

# Simulation *in vitro* des fermentations cœcales du lapin en fermenteur à flux semi-continu.

## I. Rôle du prétraitement du substrat alimentaire

D Adjiri<sup>1</sup>, M Bouillier-Oudot<sup>1</sup>, F Lebas<sup>2</sup>, M Candau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> École nationale supérieure agronomique de Toulouse, laboratoire de zootechnie et de productions animales, 145, avenue du Muret, 31076 Toulouse Cedex;

<sup>2</sup> INRA, laboratoire de recherches sur l'élevage du lapin, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

(Reçu le 8 janvier 1992; accepté le 30 juin 1992)

**Résumé** — Un fermenteur à flux semi-continu de type Rusitec a été utilisé pour étudier l'influence de prétraitements enzymatiques du substrat alimentaire sur le profil fermentaire observé au cours des 2 semaines suivant l'inoculation avec du contenu cœcal de lapin. Trois types de substrat ont été introduits dans le fermenteur : un aliment commercial pour lapins, simplement broyé; la partie solide de cet aliment, restant après un traitement de 24 h par une  $\alpha$ -amylase; le substrat 2 ayant subi en plus un traitement de 4 h par de la pepsine (double traitement enzymatique). Chaque jour, l'un des 2 sachets nylon contenant 15 g du substrat étudié est remplacé par un nouveau, ce qui conduit à une durée de fermentation uniforme de 48 h. En 5-6 j, la fermentation de l'aliment non traité conduit à un profil fermentaire totalement différent de celui observé *in vivo* dans un cæcum de lapin : l'acide propionique dépasse 35% des acides gras volatils (AGV) totaux et l'acide butyrique représente environ 15% de ces derniers. Le traitement par l'amylase seule conduit à un profil fermentaire stable plus proche de celui observé *in vivo*, mais où les acides propionique et butyrique ont des proportions très voisines, proches de 15% des AGV totaux. Le double traitement par l'amylase et la pepsine induit un faciès fermentaire stable, tout à fait comparable à celui observé *in vivo* :  $C_2 > 60\%$ ;  $C_3 < 11\%$  et  $17\% < C_4 < 21\%$ . Pour ce dernier substrat, le taux de disparition des constituants membranaires (ADF de Van Soest) en 48 h, est comparable au coefficient de digestibilité mesuré *in vivo* par d'autres auteurs pour le même aliment de base. Enfin, il convient de signaler la présence d'un taux élevé d'acides gras volatils à 5 carbones (environ 5%) qui pourrait être due au mode discontinu d'approvisionnement du fermenteur : un sachet nouveau y est en effet introduit toutes les 24 h. En conclusion, un double prétraitement de l'aliment par une  $\alpha$ -amylase et de la pepsine permet de simuler *in vitro* les fermentations cœcales du lapin dans un fermenteur semi-continu de type Rusitec.

**lapin / cæcum artificiel / substrat / prétraitement / acide gras volatil**

**Summary** — *In vitro* simulation of rabbit caecal fermentation in a semi-continuous flow fermentor. I. Effect of food substrate pretreatment. A Rusitec semi-continuous flow fermentor was used to study the influence of enzyme pretreatment of food substrates on the fermentation profile over a 2-week period following inoculation with rabbit caecal contents. Three types of substrate were examined: 1) homogenized commercial rabbit feed; 2) the solid remains of this feed after digestion with  $\alpha$ -amylase for 24 h; and 3) substrate 2 digested for 4 h with pepsin (double enzyme treatment). One of a pair of nylon pouches containing 15 g substrate was replaced each day, thus producing a uniform 48-h fermentation. Fermentation of the untreated feed (1) for 5-6 days produced a fermenta-

tion profile quite different from that obtained *in vivo* in the rabbit caecum: propionic acid accounted for over 35% of total volatile fatty acid (VFA), and butyric acid for about 15%. Amylase digestion (2) gave a stable ferment profile closer to the *in vivo* profile, except that propionic and butyric acids were similar at 15% of total VFA. Digestion with both amylase and pepsin (3) produced a stable fermentation profile very close to the *in vivo* profile:  $C_2 > 60\%$ ,  $C_3 < 11\%$  and  $17\% < C_4 < 21\%$ . The rate at which membrane constituents (acid detergent fibre, ADF) were lost in 48 h was similar to the digestibility coefficient measured *in vivo* by others for the same basic feed. Lastly, there was a high percentage (about 5%) of volatile  $C_5$  fatty acids; this could be due to the discontinuous fermentor input of one pouch per 24 h. Thus, feed pretreated with both amylase and pepsin simulates, *in vitro*, rabbit caecal fermentation in a semi-continuous Rusitec type fermentor.

