

APPORTS ET LIMITES DES TECHNIQUES ALTERNATIVES À LA CHIRURGIE EXPÉRIMENTALE DU TRACTUS DIGESTIF DES HERBIVORES

INTEREST AND LIMITATIONS OF TECHNIQUES REPLACING EXPERIMENTAL SURGERY ON THE DIGESTIVE TRACT OF HERBIVORES

Par Michel DOREAU
(Communication présentée le 23 octobre 2008)

RÉSUMÉ

L'étude de la digestion chez les herbivores fait souvent appel à des techniques chirurgicales consistant à poser des canules sur différentes parties du tube digestif. Ces techniques ont permis des progrès rapides et importants dans la connaissance et la quantification des processus digestifs. Les principales méthodes ne faisant pas appel à la chirurgie sont décrites et leurs intérêts et leurs limites évalués : différentes méthodes *in sacco* et *in vitro* (rumen artificiel), mesures chez des animaux abattus, rumenocentèse, analyses des fèces ou de liquides biologiques, et approches par méta-analyse ou modélisation. L'auteur conclut que ces méthodes alternatives peuvent remplacer seulement en partie les techniques de chirurgie digestive.

Mots-clés : digestion, chirurgie, méthodes, ruminant, cheval.

SUMMARY

*The study of digestion in herbivores often requires the surgical setting of cannulas on different parts of the digestive tract. These techniques helped to improve rapidly and substantially our knowledge of the mechanisms and extent of the digestive processes. The main non-surgical techniques are described and their interest and limitations are evaluated. These techniques include various *in sacco* and *in vitro* (artificial rumen) methods, measurements in slaughtered animals, rumenocentesis, analyses of faeces and biological fluids, and meta-analyses and modelling. The author concludes that these alternative techniques can replace only partially the use of digestive surgery.*

Key words: digestion, surgery, methods, ruminant, horse.

(1) Adresse : INRA Centre de Clermont-Ferrand-Theix, UR Herbivores, 63122 Saint-Genès Champanelle. Courriel : doreau@clermont.inra.fr

Les processus digestifs chez les animaux d'élevage ont intéressé depuis longtemps les physiologistes et les zootechniciens. La curiosité scientifique d'abord, la nécessité de rationaliser l'alimentation des animaux en optimisant la digestion des aliments ensuite, ont conduit les chercheurs à pratiquer des actes de chirurgie digestive, en particulier la pose de canules permanentes. Ces techniques sont à l'origine de l'amélioration considérable de l'efficacité de la digestion à partir des connaissances acquises sur les dégradations, les synthèses et l'absorption des nutriments. Citons à titre d'exemple le développement d'un système d'évaluation des apports azotés, le système PDI – protéines digestibles dans l'intestin – (INRA 1978) ; ce système a permis des économies notables de protéines à l'échelle de l'éleveur et de la nation. La santé animale a également largement bénéficié des connaissances sur des pathologies comme l'acidose chez le ruminant ou les coliques chez le cheval. Depuis près de deux décennies, d'autres finalités que l'efficacité alimentaire mobilisent les chercheurs. Le consommateur réclame des produits sains, et les phénomènes de détoxification dans le rumen prennent leur importance. Il exige des produits de meilleure valeur nutritionnelle et l'étude des conversions de nutriments dans le rumen, en particulier pour les acides gras, permet de comprendre et de prévoir la composition du lait et de la viande. Enfin, la préoccupation actuelle pour la préservation de l'environnement et les menaces liées au réchauffement climatique rendent d'actualité la connaissance des mécanismes de production de méthane par l'écosystème microbien du rumen. Face à ce besoin de connaissances renouvelé, le citoyen exprime une demande forte pour améliorer le bien-être animal. Ceci induit un questionnement sur les moyens de limiter les études chez des animaux ayant subi un acte chirurgical, même si les poses de canules du tractus digestif telles qu'elles sont pratiquées actuellement peuvent apparaître comme moins traumatisantes que la maladie ou même que certaines pratiques d'élevage.

Cet article fait donc le point des méthodes substitutives permettant de limiter le recours à la chirurgie digestive, et tente d'en définir les intérêts et les limites.

ÉVOLUTION DES TECHNIQUES CHIRURGICALES

La plus ancienne méthode utilisée chez les grands herbivores est la fistule du rumen, pratiquée par Flourens (1833), puis par Colin (1854). La pose d'une canule permanente est plus tardive, bien que Colin rapporte que la canulation ait été pratiquée sur l'estomac du Chien par Blondlot dès 1843. À notre connaissance, Schalk et Amadon (1928) auraient les premiers obturé une fistule du rumen avec une pièce de bois maintenue en place. Le bois a fait place d'abord au métal, puis très rapidement au plastique. Au début, les mesures ont consisté à prélever du contenu et à l'analyser. Après une longue période d'utilisation modérée de cette technique, les études sur animaux porteurs de canules du rumen se sont diversifiées. Cette technique est maintenant répandue dans le monde entier, du fait de sa simplicité de mise

en œuvre, du très faible risque d'infection puisque la paroi du rumen est suturée à la peau, et de l'absence apparente de perturbations de l'animal qui peut la garder pendant de nombreuses années (*figure 1*). La canulation du cæcum et du côlon est également pratiquée sans risque chez le cheval : Alexander (1952) a ainsi posé sur un même cheval trois canules au niveau du cæcum, du côlon ventral et du côlon dorsal.



Figure 1 : Zébu pourvu d'une canule du rumen

La canulation du rumen nécessite une intervention chirurgicale simple, pratiquée dans un grand nombre de pays. Ce zébu d'un centre de recherches du Burkina Faso porte en outre un système d'enregistrement des activités masticatoires. (cliché M. P. Vergeron).

