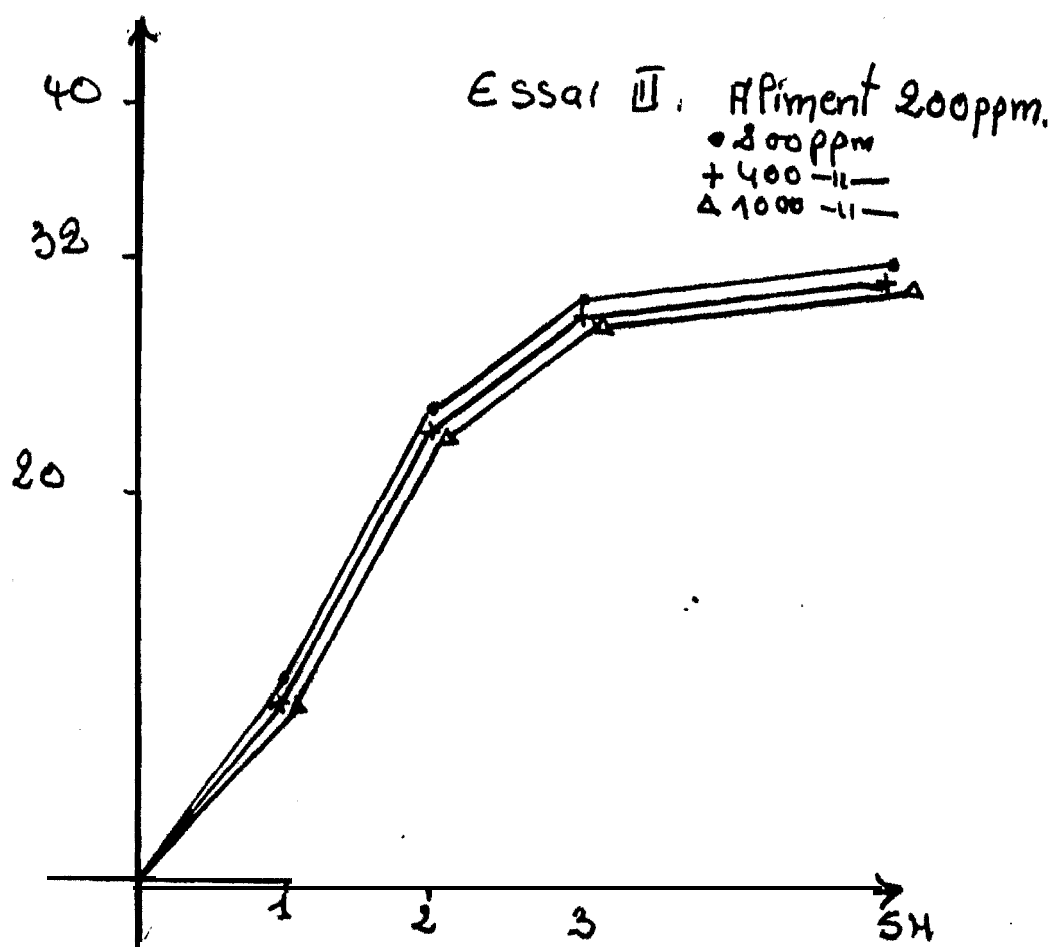
