

Mesure du potentiel redox dans le cæcum du lapin: premiers résultats méthodologiques

M. KIMSÉ, T. GIDENNE, C. BAYOURTHE, V. MONTEILS

INRA Toulouse, UMR1289, TANDEM, BP 52627, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

Résumé- L'objectif de cette étude est la mise au point d'une méthode de mesure du potentiel redox (Eh) dans le cæcum du lapin, afin d'estimer l'état d'anaérobiose du milieu cæcal. Le pH, l'Eh et la température cæcale ont été mesurés selon deux méthodes (*in vivo* vs *post mortem*) et à 3 heures dans la journée (8-10h, 12-14h, 18-19h). Les mesures ont porté sur un total 34 lapins âgés de 65 jours et pesant en moyenne 2,2 kg. Le pH, l'Eh ne diffèrent pas significativement en fonction de la méthode, ni en fonction de l'heure dans la journée. Les valeurs moyennes de pH et d'Eh sont respectivement de $6,2 \pm 0,3$; -204 ± 31 mV. Seule, la température moyenne du cæcum est 2°C plus élevée avec la méthode *in vivo* (39°C vs 37°C , $P < 0.01$). L'Eh est élevé 2 min après le début de la mesure, puis se stabilise à partir de 20 minutes, pour atteindre à 35 min -220 ± 20 mV. Ces valeurs de potentiel redox confirment le fait que l'écosystème cæcal du lapin est fortement anaérobic.

Abstract- An original method to measure redox potential in rabbit caecum: the first methodological results. The study aimed to set up a method for measuring the redox potential (Eh) in the rabbit caecum, for assessing the anaerobiosis in the caecal biotope. Eh, pH and temperature in caecal content were measured according to 2 procedures (*in vivo* vs *post mortem*) and at 3 hours in the day (8-10h, 12-14h, 18-19h), on a total of 34 rabbits aged of 65 days and weighing 2.2 kg. pH, Eh were not significantly affected by the method nor by the sampling hour in the day. Mean values for pH, Eh were 6.2, -204 mV respectively. Only the caecal temperature was 2°C higher ($P < 0.01$) for *in vivo* (39°C) compared to *post mortem* (37°C) method. The Eh was high 2 min after the start of the measurement, and then stabilised after 20 min to reach at 35 min -220 ± 20 mV. This confirmed that the rabbit caecal ecosystem was highly anaerobic.

Introduction

Les études d'activité microbienne dans le cæcum du lapin sont généralement basées sur l'analyse des paramètres physico-chimiques notamment le pH, et les concentrations en produits terminaux des fermentations. Ces paramètres peuvent être complétés par la mesure du potentiel redox (Eh), en vue d'estimer l'état d'anaérobiose du milieu, comme cela a été effectué chez le ruminant (Marden et al., 2005). La mesure du Eh dans un milieu aqueux tels que le contenu ruminal ou cæcal permet d'estimer la capacité de ce milieu à céder ou à capter des électrons ou de l'hydrogène. Les couples redox généralement concernés sont d'une part les CO_2/CH_4 , $\text{SO}_4^{2-}/\text{SH}^-$ où dominant les bactéries méthanogènes, et d'autre part les S/SH^- , $\text{CO}_2/\text{CH}_3\text{COO}^-$ pour les bactéries acétogènes. Contrairement au rumen, il n'existe pas d'étude qui décrive l'Eh dans le cæcum du lapin. La mise au point d'une méthode de mesure du Eh doit être faite de sorte à éviter la contamination du milieu de mesure par l'air atmosphérique (Nordstom et Wilde, 1998), sous peine de modifications des caractéristiques physico-chimiques du biotope et d'erreurs de mesure d'Eh. Cette étude a donc pour but de mettre au point la mesure du potentiel redox dans l'écosystème cæcal du lapin. Il s'agit aussi d'estimer l'effet de la technique de mesure : chez l'animal anesthésié "*in vivo*" ou après son euthanasie "*post mortem*", ainsi que l'effet de l'heure de la mesure.

1. Matériel et méthodes

1.1. Animaux

L'étude a porté sur un total de 34 lapins issus du croisement entre la souche femelle INRA 9067 (Neo-

zelandais x Californiens) et la souche commerciale mâle Zika®, âgés de 65 jours et d'un poids vif moyen de 2,2 kg. Les animaux sont nourris à volonté avec un régime commercial standard (MAT=16%; ADF=19,1%). Les animaux ont été élevés en cage individuelle avec un éclairage de 12 h (7 :00 à 19 :00 h) et une température de $18 \pm 3^\circ\text{C}$.

