



**HAL**  
open science

# Absorption et émission post-hépatique des acides gras volatils chez la vache laitière : évaluation de modèles de prédiction

Audrey Illovez

► **To cite this version:**

Audrey Illovez. Absorption et émission post-hépatique des acides gras volatils chez la vache laitière : évaluation de modèles de prédiction. Sciences du Vivant [q-bio]. 2012. hal-02802241

**HAL Id: hal-02802241**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02802241>**

Submitted on 5 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université d'Auvergne  
49, Bd François Mitterrand  
63 000 CLERMONT-FD



VetAgro Sup  
89, Av de l'Europe  
63 370 LEMPDES



Institut National de la Recherche Agronomique  
Centre de recherche de Clermont-Ferrand Theix  
63 122 ST-GENES CHAMPANELLE

**Master Sciences, Technologies, Santé Mention Nutrition et Sciences des Aliments**

**Spécialité Nutrition Animale et Elevage**

Master 2<sup>ème</sup> année

Promotion 2011-2012

## *Rapport de stage*

**Absorption et émission post-hépatique des acides gras volatils**

**chez la vache laitière :**

**Evaluation de modèles de prédiction**



**Audrey ILLOVIES**

*Période de stage* : Janvier à Juin 2012

*Responsable du master* : Mme BLANC Fabienne

*Responsable du stage* : Mme ORTIGUES-MARTY Isabelle





Université d'Auvergne  
49, Bd François Mitterrand  
63 000 CLERMONT-FD



VetAgro Sup  
89, Av de l'Europe  
63 370 LEMPDES



Institut National de la Recherche Agronomique  
Centre de recherche de Clermont-Ferrand Theix  
63 122 ST-GENES CHAMPANELLE

**Master Sciences, Technologies, Santé Mention Nutrition et Sciences des Aliments**

**Spécialité Nutrition Animale et Elevage**

Master 2<sup>ème</sup> année

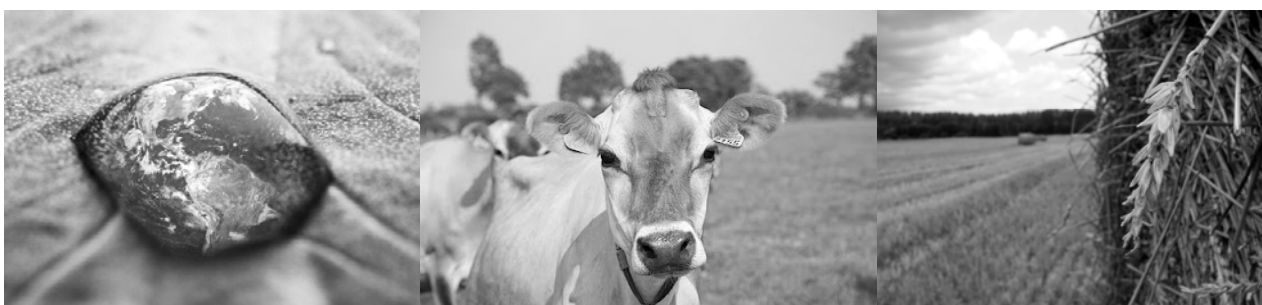
Promotion 2011-2012

## *Rapport de stage*

**Absorption et émission post-hépatique des acides gras volatils**

**chez la vache laitière :**

**Evaluation de modèles de prédiction**



**Audrey ILLOVIES**

*Période de stage :* Janvier à Juin 2012

*Responsable du master :* Mme BLANC Fabienne

*Responsable du stage :* Mme ORTIGUES-MARTY Isabelle



# Remerciements

*Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont participées au bon déroulement de mon stage au sein de l'équipe AMUVI de l'Unité Mixte de Recherche sur les Herbivores à l'INRA de Clermont-Fd Theix.*

*Je tiens à remercier plus particulièrement :*

*Isabelle ORTIQUES-MARTY, mon maître de stage, a qui j'adresse toute mon admiration.*

*Je tenais à vous remercier tout d'abord de m'avoir permis de réaliser ce stage au sein de l'équipe AMUVI, mais aussi pour votre aide et vos précieux conseils que vous m'avez apporté tout au long de mon stage. Sincèrement merci.*

*Agnès THOMAS, assistante ingénieur, personne de qualité dans tous les sens du terme.*

*Je te remercie de m'avoir si bien encadré au cours de mon stage et d'avoir rendu mon quotidien des plus agréables par ta gentillesse et ta disponibilité.*

*Gonzalo CANTALAPIEDRA-HIJAR, post-doctorant, passionné par le monde scientifique.*

*Merci de m'avoir accordé de ton temps pour répondre à mes questions et m'avoir fait partager tes connaissances.*

*Je remercie également toutes les autres personnes, stagiaires et membre de l'équipe AMUVI, pour avoir contribué à cette ambiance chaleureuse et conviviale au sein de l'équipe.*



# Résumé

Face à la multiplicité des enjeux de l'élevage, les systèmes d'alimentation énergétique des ruminants tendent à évoluer de l'unité agrégée vers la prise en considération de la quantité et de la nature des produits terminaux de la digestion ainsi que du métabolisme de ces nutriments au sein des tissus d'intérêts. L'objectif de ce stage était d'évaluer dans le cadre du projet européen Rednex des modèles récents de prédiction de l'émission post-hépatique des acides gras volatils, principaux nutriments énergétiques. Ces modèles ont été établis par méta-analyse empirique à partir d'une base de données regroupant l'ensemble de résultats publiés sur les flux sanguins de nutriments. Cinq vaches laitières Jersiaises multicathérisées ont été utilisées dans un carré latin 4x4 pour tester les effets du niveau azoté (Bas vs Normal) et de la nature des glucides (Amidon vs Paroi), notamment sur les flux sanguins d'acides gras volatils à travers le tube digestif et le foie. Différents profils d'acides gras volatils en veine porte ont été obtenus. La comparaison des résultats mesurés et prédits indique que la matière organique fermentescible ingérée sous-estime l'apparition nette portale d'acides gras volatils. Les proportions molaires d'acétate et de propionate en veine porte sont correctement prédites par la teneur en NDF digestible de la matière organique fermentescible, par contre, la proportion molaire de butyrate est prédite à 35% près. De plus faibles divergences ont été notées pour l'extraction hépatique de ces nutriments. Ces résultats ont permis d'identifier les prédicteurs d'émission post-hépatique d'acides gras volatils sur lesquels devront porter les efforts d'amélioration.

**Mots clés :** Acétate - Propionate - Butyrate - Apparition nette portale -  
Emission nette splanchnique - Equations de prédiction - Vache laitière

# Abstract

Given the multiple challenges of livestock feeding systems for ruminants, energy evaluation tends to move from the aggregated units to units taking into account the amount and nature of end products of digestion and the metabolism of these nutrients within the tissues of interest. The objective of this intership was to assess in the context of the European Rednex project recent models for predicting post-hepatic emission of volatile fatty acids, the main energy nutrients. These models have been established by meta-analysis from an empirical database of all published results on blood flow of nutrients. Five Jersey dairy cows equipped with permanent catheters were used in a 4 x4 Latin Square to test the effect of protein level (Normal vs Low) and nature of carbohydrate (Starch vs Amidon) on blood fluxes of volatile fatty acids across the gastrointestinal tract and liver. Different profiles of volatile fatty acids in portal vein were obtained. Comparaison of measured and predicted results indicates that the fermentable organic matter intake underestimates the net portal appearance of volatile fatty acids. The molar proportions of acetate and propionate in portal vein are correctly predicted by the digestible NDF content of fermentable organic matter, on the other side, the molar proportion of butyrate is predicted to nearly 35%. Smaller differences were noted for hepatic extraction of these nutrients. These results were used to identify predictors of post-hepatic emission of volatile fatty acids on which to focus improvement efforts.

**Key words :** Acetate - Propionate - Butyrate - Net portal appearance -  
Net splanchnic fluxes - Prediction equations - Dairy cow





## *Liste des abréviations*

**ADF** : Acid detergent fiber

**AGV** : Acide gras volatil

**AGVT** : Acides gras volatils totaux

**ANP** : Apparition nette portale

**C2**: Acétate

**C3**: Propionate

**C4** : Butyrate

**C5**: Valérate

**EE** : Extrait Ethéré

**ENS** : Emission nette spalchnique

**FNH** : Flux net hépatique

**Iso C4**: Iso Butyrate

**Iso C5** : Iso Valérate

**LSMeans** : Least Square Means

**MAT** : Matière azotée totale

**MO** : Matière organique

**MOF** : Matière organique fermentescible

**MS** : Matière sèche

**NDF** : Neutral detergent fiber

**NDFd** : Neutral detergent fiber digestible

**PDIE** : Protéine digestible dans l'intestin quand l'énergie fermentescible dans le rumen est limitante

**PDIN** : Protéine digestible dans l'intestin quand l'azote fermentescible dans le rumen est limitant

**RdNDF** : Neutral detergent fiber digestible dans le rumen



# Liste des figures

**Figure 1 :** Voies du métabolisme des glucides dans le rumen (*Jouany, 1995*)

**Figure 2 :** Voies métaboliques du métabolisme hépatique de l'acétate (*Loncke, 2009*)

**Figure 3 :** Schéma récapitulatif des principales voies métaboliques de l'acétate (C2) dans le rumen et les tissus splanchniques

**Figure 4 :** Voies métaboliques du propionate (*Loncke, 2009*)

**Figure 5 :** Schéma récapitulatif des principales voies métaboliques du propionate (C3) dans le rumen et les tissus splanchniques