### **rabbit / artificial caecum / substrate / initial treatment / volatile fatty acid**

## **INTRODUCTION**

Chez le lapin, les processus digestifs sont dominés par la succession d'une dégradation enzymatique dans l'intestin grêle avec absorption des produits issus de cette dégradation, suivie d'une fermentation du bol alimentaire dans le cæcum. Contrairement aux autres herbivores monogastriques (cheval, cobaye) et aux ruminants en général, le profil des acides gras volatils (AGV) du contenu du fermenteur digestif est caractérisé, chez le lapin, par une proportion d'acide butyrique supérieure à celle de l'acide propionique.

Les troubles digestifs du lapin sont presque systématiquement associés à une perturbation de cet équilibre des AGV (Prohaszka, 1980; Morisse *et al*, 1985). Il est donc nécessaire de bien en analyser le déterminisme. L'étude *in vivo* des paramètres susceptibles d'influencer la teneur et la proportion des AGV est difficile, en particulier, en raison des problèmes de canulation cæcale et surtout des artefacts associés aux prélèvements trop rapprochés. L'observation *in vivo* est même parfois impossible pour certains métabolites rapidement absorbés à travers la paroi cæcale. Par contre, l'étude *in vitro* des facteurs de variation du profil fermentaire peut être un outil d'investigation intéressant dans la mesure où une perturbation de la flore n'entraîne pas de réaction de la part de «l'hôte».

Des travaux en fermenteur clos ont été publiés par différents auteurs (Tafari, 1981; Salse, 1985). Ils permettent d'étudier par exemple la vitesse initiale d'hydrolyse, mais rapidement les fermentations sont inhibées par l'accumulation des métabolites issus de l'activité de la flore elle-même. Ce modèle de fermenteur *in vitro* ne peut donc permettre d'étudier que les paramètres pouvant influencer l'activité de la flore dans les quelques heures suivant la fermeture du système. Par voie de conséquence, ils ne sont pas adaptés aux études sur une longue période.

C'est pourquoi nous nous proposons de mettre au point un cæcum artificiel sous forme d'un fermenteur «ouvert» permettant des études sur plusieurs jours et pouvant ainsi devenir l'outil d'investigation mentionné plus haut. Pour accélérer la mise au point de ce cæcum artificiel, nous sommes partis d'un fermenteur semi-continu du type Rusitec (Czerkawski et Brekenridge, 1977). Rappelons simplement que dans ce type de fermenteur, le matériel alimentaire solide est introduit périodiquement et qu'un flux continu de «salive artificielle» permet une évacuation continue des produits de la fermentation.

Le présent travail vise à déterminer les conditions de préparation du substrat alimentaire introduit chaque jour dans le fermenteur, de manière telle que le profil fermentaire des AGV soit stable et conforme à celui du lapin : prédominance de l'acide acétique et teneur en acide butyrique supé-

rière à celle de l'acide propionique. À cette fin, et pour estimer le rôle de la digestion dans l'intestin grêle sur les caractéristiques du profil fermentaire, nous avons comparé l'effet d'un traitement de l'aliment par de l'amylase, suivi ou non par un traitement par de la pepsine, en comparaison avec le profil observé *in vitro* avec l'aliment brut non traité.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Nature et réalisation des substrats

Trois types de substrat ont été réalisés. Le premier est un aliment de type commercial «lapin-croissance» (substrat ALIMENT) constitué de 40% de luzerne deshydratée, 30% d'orge, 10% d'avoine, 10% de tourteau de tournesol, 5% de tourteau de soja et 5% d'un complément minéral vitaminisé. Il est employé après un simple broyage des granulés (grille de 1 mm).

Le 2<sup>e</sup> substrat est obtenu à partir de cet aliment par un prétraitement à l'amylase (substrat AMYL). Ce dernier est réalisé de la manière suivante : un mélange de 750 g d'aliment broyé et de 60 g d'amylase (EC 3.2.1.1. Sigma réf A3176) dans 3,75 l d'eau est mis à incuber sous agitation à 39 °C durant 24 h. Ce mélange est ensuite filtré sur une toile à bluter de 150 µm de vide de maille. Le résidu est lavé, puis séché à 60 °C.

Le 3<sup>e</sup> substrat correspond au même aliment soumis à l'hydrolyse amyliques précédente, suivie d'une dégradation par la pepsine (substrat AMYL-PEPS). Après l'incubation en présence d'amylase et avant filtration, le produit est l'objet d'une acidification jusqu'à pH 1,5 par action d'acide chlorhydrique. Il est ensuite incubé 4 h dans les mêmes conditions, en présence de 15 g de pepsine (EC 3.4.23.1 Merk réf 7190). Le pH du mélange est ensuite élevé entre 5 et 6 par de la soude, avant filtration, lavage et séchage du résidu.