Les utilisations d'animaux dont le rumen est canulé sont multiples ; la plupart d'entre elles sont répertoriées dans l'ouvrage de Jarrige *et al.* (1995). Outre l'emploi de la méthode *in sacco* et le prélèvement de contenu pour les méthodes *in vitro*, décrites ci-dessous, la canulation permet l'infusion de marqueurs indigestibles pour l'étude du transit ou des flux digestifs ou de nutriments. Elle autorise des prélèvements pour analyser les produits terminaux de la digestion, isoler ou quantifier les populations bactériennes et analyser leur composition. Il est possible de connaître le rôle des protozoaires dans leur ensemble ou d'une espèce de protozoaire en les éliminant du rumen (défaunation), et éventuellement en réinoculant une espèce spécifique (Jouany *et al.* 1981). Les mesures peuvent être multipliées et des mesures en cinétique souvent pratiquées. Le rumen peut être totalement vidé, afin de peser ou d'échantillonner son contenu. Vidé et lavé, il peut être rempli d'une solution dont on veut mesurer la vitesse d'absorption : cette technique souvent utilisée pour les minéraux a été appliquée aux acides gras volatils (Perrier *et al.* 1994) (*figure 2*). Des prélèvements de papilles ou des biopsies de l'épithélium ont également été pratiqués en passant par la canule. Enfin, il est possible de poser, aussi par cette voie, une canule au niveau de l'orifice réticulo-omasal pour étudier son rôle (Bueno 1972) ou d'introduire, par cet orifice, un cathéter aboutissant dans le feuillet.

La chirurgie intestinale a d'abord été destinée à l'accroissement des connaissances. Les anses de Thiry-Vella, qui isolaient un morceau d'intestin, ne sont plus utilisées et l'apport de cette technique a été limité. À l'époque où elle se pratiquait, les méthodes d'analyse biochimique étaient peu évoluées, et dans les ouvrages de physiologie d'il y a un demi-siècle comme celui

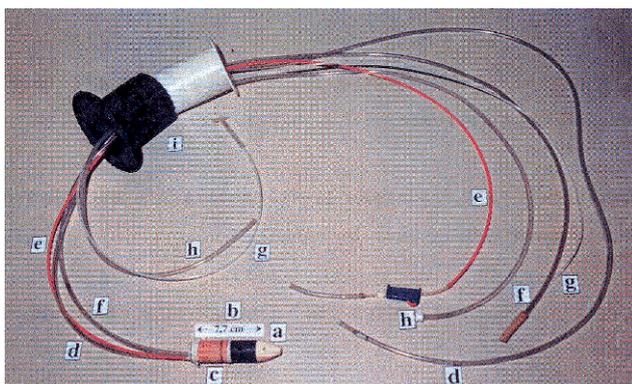


Figure 2 : Technique du rumen vidé lavé : système d'infusion et de prélèvement de nutriments.

Technique de mesure de l'absorption par la paroi du rumen chez l'animal vigile. Une fois le rumen vidé de son contenu et lavé, une canule souple est installée, une solution contenant les nutriments dont on étudie l'absorption est introduite dans le rumen. Un collecteur de salive placé dans l'œsophage permet d'éviter la contamination par les sécrétions salivaires.

a et b : embout et corps du collecteur de salive ;

c : manchon gonflable ;

d : tuyau d'aspiration de la salive ;

e : tube pour gonfler le collecteur de salive ;

f : tuyau de prise d'air ;

g : tuyau de bullage de CO₂ ;

h : tuyau d'infusion et de prélèvement de liquide.

Le ballonnet pour obturer l'orifice réticulo-omasal n'est pas montré.

(cliché M. Doreau)

de Dukes (1955), on peut lire la composition des jus intestinaux en eau, protéines, minéraux et autres substances, ce qui, de toute évidence, faisait peu progresser la physiologie digestive. Actuellement les techniques analytiques sont très précises mais la technique des anses isolées a été abandonnée, du fait de sa faible représentativité des processus digestifs normaux. Néanmoins, des techniques chirurgicales lourdes comme la perfusion d'un rumen isolé ont permis de faire progresser les connaissances sur l'absorption (Le Bars *et al.* 1958).

Les premières tentatives visant à quantifier la part respective des préestomacs et des intestins dans la digestion des ruminants ont consisté en fistules du duodénum proximal, placées avant le débouché du canal de Wirsung et du canal cholédoque. Dougherty (1955) a proposé un premier modèle de canule simple chez le ruminant. Le modèle de canule réentrante développé par Ash (1962) chez le ruminant a été longtemps considéré comme une référence en raison de la représentativité des prélèvements réalisés, puis a été totalement abandonné en raison des perturbations importantes des fonctions digestives de l'animal. La pose de canule sur des compartiments tubulaires est couramment pratiquée, bien qu'étant d'un emploi plus délicat que la pose de canule du rumen. Les risques post-opératoires sont plus fréquents ; l'arrachement de la canule suivi de la fermeture de la fistule peut se produire, en particulier lorsque l'animal est au pâturage. Néanmoins, il a été possible d'associer l'emploi de canules du rumen, du duodénum et de l'iléon à la pose de cathéters permanents de l'aire splanchnique, afin de mesurer simultanément la digestion des aliments et l'absorption des nutriments (Nozière *et al.* 2005). En revanche, la pose de

canules de l'iléon chez le cheval pour quantifier la part de la digestion ante-cæcale est très délicate. Il en est de même de la canule de l'œsophage chez le ruminant destinée à déterminer les effets de la mastication. (Cook *et al.* 1958).