**Figure 6 :** Schéma récapitulatif des principales voies métaboliques du butyrate (C4) dans le rumen et les tissus splanchniques

**Figure 7 :** Relations statistiques entre la quantité ingérée de matière organique fermentée (MOF) et les acides gras volatils (AGV) totaux produits dans le rumen ou apparaissant en veine porte (*Nozière et al., 2009*)

**Figure 8 :** Représentation schématique de la physiologie vasculaire de l'aire splanchnique chez les ruminants (*Seal et Reynolds, 1993*)

**Figure 9 :** Illustration des conditions expérimentales les jours de prélèvements sanguins



# Liste des tableaux

**Tableau 1 :** Valeurs alimentaires estimées d'après les tables INRA (2007) des régimes expérimentaux pour vaches laitières

**Tableau 2 :** Composition en ingrédients des quatre régimes expérimentaux pour vaches laitières

**Tableau 3 :** Equations de prédiction de l'apparition nette portale (Loncke *et al.*, 2009) et des flux nets hépatiques (Loncke, 2009) des acides gras volatils majeurs [Acétate (C2), Propionate (C3) et Butyrate (C4)] chez la vache laitière ainsi que la liste des abréviations utilisées et des unités

**Tableau 4 :** Teneurs moyennes des régimes expérimentaux Bas en azote et Amidon (BA), Bas en azote et Parois végétales (BP), Normal en azote et Amidon (NA) et Normal en azote et Parois végétales (NP) en matière sèche (MS), matière organique (MO), matières azotées totales (MAT), en Neutral Detergent Fiber (NDF) et en Extrait Ethéré (EE)

**Tableau 5 :** Poids vif, production laitière et quantités ingérées en matière sèche (MS), matière organique (MO), matières azotées totales (MAT), Neutral Detergent Fiber (NDF), amidon, matière organique fermentée (MOF), Neutral Detergent Fiber digestible (NDFd), PDIE et UFL des vaches Jersiaises recevant des régimes Bas en azote et amidon (BA), Bas en azote et parois végétales (BP), Normal en azote et amidon (NA) et Normal en azote et parois végétales (NP). La production laitière et les quantités ingérées rapportées ont été mesurées lors de la journée de mesure sur chaque traitement. Les LS Means sont présentées

**Tableau 6 :** Hématocrite moyenne et débits plasmatiques et sanguins (l/min) en artère hépatique, veine porte et veine sus hépatique des vaches Jersiaises recevant des régimes Bas en azote et Amidon (BA), Bas en azote et Parois végétales (BP), Normal en azote et Amidon (NA) et Normal en azote et Parois végétales. Les LS Means sont présentées



**Tableau 7 :** Concentrations sanguines en artère, veine porte, veine sus-hépatique, bilans nets au niveau des tissus drainés par la veine porte, du foie, et des tissus splanchniques (mmol/min), et taux d'émission ou d'extraction nette pour l'acétate, le propionate, le butyrate mesurés chez les vaches Jersiaises recevant des régimes Bas en azote et Amidon (BA), Bas en azote et Parois végétales (BP), Normal en azote et Amidon (NA) et Normal en azote et Parois végétales. Les LS Means sont présentées

**Tableau 8 :** Comparaison entre les résultats moyens d'apparition nette portale (ANP) prédits (les numéros d'équation se rapportent au Tableau 3), et mesurés pour les AGVT, l'acétate, le propionate, le butyrate chez des vaches Jersiaises recevant des régimes Bas en azote et Amidon (BA), Bas en azote et Parois végétales (BP), Normal en azote et Amidon (NA) et Normal en azote et Parois végétales. Les LS Means sont présentées

**Tableau 9 :** Comparaison entre les résultats moyens de flux nets hépatiques (FNH) prédits (les numéros d'équation se rapportent au Tableau 3), et mesurés pour le propionate et le butyrate chez des vaches Jersiaises recevant des régimes Bas en azote et Amidon (BA), Bas en azote et Parois végétales (BP), Normal en azote et Amidon (NA) et Normal en azote et Parois végétales. Les LS Means sont présentées

**Tableau 10 :** Comparaison entre les valeurs minimum et maximum de l'expérimentation et celle de la plage de validité des équations de prédiction chez la vache laitière pour les quantités ingérés de MS, MOF, NDFd, pour la composition du régime en MAT, NDF, Amidon, MOF, NDFd, pour les concentrations artérielles et l'ANP en acétate, propionate et butyrate





# *Liste des annexes*

**Annexe 1 :** Composition chimique et valeur alimentaire des aliments composant les quatre régimes expérimentaux estimées d'après les Tables INRA (2007)

**Annexe 2 :** Dosage des acides gras volatils à partir d'échantillon sanguin d'après la méthode de *Reynolds et al.*(1986)

**Annexe 3 :** Tableau récapitulatif des résultats de validation de la méthode de dosage des AGV par CPG



# Sommaire

<b>Introduction</b>	1
<b>1. Synthèse bibliographique</b>	2
1.1. Production, absorption et métabolisme des acides gras volatils par le tube digestif et le foie	2
1.1.1. Apparition nette portale des acides gras volatils	2
1.1.1.1. Origine digestive des acides gras volatils	2
1.1.1.2. Absorption et métabolisme des acides gras volatils dans la paroi du tube digestif	3
1.1.2. Métabolisme et émission ou captation hépatique des acides gras volatils	5
1.2. Prédiction de l'apparition nette portale et de l'émission post-hépatique des acides gras volatils et domaine de validité des prédictions	6
1.2.1. Apparition nette portale	6
1.2.2. Flux nets hépatiques et émission nette splanchnique	6
<b>Objectifs du stage</b>	7
<b>2. Matériel et méthodes</b>	8
2.1. Animaux	8
2.2. Préparation chirurgicale	8
2.3. Alimentation	8
2.4. Calendrier et plan expérimental	9
2.5. Mesures et prélèvements	10
2.5.1. Poids des animaux et production laitière	10
2.5.2. Aliments, Refus	10
2.5.3. Débits sanguins	10
2.5.4. Sang	10
2.6. Analyses de laboratoire	11
2.6.1. Sur les aliments	11
2.6.2. Sur le sang et le plasma	11
2.7. Calculs	12
2.7.1. Quantités ingérées	12
2.7.2. Débits sanguins	12
2.7.3. Flux sanguins d'acide gras volatils	12
2.8. Equations de prédiction	13
2.9. Analyses statistiques	13
<b>3. Résultats</b>	14
3.1. Animaux et cathéters	14
3.2. Composition des rations et ingestion	14
3.3. Débits sanguins	15
3.4. Concentrations sanguines, bilan et taux extraction d'AG	15
3.5. Comparaison aux résultats prédits	16
<b>4. Discussion</b>	17
4.1. Conditions alimentaires et production laitière	17
4.2. Flux sanguins splanchniques d'acides gras volatils	18
4.2.1. Qualité du dosage des AGV	18
4.2.2. Influence du niveau azoté et de la nature des glucides sur l'apparition nette portale d'AGV	18
4.2.3. Influence du niveau azoté et de la nature des glucides sur les flux nets hépatiques d'AGV	19
4.3. Evaluation des équations de prédiction des flux splanchniques d'AGV	20
<b>Conclusion et Perspectives</b>	22