### Appareillage de fermentation

Comme indiqué plus haut, le système de fermentation utilisé est celui mis au point par Czerkawski et Brekenridge en 1977 pour simuler les fermentations dans le rumen. L'équipement comprend 4 fermenteurs indépendants, en altuglass, de 1 l de volume et maintenus dans un bain thermostaté à 39 °C. Les substrats solides sont contenus dans 2 sachets de 15 x 8 cm, fabriqués avec un tissu de nylon ayant un vide de maille de 150 µm. Ces sachets sont introduits dans un flacon plastique perforé et soumis à un mouvement linéaire alternatif à l'intérieur du fermenteur. Une solution saline (tableau I) est apportée en continu et les effluents liquides et gazeux évacués par trop plein. Seuls les premiers sont récupérés.

Devant le peu d'information disponible concernant la composition minérale des contenus iléaux et cœcaux du lapin, la composition de la so-

**Tableau I.** Composition de la solution saline infusée dans les fermenteurs.

Bicarbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> ) mg/l	9 240
Phosphate disodique (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O) mg/l	7 125
Chlorure de sodium (NaCl) mg/l	470
Chlorure de potassium (KCl) mg/l	450
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> anhydre) mg/l	55
Chlorure de magnésium (MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O) mg/l	72
Sulfate de sodium (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) mg/l	22,20 <sup>a</sup>
Sulfate de zinc (ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O) mg/l	4,40
Chlorure de cobalt (CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O) mg/l	1,20
Sulfate de manganèse (MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O) mg/l	19
Sulfate ferreux FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O mg/l	36,80
Sulfate de cuivre (CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O) mg/l	0,98

<sup>a</sup> La quantité de sulfate de sodium varie en fonction de la quantité d'azote uréique apportée : 47,3 mg/l pour AMYL, 58,5 pour AMYL-PEPS

lution saline dérive de celle utilisée pour la simulation des fermentations du rumen en Rusitec (Blanchart *et al*, 1989). Seule la teneur en phosphate a été modifiée pour obtenir un pH voisin de celui du contenu iléal du lapin (pH > 7,5–8). Cette solution doit permettre d'assurer le pouvoir tampon du milieu ainsi que les apports indispensables en oligo-éléments pour assurer la croissance microbienne.

### **Ensemencement et mise en œuvre des fermentations**

Chaque fermenteur estensemencé à partir du contenu de 5 cæca provenant de lapins nourris avec un aliment comparable à l'aliment expérimental. Après sacrifice des animaux, les contenus cæcaux sont recueillis dans 300 ml de mélange eau-solution saline (2/1, v/v), maintenu à 39 °C sous barbotage de CO<sub>2</sub>. Le mélange est filtré sur 4 couches de gaze et 400 ml de filtrat sont introduits dans le fermenteur, constituant l'inoculum liquide. Le contenu du fermenteur est ensuite complété à 1 l avec le mélange eau-solution saline. Environ 100 g de résidu solide de filtration contenus dans un sachet de nylon sont introduits dans le fermenteur pour constituer l'inoculum solide. Simultanément, est introduit le 2<sup>e</sup> sachet avec 15 g de substrat expérimental. Après fermeture du fermenteur, une perfusion de solution saline assure, pendant toute la durée de l'observation, un renouvellement de la phase liquide de 0,5 l/j.

Vingt quatre heures après la mise en route, le sachet contenant l'inoculum solide est remplacé par un sachet contenant 15 g de substrat. Chaque jour est ensuite assuré le renouvellement du sachet ayant séjourné 48 h dans le fermenteur.

Les 2 fermenteurs recevant les substrats AMYL et AMYL-PEPS reçoivent en outre, une complémententation azotée journalière, calculée de manière à assurer un apport global de 17 g de MAT pour 100 g de substrat, apport voisin de celui du contenu iléal du lapin. Cette complémententation n'est pas nécessaire pour l'aliment non traité. Elle est assurée pour moitié sous forme d'urée dans la solution minérale et pour moitié sous forme de peptone de caséine introduite directement dans le fermenteur.

### **Paramètres étudiés**

Le pH est mesuré journallement dans chaque fermenteur au moment de l'ouverture.

Dans le volume d'effluent recueilli chaque 24 h, sont déterminées les concentrations en azote ammoniacal par colorimétrie, en azote protéique (dosage de l'azote total sur le culot de centrifugation obtenu après précipitation à l'acide trichloracétique à 10%) et en AGV par chromatographie en phase gazeuse (Jouany, 1982).