UNE MÉTHODE RADICALE MAIS FRUCTUEUSE : L'ABATTAGE DES ANIMAUX

L'un des moyens de limiter la chirurgie digestive est d'abattre l'animal non opéré. Des mesures chez les animaux abattus ont été réalisées dès la fin du 19^e siècle. Ainsi, Muntz & Girard (1884) ont décrit leur expérimentation en ces termes : « un cheval auquel M. Pasteur avait inoculé le charbon a été mis en box et nourri pendant 11 jours avec du son. Le 29 juin 1881, on l'a abattu d'un coup de massue ». Ce malheureux cheval n'a fait l'objet que d'observations de portée très limitée, même pour l'époque. Puis, de nombreux essais ont été menés chez des animaux anesthésiés et sacrifiés après les mesures. Des opérations irréversibles étaient parfois menées : Ash & Kay (1959) ont observé que la rumination ne se produisait pas après décérébration. Mais ce sont surtout des mesures de motricité digestive qui ont été réalisées chez les animaux anesthésiés, et de nombreux expérimentateurs ont largement fait progresser les connaissances dans ce domaine (Simonnet *et al.* 1952). Toutefois, la technique d'enregistrement de la motricité digestive chez des animaux éveillés, grâce à la pose préalable d'électrodes à demeure sur tel ou tel segment du tractus digestif, a permis de diminuer le nombre d'animaux expérimentaux et d'éviter leur euthanasie (Ruckebusch 1973).

Pour sa part, Forbes (1968) a abattu, congelé et présenté en coupes sériées macroscopiques, 22 brebis tarées ou gravides, afin de montrer que lorsqu'un fœtus occupait la cavité abdominale, le volume du rumen était réduit. Les abattages ont ensuite été utilisés de manière plus efficace. En premier lieu, ils ont servi à des fins de quantification de la digestion, mais cela a peu contribué à l'avancement des connaissances. En effet, les mesures pratiquées chez les animaux abattus fournissent un état

Paroi digestive
- Poids et dimensions des éléments du tractus
- Histologie
- Capacité d'absorption du tissu isolé (chambres de Ussing)
- Prélèvements pour cultures cellulaires
Contenu digestif
- Poids de contenus digestifs
- Produits terminaux de la digestion présents dans le rumen ou le gros intestin (évaluation)
- Granulométrie des contenus, séparation de fractions physiques
- Écosystème microbien, incluant l'identification par techniques de biologie moléculaire

Tableau 1 : Principaux acquis obtenus grâce à l'abattage des animaux.

instantané, mais ni un flux ni une dynamique de dégradation ou de synthèse. Pour pallier cet inconvénient, les expérimentateurs ont souvent programmé les abattages à des heures variables après le dernier repas. Mais les abattages se prêtent à bien d'autres mesures relatives à la sphère digestive. Le *tableau 1* récapitule les principaux paramètres mesurés pour lesquels les abattages peuvent fournir un accroissement significatif des connaissances. Contrairement à une idée prévalente, les mesures chez les animaux abattus peuvent faire appel à des techniques sophistiquées : mesures d'absorption de nutriments, de minéraux ou de xénobiotiques sur tissus isolés, détermination de la composition de l'écosystème microbien par des techniques d'empreinte ou de PCR quantitative... La principale contrainte est de réaliser les mesures très rapidement après abattage, ce qui, dans la pratique, est plus aisé pour les petits ruminants que pour les gros herbivores. En outre, pour des raisons de coût, les abattages expérimentaux sont généralement pratiqués chez les petits ruminants ou chez les animaux normalement destinés à l'abattage, en croissance ou à l'engraissement, ou de réforme.

UNE TECHNIQUE *IN VIVO* À HAUT DÉBIT : LA MÉTHODE *IN SACCO*

C'est une très ancienne technique aussi appelée *in situ*. Elle consiste à suivre le devenir d'un aliment dans le tube digestif, rumen ou intestin, en l'emprisonnant dans un sachet. Les précurseurs, Réaumur en 1752, cité par Spallanzani (1783) et surtout Spallanzani lui-même, ont introduit de l'herbe dans un tube métallique ingéré par un ruminant. Mais le véritable ancêtre de cette méthode, qu'on pouvait alors qualifier de « *in cochleo* », a été Colin (1854) qui a fait ingérer des escargots dans leur coquille à des chevaux, afin de montrer l'absence de digestion de la viande crue tout en évaluant la durée du transit alimentaire. Dans la première moitié du siècle dernier, des sachets de jute remplis de fourrages ont été introduits dans le rumen par une canule. Des fils de coton ont ensuite été introduits dans le rumen afin de mesurer la dégradation de la cellulose. La méthode actuelle consiste à remplir d'aliment des sachets de dacron dont la maille est calibrée et à les suspendre dans le rumen où ils séjournent pendant un temps déterminé. Deux types d'utilisations sont réalisées : la première consiste à comparer l'activité de dégradation d'un aliment standard par des animaux qui ont reçu différents régimes et dont l'activité microbienne du rumen est donc variable ; la seconde, plus largement répandue, consiste à comparer différents aliments avec un contenu de rumen « standard », l'animal ayant reçu une ration déterminée. Les résultats sont dépendants des conditions de mesure : mode de présentation et granulométrie de l'aliment introduit dans le sachet, taille de la maille laissant passer ou non les gros protozoaires... (Michalet-Doreau & Nozière, 1999). Les principaux biais sont liés à un microclimat microbien dans le sachet, aux pertes de petites particules et de constituants solubles. Néanmoins, lorsque la méthode standardisée est mise en œuvre, il existe une excellente corrélation entre la dégradation des aliments mesurée *in sacco* et celle mesurée *in vivo*. Orskov & McDonald (1979) ont les premiers proposé un modèle simple

de la cinétique de disparition du substrat, avec une fraction soluble ou rapidement dégradée, une fraction lentement dégradée et une vitesse de dégradation constante de cette dernière fraction. Une « dégradabilité théorique » des aliments peut également être calculée en prenant en compte le temps de séjour estimé du substrat dans le rumen. Ces modèles ont permis de réduire une cinétique complète à quelques valeurs synthétiques simples et de comparer des résultats obtenus dans des laboratoires différents.