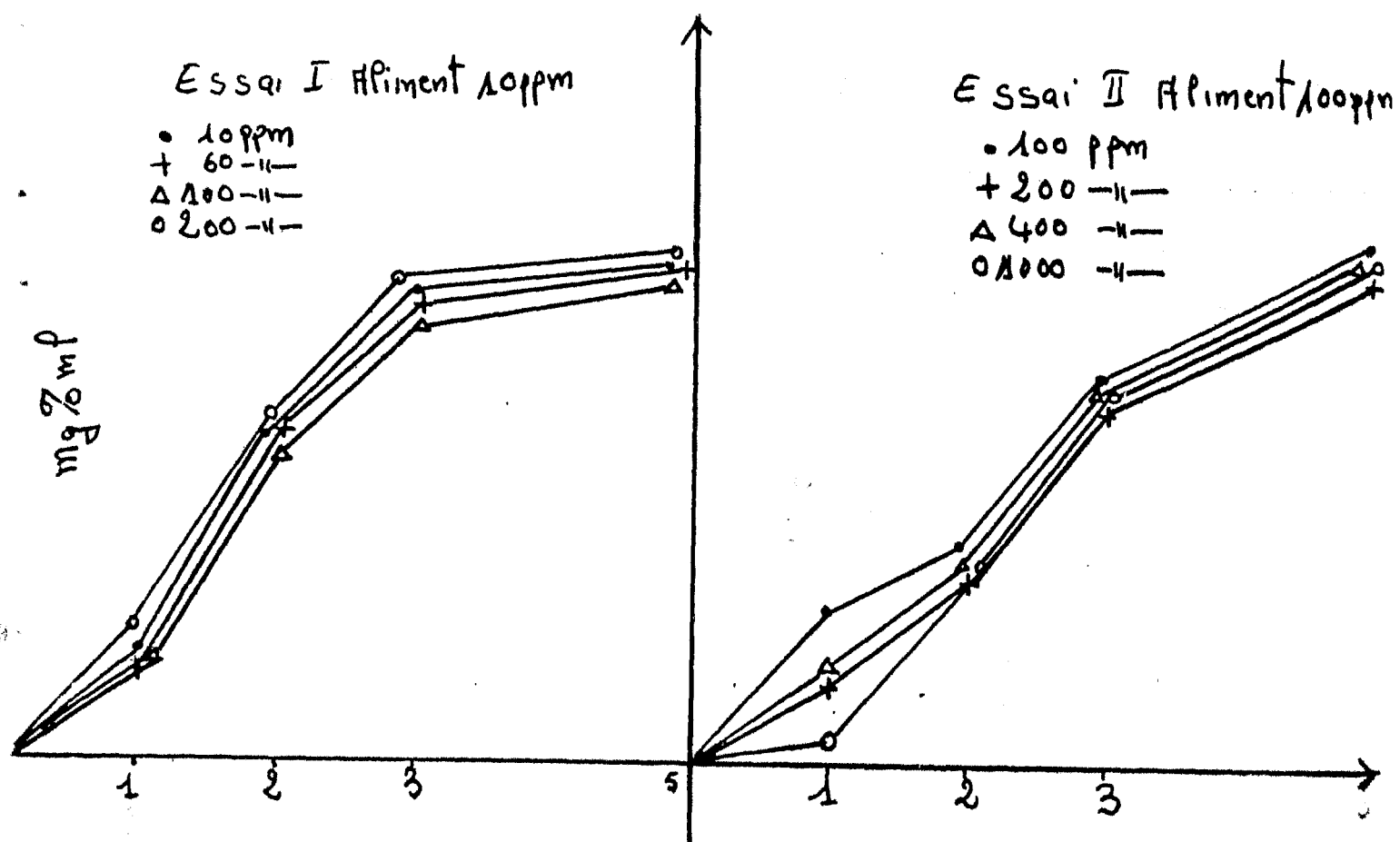