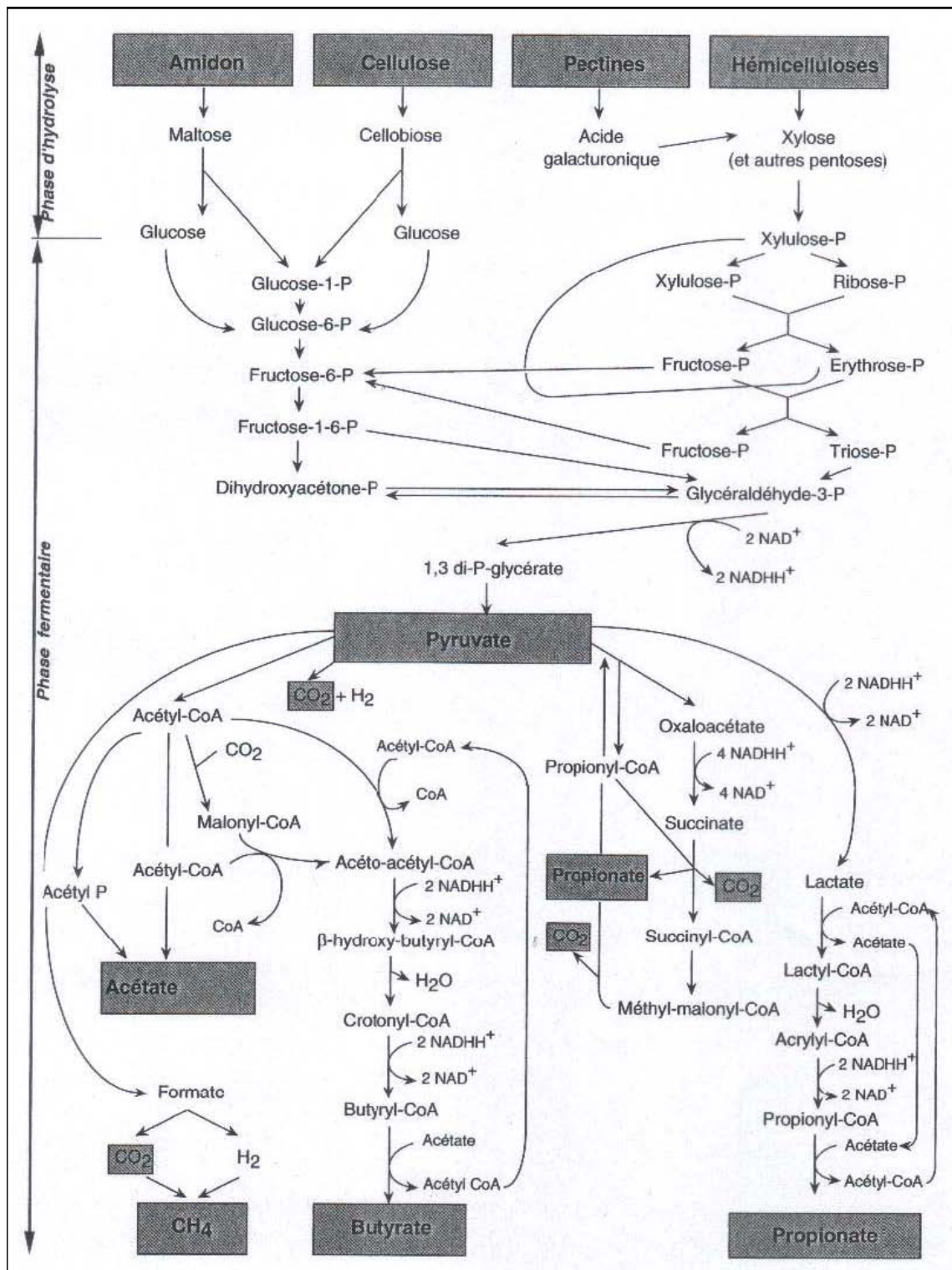


## Introduction

Dans le système INRA d'alimentation des ruminants, la valeur énergétique des rations est définie sous forme d'unités agrégées et c'est l'énergie nette qui est utilisée pour ajuster les apports énergétiques aux besoins (*INRA, 1987, 1988 et 2007*). Cependant, les enjeux de l'élevage ont évolué, la productivité (*Vermorel and Coulon, 1998*) n'est plus le seul objectif auquel doit répondre l'alimentation. Celle-ci doit aussi satisfaire la qualité des produits, œuvrer pour diminuer les rejets des animaux dans l'environnement et respecter les animaux au niveau de leur santé et leur bien-être. Ainsi, le système INRA d'alimentation énergétique des ruminants doit évoluer. La prise en considération des nutriments énergétiques et de leur métabolisme au sein des principaux tissus utilisateurs constitue un des principaux axes de recherche en nutrition animale (*Reynolds, 2000*). L'objectif est d'en intégrer les principaux enseignements quantitatifs dans les outils de formulation des régimes alimentaires.

L'apport en nutriments énergétiques est principalement véhiculé par les acides gras volatils (AGV) à hauteur de 70% (*Bergman, 1990*). Les principaux tissus utilisateurs d'AGV sont le tube digestif, le foie et les tissus périphériques. L'acétate est utilisé à hauteur de 30% par le tube digestif, faiblement utilisé par le foie puis majoritairement orienté vers les tissus périphériques (*Bergman et Wolf, 1971*). En revanche le propionate est faiblement métabolisé par le tube digestif mais fortement utilisé par le foie (90% environ) et le butyrate est principalement utilisé par le tube digestif (70% environ) puis par le foie (*Nozière et Hoch, 2005*). L'apparition nette des AGV en veine porte contribue à caractériser la composition en nutriments de l'énergie métabolisable ingérée (*Loncke et al., 2009a*). La captation des AGV par le foie avant leur redistribution aux tissus périphériques (muscle, mamelle) détermine les quantités de nutriments (AGV ou leurs métabolites secondaires) disponibles pour les tissus d'intérêt zootechnique. Ainsi des modèles de prédiction de l'absorption portale et de l'émission post hépatique des AGV ont été développés (*Loncke et al., 2009 ; Loncke, 2009*) à partir d'une démarche de méta-analyse et en se référant à des données issues de la base de données FLORA (*Vernet et Ortigues-Marty, 2006*). Le caractère empirique de la démarche représente une force de ces modèles et est totalement compatible avec les modèles INRA existants, eux-mêmes empiriques, d'alimentation énergétique des ruminants.

En revanche, ces modèles n'ont pas encore été testés sur de nouvelles données expérimentales. Les résultats obtenus dans le cadre du programme européen Rednex et présentés dans ce rapport sont les premiers disponibles pour évaluer la qualité des équations de prédiction.



**Figure 1 :** Voies du métabolisme des glucides dans le rumen (Jouany, 1995)

## 1. Synthèse bibliographique

Avant de présenter les prédicteurs des AGV au niveau de leur apparition nette portale, extraction hépatique et émission nette splanchnique, cette synthèse résume l'origine digestive des AGV chez les ruminants et les bases de leur métabolisme dans les tissus du tube digestif et du foie.

### 1.1. Production, absorption et métabolisme des acides gras volatils par le tube digestif et le foie

#### 1.1.1. Apparition nette portale des acides gras volatils

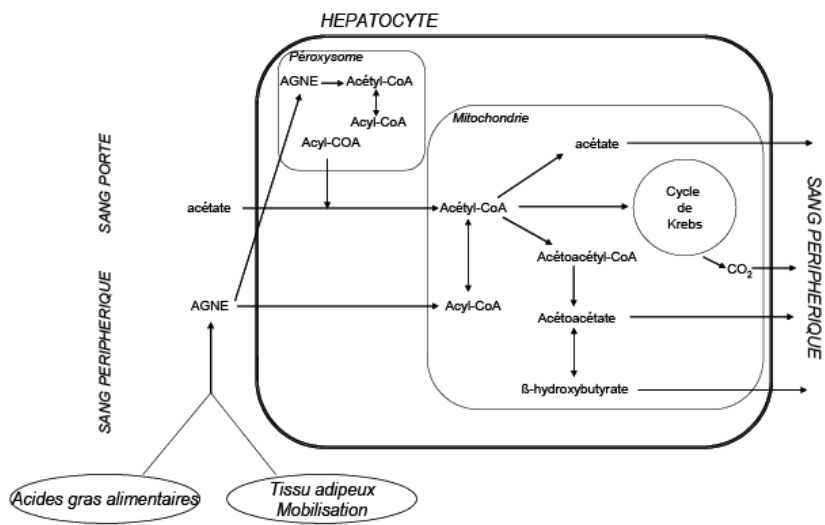
##### 1.1.1.1. Origine digestive des acides gras volatils

Les AGV sont des produits terminaux de la digestion, principalement ruminale. Ils sont issus de l'hydrolyse et de la fermentation des glucides (cellulose, hémicellulose, pectine, amidon et sucres solubles) par les micro-organismes au niveau du rumen (*Masson et Phillipson, 1951*) (**Figure 1**). Les AGV sont des acides gras à chaînes courtes (6 atomes de C maximum) dont les principaux sont l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique. Le groupe des AGV inclue également l'acide iso-butyrique, l'acide valérique et l'acide iso-valérique qui sont considérés comme des AGV mineurs. Les AGV, produits au niveau du rumen, forment la principale source d'énergie chez les ruminants contribuant pour 70% à leurs besoins caloriques (*Bergman, 1990*). Ils représentent 50 à 70% de l'énergie digestible ingérée (*Sutton, 1985*) et 65 à 75% de l'énergie métabolisable ingérée (*Bergman, 1990*).

La quantité totale d'AGV produite est fonction de la quantité de matière organique ingérée, de la digestibilité de la matière organique (MO) et de la proportion de MO digestible qui est digérée dans le rumen. L'ensemble de ces critères sont inclus dans la notion de MO fermentescible (MOF) ingérée qui est calculée par la différence entre la MO digestible ingérée totale et les quantités de MO digestible au niveau intestinal (composée de lipides, protéines non dégradables et d'amidon non dégradable dans le rumen). Chez une vache laitière ingérant 18 kg de MO, 8 kg de MO sont fermentés dans le rumen (*Jouany et Thivend, 1972*). La MOF ingérée est alors transformée en AGV ainsi qu'en protéines microbiennes, CO<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub>. Le critère MOF apparaît comme un bon indicateur pour prédire la quantité d'AGV totaux (AGVT) produite dans le rumen : en moyenne 8 moles par kg de MOF ingérée (*Nozière et al., 2010*). Dans le rumen, les concentrations en AGV reflètent l'équilibre entre les quantités produites et absorbées, elles varient de 60 à 150 mM en fonction de la composition du régime et du temps écoulé après le repas (*Bergman, 1990*).

