

UTILISATION DU CÉRIUM-141 COMME MARQUEUR DE LA PHASE SOLIDE DES CONTENUS DIGESTIFS CHEZ LE RUMINANT

I. — CONDITIONS DE FIXATION SUR LES ALIMENTS
ET COMPORTEMENT DANS LE CONTENU DE RUMEN *IN VIVO*

C. PONCET

*Station de Recherches sur l'Élevage des Ruminants,
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, I. N. R. A.,
Theix, Saint Genès Champanelle, 63110 Beaumont*

RÉSUMÉ

Deux expériences à caractère méthodologique ont été réalisées pour étudier l'aptitude du cérium-141 à être utilisé comme marqueur de la phase solide des contenus digestifs.

Nous avons déterminé l'importance et les facteurs de la fixation du cérium-141 par trempage dans une solution radioactive (pH de la solution, durée d'incubation) sur un foin (luzerne) et une céréale (sorgho) broyés à la grille de 10 mm. La fixation du cérium est rapide et principalement conditionnée par le temps de trempage. Le taux de fixation est important dans le cas du foin, et apparemment plus faible avec la céréale. La fixation du cérium est solide sur le foin, plus fragile sur la céréale.

Sur deux moutons munis d'une canule du rumen, nous avons étudié l'évolution de la répartition du cérium entre les différents constituants physiques du contenu de rumen, après ingestion d'un seul repas radioactif. Le liquide du rumen, isolé par centrifugation énergique, contient toujours une quantité de radioactivité négligeable. Le cérium reste fixé sur les particules alimentaires au cours de leur dégradation. Après ingestion d'aliments non marqués, il se produit un transfert de radioactivité du jus de rumen sur la phase solide des contenus. La radioactivité spécifique des microorganismes est toujours plus élevée que celle des particules de taille supérieure. Les microorganismes pourraient être responsables du transfert de radioactivité observé après un repas non marqué.

INTRODUCTION

De nombreux marqueurs de la phase solide des contenus digestifs ont déjà été employés dans les études de digestion. Parmi les plus utilisés (cf. revue de KOLB et LUCKEY, 1972), on peut citer les particules colorées, la lignine et surtout l'oxyde de

chrome (Cr_2O_3). Aucune de ces substances ne répond totalement aux principaux critères de qualité d'un bon marqueur : non dégradation, non absorption et récupération complète en tout point du tube digestif, vitesse de migration identique à celle de la phase étudiée du contenu digestif, détermination chimique précise et rapide (FAICHNEY, 1972 ; McRAE, 1974). Aussi, depuis quelques années, les recherches se sont orientées vers l'emploi de substances radioactives possédant la propriété essentielle de s'adsorber sur les particules solides du contenu digestif. Il s'agit principalement des terres rares ou lanthanides parmi lesquelles on classe communément l'yttrium et le complexe ruthénium-phénanthroline, d'application plus récente (TAN, WESTON, HOGAN, 1971). Ces substances sont indigestibles chez les mammifères (GARNER, JONES, EKMAN, 1960 ; KYKER, 1961). Leur mode de fixation sur les particules alimentaires, assez mal connu, semble être un phénomène d'adsorption d'hydroxyde colloïdal (SCHWERTZER et JACKSON, 1952 ; KYKER, 1961 ; HUSTON et ELLIS, 1968). Le dosage de ces métaux lourds, par des méthodes chimiques, est impossible du fait des faibles concentrations (10^{-7} à 10^{-11} M/l) et s'effectue par mesure de la radioactivité des échantillons. Ceci n'exclut pas la possibilité d'utiliser ces éléments à leur état stable pour les mesures *in vivo* puisque les terres rares peuvent être radioactivées au moment du dosage (ELLIS, 1968 ; GRAY et VOGT, 1974 ; LUCKEY *et al.*, 1975).