1.2. Mesures de la température, du pH et du Eh dans le cæcum

Les mesures du potentiel redox (Eh), de la température (Te), et du pH ont été effectuées selon un schéma factoriel 2×3 , correspondant à la comparaison de 2 techniques de mesures et de 3 périodes de mesure. Les mesures ont été effectuées soit "*in vivo*" sur animal sous anesthésie (xylazine et ketamine), soit "*post-mortem*" sur animal euthanasié (après anesthésie par injection intra-cardiaque de T61®). Trois heures de mesures ont été choisies: soit durant la caecotrophie (de 8 à 10h), soit en fin de caecotrophie (12-14h), soit en dehors de la caecotrophie en fin de période d'éclairage (18-19h). Deux électrodes en verre ont été utilisées pour les différentes mesures. Le pH et la température Te du milieu cæcal ont été relevés simultanément avec une électrode de type "Unitrode" (Pt1000/B/2/3MKCl; Metrohm®), L'Eh avec une électrode de platine (Combined Pt-ring electrode; Pt/-20 80°C ; Metrohm®). Les 2 électrodes, connectées à un pH-mètre de type Metrohm® (model 713 CH-9101, Herisau, Switzerland) ont été introduites dans la matière cæcale après laparotomie et incision du cæcum entre la 5^{ème} et la 7^{ème} spire. Les premiers enregistrements de Te, pH et de Eh ont été effectués 2 min après l'introduction simultanée des 2 électrodes

(temps de référence zéro = t0). Sept autres mesures ont suivi à intervalle régulier de 5 min. Un prélèvement du contenu cœcal a été effectué immédiatement après la dernière mesure d'Eh (t+35 min) en vue de déterminer sa concentration en matière sèche (MS) et en acides gras volatils (AGV). Les animaux utilisés dans la méthode *in vivo* ont été euthanasiés par injection intracardiaque de T61® avant d'effectuer les prélèvements.

1.3. Analyses chimiques

La teneur en MS dans les matières cœcales est déterminée par séchage pendant 24h à 103 °C. Le dosage des AGV a été effectué par chromatographie en phase gazeuse.

1.4. Mesure du potentiel redox (Eh), et calcul de la pression partielle d'oxygène (PPO).

Le Eh a été calculé selon l'équation suivante: $Eh = E_0$

+ C, où E_0 représente la valeur du potentiel redox lue sur le pH-mètre et C le potentiel de l'électrode de référence par rapport à l'électrode en hydrogène qui est la référence absolue. La valeur de C est de +199 mV à 39 °C selon Nordstrom (1977). La pression partielle en oxygène "PPO" est calculée selon l'équation de Nernst. La PPO est calculée selon : $PPO (\log \text{atm}) = 64,59 \times Eh (V) + 4 \times \text{pH} - 78,60$ à 39 °C (Valsaraj, 2000).

1.5. Analyses statistiques

Les données d'Eh, PPO, pH et Te ont été soumises à une analyse de la variance avec pour effet fixe la méthode et l'heure de mesure. Les données de MS et d'AGV ont fait d'objet d'une analyse de la variance avec comparaison des moyennes. L'interaction entre les deux facteurs étant non significative elle a été retirée du modèle (procédure GLM de SAS)

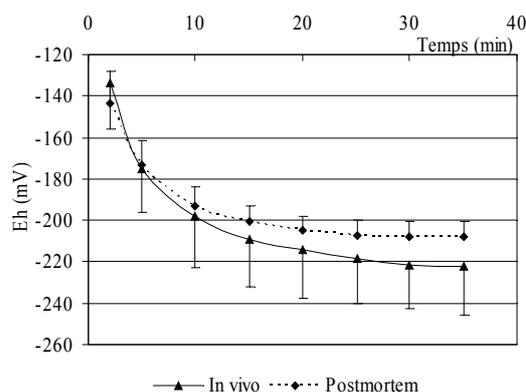
Tableau 1 : Caractéristiques de l'activité fermentaire cœcale en fonction de la méthode et de l'heure de la mesure