La proportion molaire de chacun des AGV par rapport aux AGVT est comprise entre 55 et 75 % pour l'acétate, 10 et 25 % pour le propionate et 5 et 15 % pour le butyrate

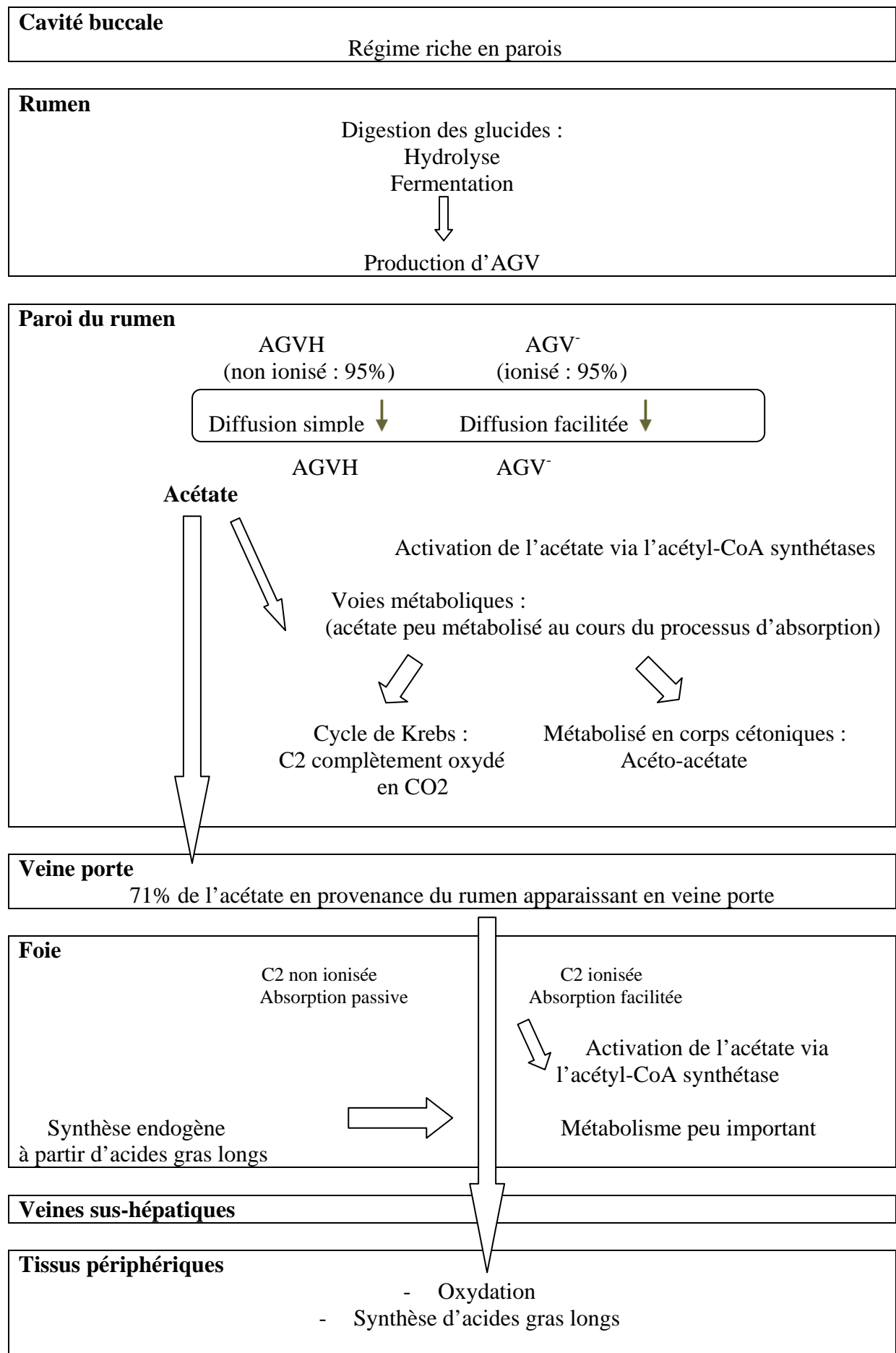




**Figure 2 :** Voies métaboliques du métabolisme hépatique de l'acétate (Loncke, 2009)

(*Bergman, 1990*). Les proportions molaires de chaque AGV dépendent prioritairement de la MOF et en amont de la MO digestible. Plus la digestibilité d'une ration augmente, plus la proportion molaire de C2 diminue alors que celle du C3 et C4 augmente (*Thomas et Rook, 1981*). Les proportions molaires des AGV varient aussi en fonction de la composition de la ration et notamment la nature des glucides ainsi que leur vitesse de dégradation. Plusieurs types de glucides sont identifiables. D'une part, les parois végétales qui se caractérisent par une fraction insoluble dans une solution de détergent neutre. Cette fraction appelée NDF est constituée de cellulose, d'hémicellulose et de lignine. Selon le fourrage considéré, NDF peut constituer 30 à 80% de la matière sèche. La digestion ruminale du NDF dépend du temps de séjour des particules dans le rumen et de la nature de lignification (*Nozière et al., 2010*). D'autre part, l'amidon, qui peut représenter jusqu'à 50% de la matière sèche. L'amidon est en partie dégradé au niveau du rumen (25 à 100%) par des bactéries amylolytiques, qui sous l'action de l' $\alpha$ -amylase découpent l'amidon en polyholosides puis en maltose (2 glucoses). Le reste de l'amidon digestible est dégradé au niveau de l'intestin grêle par des amylases pancréatiques (*Jouany and Thivend, 1972*). L'amidon est dégradé à des rythmes différents en fonction du type d'aliments qui le contient. Enfin les glucides solubles dans l'eau qui constituent moins de 15% de la matière sèche sont fermentés très rapidement au niveau du rumen (*Nozière et al., 2010*).

Les rations à base de fourrage sont riches en parois végétales, elles favorisent le développement des espèces microbiennes cellulolytiques et la production d'acétate. La proportion d'acétate représente 70% de la production totale d'AGV avec un régime à base de fourrage contre 46% avec un régime à base de céréales chez une vache (*Balch and Rowland, 1957*). A l'inverse, les rations à base de concentré, riches en amidon, favorisent le développement des espèces microbiennes amylolytiques et la production de propionate : 46% de propionate produit avec un régime à base de céréales contre 19% avec un régime à base de fourrages (*Balch and Rowland, 1957*). Enfin, la présence de glucides rapidement fermentescibles favorise la production de propionate et butyrate au détriment de l'acétate ; plus la fermentescibilité des glucides et leur niveau d'ingestion sont élevés, plus la production de propionate est accrue (*Balch and Rowland, 1957*). En revanche, la présence de concentré lentement fermentescible tel que l'amidon de maïs, favorise la production de butyrate (*Vérité et Journet, 1975*).

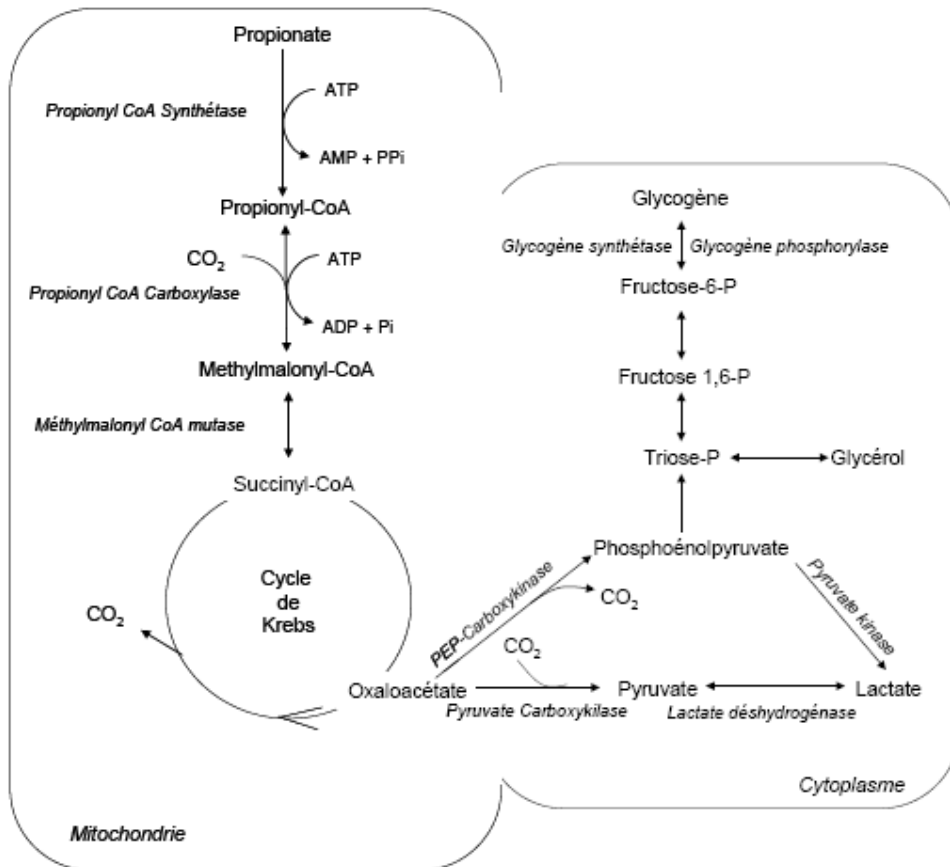


**Figure 3 :** Schéma récapitulatif des principales voies métaboliques de l'acétate (C2) dans le rumen et les tissus splanchniques