Sur les résidus des sachets, sont déterminées les teneurs en matière sèche, en matière organique et les constituants pariétaux NDF et ADF (Van Soest et Wine, 1967), de manière à estimer la dégradation de chaque constituant sur 48 h (DMS, DMO, DNDF, DADF).

### **Analyse mathématique des résultats**

À partir des données recueillies chaque jour sur chaque fermenteur, les valeurs moyennes par fermenteur ont été comparées par analyse de variance selon un schéma factoriel incluant les effets fermenteur et jour de contrôle (bibliothèque statistique SAS-micro). Les moyennes sont fournies avec indication de l'écart type de la moyenne ( $m \pm s_m$ ).

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

La composition chimique des substrats utilisés dans les fermenteurs est présentée au tableau II en référence à la composition chimique du contenu de l'iléon de lapins recevant le même aliment de base (valeurs relevées par Gidenne et Ruckebusch en 1989). L'aliment non traité présente une teneur en amidon très supérieure à celle du contenu iléal, un niveau de matières azotées totales très voisin et une teneur en constituants pariétaux (NDF) inférieure. Après traitement enzymatique, la concentration en amidon est fortement réduite. Elle approche celle du contenu iléal. Par contre, la teneur en fibres des 2 substrats AMYL et AMYL-PEPS est supérieure à celle du contenu iléal. Après une phase d'adaptation de 4–5 j, l'utilisation des substrats AMYL et AMYL-PEPS a pour conséquence un pH du milieu fermentaire supé-

**Tableau II.** Composition chimique des différents substrats. Comparaison avec la composition du contenu iléal déterminée par Gidenne et Ruckebusch (1989).

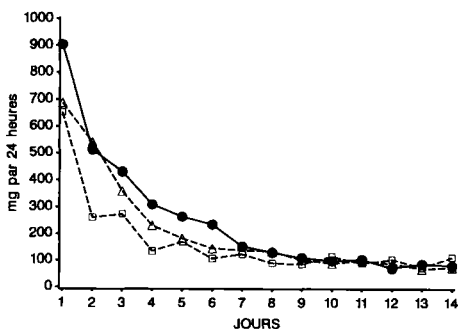
Substrat	ALIMENT	AMYL	AMYL-PEPS	Iléon <sup>a</sup>
g/kg MS				
Matière organique	906	930	912	834 ( 6)
MAT	175	92	74	155 ( 6)
Amidon	207	15	14	13 ( 2)
NDF	336	665	691	455 (20)
ADF	205	435	474	307 (20)

<sup>a</sup> Valeurs moyennes et erreur standard entre parenthèses pour prélèvements iléaux sur 6 lapins alimentés avec l'aliment non traité (ALIMENT) (Gidenne et Ruckebusch, 1989)

rier à celui obtenu avec l'aliment non traité (6,5–6,8 vs 6,4), et supérieur au pH observé *in vivo* (5,8–6,2).

### Production azotée

L'évolution journalière de l'azote protéique recueilli dans les effluents suit, quel que soit le substrat utilisé, une courbe de type exponentiel décroissant (fig 1). Après une chute continue durant les 5 ou 6 premiers



**Fig 1.** Influence du prétraitement enzymatique du substrat sur l'évolution journalière de l'azote protéique (mg/j) recueilli dans l'effluent du cæcum artificiel. Fermenteur ALIMENT : cercles pleins; fermenteur AMYL : carrés vides; fermenteur AMYL-PEPS : triangles vides.

jours, on observe une stabilisation au voisinage de 100 mg/j quel que soit le fermenteur considéré (tableau III).

Malgré une possible contamination des effluents par de l'azote issu du substrat (Blanchart *et al*, 1989), l'azote protéique de l'effluent peut être assimilé pour l'essentiel à de l'azote microbien (Fuller et Johnson, 1981). On observe donc, dans les premiers jours de fermentation, un lessivage microbien. Celui-ci semble lié au fait qu'à un inoculum important (50 g de MS environ) et riche en matériel microbien issu des contenus cœcaux de 5 lapins, seulement 15 g de matière sèche sont apportés journalièrement par fermenteur, soit un flux nettement inférieur à celui observé *in vivo* au niveau cœcal : de l'ordre de 80–100 g de MS entrent chaque jour dans le cæcum, pour un contenu représentant 25–30 g de MS. Cette chute de la population microbienne, induite par une diminution drastique de la disponibilité en substrat, se poursuit jusqu'à obtention de l'équilibre entre flux alimentaire et croissance microbienne. Celui-ci semble survenir au bout de 6 j environ.