Une fois standardisée, la méthode *in sacco* a permis de déterminer la dégradation ruminale de la matière sèche, des parois, des protéines, de l'amidon de très nombreux aliments, et ainsi de contribuer à améliorer les tables de valeur des aliments dans de nombreux systèmes d'alimentation, ainsi que des modèles de dégradation. La grande force de cette technique réside dans sa rapidité et sa facilité d'utilisation. Son principal inconvénient est qu'elle se limite à la connaissance de la dégradation mais ne fournit aucune information sur les constituants formés. Elle peut par ailleurs conduire à des biais parfois importants dans le cas de certaines matières premières pour lesquelles le broyage accélère fortement les processus de dégradation, comme les protéagineux. Un essai récent mené dans notre laboratoire avec des moutons porteurs de canules du duodénum a permis de montrer que les flux de protéines alimentaires parvenant au duodénum étaient comparables pour du lupin grossièrement aplati et du tourteau de soja, alors que la méthode *in sacco* surestimait très fortement la dégradation du lupin. La technique *in sacco* est par ailleurs inadaptée à certaines études comme celle de l'hydrogénation des acides gras dans le rumen (Fievez *et al.* 2007).

La méthode *in sacco* est également utilisée chez le ruminant pour quantifier la digestion enzymatique dans l'intestin grêle. Dans ce cas, il s'agit de sachets mobiles introduits au début de l'intestin grêle et récupérés à son extrémité. Une canule du duodénum est nécessaire pour l'introduction des sachets ; ceux-ci sont idéalement récupérés par une canule de l'iléon terminal, plus souvent dans les fèces. Il est nécessaire que les substrats introduits dans le duodénum aient été au préalable placés dans le rumen pendant le temps de séjour moyen dans ce compartiment, puis que les résidus aient été traités par la pepsine pour simuler le passage dans la caillette (Yang & Poncet, 1988). Cette méthode nécessite des animaux porteurs de plusieurs canules, mais permet de réaliser un nombre important de mesures en peu de temps. Elle est utilisée pour prédire la digestibilité intestinale des protéines dans différents systèmes d'alimentation. Depuis peu, elle a été utilisée chez le Cheval pour quantifier la digestibilité ante-cæcale, avec un petit biais toutefois dans la mesure où les sachets sont récupérés par une canule cæcale, car la canulation de l'iléon est très délicate chez le Cheval (De Fombelle *et al.* 2004).

LES MÉTHODES *IN VITRO* : LE « RUMEN ARTIFICIEL »

Curieusement, les techniques *in vitro* sont assez récentes. Pigden & Bell (1955) ont probablement réalisés les premiers

essais planifiés chez le ruminant et ont triomphalement baptisé leur système de fermentation « rumen artificiel ». Les premières mesures étaient très simples et se faisaient en tube à essai : du liquide du rumen était mélangé à un tampon pour stabiliser le pH et à un ou plusieurs substrats ; une mesure des constituants disparus ou apparus était réalisée à l'issue d'une incubation à la température du rumen et avec agitation. Cette méthode a un emploi très large, en particulier lorsqu'elle est utilisée de manière systématique pour comparer la digestion de différents aliments. Elle permet la comparaison très rapide d'un nombre très important d'échantillons, en particulier pour mesurer la dégradation des glucides ou des protéines (Aufrère & Michalet-Doreau, 1988) ou pour évaluer l'intensité globale de fermentation par le simple volume de gaz recueillis : « gaz test ». Progressivement, cette méthode s'est muée en simulation du fonctionnement du rumen : le véritable « rumen artificiel », terme dont la connotation moderne ne faisait pas oublier son caractère imparfait. Les principaux perfectionnements ont concerné l'incorporation d'une source d'azote et de minéraux, la réalisation de l'anaérobiose, l'amélioration du tampon. De très nombreuses variantes existent de ces fermenteurs dits « batch » : volume de la fermentation, temps d'incubation variant le plus souvent entre cinq et 24 h... La difficulté d'harmonisation des techniques rend difficile la comparaison entre expérimentations. Parfois, l'objectif n'est pas de se substituer à un essai *in vivo*, mais d'apporter des informations complémentaires simultanément à un essai *in vivo*. Ainsi la vitesse de dégradation d'amidon et de sucres a été suivie *in vitro*, alors qu'un essai *in vivo*, conduit en parallèle, ne permettait pas la réalisation de ces mesures (Doreau *et al.* 1993). Ces méthodes *in vitro* ont permis un progrès rapide des connaissances. Elles sont particulièrement adaptées à l'étude simultanée de plusieurs facteurs de variation, au criblage de nombreux aliments, traitements, additifs. Le risque majeur lié aux expérimentations *in vitro* par des chercheurs ne pratiquant pas de mesures *in vivo* est l'interprétation erronée des résultats, car ils obtiennent des variations significatives qui ne se retrouvent pas *in vivo*, pour deux raisons :

- i) le nombre de mesures dans un même essai est plus important *in vitro* qu'*in vivo* et la signification statistique est plus facile à obtenir, et,
- ii) les fermenteurs *in vitro* ne reproduisent le rumen que de manière simplifiée. L'étude de l'effet de l'incorporation de niacine dans la ration sur la synthèse de protéines microbiennes en constitue un exemple : l'effet positif que nous avons observé *in vitro* n'a pas été confirmé *in vivo* (Ottou & Doreau, 1996). La raison pourrait être que la source azotée apportée *in vitro* était essentiellement non protéique, alors qu'*in vivo*, la présence de tryptophane, précurseur de niacine, peut conduire à une synthèse de niacine ne nécessitant donc pas son utilisation en tant que supplément alimentaire.

Mais la principale critique des méthodes *in vitro* est le principe du fermenteur clos, très éloigné du rumen qui est régulièrement alimenté et vidangé. Pour cela, deux perfectionnements différents ont été apportés. Presque simultanément, Czerkawski &

Breckenridge (1977) ont mis au point le « Rusitec », fermenteur à alimentation semi-continue, devenu très populaire en Europe et Hoover *et al.* (1976) ont imaginé un fermenteur à double effluent, séparant la vidange des phases solides et liquides, utilisé d'abord aux États-Unis (figure 3). Ces remarquables améliorations ont permis de prendre en compte les phénomènes de transit et de mieux respecter l'intégrité des populations microbiennes. Actuellement, le « Rusitec » est moins utilisé que le fermenteur à double effluent. Cette technique permet de simuler les effets de variations du pH ou du temps de séjour des liquides et des particules. La principale critique de ce système réside dans sa complexité et sa lourdeur. Un essai en fermenteur à double effluent permet de comparer un nombre limité de traitements expérimentaux et nécessite un investissement en temps important. En outre, il ne semble pas exister d'étude comparative entre les résultats issus de flux duodénaux *in vivo* et de fermenteurs à double effluent.