	Méthode		Heure mesure			Cv	P > F		
	In vivo	Post-mortem	8h-10h	12h-14h	18h-19h		Méthode	Heure mesure	Mét x Heure
Effectif	8	8	6	6	4				
MS %	22,2	22,1	22,2	22,4	21,7	8,6	NS	NS	NS
AGV total (mmol/l)	111,1	108,7	112,7	110,3	105,7	17,0	NS	NS	NS
C2 (%)	77,1	77,1	76,0	77,5	78,1	5,6	NS	NS	NS
C3 (%)	5,0	5,2	4,8	5,4	5,1	23,0	NS	NS	NS
C4 (%)	17,1	16,9	18,4	16,3	16,1	26,1	NS	NS	NS
C4/C3	3,5	3,4	4,0	3,2	3,3	33,3	NS	NS	NS

2. Résultats

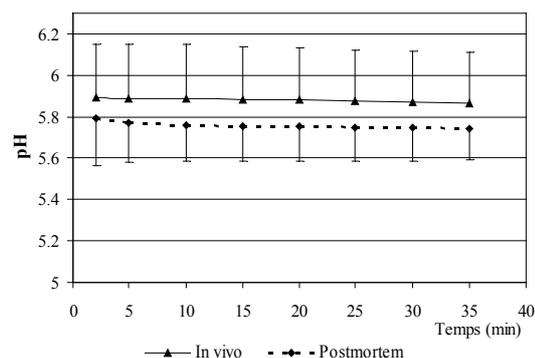
Les valeurs de Eh (et donc de PPO) baissent significativement durant les mesures. Cette diminution est d'abord rapide pendant les 15 premières minutes, puis les valeurs se stabilisent entre 20 et 35 min (figure 1). Les valeurs moyennes d'Eh et de PPO, après stabilisation (donc au-delà de 20 min de mesure) sont respectivement de -220 ± 20 mV et $\log (-69 \pm 1)$ atm.

Figure 1 : Cinétique du potentiel redox dans le contenu cœcal du lapin en fonction de la méthode de mesure. Moyennes et écart-types pour 17 répétitions par point



La méthode de mesure et l'heure n'ont pas eu d'effet significatif sur les concentrations cœcales en MS, AGV (Tableau 1). Le contenu cœcal présente une teneur moyenne en MS et en AGV totaux respectivement de 22 % et 110 mmol/l. Les proportions respectives d'acétate (C2) de butyrate (C4) et de propionate (C3) sont respectivement de 77, 17 et 5 % des AGV totaux. La méthode et l'heure de mesure n'ont pas eu d'influence significative sur le Eh et la PPO calculée.

Figure 2 : Cinétique du pH dans le contenu cœcal selon de 2 méthodes de mesures : *in vivo* vs *post mortem*. Moyennes et écart-types pour 17 répétitions par point



Les données de température et de pH ne varient pas avec la durée de la mesure entre 0 et 35 min. Par contre la température cœcale mesurée à l'aide de la méthode *in vivo* est supérieure de 2 °C (39°C) par rapport à celle obtenue par la méthode *post-mortem* (37°C) ($P < 0,01$). Contrairement à la température, le pH ne subit pas de variation significative en fonction de la méthode de mesure (pH moyen = $5,95 \pm 0,45$; figure 2).

3. Discussion

Les caractéristiques physico-chimiques d'un biotope (Eh, pH, température, O₂, CO₂, etc.) jouent un rôle important dans l'activité microbienne. Une baisse du pH se traduit par une hausse du potentiel redox (Broberg, 1957). Dans le rumen, une « acidification » du milieu ou une augmentation du Eh (soit une hausse de la pression partielle d'oxygène) serait favorable à une flore anaérobie facultative au détriment de la flore anaérobie stricte.

Notre étude montre que la prise du pH ou de la température cœcale de manière ponctuelle ou continue jusqu'à 35 min après l'introduction des électrodes de mesure est possible et n'affecte pas leur niveau. Ainsi, le pH cœcal est conforme à la littérature (Gidenne et al., 2004). L'usage de la méthode *post-mortem* pour la mesure du potentiel redox engendre une perte de 2 °C de la température du milieu cœcal par rapport à la méthode *in vivo*. Cependant, cette baisse de température ne semble pas modifier l'activité fermentaire. Les données constantes de pH enregistrées avec les 2 méthodes montrent qu'il n'y a pas de contamination du contenu cœcal par le CO₂ atmosphérique pendant les mesures. En effet le pH du rumen dépend de la pression partielle de CO₂ dans le milieu. Lorsque le pH est mesuré dans milieu exposé au CO₂, la valeur obtenue est plus élevée. Aussi, Marden et al. (2005) recommandent la prise de précautions lors des relevés de pH pour éviter les contaminations par l'air.