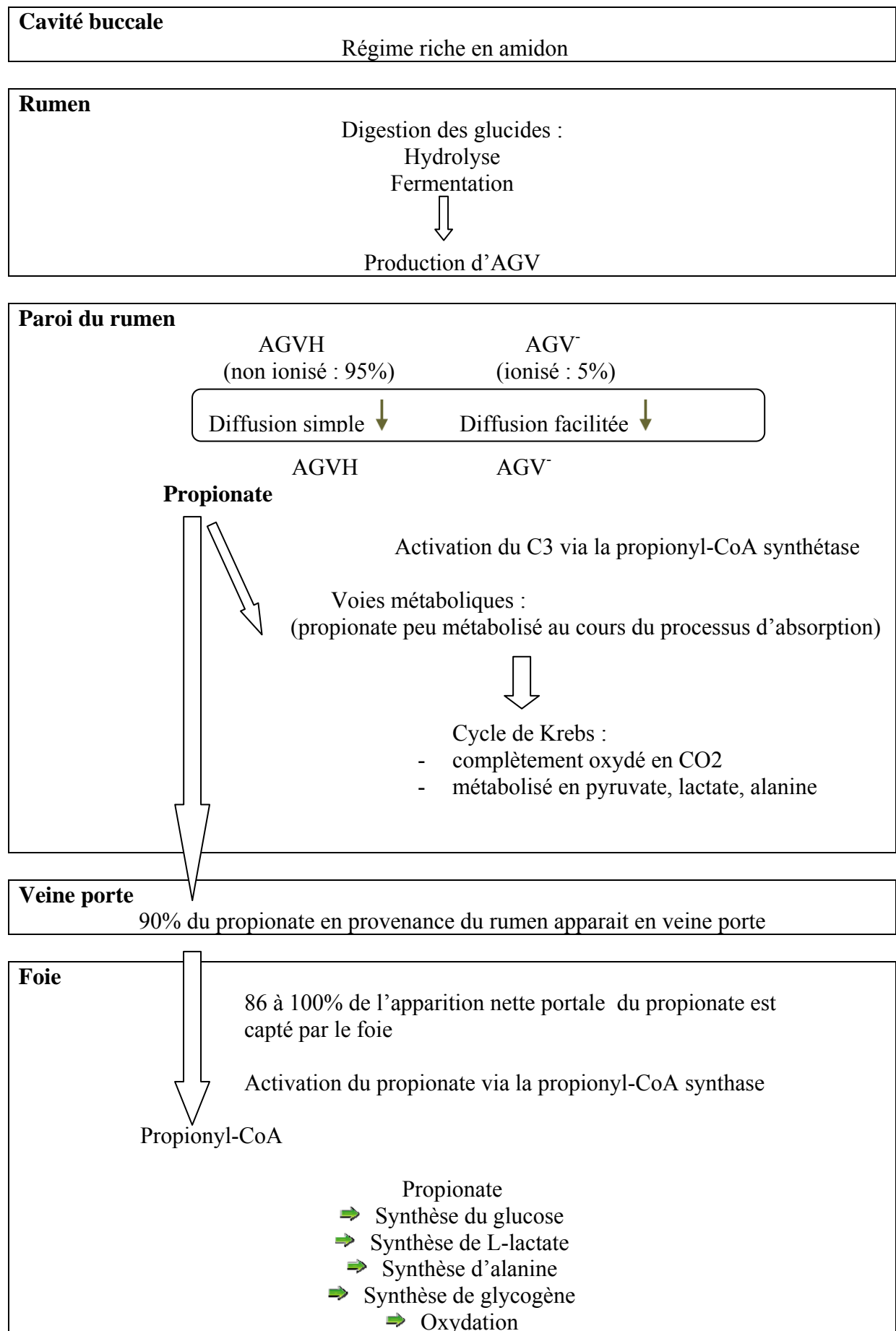
### 1.1.1.2. Absorption et métabolisme des acides gras volatils dans la paroi du tube digestif

Il est important de différencier d'une part l'absorption qui correspond au transfert d'une molécule de la lumière du tube digestif à la muqueuse du tube digestif et d'autre part le taux d'apparition portale qui correspond à la quantité de nutriment qui apparaît au niveau de la veine porte (*Bugaut, 1987*). Les nutriments absorbés peuvent être métabolisés dans la paroi du tube digestif avant d'être émis dans le sang et d'apparaître en veine porte.

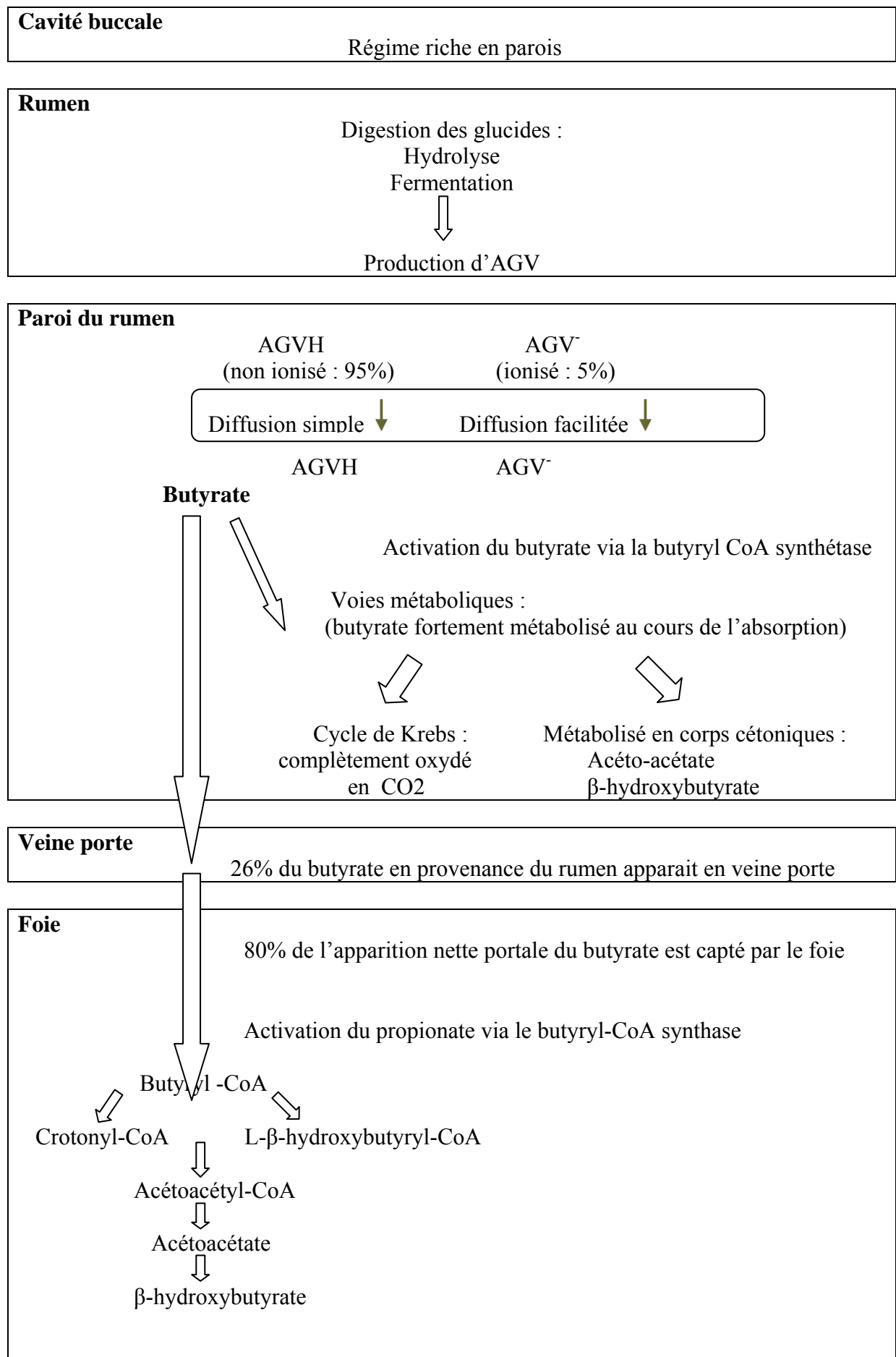
Soixante cinq à 85% des AGV produits dans le rumen sont absorbés au niveau de la paroi du réticulo-rumen, une part non négligeable des AGV du rumen serait séquestrée par les micro-organismes, le reste étant absorbé dans les parties distales du tube digestif (*Nozière et al., 2010*). Les AGV sont présents sous deux formes : ionisés (5%) ou non ionisés (95%). Les AGV non ionisés (forme majoritaire) sont principalement absorbés par diffusion passive alors que les AGV ionisés seraient absorbés par un système de diffusion facilitée (*Bergman, 1990*). L'absorption des AGV dépend de plusieurs facteurs. Le pH joue un rôle important: plus le pH est faible, moins les AGV sont ionisés et plus le taux d'absorption des AGV sous forme non ionisée est important (*Bergman, 1990*). Le taux d'absorption d'un AGV est d'autant plus important que sa chaîne carbonée est longue, ainsi le taux d'absorption du butyrate sera supérieur au propionate, lui-même supérieur à celui de l'acétate (*Stevens and Stettler, 1966*). Après absorption, l'acétate est très peu métabolisé au niveau de l'épithélium ruminal et totalement récupéré en veine porte (*Kristensen et Harmon, 2006*). Par contre, l'épithélium ruminal utilise l'acétate artériel à hauteur de 20 à 40%. Après activation par l'acétyl-CoA synthétase, l'acétate est orienté majoritairement vers le Cycle de Krebs afin d'être complètement oxydé en CO<sub>2</sub> ou métabolisé en corps cétonique (acéto-acétate). Par conséquent, la récupération nette moyenne en veine porte de l'acétate infusé au niveau ruminal (qui conjugue l'ensemble des phénomènes) est de l'ordre de 71% (*Bergman et Wolf, 1971*). Le butyrate absorbé est métabolisé dans l'épithélium ruminal en quantités bien supérieures à l'acétate, de 50 à 80% (*Kristensen et Harmon, 2006*). Après activation par le butyryl CoA, le butyrate suit la même voie métabolique que l'acétate mais sera métabolisé prioritairement en  $\beta$ -hydroxybutyrate (pour 45%), acéto-acétate (15%) ou oxydé (20%) (*Kristensen et al., 2000*). Enfin, seuls 5 à 9% du propionate absorbé pourraient être métabolisés dans l'épithélium ruminal au niveau du cycle de Krebs pour être soit complètement oxydés soit métabolisés en lactate, pyruvate ou alanine. Les taux de récupération nette moyenne en veine porte du butyrate et du propionate infusés au niveau ruminal s'élèvent donc en moyenne respectivement à 26 et 90% (*Nozière et Hoch, 2005*).