Le cérium-144 a été, parmi les lanthanides, le plus utilisé. De nombreux travaux *in vitro* (MORGAN, 1969 ; HUSTON et ELLIS, 1968 ; ELLIS, 1968 ; TERASHIMA, ITOH, MATSUMOTO, 1969) et *in vivo* (MILLER *et al.*, 1967 ; FRANÇOIS, COMPÈRE, RONDIA, 1968) ont montré qu'il se fixait rapidement sur les aliments et que cette liaison persistait au cours du transit gastro-intestinal bien qu'il existe un transfert de radioactivité entre les particules fines et les particules grossières du contenu de rumen par l'intermédiaire des microorganismes (ELLIS et HUSTON, 1968). La période longue du cérium-144 (290 jours) permet une expérimentation prolongée. En revanche, elle peut entraîner des risques de contamination importants lors de l'utilisation du marqueur *in vivo* et *in vitro*, et ralentit le rythme des différentes mesures que l'on peut réaliser sur un même animal. Nous avons donc choisi d'utiliser le cérium-141, de période beaucoup plus courte (32,5 j). Les essais que nous décrivons ici ont eu deux objectifs :

- Préciser les conditions de fixation du cérium sur deux aliments broyés à la grille de 10 mm, un foin de luzerne et une céréale (essai n° 1).
- Connaître le comportement du cérium-141 dans le contenu de rumen, *in vivo*, après ingestion en mélange avec l'aliment (essai n° 2).

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Le cérium-141 utilisé ⁽¹⁾ se trouve en solution de radioactivité spécifique voisine de 0,7 MCi/ml. Les mesures de radioactivité ont été effectuées avec un compteur gamma à cristal puits NaI, Tl (SAIP) réglé de façon à ne compter que les émissions du pic photo-électrique à 145 KeV ; la géométrie de comptage a été identique pour tous les échantillons, solides ou liquides.

(1) Commissariat à l'Énergie Atomique (91190 Gif-sur-Yvette).

Essai n° 1 : Étude de la fixation du cérium-141 sur les aliments

Cette expérience préliminaire a eu pour objet, l'étude des facteurs conditionnant la fixation du cérium (pH de la solution, durée d'incubation dans la solution radioactive) sur les deux aliments utilisés ultérieurement dans les expériences *in vivo* (foin et céréale).

Des échantillons de foin de luzerne (3 g) et de sorgho (5 g), broyés et débarrassés de la fraction fine ($\varnothing < 0,25$ mm) par tamisage, ont été placés dans des erlen-meyers de 250 ml contenant 50 ml de solution radioactive, acidifiée par HCl, soit à pH 2,5 (activité volumique de la solution : 1422 dps/ml⁽¹⁾), soit à pH 6 (radioactivité volumique : 1545 dps/ml). Ils ont subi les opérations décrites au schéma n° 1.