Figure 3 : Fermenteur à double effluent.

Ce système sophistiqué est actuellement celui qui reproduit le mieux les processus digestifs dans le rumen. Il comprend des cuves de fermentation, des débitmètres et leurs régulateurs permettant d'assurer un débit déterminé de l'entrée d'une solution comprenant en particulier tampon et minéraux, et de la sortie séparée de ses phases liquide et solide, d'où le nom de « double effluent », et des sondes mesurant le pH et le potentiel rédox, le tout étant piloté par ordinateur. Le fermenteur est alimenté deux fois par jour avec la ration à étudier, préalablement broyée. (cliché J. P. Jouany)

LA RUMINOCENTESE, MÉTHODE MOINS INVASIVE ?

La ruminocentèse ou trocardage du rumen, largement pratiquée en cas de météorisation, est très peu employée en recherche. Pourtant, un prélèvement de 50 ml de liquide peut permettre de mesurer le pH, les acides gras volatils, l'ammoniac, et même d'analyser la population de protozoaires et de bactéries de la phase liquide du rumen, donc de nombreux paramètres d'état de ce compartiment. Le principal inconvénient est la difficulté de prélever toujours au même endroit ; or si le pH et la composition des acides gras volatils varient peu selon le site de prélèvement, il n'en est pas de même pour la concentration des acides gras volatils. Il a été aussi observé que la mesure du pH par ruminocentèse fournissait des résultats similaires à ceux obtenus chez les animaux porteurs d'une canule, ce qui n'était pas le cas lors de l'utilisation d'une sonde œsophagienne (Kleen *et al.* 2004). Quant à la population bactérienne de la phase liquide, elle n'est pas représentative de la population totale. Mais l'avantage est de pouvoir effectuer des mesures répétées chez un nombre élevé d'animaux ou chez des animaux à différents stades de croissance, une canule du rumen posée dans le jeune âge n'étant plus adaptée lorsque l'animal est beaucoup plus lourd. Cette technique a ainsi permis récemment de mettre en évidence des perturbations des fermentations ruminales lors d'un essai d'alimentation (Doreau *et al.* 2001). Kleen *et al.* (2004) préconisent la ruminocentèse pour diagnostiquer l'acidose chez les bovins des élevages. Ils contestent les critiques, formulées par d'autres expérimentateurs, relatives au risque pathologique et à l'altération de la paroi ruminale, qui sont très minimes dans leurs expérimentations. Il est probable que cette différence d'appréciation provient du soin apporté à la réalisation de la ruminocentèse : taille de l'aiguille, asepsie. Bien qu'il n'y ait pas eu à notre connaissance d'évaluation de l'effet d'une ruminocentèse sur le bien-être animal, l'observation du geste montre une absence de réaction apparente de la part de l'animal, même lorsqu'il n'a pas été pratiqué d'insensibilisation locale. Un récent essai mené avec des vaches laitières (V. Deiss et M. M. Mialon, comm. pers.) montre que la ruminocentèse, avec ou sans anesthésie locale préalable, ne modifie pas l'ingestion et la production laitière, le rythme cardiaque et la teneur en cortisol circulant. Il n'en est probablement pas de même de l'intubation œsophagienne, qui provoque une réaction de défense de l'animal.

PEUT-ON SE PASSER DES MÉTHODES INVASIVES POUR ÉTUDIER LES PROCESSUS DIGESTIFS CHEZ L'ANIMAL VIVANT ?

L'une des premières tentatives pour éviter l'emploi de la chirurgie dans les études des processus digestifs est à mettre à l'actif d'Alexander & Benzie (1951) qui ont réalisé des mesures du transit alimentaire par radiologie. Cette technique a été peu employée, mais les nouvelles techniques d'imagerie fonction-

nelle pourraient redonner un regain d'intérêt à l'examen *ex vivo*, à l'instar de ce qu'a réalisé Malbert chez le Porc (cf pp. 441-448).

Les mesures dans les fèces, qui fournissent des données globales sur la digestibilité des rations, ont été utilisées depuis longtemps pour étudier le transit des digesta grâce à des marqueurs (Fish, 1923). La séparation des différents segments du tube digestif des ruminants en compartiments de mélange (rumen, gros intestin...) et en compartiments tubulaires (intestin grêle...) et la modélisation de leur vidange a permis d'exploiter les données d'excrétion de marqueurs indigestibles dans les fèces, pour estimer les temps de séjour des particules alimentaires dans les différents compartiments. Le premier modèle élaboré a été établi par Grovum & Williams (1973) qui ont considéré la cinétique d'excrétion d'un marqueur comme la somme de deux exponentielles plus un temps de latence, en déduisant le temps de séjour dans les deux principaux compartiments de mélange et le temps de passage dans l'ensemble des compartiments tubulaires. Dans la décennie suivante, de nombreux auteurs ont perfectionné cette méthode, pour un faible supplément de précision. Sa principale limite réside dans son caractère global, alors que l'avancée des connaissances en physiologie digestive rendrait nécessaire de distinguer le temps de séjour des liquides, des microbes et des particules de tailles diverses. Mais elle reste très intéressante dans les expérimentations où seule une évaluation globale du temps de séjour est nécessaire.