Toutefois, l'estimation de l'azote microbien de l'effluent (approché par l'azote protéique) ne constitue qu'une fraction de l'azote microbien produit. Le complément

**Tableau III.** Influence du traitement enzymatique du substrat sur les paramètres de dégradation et fermentaires en cæcum artificiel\*.

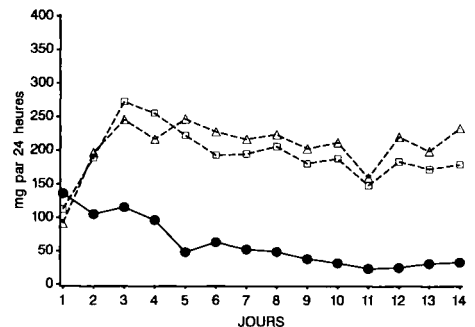
	ALIMENT	AMYL	AMYL-PEPS
pH	6,40 ± 0,04 <sup>b</sup>	6,68 ± 0,03 <sup>a</sup>	6,67 ± 0,04 <sup>a</sup>
N-NH <sub>3</sub> mg/j	35,2 ± 10,4 <sup>c</sup>	181,0 ± 16,8 <sup>b</sup>	220,0 ± 19,2 <sup>a</sup>
N-Prot mg/j	102,9 ± 26,7	98,0 ± 17,4	97,5 ± 25,6
AGV mmol/l	95,2 ± 6,2 <sup>a</sup>	80,7 ± 7,3 <sup>b</sup>	83,0 ± 3,3 <sup>b</sup>
C <sub>2</sub> %	42,7 ± 1,7 <sup>b</sup>	62,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	64,1 ± 1,1 <sup>a</sup>
C <sub>3</sub> %	35,9 ± 3,2 <sup>a</sup>	14,2 ± 0,9 <sup>b</sup>	10,3 ± 1,2 <sup>c</sup>
IsoC <sub>4</sub> %	1,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,0 <sup>a</sup>
C <sub>4</sub> %	15,4 ± 3,9 <sup>b</sup>	16,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	18,8 ± 1,1 <sup>a</sup>
IsoC <sub>5</sub> %	1,0 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
C <sub>5</sub> %	4,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,2 <sup>b</sup>

\* Valeurs moyennes obtenues sur 8 j de fermentation, après 6 j d'adaptation. a, b, c Les moyennes associées à des lettres différentes sont significativement différentes au seuil  $P < 0,001$ , sur une même ligne.

est représenté par les microorganismes attachés au substrat solide resté dans les sachets nylon. La détermination de cette fraction supposerait la séparation du matériel microbien du substrat (technique du «stomacher») et/ou le dosage des substances microbiennes spécifiques (ARN, acide diaminopimélique), ou encore l'emploi de marqueur (<sup>15</sup>N). Ceci n'ayant pas été envisagé dans cette première étape, nous ne pouvons pas établir de bilan de la synthèse microbienne dans nos fermenteurs.

Contrairement à l'azote protéique dont la production est indépendante du substrat mis à fermenter, les quantités d'azote ammoniacal recueillies dans les effluents des fermenteurs alimentés avec les substrats AMYL et AMYL-PEPS sont, après la période d'adaptation, très supérieures à celles recueillies pour l'aliment non traité (181 et 220 vs 35 mg/j) (tableau III, fig 2). Cette production plus élevée d'N-NH<sub>3</sub> peut être attribuée essentiellement à la complémentarité importante en urée apportée avec les substrats prétraités. Celle-ci est

rapidement hydrolysée par les microorganismes cæcaux entraînant un excès relatif d'ammoniaque non utilisé pour les synthèses microbiennes. Cet écart de production peut être relié au pH plus faible constaté avec le substrat ALIMENT. Par ailleurs, on doit remarquer que la concentration moyenne en N-NH<sub>3</sub> dans les fermenteurs AMYL et AMYL-PEPS, - 360–440 mg/l -, est comparable à celle obser-