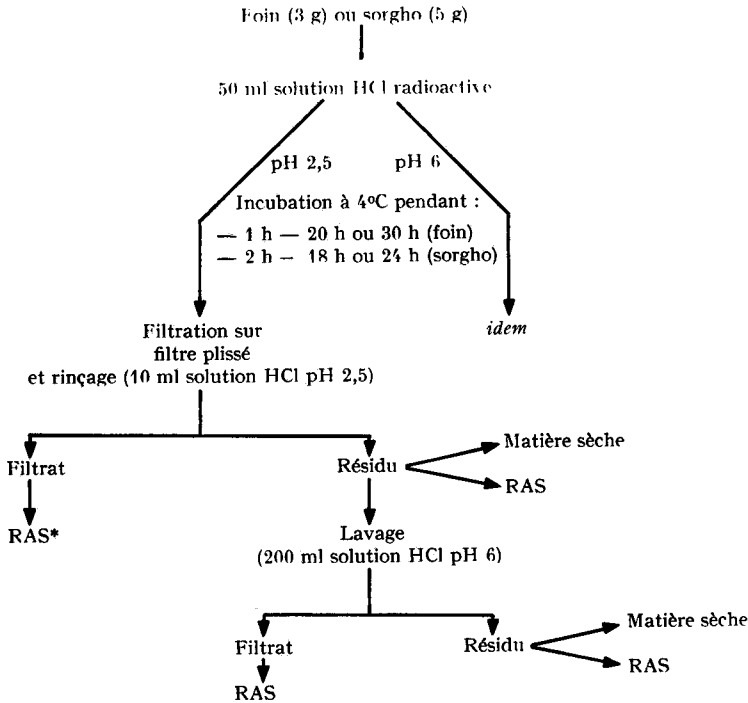


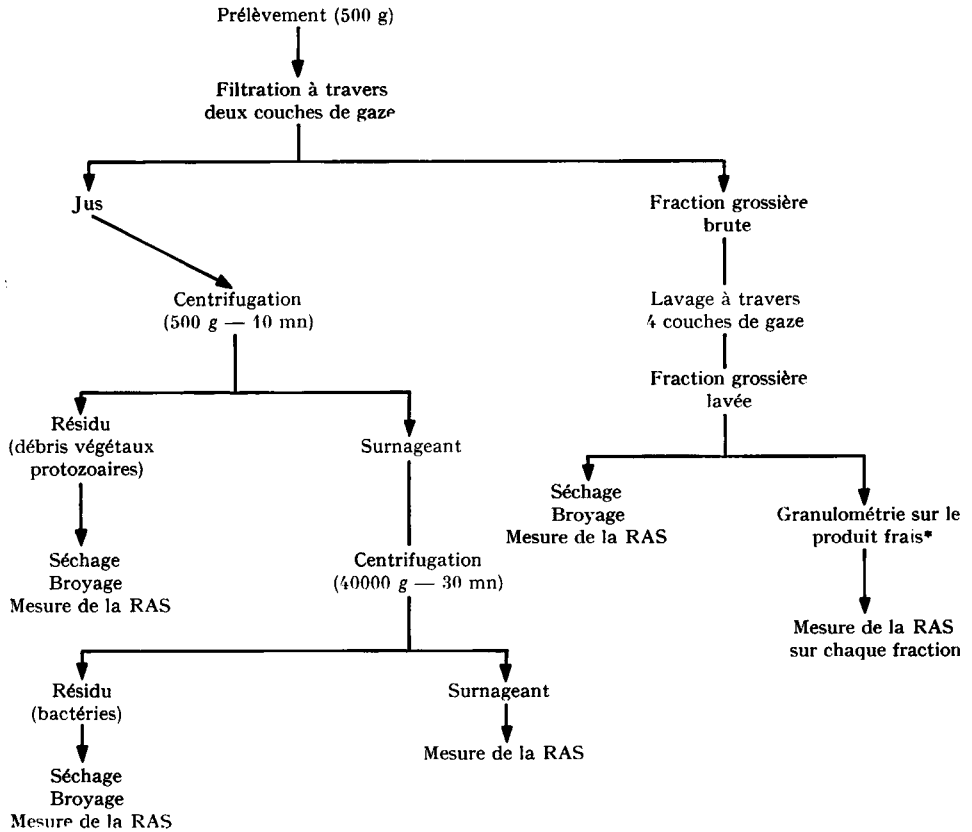
SCHÉMA 1. — Traitements appliqués aux deux aliments étudiés

* RAS = radioactivité spécifique = nombre de désintégrations par minute et par gramme de produit (liquide ou sec)

Essai n° 2 : Évolution de la répartition du cérium-141 dans le contenu du rumen *in vivo*

Deux moutons adultes munis d'une large canule du rumen ont reçu deux fois par jour (9 h, 18 h), 600 g de foin de luzerne et 150 g de sorgho. Le jour de l'expérience, le repas du matin a été marqué par substitution de 75 g de foin radioactif ($\approx 10 \mu\text{Ci}$) à une quantité égale de foin normal, et distribué de telle façon que tout le foin radioactif soit ingéré. Aux heures de prélèvement, environ 2 h, 6 h, 10 h et 22 h après ce repas, la totalité du contenu du rumen a été retirée et homogénéisée; une partie aliquote (≈ 500 g) a été prélevée et le reste réintroduit, la durée totale de cette opération étant inférieure à 5 mn. Les échantillons ainsi prélevés ont été traités selon le schéma n° 2.