Contrairement au pH, le CO₂ n'a pas d'effet direct sur le Eh et la PPO calculée. Par contre, la présence de N₂ et d'O₂ influencent négativement le Eh (Broberg, 1957). Nous n'avons pas décelé d'écart entre les 2 méthodes de mesure du Eh. La chute de l'Eh en début de mesure serait probablement liée à la nature des électrodes de mesure dont le temps de stabilisation se situerait autour de 20 min après l'insertion dans la matière cœcale. De même, dans le rumen le temps nécessaire pour la stabilisation des électrodes de mesure de Eh dans le rumen serait de 25 min (Andrade et al., 2002). Néanmoins, l'hypothèse d'une valeur élevée de l'Eh en début de mesure due à une contamination par l'air ambiant lors de l'insertion des électrodes de mesure dans la matière cœcale ne peut être exclue. L'oxygène présent serait ensuite consommé ou utilisé par des microorganismes anaérobies facultatifs.

Il est à signaler que les valeurs de Eh cœcal obtenu

sont plus basses que celles de Marden et al. (2005) dans le rumen de vache, dont le Eh est compris entre -174 et -216 mV. Ceci conforte le fait que le milieu cœcal est plus réducteur et plus anaérobie que le milieu ruminal.

La concentration et les proportions d'AGV sont conformes aux observations de Gidenne et al. (2004). Le ratio positif butyrate/propionate supérieur à 1 contrairement aux ruminants et chez le porc, s'expliquerait par une population bactérienne (*sp. Bacteriodes*) productrices de butyrate plus importante que celle productrice de propionate (Gouet et Fonty, 1979 pas dans la liste).

L'heure de mesure n'a pas d'effet majeur sur les paramètres physico-chimiques cœcaux mesurés ici (pH, Eh, AGV). Ceci pourrait s'expliquer par le rythme d'ingestion assez régulier chez le lapin nourri à volonté (absence de repas marqué).

Conclusion

La mesure du potentiel redox dans les conditions anaérobies strictes peut se réaliser chez le lapin à l'aide de la méthode *in vivo* et de la méthode *post-mortem*. La méthode de mesure *in vivo* est cependant conseillée car elle prend en compte la température réelle du cœcum qui est utilisée pour l'attribution de la valeur de référence C (+199 mV à 39 °C). Le délai minimum recommandé pour les mesures est de 20 min, correspondant au temps de stabilisation des électrodes ou d'élimination complète de l'air introduit lors de l'insertion des électrodes.

En perspectives, le potentiel redox cœcal devrait être associé à d'autres paramètres physico chimique du milieu pour mieux expliquer le fonctionnement de l'écosystème cœcal. Le potentiel redox pourrait ainsi être un candidat potentiel comme indicateur de l'équilibre de l'écosystème cœcal.

Références

- ANDRADE P.V.D., GIGER-REVERDIN S., SAUVANT D., 2002. *Relationship between two parameters (pH and redox potential) characterising rumen status. Influence of diets*. Page 332 in Proc. 9th Rencontres Recherches Ruminants, Paris, France.
- BROBERG G., 1957. Oxygen's significance for the ruminal flora as illustrated by measuring the redox potential in rumen contents. *Nord. Vet. Med.* 9:57-60.
- GIDENNE T., JEHL N., LAPANOUSE A., SEGURA M., 2004. Inter-relationship of microbial activity, digestion and gut health in the rabbit: effect of substituting fibre by starch in diets having a high proportion of rapidly fermentable polysaccharides. *British J. Nutr.*, 92, 95-104.
- GOUET P., FONTY G., 1979. Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 19, 553-566.
- MARDEN J.P., BAYOURTHE C., ENJALBERT F., MOUCOULON R., 2005. A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 88. 277-281.
- NORDSTROM D.K., 1977. Thermochemical redox equilibria of Zo Bell's solution. *Geochim. Cosmochim. Acta* 41:1835-1841.

NORDSTROM D.K., WILDE F. D., 1998. *Reduction-oxidation potential (electrode method)*. page 3-15 in National Field Manuel for the collection of Water Quality Data. U. S. Geological Survey techniques of

Water Ressources Investigations, Book 9, Chapter A6, Section 6.5. US Geological Survey, Reston, VA.
VALSARAJ K.T., 2000. *In Elements of Environmental Engineering: Thermodynamics and Kinetics*. 2nd ed. Lewis Publishers. Chelsea. MI. Page 91-93.