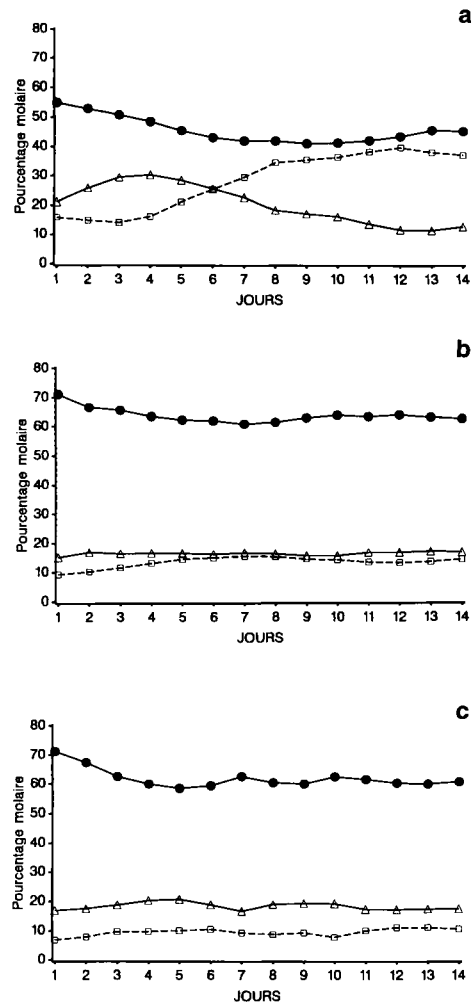
**Fig 2.** Évolution quotidienne de l'azote ammoniacal recueilli dans l'effluent des 3 fermenteurs (mg/j). Fermenteur ALIMENT : cercles pleins; fermenteur AMYL : carrés vides; fermenteur AMYL-PEPS : triangles vides.

vée *in vivo* dans le contenu cœcal, - 360–560 mg/l -, par Gidenne (1986). En conséquence, c'est la teneur en N-NH<sub>3</sub> associée au substrat ALIMENT qui doit être considérée comme réduite *in vitro* par rapport à la valeur *in vivo*. Il est alors logique de penser à une plus faible activité bactérienne associée à ce substrat, du moins pour les bactéries productrices d'N-NH<sub>3</sub>, malgré un flux azoté total comparable. La qualité de ce flux azoté, essentiellement protéique, est probablement en cause.

### Production d'AGV

En présence du substrat ALIMENT, les premiers jours de fermentation font apparaître, pour les acides gras volatils, un profil assimilable à celui des fermentations cœcales. Il y a bien prédominance de l'acide butyrique (C<sub>4</sub>) sur l'acide propionique (C<sub>3</sub>) avec toutefois une proportion faible d'acide acétique (50%) en regard de celle observée *in vivo*. Cependant ce profil n'est pas stable dans le temps (fig 3a), et dès le 6<sup>e</sup> jour de fermentation, le rapport butyrate/propionate s'inverse en faveur de l'acide propionique qui atteint une valeur élevée (C<sub>3</sub> > 35%). Parallèlement, la teneur en C<sub>4</sub> diminue lentement. Après une dizaine de jours, on observe un faciès fermentaire similaire à celui du rumen d'un polygastrique alimenté avec un régime riche en amidon.

En présence de l'aliment traité uniquement avec l'amylase (fig 3b), les proportions molaires des différents AGV apparaissent beaucoup plus stables au cours du temps. La proportion d'acide acétique (C<sub>2</sub>) est supérieure à 60%, valeur comparable à celle observée *in vivo* dans le cæcum du lapin (60–80% en fonction des conditions d'observation). Effectivement, Lang (1981) et Morisse *et al* (1985) mentionnent des proportions de C<sub>2</sub> évoluant de



**Fig 3.** Répartition des principaux acides gras volatils produits journalièrement dans chacun des 3 fermenteurs : a) substrat ALIMENT, b) substrat AMYL, c) substrat AMYL-PEPS. Acide acétique : cercles pleins; acide propionique : triangles; acide butyrique : carrés.

60 à 65%, tandis que Fioramonti et Ruckebusch (1976) et Gidenne *et al* (1991) observent des proportions d'acide acétique allant jusqu'à 78%. Par contre, malgré une

prédominance légère mais significative ( $P < 0,001$ ) de l'acide butyrique, les niveaux de celui-ci et de l'acide propionique sont très voisins et se stabilisent autour de 15%. Cette valeur est relativement élevée pour de l'acide propionique provenant de fermentations cœcales.

En présence de l'aliment traité par l'amylase et la pepsine, les fermentations conduisent à un faciès d'AGV (fig 3c) typique des fermentations cœcales du lapin, avec une grande stabilité sur l'ensemble de la période de fermentation ( $C_2 > 60\%$ ,  $C_3 < 11\%$  et  $17\% < C_4 < 21\%$ ).

Par ailleurs, quel que soit le substrat utilisé, les fermentations se caractérisent par un niveau élevé des acides  $C_5$  et iso $C_5$  (1,0–2,8% et 2,8–4%, respectivement). Nous avons également détecté la présence de  $C_6$ , mais les teneurs n'ont pas été quantifiées. Selon Kolb (1975), l'acide valérique ainsi observé pourrait provenir du catabolisme des protéines, et en particulier de la lyse bactérienne. Bien que peu d'auteurs mentionnent les teneurs en ces acides gras volatils chez le lapin, nos observations sont en contradiction avec celles de Dehalle et Lebas (1981) et Gidenne (1986) qui, pour les lapins alimentés à volonté, mentionnent des teneurs inférieures à 1% en  $C_5$  et iso $C_5$ . Cependant, Demaux *et al* (1981) observent, en fin de repas chez les animaux nourris en un repas par jour, une élévation au-delà de 8% des AGV totaux, pour l'ensemble  $C_5$ , iso $C_5$  et  $C_6$ . Cette proportion redescend à 3% après 6 h. Au vu de nos résultats, l'utilisation dans notre cas d'une technique de fermentation en semi-continu s'apparente semble-t-il à cette dernière conduite alimentaire.