(1) dps/ml = désintégration par seconde dans un millilitre de solution.

SCHÉMA 2. — *Traitement des échantillons de contenus de rumen*

* Analyse granulométrique effectuée par tamisage du produit frais sur un tamiseur électromagnétique avec aspersion d'eau (mailles des tamis utilisés, en mm : 2,5 ; 1,25 ; 1,0 ; 0,8 ; 0,4)

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Essai n° 1 (tabl. 1)

La fixation du cérium sur les particules de foin de luzerne est un phénomène rapide et important : après une heure d'incubation, 80 p. 100 de la radioactivité initiale se trouvent fixés sur la matière sèche. Ce pourcentage augmente avec le temps de contact (95 p. 100 après 30 h d'incubation). Le pH de la solution radioactive de départ ne semble pas avoir d'influence sur le pourcentage de radioactivité fixée, quelle que soit la durée d'incubation. La perte de radioactivité du fourrage, consécutive au lavage à pH 6, est relativement faible (5 à 10 p. 100), et celle due au lavage suivant (pH 2,5) encore plus faible (0 à 8 p. 100). Cependant, le petit nombre d'échantillon

analysé ne permet pas de conclure avec certitude sur l'influence éventuelle de la durée et du pH d'incubation, sur l'importance de ce « lessivage » de la radioactivité.

TABLEAU I

Influence de la durée et du pH d'incubation sur le taux de fixation de la radioactivité et sur la solidité de cette fixation

Aliments	Temps d'incubation (h)	pH	Radioactivités (en p. 100 de la radioactivité initiale du bain)		
			après trempage et léger lavage	après premier lavage pH 6	après deuxième lavage pH 2,5
Foin	1	2,5	79	74	71
		6	80	73	72
	20	2,5	86	82	82
		6	88	83	79
	30	2,5	95	85	85
		6	96	87	80
Sorgho	1	2,5	—	—	—
		6	17	16	16
	18	2,5	16	18	—
		6	15	13	—
	24	2,5	25	24	—
		9	24	17	—

L'étude de la fixation du cérium sur un échantillon de sorgho broyé a été plus difficile, car les particules gonflent, se décomposent dans l'eau assez rapidement et les produits filtrent mal ou pas du tout. Le pourcentage de la radioactivité initiale fixée sur les particules du sorgho est relativement faible, mais augmente avec le temps d'incubation (de 17 à 24 p. 100). Le pH du milieu d'incubation n'a pas d'influence sur le pourcentage de radioactivité retenu. Le lavage à pH 6 provoque une perte de radioactivité plus importante que dans le cas du foin (6 à 29 p. 100 de la radioactivité initiale). Cependant, différents filtrats obtenus étant troubles, on peut penser qu'une partie importante de la radioactivité initiale du bain a été entraînée dans le filtrat tout en étant fixée sur une fraction de la matière sèche du sorgho non retenue par le filtre. De plus, il est probable que nous n'avons pas récupéré une part importante des fines particules de RAS élevée (amidon) incrustées dans le filtre. Nous aurions probablement trouvé un pourcentage de radioactivité fixée plus important si nous avions centrifugé la solution d'incubation. Enfin, la surface spécifique du sorgho broyé est plus faible que celle du foin, ce qui diminue la capacité d'adsorption du sorgho.