**Figure 4** : Voies métaboliques du propionate dans le foie (Loncke, 2009)



**Figure 5 :** Schéma récapitulatif des principales voies métaboliques du propionate (C3) dans le rumen et les tissus splanchniques



**Figure 6 :** Schéma récapitulatif des principales voies métaboliques du butyrate (C4) dans le rumen et les tissus splanchniques

### 1.1.2. Métabolisme et émission ou captation hépatique des acides gras volatils

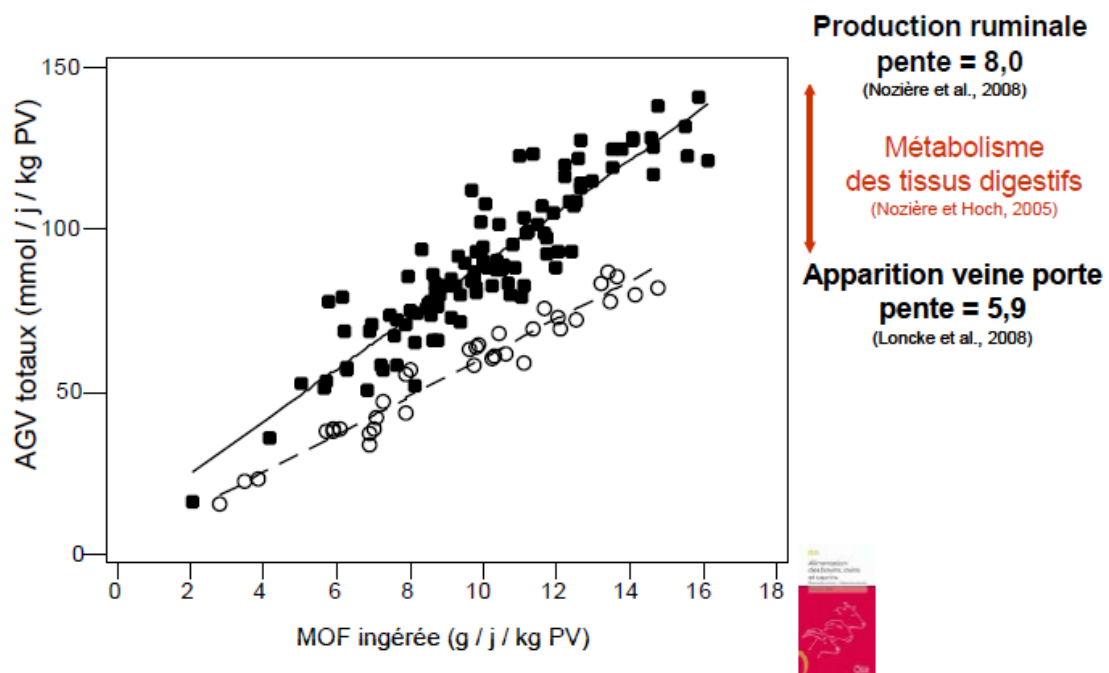
Les AGV sont ensuite orientés vers le carrefour métabolique majeur de l'organisme qu'est le foie par l'intermédiaire de la veine porte. L'absorption à travers la membrane des hépatocytes est réalisée de manière passive pour les AGV sous forme non ionisée (minoritaire) (*Bergman, 1990*) et par l'intermédiaire de transporteurs à monocarboxylate pour les AGV sous forme ionisée (forme la plus abondante) (*Kirata et al., 2007*).

L'acétate est faiblement capté et métabolisé au niveau du foie car l'activité métabolique de l'acétyl-CoA synthétase (activatrice) est faible (*Ash et Baird, 1973*) (**Figure 2**). Par exemple, pour une quantité d'acétate afférente de 175 mmol/h (dont 90, 7 et 3 % proviennent respectivement de la veine porte, de l'artère hépatique et d'origine endogène) seulement 5 mmol/h sont catabolisés au niveau du foie (*Bergman et Wolff, 1971*). Toutefois, l'acétate occupe une place importante avec l'acétyl-CoA qui constitue un intermédiaire de nombreux métabolismes. Ainsi le foie synthétise une quantité non négligeable d'acétate, pouvant aller jusqu'à 20% de l'apparition nette portale. L'origine des précurseurs de l'acétate endogène n'a pas encore été complètement élucidée mais pourrait provenir de l'oxydation partielle des acides gras à chaîne longue (*Nozière et al., 2010*). L'acétate émis par les tissus splanchniques est véhiculé en direction des tissus périphériques afin d'y être oxydé ou métabolisé pour la synthèse d'acides gras à chaîne longue (**Figure 3**).

Le propionate véhiculé par la veine porte est fortement capté par le foie, de 86 à 100% de l'apparition nette portale (ANP) (*Reynolds et al., 1994*). Le propionate est activé par la propionyl-CoA synthetase ATP-dépendante qui est très active (**Figure 4**). Après activation, le propionate, molécule à trois carbones, est fortement métabolisé en glucose dont il est le principal précurseur (*Wiltrout et Satter, 1972*), ou de façon moindre en L-lactate, alanine, glycogène ou utilisé pour l'oxydation (*Danfaer, 1994*). Le prélèvement et le métabolisme hépatiques du propionate varient en fonction de l'apport de butyrate (action inhibitrice), la sécrétion d'hormone (insuline), le niveau alimentaire et la nature du régime (**Figure 5**).

Comme le propionate, la majorité du butyrate apparaissant en veine porte (80% environ) est capté par le foie (*Bergman et Wolff, 1971*) et métabolisé en corps cétoniques, principalement en  $\beta$ -hydroxybutyrate (*Giesecke et al., 1979*). Le métabolisme du butyrate et donc du  $\beta$ -hydroxybutyrate dépend du statut nutritionnel et physiologique des animaux. Plus le niveau alimentaire est faible, moins l'apport en butyrate sera important ainsi que la quantité de  $\beta$ -hydroxybutyrate produite (**Figure 6**).





**Figure 7 :** Relations statistiques entre la quantité ingérée de matière organique fermentée (MOF) et les acides gras volatils (AGV) totaux produits dans le rumen ou apparaissant en veine porte (Nozière et al., 2010).

## 1.2. Prédiction de l'apparition nette portale et de l'émission post-hépatique des acides gras volatils et domaine de validité des prédictions

### 1.2.1. Apparition nette portale

Compte tenu de l'importance des AGV pour la nutrition énergétique des ruminants, de nombreux auteurs ont cherché à prédire les quantités d'AGV majeurs produits dans le rumen. Très récemment, des équations de prédiction de l'apparition nette portale des AGV ont été publiées (*Loncke et al., 2009*). Elles ont été obtenues grâce à une démarche de méta-analyse (*Sauvant et Mertens, 2008*), appliquée aux données issues de publications internationales rapportant des résultats de flux sanguins d'AGV chez les ruminants (et regroupées au sein de la base de données Flora, *Vernet et Ortigues-Marty, 2006*). Les prédicteurs ont été choisis pour leur pertinence mais aussi leur simplicité, leur robustesse et leur compatibilité avec le système INRA d'alimentation (*Loncke et al., 2009*).

La matière organique digestible ingérée est un des prédicteurs communs aux nutriments énergétiques pour déterminer leur ANP. Toutefois, concernant l'ANP des AGVT, le meilleur critère s'est avéré être la quantité de MOF ingérée (qui caractérise spécifiquement la digestion ruminale). L'ANP d'AGVT serait de 5,9 mol/kg de MOF (*Loncke et al., 2009*) ce qui est compatible avec la production ruminale moyenne de 8 mol d'AGVT/kg de MOF et une récupération moyenne de 75% en veine porte (*Nozière et al., 2007*) (**Figure 7**). Pour les proportions molaires individuelles d'AGV, c'est la composition de la MOF qui a été retenue comme critère de prédiction. La proportion de NDF digestible dans le rumen (RdNDF/MOF) s'est avérée être un meilleur prédicteur que l'amidon digestible dans le rumen.

Les modèles obtenus sont génériques et applicables aux bovins et ovins, mais des limites existent à ces modèles empiriques en raison des données qui ont servis à leur développement. Les situations physiologiques et nutritionnelles sont incomplètes notamment les rations enrichies en lipides et les additifs ne sont pas représentés. De plus, les prédictions suivent des lois linéaires pour des ingestions allant jusqu'à 30 g MS/j/kg de PV et n'excédant pas 70% de concentré, alors que les variations semblent quadratiques pour des niveaux supérieurs. Enfin, les variations de composition de MOF (NDFd/MOF qui s'est avéré être un critère prépondérant) ont souvent résulté de variations simultanées des proportions fourrages : concentrés des régimes et de composition chimique des aliments (*Loncke et al., 2009*).

### 1.2.2. Flux nets hépatiques et émission nette splanchnique

La démarche utilisée pour établir les équations de prédictions des flux nets hépatiques des AGV est la même que celle pour l'ANP.