Enfin, la concentration moyenne des acides gras volatils totaux (tableau III) apparaît légèrement, mais significativement plus élevée en présence de l'aliment non traité. Ceci est à relier à la présence d'ami-

don et de sucres solubles rapidement fermentés, alors que ceux-ci ont été en majeure partie éliminés par les traitements subis par les deux autres substrats plus riches en fibres.

### **Conditions générales de fermentation**

Nos différents résultats ont été obtenus chaque fois avec 2 semaines d'observations quotidiennes, mais avec un seul fermenteur par type de substrat. Toutefois, les travaux conduits en parallèle par l'un d'entre nous (Adjiri, données non publiées) ont déterminé la répétabilité entre fermenteurs des profils fermentaires. Pour un même substrat et des conditions identiques, les écarts observés entre fermenteurs pour les différents paramètres fermentaires en général et les proportions d'AGV en particulier sont toujours nettement inférieures à celles observées ici en fonction du substrat, y compris la différence entre AMYL et AMYL-PEPS pour les proportions de  $C_3$  et de  $C_4$ . Nos observations sont donc généralisables.

Ainsi, seul le prétraitement par l' $\alpha$ -amylase et la pepsine, simulant la digestion enzymatique pré-cœcale, nous a permis de maintenir *in vitro* des fermentations dont le faciès se rapproche de celui des fermentations cœcales du lapin. La présence d'amidon semble inhiber la production d'AGV. Compte tenu du taux de disparition des constituants membranaires du substrats AMYL-PEPS (DNDF de  $24,5 \pm 5,6\%$  et DADF de  $17,4 \pm 6,8\%$ ) nous pouvons penser que les AGV observés dans l'effluent ont pour origine principale la dégradation microbienne des constituants fibreux. Nous devons également souligner que notre coefficient moyen de disparition de ADF est tout à fait comparable à celui observé *in vivo* pour le même aliment : CUDa de  $15,0 \pm 2,6\%$  (Gidenne et Ruckebusch, 1989).



La seule élimination de la majeure partie de la fraction amyliacée n'est pas suffisante pour assurer un substrat adéquat simulant le contenu iléal entrant dans le cæcum. L'élimination d'une fraction de l'azote protéique alimentaire insoluble dans l'eau et/ou la modification structurelle de la fraction restante, à la suite du traitement par la pepsine, s'avère aussi utile pour orienter les fermentations vers un faciès cæcal. Les aspects quantitatifs de l'apport azoté ne semblent pas en cause, dans la mesure où l'azote alimentaire éliminé par le prétraitement pepsique est remplacé par une quantité équivalente d'azote sous forme uréique et peptidique. Entre les 2 substrats AMYL et AMYL-PEPS, les complémentations azotées ainsi réalisées sont assez proches : 7,8 g pour 100 g du premier substrat et 9,6 g pour 100 g du second. Aussi, il nous semble peu probable que ce modeste écart d'apport uréique et de peptone puisse entraîner à lui seul la différence sensible de faciès observée pour les acides butyrique et propionique. Considérer cette modification du faciès comme la conséquence de l'effet du traitement pepsique sur la modification de la structure protéique nous paraît plus vraisemblable, mais nous ne pouvons, dans le cadre de cette expérience, en apporter la preuve formelle.

## CONCLUSION

En utilisant un fermenteur semi-continu, à partir d'un inoculum constitué par du contenu cæcal et en employant un substrat préalablement traité par voie enzymatique, nous avons réussi à maintenir sur l'ensemble d'une période d'observation de 2 semaines, des fermentations présentant, sur la base des profils en AGV produits, les principales caractéristiques fermentaires cœcales du lapin.

À partir d'un aliment de type commercial, un double traitement enzymatique par l'amylase et la pepsine visant à simuler les dégradations pré-cœcales apparaît nécessaire pour fournir un substrat adéquat se rapprochant du contenu iléal et assurer ainsi un profil de fermentation de type cæcal.