Comme l'avaient observé HUSTON et ELLIS (1968), le principal facteur influençant l'importance et la solidité de la fixation du cérium sur les particules alimentaires est le temps de séjour de l'aliment dans la solution radioactive. Les quantités de radioactivité adsorbables sur le sorgho sont beaucoup plus faibles que sur le fourrage, et nous avons vu que ce phénomène peut être expliqué sans attribuer au cérium un comportement particulier vis-à-vis de la céréale. TAN *et al.* (1971) ont aussi trouvé des taux de fixation très faibles (36 p. 100 de la radioactivité initiale) du Ruthénium-103 sur du gluten dans une solution radioactive à pH 3, alors qu'à pH 8, le taux de fixation est élevé (80 p. 100). Les auteurs expliquent ce résultat par le fait que le gluten a tendance à devenir gélatineux à pH faible.

Essai n° 2 (fig. 1, 2 ; tabl. 2)

L'évolution de la répartition du cérium entre les différentes fractions séparées du contenu de rumen est sous la dépendance de trois principaux facteurs qui sont la réduction de la taille des particules alimentaires marquées ou non, la vidange du rumen et l'arrivée d'autres aliments dès la fin du repas radioactif (complément du repas et repas marqué suivant). L'interférence de ces 3 facteurs rend l'interprétation des résultats délicate.

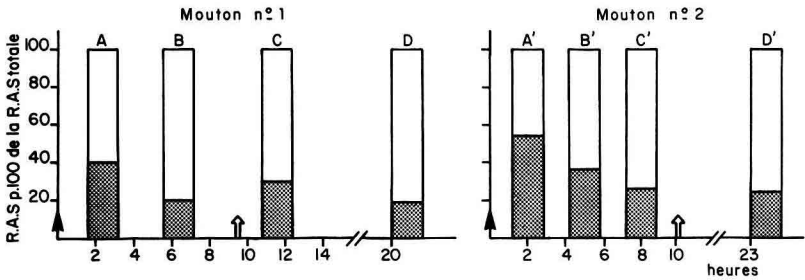


FIG. 1. — Évolution comparée de la RAS du jus (blanc) et de la phase solide (gris) du contenu du rumen, en fonction du temps après le début du repas marqué

flèche noire : repas marqué
flèche blanche : repas non marqué

Deux heures environ après le début du repas marqué, la radioactivité spécifique du jus de rumen est peu différente de la RAS de la fraction grossière (fig. 1). Elle s'enrichit ensuite en radioactivité aux dépens de la radioactivité de la phase solide. L'arrivée dans le rumen de nouvelles quantités de foin non marqué provoque apparemment un phénomène inverse, c'est-à-dire un transfert de radioactivité du jus vers la fraction grossière.

Le liquide surnageant, obtenu par centrifugation du jus, a une radioactivité toujours très faible, probablement liée à la matière sèche soluble qu'il contient (1,5 à 2,5 p. 100 de MS), alors que les protozoaires, les débris végétaux fins, et les bactéries, ont une radioactivité spécifique élevée, beaucoup plus importante que celle de la fraction grossière.

La séparation arbitraire des différentes fractions granulométriques de la phase solide du contenu en deux classes (particules supérieures et inférieures à 1 mm),

montre que la granulométrie des particules du contenu de rumen et la distribution de la radioactivité entre les fractions de différentes tailles (fig. 2) évoluent de façon parallèle. Ceci indique que la fixation du cérium sur les particules solides est indépendante de la taille de ces particules et qu'elle persiste au cours de la digestion.

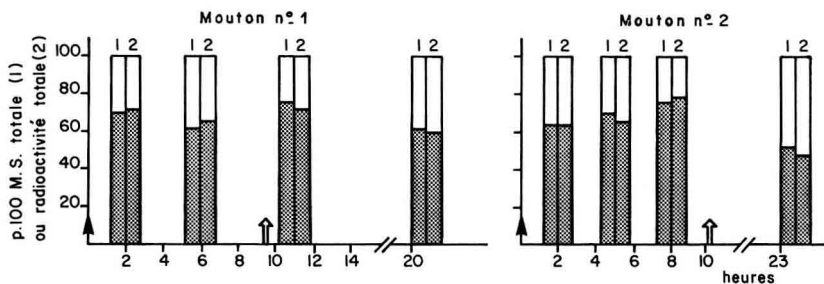


FIG. 2. — Évolution comparée de la matière sèche (1) et de la radioactivité (2) de la fraction grossière entre les particules de différentes tailles (gris : < 1 mm ; blanc : > 1 mm)