Essai II HPiment 100ppm

• 100 ppm
+ 200 - " -
Δ 4000 - " -
○ 1000 - " -



EFFET DU ZINC SUR LA
DEGRADATION DE L'UREE

Utilisation de $P'NH_3$ 

Effet du zinc sur l'uréase : cellules broyées ou non:
inhibition en % témoin sans zinc

heure	Cellules intactes	Cellules broyées	
		5 mn	10 mn
1		62	64
2	6	57	62
3	5	70	63

Heure	Cellules intactes	Cellules broyées	
		5 mn	10 mn
1		62	64
2	6	57	62
3	5	70	63

Effet du zinc sur l'uréase : cellules broyées ou non:
inhibition en % témoin sans zinc

E. CONCLUSION

Nous avons effectué ce travail en utilisant uniquement la méthode d'incubation in vitro et l'étude de l'évolution de divers paramètres : pH, N-NH₃, N-urée, cellulose. L'intérêt de cette méthode est de pouvoir effectuer des bilans plus exacts, des fermentations puisque les facteurs "absorption" et "transit" sont supprimés. Il serait intéressant de faire une étude cinétique des mêmes paramètres in vivo, mais le temps qui nous était imparti ne l'a pas permis. Néanmoins, nous avons essayé de nous rapprocher des conditions in vivo en utilisant du contenu total de rumen comme inoculum pour l'étude de l'utilisation de l'urée et du jus filtré pour la cellulolyse. Le substrat est constitué par l'aliment distribué aux animaux. Pour nos doses de zinc, nous sommes restés dans les limites d'une carence et d'un excès. Ainsi, il nous a été possible de voir que le zinc joue un rôle certain dans la cellulolyse. Pour les essais de retarder l'uréolyse, le zinc ne semble pas intéressant car nous n'avons obtenu une inhibition qu'en travaillant sur les extraits de bactéries broyées. Ainsi avec 18,4 mg de zinc p.100 ml de notre milieu, l'activité de l'uréase libre est inhibée de 70 p.100, tandis que la cellulolyse est inhibée elle de 28 p.100.

Le travail effectué mériterait d'être poursuivi in vitro et in vivo en faisant varier les doses de zinc d'une part et d'autre part en utilisant des sources d'énergie différentes. .

BIBLIOGRAPHIE

- ANNISON E.F., ARMSTRONG (1970)
In : Physiology of digestion and metabolism in the ruminant,
Ed. A.T. Phillipson, Griel Press.
- ARIAS C., BURROUGHS W., GERLAUGH P., BETHKE R.M. (1951)
Influence of different amounts and sources of energy upon in vitro utilization.
J. Anim. Sc., 10, 683-692.
- BAINTER K., KURELE C.V., KOLSABAI K. (1969)
Effect of urease inhibitor acetohydroxamic acid upon utilization of urea by
sheep,
Allattenyesztei, 17, 187-192.
- BARTLEY E.E., DAVIDOVICH A.D., BARR G.W., GRIFFEL G.W., DAYTON A.D., DEYOE C.W.
BECHTLER M. (1976)
Ammonia toxicity in cattle. I. Rumen and blood changes associated with toxicity
and treatment methods.
J. Anim. Sc., 43, 4, 835-841.
- BLACKMON D.M., MILLER W.J., MORTON J.D. (1967)
Zinc deficiency in ruminant : occurrence, effects, diagnosis and treatments.
Vet. Med., 68, 625.
- BRAY A.C., HEMSLEY J.A. (1969)
Sulfur metabolism of sheep. IV. The effect of varied dietary sulfur content
on some body fluid sulfate levels and on the utilization of urea, supplemented
roughage by sheep.
Aust. 3. Agric. Res., 20, 759-773,
- BREMNER 1. (1970)
Trace elements in the alimentary tract.
Br. J. Nutr., 24, 769-783.
- BRENT B.E., ADEPOJU A., PORTELA F., RICHARDSON D. (1968)
Inhibition of Rumenal urease. 1. The intracellular nature of urease, II, Effects
of acetohydroxamic acid of rumen urease.
Progress Report, 40-43, in 4th Bull. 518 Enzyme Ruminants.
Kansas Agr. Exp. st. 55th Annual cattlemen's day.
- BRENTBE, ADEPOJU A., PORTELA F. (1971)
In vitro inhibition of rumen urease with acetohydroxamic acid.
J. Anim. Sc., 32, 794-798.
- BRIGG M.H. (1967)
Urea as a protein supplement.
Pergamon Press, London
- BROCHART M. (1971)
Oligoéléments et fertilité.
Ann. Nutr. Alim., 25, B493 - B520.
- BROCHART M.
Le diagnostic des troubles de la nutrition minérale des bovins par analyse,
Piliaire. Interprétation des résultats.
C.R. XVIIIe Congres Mondial Vét., Paris, 2, 541-544.

BRYANT (1959, 1965, 1975) cite par PRINS (1975).

BUTTERY P.J. (1975)

Protein synthesis in the feeding of N.P.N. to Ruminants.
In Principles of cattle production Butterworths, London-Boston.

CHESTERS (1970) cité par WALTER

Trace elements in Human Health and Disease, vol.I. Zinc and Copper.
Ed. by A.S. Prasad, Acad. Press., Inc. N.Y., 1976,

CHURCH D.C.

Digestive physiology and nutrition of ruminants, vol.2 Nutrition, O.S.U. Book stores, Inc., Oregon (USA).

COOMBE J.B., TRIBE D.E., MORRISON J.W.C. (1960)

Some experimental observations on the toxicity of urea to sheep,
Austr. J. Agr. Res., 11, 247-256.