Parmi les différents produits terminaux de la digestion dans le rumen, seuls les gaz éructés peuvent être mesurés par des

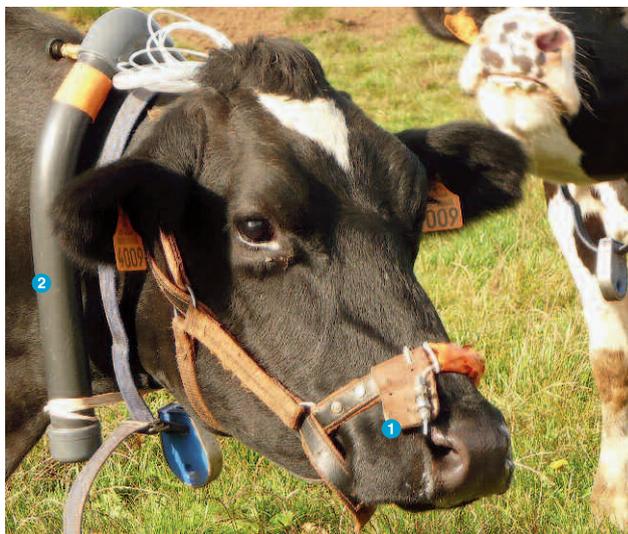


Figure 4 : Mesure de l'émission de méthane au pâturage par la méthode du gaz traceur.

Un gaz inerte (SF_6) est introduit dans une capsule à membrane perméable, elle-même introduite par voie orale dans le rumen avant le début des mesures. La vitesse de diffusion du gaz est constante. On remarque sur le cliché le capteur 1 permettant de recueillir un échantillon représentatif des gaz émis par éructation et au niveau du garrot, une boîte de collecte des gaz 2 dans laquelle on a préalablement fait le vide. La quantité de méthane produite dans le rumen est calculée à partir de la vitesse de diffusion du SF_6 et des concentrations en méthane et en SF_6 dans les gaz recueillis dans la boîte. (cliché C. Martin)

méthodes non invasives. Jusqu'à la fin des années 1990, la calorimétrie en chambres respiratoires était utilisée. Cette technique lourde et contraignante pour l'animal est désormais supplantée par une méthode utilisant un marqueur, l'hexafluorure de soufre (SF₆) (Johnson *et al.* 1994). Un « bolus » de petite taille contenant ce gaz diffusant à une vitesse préalablement mesurée est introduit par voie orale dans le rumen. Les gaz érucés sont recueillis par un capteur situé près de la bouche de l'animal, et la mesure des concentrations de méthane et de SF₆ dans l'échantillon recueilli permet de déterminer la production de méthane. Cette technique, utilisable chez l'animal au pâturage (figure 4), a permis des avancées rapides dans la connaissance des facteurs de variation des émissions de méthane, sujet dont l'intérêt est relancé par sa contribution à l'effet de serre (Martin *et al.*, 2006).

Des prélèvements dans différents liquides biologiques permettent d'évaluer des paramètres du métabolisme ruminal. Ainsi, les dérivés des bases puriques dans l'urine sont un bon estimateur de la synthèse ruminale de protéines microbiennes, dont une mesure directe consiste à déterminer d'abord le flux duodénal de protéines avec des marqueurs de flux, puis la part de microbes dans les protéines avec des marqueurs des protéines microbiennes, parmi lesquels les bases puriques et pyrimidiques. L'étalonnage de cette méthode a été réalisé avec un certain nombre de rations (Chen & Gomes, 1992) et la mesure dans l'urine ne peut, par conséquent, être réalisée que pour des rations classiques ayant servi à l'étalonnage. Il est permis de penser que cette méthode indirecte peut être plus précise que la méthode directe, les mesures de flux avec marqueurs étant entachées d'une forte imprécision : elles nécessitent en effet un ou deux marqueurs du flux digestif et un marqueur des microbes.

À l'avenir, les outils de la métabolomique (empreintes métaboliques) permettront une cartographie précise des processus digestifs à partir de prélèvements sur l'urine, le sang ou le lait en particulier. Les études sur les relations entre digestion et composition du lait sont les plus avancées en raison de la facilité de prélèvement de ce dernier. Les acides gras à chaîne impaire et ramifiée en particulier, parce qu'ils sont des indicateurs de bactéries du rumen, permettent de prédire la composition des acides gras volatils (Vlaeminck *et al.* 2006). Mais la validité des modèles proposés n'est pas encore généralisable à toutes les situations nutritionnelles. Le métabolisme des lipides dans le rumen, pour sa part, pourrait être en partie prédit à partir de prélèvements sanguins ; mais cela est possible seulement pour certaines catégories d'acides gras en raison des modalités de transport des lipides dans l'organisme (Doreau *et al.* 2008).

L'APPROCHE *IN SILICO*: MÉTA-ANALYSES ET MODÉLISATION

Deux techniques principales sont en développement dans les laboratoires de recherche : la méta-analyse par modélisation empirique et la modélisation mécaniste. La première est un per-

fectionnement de ce qui était appelé « bibliographie quantitative ». Elle part de bases de données bibliographiques qu'elle exploite par un traitement statistique. Une excellente synthèse des techniques statistiques de méta-analyse en alimentation animale a été récemment publiée (Sauvant *et al.* 2005). Curieusement, la méta-analyse est d'usage récent en expérimentation animale, alors qu'elle est répandue depuis de nombreuses années en médecine. Dans ce cas, elle répondait à un double besoin lié d'une part, à l'éparpillement des résultats de recherches entre de multiples établissements hospitaliers et d'autre part, à l'impérieuse nécessité d'une analyse exhaustive de l'efficacité d'un traitement.

Certaines limites des méta-analyses sont d'ordre méthodologique ; elles concernent en particulier le poids relatif des différentes expérimentations. Des techniques de pondération existent, pour tenir compte du nombre d'animaux utilisés ou de la variabilité e données de base. Mais le poids d'un essai tient aussi à la maîtrise de la méthodologie employée, et cela est difficilement quantifiable. Dans le cas de la détermination, lourde et complexe, des flux de matière sèche transitant dans le duodénum, l'expérimentateur a pu utiliser un ou deux marqueurs, faire de six à 24 prélèvements de contenu pour obtenir un échantillon homogène, analyser les marqueurs par des techniques plus ou moins adaptées. Ces aspects ont été analysés dans un article très pertinent (Titgemeyer 1997). Par ailleurs, certains processus digestifs ne peuvent faire l'objet de méta-analyses en raison d'un nombre insuffisant de données disponibles ou de leur plage de variation trop limitée.