Si l'élimination de la majeure partie de l'amidon alimentaire ne semble pas suffisante pour obtenir un substrat adéquat, le traitement par la pepsine apparaît indispensable, plus par les transformations qualitatives qu'il entraîne que par la diminution de l'azote du substrat.

Enfin, si nous avons mis en évidence la possibilité de simuler *in vitro* les fermentations cœcales du lapin, ce travail ne constitue qu'une première étape de mise au point qu'il est nécessaire de poursuivre pour mieux cerner les conditions de mise en œuvre et ainsi s'approcher au plus près des conditions physiologiques du cæcum *in vivo*. De nombreux points restent encore obscurs. Il faudra par exemple connaître le rôle précis de l'origine de l'inoculum employé sur le faciès fermentaire : serait-il le même avec un inoculum ruminal appliqué au substrat AMYL-PEPS, qu'avec un inoculum cæcal de lapin ? Sa masse initiale devra également faire l'objet d'investigations. Il conviendra aussi de bien déterminer le rôle des apports azotés complémentaires utilisés, en quantité et en nature. Enfin une adaptation technique devrait être trouvée pour permettre d'étudier des temps de séjour en fermenteur beaucoup plus courts et proches des conditions physiologiques (8–12 h). Sous cet angle, en dehors des contraintes d'emploi du temps, la principale difficulté actuelle est la rupture relative d'anaérobiose associée à chaque ouverture de la cuve de fermentation pour y introduire le ou les nouveaux sachets.

En conclusion, cette technique semble être un outil perfectible mais déjà efficace,

devant contribuer à l'avenir à l'étude du rôle des substrats entrant dans le cæcum, sur l'activité fermentaire qui s'y développe.

## RÉFÉRENCES

- Blanchart G, Durand M, Barry JL, Bouillier-Oudot M, Jouany JP (1989) Intérêts et limites des fermenteurs à flux semi-continu de type Rusitec dans l'étude des fermentations du rumen. *Ann Zootech* 38, 285-314
- Czerkawski JW, Brekenridge G (1977) Design and development of a long-term rumen simulation technic (Rusitec). *Br J Nutr* 38, 371-384
- Dehalle C, Lebas F (1981) Incidence de régimes alimentaires à base de luzerne sur la composition en acides gras volatils du contenu digestif chez le lapin. *Reprod Nutr Dev* 21, 867
- Demaux G, Guémon L, Gallouin F (1981) Temporal changes of some biochemical and histological parameters at different levels in the rabbit digestive tract. *Reprod Nutr Dev* 21, 868
- Fioramonti J, Ruckebusch Y (1976) La motricité cæcale chez le lapin. III. Dualité de l'excrétion fécale. *Ann Rech Vét* 7, 281-295
- Fuller JR, Johnson DE (1981) Monensin and lasalocid effects on fermentations *in vitro*. *J Anim Sci* 53, 1574-1580
- Gidenne T, Ruckebusch Y (1989) Flow and passage rate studies at the ileal level in the rabbit. *Reprod Nutr Dév* 29, 403-412
- Gidenne T (1986) Évolution nyctémérale des produits de la fermentation bactérienne dans le tube digestif du lapin en croissance. Relations avec la teneur en lignine de la ration. *Ann Zootech* 35, 121-136
- Gidenne T, Scalabrini F, Marchais C (1991) Adaptation digestive du lapin à la teneur en constituants pariétaux du régime. *Ann Zootech* 40, 73-84
- Jouany JP (1982) Dosage des acides gras volatils (AGV) et des alcools dans les contenus digestifs, le jus d'ensilage, les cultures bactériennes et les contenus de fermenteurs anaérobies. *Sci Alim* 2, 131-144
- Kolb E (1975) *Physiologie des animaux domestiques*. Éditions Vigot Frères, Paris
- Lang J (1981) The nutrition of commercial rabbit. I. Physiology, digestibility and nutrient requirements. *Nutr Abstr Rev* 51, 197-225
- Morisse JP, Boilletot E, Maurice R (1985) Alimentation et modifications du milieu intestinal chez le lapin (AGV, NH<sub>3</sub>, pH, flore). *Rec Méd Vét* 161, 443-449
- Prohaszka L (1980) Antimicrobial effect of volatile fatty acids in enteric *Escherichia coli* infections of rabbits. *Zbl Vet Med B27*, 631-639
- Salse A (1985) Development of an artificial cecum and quality of the obtained product. *Reprod Nutr Dev* 32, 491-501
- Tafari JP (1981) Étude de l'utilisation digestive des fibres alimentaires chez le lapin par la technique du cæcum artificiel. Thèse de Doctorat vétérinaire, Fac Méd Créteil, 111 p
- Van Soest PJ, Wine RH (1967) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. *J Assoc Offic Agric Chem* 50, 50-55