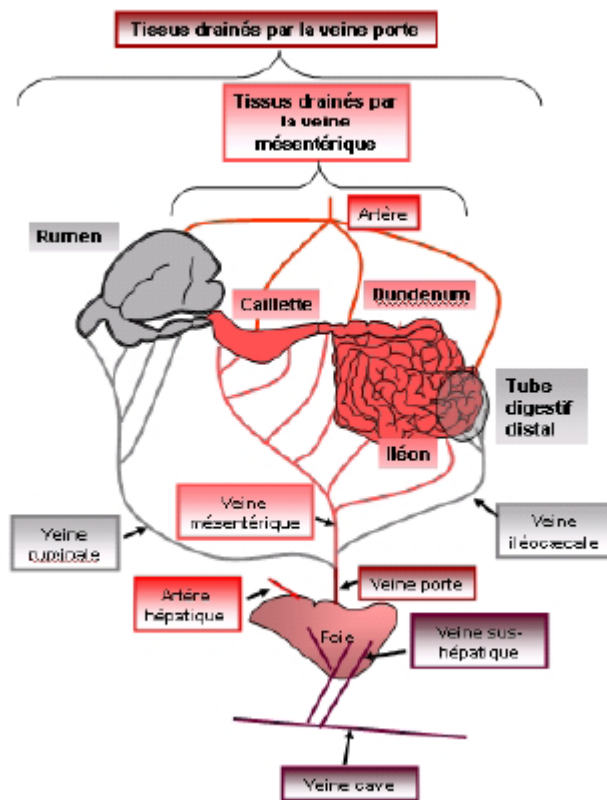


L'émission nette splanchnique permet d'évaluer la quantité d'AGV disponible pour les tissus périphériques. Elle est la résultante de l'apparition nette portale et de l'extraction ou émission nette hépatique. Aucune équation de prédiction de l'émission nette hépatique d'acétate n'a pu être établie compte tenu des faibles quantités émises et des incertitudes associées à ces mesures. Seule, une équation de prédiction de son émission nette splanchnique a été établie à partir des quantités ingérées de MOF (Loncke, 2009).

Des équations de prédiction du prélèvement hépatique des deux autres AGV (propionate et butyrate) ont eu pour objectif d'évaluer la quantité de ces nutriments potentiellement transformée en nutriments (glucose,  $\beta$ -hydroxybutyrate) utilisables par les tissus périphériques. Pour le butyrate, son taux de prélèvement hépatique a été prédit à 75% de l'ANP avec un effet inhibiteur de la digestibilité de la MO (Loncke, 2009). En ce qui concerne le propionate, son taux de prélèvement moyen a été prédit à 91% de l'ANP, mais sous influence du stade physiologique, du bilan énergétique et du rapport protéine digestible dans l'intestin/énergie métabolisable (PDI/EM) de la ration (Loncke, 2009). L'émission nette splanchnique de propionate, qui peut être non nulle pour des régimes riches en concentrés, est prédite par la MOF et la composition de la MOF (NDFd/MOF). Le domaine de validité de ces équations est similaire à celui des équations précédentes d'ANP.

### **Objectifs du stage**

Dans ce contexte, j'ai travaillé sur une expérimentation d'un projet Européen 'Rednex' cherchant à réduire les rejets azotés des vaches laitières et limiter la baisse de production laitière associée en testant l'impact de la nature des glucides alimentaires. La phase animale de cette expérimentation avait été réalisée entre septembre 2010 et mai 2011. Le premier objectif de mon stage était de déterminer l'apparition nette portale et l'émission nette splanchnique des AGV majoritaires (acétate, propionate, butyrate) en me consacrant au dosage des AGV sur des échantillons sanguins. Le second et ultime objectif était de comparer ces résultats avec ceux établis à partir des équations de prédiction. L'étude expérimentale 'support' est la première de cette nature à l'UMRH pouvant servir à évaluer les modèles de prédiction depuis qu'ils ont été établis. Cette étude sur vaches laitières a aussi la particularité d'avoir appliqué des niveaux d'alimentation plus élevés (de 25 % en moyenne) et d'avoir testé des variations de composition de MOF à proportions fixes de fourrage : concentrés dans les rations.



**Figure 8 :** Représentation schématique de la physiologie vasculaire de l'aire splanchnique chez les ruminants (*Seal et Reynolds, 1993*)

La caillette, le duodénum, l'iléon sont drainés par la veine mésentérique, le rumen par la veine ruminale et le tube digestif distal par la veine iléocœcale. Ces trois veines convergent vers la veine porte qui arrive au foie tout comme l'artère hépatique. Le foie est drainé à son tour par des veines sus-hépatiques qui se déversent en veine cave. Les tissus drainés par la veine porte (qui incluent les tissus du tube digestif, les tissus adipeux mésentériques et omentaux ainsi que la rate et le pancréas) et le foie constituent les tissus splanchniques. Les cathéters de prélèvement étaient positionnés au niveau de l'artère mésentérique, des veines porte et sus-hépatique, et les cathéters d'infusion au niveau des veines mésentérique et ruminale.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Animaux

Cinq vaches laitières multipares de race Jersiaise, d'un poids vif initial de 364 kg ont été utilisées pour l'expérimentation. Les vaches étaient logées dans des stalles individuelles équipées de distributeurs automatiques d'aliments et ont bénéficié d'un éclairage permanent.

### 2.2. Préparation chirurgicale

Les animaux ont été opérés chirurgicalement trois à quatre semaines après la mise bas, juste avant le pic de lactation. L'opération chirurgicale a consisté à implanter en chronique quatre cathéters sanguins de prélèvement au niveau splanchnique : en veine porte, sus hépatique, et deux en artère mésentérique. Deux cathéters d'infusion ont également été posés : au niveau des veines mésentérique et ruminale (*Ortigue et al., 1994*) (**Figure 8**).

### 2.3. Alimentation

Les vaches ont été alimentées successivement avec quatre régimes expérimentaux différents. Ces régimes se caractérisaient d'une part, par leur niveau de couverture des besoins protéiques par rapport à l'énergie, selon *INRA (1988, 2007)* : soit Normal (N, 100 g PDIE/UFL) soit Bas (B, 80 g PDIE/UFL) (**Tableau 1**) et d'autre part, par la nature des glucides et donc de l'énergie nette de la ration : amidon (A) ou parois végétales (P). Ils étaient iso-énergétiques et constitués de 50% de fourrage et de 50% de concentré (**Tableau 2**). Dans les régimes riches en parois végétales, le principal fourrage était l'ensilage d'herbe, alors que du maïs déshydraté, riche en amidon, a été utilisé dans les régimes Amidon. La paille de blé permet, dans un régime pauvre en fibre, d'éviter l'acidose ruminale. L'ajout de foin permet aussi d'apporter des fibres et de maintenir une teneur minimum en Neutral Detergent Fiber (NDF) de 30%. Les concentrés tels que le maïs, l'orge, le blé et le blé tendre sont reconnus pour apporter de l'amidon tandis que les sous-produits comme les coques de soja, les pulpes de citrus, les pulpes de betteraves déshydratées apportent des fibres. Le tourteau de soja tanné a permis d'équilibrer les teneurs en protéine digestible dans l'intestin (PDI), notamment des régimes riches en énergie (**Annexe 1**). De plus, des compléments en minéraux et vitamines (Galaphos®) et méthionine protégée (Smartamine®, apportée pour équilibrer les rapports de Méthionine et de Lysine entre régimes) ont été distribués. Les apports alimentaires ont été calculés pour couvrir 100% des besoins énergétiques des vaches (*INRA, 2007*) calculés en fonction de leurs poids vifs, de la production laitière au milieu de la période expérimentale, du

**Tableau 1 :** Valeurs alimentaires estimées d'après les tables INRA (2007) des régimes expérimentaux pour vaches laitières

	Bas Protéine/Energie (80g PDIE/UFL)		Normal Protéine/Energie (100g PDIE/UFL)	
	Amidon	Parois végétales	Amidon	Parois végétales
	<b>BA</b>	<b>BP</b>	<b>NA</b>	<b>NP</b>
<i>Valeurs alimentaires calculées</i>				
Amidon dégradable dans le rumen (g/kg MS)	94.9	3.5	94.3	3.67
ENL (UFL/kg MS)	1.01	0.99	0.99	0.98
PDIE (g/kg MS)	78.7	79.8	97.7	96.8
PDIN (g/kg MS)	72.8	71.5	105.5	105.8
PDIN-PDIE (g/kg MS)	-5.9	-8.3	7.8	9
PDIE/UFL	77.9	80.6	98.7	98.8

**Tableau 2 :** Composition en ingrédients des quatre régimes expérimentaux pour vaches laitières

	Bas Protéine/Energie (80g PDIE/UFL)		Normal Protéine/Energie (100g PDIE/UFL)	
	Amidon	Parois végétales	Amidon	Parois végétales
	<b>BA</b>	<b>BP</b>	<b>NA</b>	<b>NP</b>
<i>Fourrage (% matière sèche (MS))</i>				
Ensilage d'herbe	12	30	5	33
Foin <sup>1</sup>	16	4	8	9
Mais déshydraté	22	16	28	8
Paille de blé broyée, mélassée			9	
<i>Concentré (% matière sèche)</i>				
Mais	28		30	
Orge	9.3			
Son fin de blé			2.9	
Blé tendre	9.2		2.6	
Coque de soja		22.8		25.6
Pulpe de citrus		7.1		
Pulpe betterave déshydratée		17.6		11
Tourteau de soja tanné	0,4		11.7	10.8
Urée	0.6	0.6	1.3	0.5
Palmitostéarine <sup>2</sup>	0,4	1.3		1.1
Mélasse de canne				
	2.1	1	1.5	1.5
<i>Compléments alimentaires</i>				
Minéraux-vitamines <sup>3</sup> (gramme/jour)	200	200	200	200
Méthionine protégée <sup>4</sup> (mg/kg MS)	308	431	524	769