Pour sa part, la modélisation mécaniste a considérablement évolué. De déterministe, elle est devenue stochastique ; d'abord prédictive, elle a évolué en outil de recherche. Son intérêt est clairement montré dans l'article de Van Milgen chez le porc (cf pp. 435–440). Chez le ruminant, la modélisation prédictive à partir de résultats obtenus chez des animaux porteurs de canule a été à l'origine des systèmes d'alimentation français, dont le système PDI d'évaluation des besoins et apports azotés est peut-être le plus abouti (INRA 1978). La modélisation mécaniste par compartiments de l'ensemble des processus digestifs dans le rumen a été développée en France par Sauvant, précurseur en ce domaine (Lescoat & Sauvant, 1995). Par rapport à une démarche « historique » dans laquelle la modélisation était dissociée de l'expérimentation, les échanges entre les deux approches sont de plus en plus fréquents. La création d'un modèle d'abord simple permet de déterminer les points faibles et donc de cibler les processus nécessitant des expérimentations complémentaires. Cela conduit à éviter des expérimentations dont l'apport serait marginal. La modélisation permet de limiter le recours à la chirurgie dans la mesure où elle évite des expérimentations dont l'impact sur l'accroissement des connaissances en physiologie digestive est réduit, et autorise des expérimentations « virtuelles » dans des conditions incompatibles avec l'expérimentation sur animaux.

CONCLUSION

Il existe de nombreuses techniques permettant de limiter le recours à la chirurgie digestive. Certaines d'entre elles, comme la technique *in sacco* et le fermenteur *in vitro* dit « rumen artificiel », permettent une analyse rapide des phénomènes digestifs, mais elles requièrent l'utilisation de canules du rumen ou, pour le Cheval, du cæcum ou du côlon. Le nombre d'animaux nécessaires est toutefois limité. La pose de canules du duodénum ou de la caillette et de l'iléon est la seule méthode permettant de quantifier de manière fiable le lieu et l'importance de la digestion dans le rumen, l'intestin grêle et le gros intestin. Les mesures sur animaux abattus, lorsqu'elles sont possibles, permettent de faire notablement progresser les connaissances sur la digestion, mais toute étude de phénomènes dynamiques est impossible. L'utilisation de méthodes non invasives sur ani-

maux vivants a été jusqu'à présent insuffisamment exploitée, et son développement est nécessaire. Elle ne répondra toutefois pas à l'ensemble des questions posées. Enfin, les approches *in silico* permettent de cibler les expérimentations les plus pertinentes et donc de réduire l'utilisation d'animaux canulés. Il est donc possible de recourir à des méthodes alternatives à la chirurgie digestive ou de limiter leur usage, bien que la canulation soit la seule méthode disponible pour une connaissance exhaustive du fonctionnement digestif. Afin d'optimiser l'utilisation d'animaux canulés, il serait souhaitable qu'ils servent à plusieurs expérimentations successives, ce qui n'est pas admis dans tous les pays et nécessite alors de multiplier les poses de canules sur des animaux différents. Les chercheurs se doivent également de développer des collaborations permettant à plusieurs équipes aux compétences complémentaires d'effectuer des prélèvements et mesures sur les mêmes animaux.

BIBLIOGRAPHIE

- Alexander, F. 1952. Some functions of the large intestine of the horse. *Quart J Exp Physiol.* 37: 205–214.
- Alexander, F. & Benzie, D. 1951. A radiological study of the digestive tract of the foal. *Quart. J Exp Physiol.* 36: 213–217.
- Ash, R. W. & Kay, R. N. B. 1959. Stimulation and inhibition of reticulum contractions, rumination and parotid secretion from the stomach of conscious sheep. *J Physiol.* 149: 43–57.
- Ash R. W. 1962. Gastrointestinal re-entrant cannulae for studies of digestion in sheep. *Anim Prod.* 4: 309–312.
- Aufrère, J. & Michalet-Doreau, B. 1988. Comparison of methods for predicting digestibility of feeds. *Anim Feed Sci Technol.* 20: 203–218.
- Bueno, L. 1972. Action du sphincter réticulo-omasal sur le transit alimentaire chez les bovins. *Ann Rech Vét.*, 3: 83–91.
- Chen, X. B. & Gomes, M. J. 1992. *Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of the technical details.* Occas. Publ. Rowett Research Institute, UK.
- Colin, G. 1854. *Traité de Physiologie comparée des animaux domestiques*, vol. 1. Baillière, Paris.
- Cook, C.W., Thorne, J.L., Blake, J.T., Edlfsen, J. 1958. Use of an esophageal-fistula cannula for collecting forage samples by grazing sheep. *J Anim Sci.* 17: 189–193.
- Czerkawski J. & Breckenridge 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (RUSITEC). *Br J Nutr.* 38: 371–384.
- De Fombelle, A., Veiga, L., Drogoul, C., Julliand, V. 2004. Effect of diet composition and feeding pattern on the prececal digestibility of starches from diverse botanical origins measured with the mobile nylon bag technique in horses. *J Anim Sci.* 82: 3625–3634.
- Doreau M., Ben Salem H., Krzeminski R. 1993. Effect of lipid supply on *in vitro* ruminal digestion in cows: comparison of hay and maize silage diets. *Anim Feed Sci Technol.* 44: 181–189.
- Doreau, M., Ollier, A., Michalet-Doreau, B. 2001. Un cas atypique de fermentations ruminales associées à une cétose chez la vache en début de lactation. *Rev Med Vet.* 152: 301–306.
- Doreau, M., Laverroux, S., Normand, J., Chesneau, G., Glasser, F. 2008. Effect of linseed fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on fatty acid rumen metabolism and intestinal digestibility in cows. *Lipids* 43: *sous presse*.
- Dougherty, R. W. 1955. Permanent stomach and intestinal fistulas in ruminants: some modifications and simplifications. *Cornell Vet.* 3: 331–356.
- Dukes, H. H. 1955. *The physiology of domestic animals.* Comstock Publ., Ithaca, NY, USA.
- Fievez, V., Vlaeminck, B., Jenkins, T., Enjalbert, F., Doreau, M., 2007. Assessing rumen biohydrogenation and its manipulation *in vivo*, *in vitro* and *in situ*. *Eur J Lipid Sci Technol.* 109: 740–756.
- Fish, P.A. 1923. A test for peristaltic activity. *Proc Soc Exp Biol Med.* 20: 524–526.
- Flourens, P.J.M. 1833. Expériences touchant l'action de l'émétique (tartre de potasse antimonié) sur les animaux ruminans. *Gazette Médicale de Paris*, tome I: 169–171.
- Forbes, J.-M. 1968. The physical relationships of the abdominal organs in the pregnant ewe. *J Agric Sci, Camb.* 70: 171–177.
- Grovum, W. L. & Williams, V. J. 1973. Rate of passage of digesta in sheep. 4. Passage of marker through the alimentary tract and the biological relevance of rate constants derived from the changes in concentration of marker in feces. *Br J Nutr.* 30: 313–329.
- Hoover, W. H., Crocker, B. A., Sniffen, C. J. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J Anim Sci.* 43: 528–534.
- INRA. 1978. *Alimentation des ruminants.* INRA, Versailles.
- Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M. H., Journet, M. 1995. *Nutrition des ruminants domestiques. Ingestion et digestion.* INRA, Paris.