TABLEAU 2

Radioactivité spécifique des différentes fractions isolées du jus de rumen par centrifugation et de la phase grossière par analyse granulométrique

Fractions isolées	Radioactivité spécifique (cpm × 10 ⁻² par g)			
	Nombre d'heures après le repas marqué			
	2,5	6,5	11,5	20,5
<i>Jus de rumen :</i>				
- surnageant	6,6	5,1	2,4	2,6
- protozoaires et débris végétaux	124,2	176,8	89,1	81,7
- bactéries	146,1	124,9	98,9	77,6
<i>Phase grossière :</i>				
- Particules :				
• supérieures à 4 mm ...	66,7	44,6	17,2	12,0
• entre 1,25 et 4 mm ...	76,6	32,5	17,4	13,0
• entre 1 et 1,25 mm ...	51,0	26,8	21,3	14,9
• entre 0,8 et 1 mm ...	41,3	27,5	20,5	13,2
• entre 0,4 et 0,8 mm ...	67,3	37,2	21,7	13,6

Entre les prélèvements B et C, s'intercale le repas du soir non radioactif, de même qu'entre les prélèvements A' et C' se situe le repas complémentaire non radioactif du repas du matin. Cette ingestion d'aliments grossiers non marqués s'accompagne normalement de l'accroissement du pourcentage de particules de tailles supérieure à 1 mm dans la fraction grossière mais aussi de l'accroissement du pourcentage de radioactivité de cette fraction. Il s'agit là d'un transfert du marqueur pouvant s'expliquer par la migration et la fixation des bactéries et des protozoaires de RAS élevée, sur

les aliments arrivant dans le rumen ; HUSTON et ELLIS (1968) ont observé, par incubation de contenu de rumen dans une solution radioactive *in vitro*, un transfert de radioactivité des petites particules vers les grosses particules sans observer de changement dans la distribution de la matière sèche entre les différentes fractions granulométriques. Les microorganismes joueraient donc un rôle important dans l'évolution de la distribution du cérium dans le contenu du rumen. Du fait de leur importante surface de contact accessible au cérium, et peut-être aussi, d'autre part, de leur propriété de concentrer les terres rares par voie métabolique (JOHNSON et KYKER, 1966), ils fixent peu de temps après le repas « marqué » une quantité de radioactivité importante prélevée sur les particules végétales qu'ils digèrent.

En conclusion, bien que la méthode utilisée pour séparer la fraction solide de la fraction liquide du contenu de rumen soit critiquable dans la mesure où elle ne permet pas de séparer quantitativement et avec précision les différentes fractions granulométriques, les résultats obtenus montrent que le cérium reste toujours fixé sur la matière sèche du jus de rumen et que, par l'intermédiaire des microorganismes, il peut être transféré sur des particules alimentaires non marquées. Les conséquences prévisibles de ce transport sont importantes, dans le cas où l'on veut utiliser le cérium comme marqueur pour mesurer la vitesse de transit d'un aliment.

Reçu pour publication en décembre 1975.

SUMMARY

USE OF ^{141}Ce AS A PARTICULATE DIGESTA FLOW MARKER IN RUMINANTS.

I. DETERMINATION OF FIXATION ON FEED AND BEHAVIOR IN RUMEN DIGESTA *IN VIVO*

The suitability of ^{141}Ce as a particulate digesta flow marker is studied in sheep.