COOK A.R. (1976)

Urease activity in the rumen of sheep and the isolation of ureolytic bacteria,
J. Gen. Microb., 92, 32-48.

DRUM (1967) cité par J.F. RIORDAN (1976)

FESTENSTEIN G.N. (1959)

Substrate specificity of rumen, cellulolytic enzymes,
Bioch. J., 72, 75-79.

GIBBONS R.J., DOETSCH R.N. (1959)

Physiological study of an obligately anaerobic ureolytic bacterium.
J. Bact., 77, 418-428.

HAMBIGE C. (1972) voir PRASSAD (1976)

HELLWEGE H.H. (1972) voir PRASSAD (1976)

HUBBERT F., CHENG E., BURROUGHS W. (1958)

Mineral requirement of rumen microorganisms of cellulase digestion in vitro.
J. Anim. Sci., 17, 559-568.

HUNGATE R.E. (1969)

The rumen and its microbes.
Acad. Press. N.Y. and London.

HUME I.D., BIRD P.B. (1970 c)

Synthesis of microbial protein in the rumen : IV. The influence of the level and form of dietary sulphur.
Aust. J. Agr. Res., 21, 315-322.

JONES G.A., McLEOD R.A., BLACKWOOD (1964) .

Ureolytic rumen bacteria. I. Characteristics of the microflora from a urea fed sheep.
Can. J. of Microb., 10, 371-378.

JONES G.A. (1965)

Effect of divalent cations on the activity of bacterial urease.
Can. J. Microb., 10, 120-122.

JOURNET M. (1975)

Urease activity and its regulations in the rumen contents of animal given N.P.N. compounds.
Symposium of utilization of NPN compounds by ruminants; Xth Intern. Congress of Nutr. Kyoto (Japan), August, 1975).

KEILIN D., MANN (1940)
Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme.
Biochem. J., 34, 1163.

KUMARESAN A. (1975)
Interactions entre le zinc et les microorganismes du rumen chez le mouton
recevant de l'urée comme source unique d'azote.
Thèse Doctorat d'Univ., Toulouse,

LAMAND M. (1970, 1971, 1972, 1973) cite par LAMAND (1974)
Etiopathogenie des carences en oligo-éléments dans les ensilages de maïs
enrichis en urée et en soufre.
Ann. Rech. Vét., 5 (3), 281-289,

LAMAND (1975)
Utilisation digestive et métabolique des oligo-éléments. Les besoins de l'adulte et du jeune,
Les Minéraux et les Vitamines, tome 1, Point vétérinaire, p.123-133.

LAWLOR M.J., SMITH W.H., BEESOW W.M. (1965)
Iron requirement of the growing lamb.
J. Anim. Sci., 24, 742,

LEGG S.P., SEARS L. (1960)
Zinc sulphate treatment of parakeratosis in cattle.
Nature, 186, 1061.

LITTLE O., CHENG, BURROUGHS W. (1958)
Effects of chelating agents on cellulose digestion in vitro by rumen organisms.
J. Anim. Sci., 17, 1190.

LOPER D.C., RICHARDSON D., HARBERS L.H. (1972)
In vitro and in vivo responses of ruminants to ureolytic inhibition,
Transactions of the Kansas Acad. of Sc., 74 (3-4).

MAHADEVAN S., SAUER F.D., ERFLE J. D. (1976)
Properties of bovine rumen bacterial urease and an evaluation of some possible inhibitions.
J. Anim. Sc., 42 (3), 745-763.

MARTINEZ A. (1972)
Effects of some major and trace elements interactions upon in vitro rumen
cellulose digestion.
Thesis, Oregon State University.

MILLER J.K., MILLER W.J. (1962)
Experimental zinc deficiency and recovery of calves.
J. Nutr., 76, 467-473.

MILLER J.K. (1960) cité par KUMARESAN (1975)

MILLER W.J. (1965 b, 1970) cité par KUMARESAN (1975)

MILLS (1965, 1967 'b) cité par KUMARESAN (1975)

MOORE W.J., WOODS W.R., KLOPFENSTEIN T.J. (1968)
Nitrogen metabolism as influenced by acetohydroxamic acid.
J. Anim. Sc., 27, 1172-1173.