- Johnson, K. A., Huyler, M., Westberg, H., Lamb, B., Zimmerman, P. 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. *Environ Sci Technol.* 28 : 359–362.
- Jouany, J.-P., Zainab, B., Senaud, J., Grolière, C.A., Grain, P., Thivend, P. 1981. Role of the rumen ciliate protozoa *Polyplastron multivesiculatum*, *Entodinium* sp., and *Isotricha prostoma* in the digestion of a mixed diet in sheep. *Reprod Nutr Dev.* 22 : 735–752.
- Kleen, J. L., Hooijer, G. A., Rehage, J., Noordhuizen, J. P. T. M. 2004. Rumenocentesis (rumen puncture): a viable instrument in herd health diagnosis. *Deutsche Tierärztl. Wochenschr.*, 111 : 458–462.
- Le Bars, H., Mollé, J., Rerat, A., Simonnet, H. 1958. La perfusion des organes digestifs. Méthode d'étude de l'absorption. *Bull Acad Vet Fr.* 31 : 305–310.
- Lescoat P., Sauvant D., 1995. Development of a mechanistic model for rumen digestion validated using the duodenal flux of amino acids. *Reprod Nutr Dev.* 35 : 45–70.
- Martin, C., Morgavi, D. P., Doreau, M., Jouany, J. P. 2006. Comment réduire la production de méthane chez les ruminants? *Fourrages*, 187 : 283–300.
- Michalet-Doreau, B. & Nozière, P. 1999. Intérêts et limites de l'utilisation de la technique des sachets pour l'étude de la digestion ruminale. *INRA Prod Anim.* 12 : 195–206.
- Muntz, A., Girard, A.C. 1884. Expériences sur les phénomènes chimiques de la digestion chez le cheval. *Annales Inst Nat Agron.* 8 : 203–211.
- Nozière, P., Rémond, D., Lemosquet-Simon, S., Chauveau, B., Durand, D., Poncet, C. 2005. Effect of site of starch digestion on portal nutrient net fluxes in steers. *Br J Nutr.* 94 : 182–191.
- Ørskov, E. R. & McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J Agric Sci, Camb.* 92 : 499–503.
- Ottou, J.-F. & Doreau, M., 1996. Influence of niacin on *in vitro* ruminal fermentation and microbial synthesis depending on dietary factors. *Anim Feed Sci Technol.* 58 : 187–199.
- Perrier, R., Ferchal, E., Durier, C., Doreau, M. 1994. Effect of undernutrition on the ability of the sheep rumen to absorb volatile fatty acids. *Reprod Nutr Dev.* 34 : 341–347.
- Pigden, W. J. & Bell, J. M. 1955. The artificial rumen as a procedure for evaluating forage quality. *J Anim Sci.* 14 : 1239–1240.
- Ruckebusch, Y. 1973. Les particularités motrices du jéjuno-iléon chez le cheval. *Cah Méd Vét.* 42 : 128–143.
- Sauvant, D., Schmidely, P., Daudin, J. J. 2005. Les méta-analyses des données expérimentales: applications en nutrition animale. *INRA Prod Anim.* 18 : 63–73.
- Schalk, A. F. & Amadon, R. S. 1928. Physiology of the ruminant stomach (bovine): study of the dynamic factors. *North Dakota Agric Exp Stat Bull.* 216 : 1–64.
- Simonnet, H., Le Bars, H., Stassive, W., Chapeville, F. 1952. Pharmacologie de l'intestin du Cheval. Action de l'adrénaline sur la motricité du duodénum de cheval *in vitro*. *Bull Acad Vet France* 25 : 75–82.
- Spallanzani, L. 1783. *Expériences sur la digestion de l'homme et de différentes espèces d'animaux.* Chirol, Genève.
- Titgemeyer, E. C. 1997. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *J Anim Sci.* 75 : 2235–2247.
- Vlaeminck, B., Fievez, V., Tamminga, S., Dewhurst, R. J., Van Vuuren, A. M., De Brabander, D., Demeyer, D. 2006. Milk odd- and branched-chain fatty acids in relation with the rumen fermentation pattern. *J Dairy Sci.* 89 : 3954–3964.
- Yang, W.Z., Poncet, C. 1988. Mesure de la digestion de l'azote alimentaire dans les différentes parties du tube digestif du mouton par la technique des sachets de nylon. *Reprod Nutr Dev.* 28 (suppl. 1) : 125–126.