1. We determine the amount and the factors of cerium fixation on feed particles (solution pH, incubation time) by incubating alfalfa hay and sorghum seeds (ground through a 10 mm screen) in water containing ^{141}Ce in solution (diagram 1) (table 1). After soaking one hour, 80 p. 100 radioactivity is retained on the hay, 17 p. 100 on the sorghum. Incubation time is the main factor determining fixation rate. This fixation is solid on the hay and more fragile on the sorghum when washed two successive times at pH 6 and pH 2.5, respectively.

2. The evolution of ^{141}Ce distribution among the different physical constituents of rumen digesta is studied on two sheep given a single radioactive meal (10 μCi) (diagram 2, fig 1 and 2). These sheep are fitted with a rumen cannula and fed twice daily with hay (80 p. 100) and sorghum (20 p. 100).

There is little ^{141}Ce in solution in the supernatant liquid after centrifugation of digesta.

At the end of the « labelled » meal, specific radioactivity (RAS) of liquid-phase digesta, separated by filtering on two layers of gauze, is equal to or higher than the RAS of the solid phase. It increases up to the next unlabelled meal and then decreases. Microorganisms may cause this transfer of liquid-phase radioactivity to the large particles. Specific radioactivity of the microorganisms remains very high after the « labelled » meal as compared to that of different granulometric fractions of solid digesta (table 2)

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ELAM C. J., PUTNAM P. A., DAVIES R. E., 1959. Faecal excretion pattern of chromic oxide administered to *Hereford* heifers in a completely pelleted ration. *J. Anim. Sci.*, **18**, 718-825.
- ELLIS W. C., 1968. Dysprosium as an indigestible marker and its determination by radioactivation analysis. *J. Agric. Food. Chem.*, **16**, 220-224.

- ELLIS, W. C. HUSTON J. E., 1968. Cérium-144-Pr as a particulate digesta flow marker in ruminants. *J. Nutr.*, **95**, 67-78.
- FRANÇOIS E., COMPÈRE R., RONDIA C., 1968. Étude comparée de la vitesse de passage des aliments et des résidus alimentaires non digérés dans le tractus digestif du Rat et du Mouton. *Bull. Rech. Agronom. Gembloux*, **3**, 655-688.
- GRAY D. H., VOGT J. R., 1974. Neutron activation analyses of stable heavy metals as multiple markers in nutritional monitoring. *J. Agr. Food. Chem.*, **22**, 144-146.
- HUSTON J. E., ELLIS W. C., 1968. An evaluation of certain properties of radiocerium as an indigestible marker. *J. Agr. Food. Chem.*, **16**, 225-230.
- JOHNSON G. T., KYKER G. C., 1966. The mechanism of Cerium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycologia*, **58**, 91-99.
- KOTB A. R., LUCKEY T. D., 1972. Markers in nutrition. *Nutr. Abst. Rev.*, **42**, 813-845.
- KYKER G. C., 1961. In COMAR C. L., BRONNER F. *Mineral metabolism*. Vol. 2, part B, 499-541. Academic Press, New York.
- LUCKEY T. D., KOTB A., VOGT J. R., HUTCHESON D. P., 1975. Feasibility studies in rats fed heavy metals as multiple nutrient markers. *J. Nutr.*, **105**, 660-669.
- McFEE A. F., 1964. Effects of cerium-144 administered to pregnant rats. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **116**, 712-715.
- MILLER J. K., PERRY S. C., CHANDLER P. T., CRAGLE R. G., 1967. Evaluation of radiocerium as a non absorbed reference material for determining gastro-intestinal sites of nutrient absorption and excretion in cattle. *J. Dairy Sci.*, **50**, 355-361.
- TAN T. M., WESTON R. H., HOGAN J. P., 1971. Use of ^{103}Ru -labelled *tris* (1, 10-phenanthroline)-Ruthénium (II) chloride as a marker in digestion studies with sheep. *J. Appl. Rad. Isot.*, **22**, 301-308.
- TERASHIMA Y., ITOH H., MATSUMOTO T., 1969. Cerium-144 as a marker in digestibility trial with ruminants. *Jap. J. Zootech. Sci.*, **40**, 55-60.