- Mac NAUGHT M.C., OYEN E.C., SMITH J.A.B. (1950)
Utilization of NPN in the bovine rumen. 6. The effect of metals on the activity of the rumen bacteria.
Bioch. J., 46 (1), 36-43.
- O'DELL B.L., NEWBEKNE P.M., SAVAGE J.E. (1958)
Significance of dietary zinc for growing chicken.
J. Nutr., 65, 503.
- OLTJEN R.R., DAVIS R.E. (1963)
Zinc, urea and buffers in all concentrate steer rations.
J. Anim. Sc., 22, 842.
- OTT E.A., SMITH W.H., HARRINGTON R.B., STOB M., PARKER H.E., BEESON W.M. (1965)
Zinc requirement of growing lamb fed a purified diet
J. Nutr., 87, 459.
- OVERJERO F.J., HOGUE D.E. (1970)
Mineral additions to urea diets for sheep.
Fed. Proc., 29, 692.
- PEARSON R.M., SMITH J.A.B. (1943)
The utilization of urea in bovine rumen. 2. Conversion of urea to ammonia.
Biochem. J., 37, 148-153.
- PERIGAUD S. (1972)
Liaisons carencielles entre sois, végétaux et animaux.
Ann. Nutr. Alim., 26, B327-B378.
- PLOCKE D.J., LEVINTHAL L., VALLEE R.C. (1962)
Alkaline phosphate of *Escherichia coli*. A zinc metalloenzyme.
Biochem., 1, 373,
- PRASAD A.S. (1976)
Trace elements in Human Health and disease, vol. 1. Zinc and Copper.
Academic Press, New-York, London.
- PRINS R.A. (1975)
The normal microflora of the gut.
Edited by Clarke R.T.G. and Bauchop T. Academic Press, New-York.
- RAIBAUD P. (1966)
Hydrolyse de l'urée in vitro et in vivo dans le caecum de rats gnotobiotiques par différentes souches bactériennes isolées du tube digestif de rats conventionnels.
C.R. Acad.Sc., Paris, 262, 944-947.
- REITHEL F. J. (1971)
Ureases in The Enzymes vol. IV. Ed. by P.D. Boyer, 3th Ed.
Acad. Press, New-York, London.
- RONAGHY H.A. (1969) cité par PRASAD (1976)
- RIORDAN J.F. (1964) cité par PRASAD (1976)
- SALA J.C. (1957) cité par MARTINEZ (1970)
- SELZE J.C. (1971)
Le zinc dans l'alimentation animale.
Thèse Doc. Vét., Paris.

SLYTER L.L., OLTJEN R.R., KERN D.L., WERNER J.M. (1968)
Microbial species including ureolytic bacteria from the rumen of cattle fed purified diets.
J. Nutr., 94 (2)

SHAW W.H.R. (1954)
The inhibition of urease by various metal ions.
J. Am. chem. Soc., 76 (2), 2160-2163.

SIDHU K.S., JONES E.W., TILLMAN A.D. (1968)
Effect of urease immunity on growth digestion and nitrogen metabolism in ruminant animal.
J. Anim. Sc., 27, 1703-1708.

STANLEY R.W., KESLER E.M. (1959)
Preparation and some basic properties of cell free cellulolytic extracts of rumen fluid.
J. Dairy Sc., 42, 127-136.

TODD W.R., ELVEHSEM C.A., HART E.B. (1934)
Zinc in the nutrition of the rat.
Am. J. Physiol., 107, 106,

TUCKER H.F., SALMON W.D. (1955)
Parakeratosis on zinc deficiency disease in the pig.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 88, 613.

UNDERWOOD E.J. (1971)
Trace element in Human and animal nutrition.
Acad. Press. New-York and London.

VALLEE B.L., NEURATH N. (1950) cité par SELZE (1971) et PRASAD (1976)

Von WARTBURG J.P. (1964) cité par PRASAD (1976)

WOOD S.W. (1965) cité par MARTINEZ (1972)

ZHEREBTSOV P.I., NABIEV N.K. (1970 a)
Effect of different amounts of zinc on nitrogen and carbohydrate metabolism in the rumen of cattle.
Izv. Timirjazev. sel'skokoz Akad., 3, 189-193.