<sup>1</sup> Prairie permanente, demi-montagne (Auvergne) fané au sol par beau temps 1<sup>er</sup> cycle, floraison

<sup>2</sup> acide gras hydrogéné palmitique

<sup>3</sup> Galaphos : 4.5% P, 20% Ca, 4.5% Mg, 5% Na

<sup>4</sup> Smartamine (Adisseo)

taux butyreux et de la persistance de la lactation (98,2% mesurée chez des vaches jersiaises) (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2012), selon la formule suivante :

$$\text{Besoins énergétiques de l'animal (en UFL)} = [(0.041 \times \text{PV}^{0.75}) \times \text{Iact}] + (0.44 \times \text{PL}_{4\%})$$

avec PV : poids vif ; Iact : indice d'activité

et PL<sub>4%</sub> : production de lait à 4% de matière grasse

Les besoins de gestation n'ont pas été pris en considération car les chaleurs des vaches ont été bloquées par la pose d'implants tout le long de l'expérimentation. Les besoins totaux ont été majorés de 10% (marge de sécurité) pour tenir compte de différences observées entre l'ingestion ad libitum de vaches Jersiaises (cette expérimentation) et de vaches Holstein (pour lesquelles sont formulées les recommandations).

Ensuite les rations ont été élaborées de manière à être iso-énergétiques par addition pondérée des valeurs d'énergie nette de chaque aliment. Un terme correctif a été soustrait à la somme des apports énergétiques des aliments afin de tenir compte des interactions digestives. Les apports énergétiques sont restés stables sur les quatre périodes expérimentales pour une vache donnée. Les rations ont été fractionnées en vingt-quatre repas égaux par jour (de 1.5 à 2 kg par repas, soit 36 à 48 kg par jour) afin que l'état métabolique des animaux reste stable au cours de la journée. Chaque quantité d'aliment distribué était pesée avec précision (à 10 à 20 g près). Les aliments agglomérés tels que les agglomérés de concentré, de paille, de maïs déshydraté, la pulpe de betterave, la Smartamine® et le Galaphos® étaient distribués automatiquement par l'intermédiaire de distributeurs alors que l'ensilage d'herbe et les autres fourrages étaient distribués manuellement 3 fois par jour (25% à 8h00, 25% à 11h30 et 50% à 16h30). Les animaux avaient à leur disposition de l'eau en permanence.

#### 2.4. Calendrier et plan expérimental

Les opérations chirurgicales se sont étalées de septembre 2010 à janvier 2011 en raison des dates de vêlage. Après opération chirurgicale, les vaches ont bénéficié de quatre semaines de récupération avant le début de l'expérimentation. Par la suite, chaque vache a reçu successivement chacun des quatre régimes expérimentaux selon un carré latin 4x4. L'expérimentation s'est ainsi échelonnée sur quatre périodes, chacune constituée de quatre semaines pour une bonne adaptation des vaches aux régimes. Les prélèvements sanguins ont été effectués sur l'avant dernier jour de chaque période.





**Figure 9 :** Illustration des conditions expérimentales les jours de prélèvements sanguins :

- a- Vache Jersiaise équipée de la ligne d'infusion (PAH) avec à son côté le matériel de prélèvements sanguins
- b- Prélèvements sanguins par l'intermédiaire de cathéters
- c- Infusion de PAH par l'intermédiaire de pousse-seringue

## 2.5. Mesures et prélèvements

### 2.5.1. Poids des animaux et production laitière

Les vaches ont été pesées le premier et dernier jour de chaque période expérimentale. Les vaches étaient traitées deux fois par jour, avec un intervalle de traite de 11h en journée.

### 2.5.2. Aliments, Refus

Des prélèvements d'aliments étaient effectués deux fois par semaine pour l'ensilage d'herbe et une fois par semaine pour le foin, les concentrés, la pulpe de betteraves et le maïs déshydraté. Ces échantillons ont partiellement été utilisés pour la détermination hebdomadaire de leur teneur en matière sèche (à l'étuve à 103°C pendant 24 heures). Le reste des échantillons était conservé à température ambiante, excepté pour l'ensilage d'herbe qui était congelé à -20°C, pour l'analyse de leur composition chimique. De plus, un échantillonnage de chacun des aliments a été réalisé le jour et la veille des prélèvements sanguins afin d'analyser leur teneur en matière sèche et composition chimique.

Les refus ont été pesés chaque jour et une appréciation visuelle de la composition en ingrédients des refus a été réalisée. De plus, chaque jour de prélèvement sanguin (J+1), les refus étaient pesés et évalués chaque heure (à partir de 8h00). Si les refus horaires étaient inférieurs à 500 g, ils étaient remis dans l'auge après pesée ; sinon ils étaient retirés et congelés à -20°C en attendant leur analyse (teneur en matière sèche et analyse chimique).

### 2.5.3. Débits sanguins

Les débits sanguins en veines porte et sus-hépatique ont été mesurés les jours de prélèvements sanguins, par dilution de marqueur, l'acide para-amino hippurique (PAH) (*Katz et Bergman, 1969*). La solution à infuser était préparée en diluant 100g de PAH /L dans de l'eau distillée avant stérilisation à l'autoclave. Après l'injection d'une surcharge initiale de 40 mL de la solution de PAH en veine mésentérique, quarante cinq minutes avant le premier prélèvement sanguin, la solution de PAH a été infusée en continu (1.2 mL/min, soit 7,2 g/h) à l'aide de pousse-seringues pour moitié au niveau de la veine ruminale et pour moitié au niveau de la veine mésentérique (**Figure 9**) pendant toute la durée des prélèvements (soit 6 h).

### 2.5.4. Sang

Les prélèvements sanguins ont été réalisés l'avant dernier jour de chaque période en J+1. Six séries d'échantillons ont été prélevés en raison d'une toutes les heures de 11h30 jusqu'à 16h30 (H1 à H6). Au sein de chaque série, trois échantillons sanguins ont été prélevés



sur héparine en artère mésentérique, veine porte et veine sus-hépatique en vue de la détermination immédiate de l'hématocrite, du dosage du PAH et des AGV. Pour le dosage du PAH, 9 mL de sang ont été prélevés par vaisseau, puis centrifugés ; le plasma a été congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  en attente du dosage. Pour le dosage des AGV, les échantillons d'1 ml de sang par vaisseau ont été congelés dans l'azote liquide avant d'être stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.6. Analyses de laboratoire

### 2.6.1. Sur les aliments

Les aliments distribués et les refus associés à chaque journée de prélèvement sanguin ont été analysés pour leurs teneurs en matière sèche ( $103^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures), matière organique (MO,  $550^{\circ}\text{C}$  pendant 3 heures, *AOAC, 2005*), matières azotées totales (MAT Kjeldahl, *AOAC, 2005*), paille (Neutral Detergent Fiber, NDF selon Van Soest, *AOAC, 2005*) et extrait éthéré (EE avec l'éther de pétrole, *AOAC, 2005*).

Une fois ces éléments quantifiés, la matière organique fermentescible (MOF) et le NDF digestible (NDFd) ont été déterminés à partir des valeurs tables :

$$\text{MOF} = \text{MOD} - \text{PF} - \text{MATNDR} - \text{EE} - \text{AmidonNDR}$$

Avec MOD, PF, MATNDR, EE et Amidon NDR qui sont respectivement la matière organique digestible, les produits de la fermentation, les matières azotées totales non dégradées dans le rumen, l'extrait éthéré et l'amidon non dégradé dans le rumen

$\text{NDFd} = \text{teneur NDF} \times \text{digestibilité NDF}$ , en appliquant la digestibilité des rations déterminée dans un essai précédent (*Cantalapiedra-Hijar et al., 2012*).

### 2.6.2. Sur le sang et le plasma

L'hématocrite a été déterminée par centrifugation des échantillons sanguins placés dans un tube capillaire durant deux minutes.

Le PAH a été dosé sur les échantillons plasmatiques, en vue de déterminer les débits sanguins au niveau porte et sus-hépatique, selon la méthode de *Hamburger et al. (1948)*. Une étape de déacétylation a été réalisée afin de tenir compte de l'acétylation partielle du PAH au niveau du foie (*Rodríguez-López et al., 2012*) avec ajout d'une solution d'acide chlorhydrique à l'échantillon avant incubation à  $90^{\circ}\text{C}$  pendant une heure (*Lobley et al., 1995*).

Les principaux acides gras volatils (acétate, propionate et butyrate) ont été dosés dans les échantillons de sang artériel, veineux portal et sus-hépatique. Les échantillons ont été décongelés à  $+4^{\circ}\text{C}$  la veille du dosage. Ces conditions standard de décongélation ont été déterminés dans le cadre de mon stage afin d'éviter toute synthèse *de novo* d'acétate (*Rémesy*



et Démigné, 1974). La décongélation a un impact sur le taux de récupération de l'acétate : une décongélation à T° ambiante conduit à un taux de récupération de l'acétate de 134% alors qu'il est de 111% à +4°C. Le dosage (détaillé en **Annexe 2**) a été réalisé selon la méthode de Reynolds et al. (1986) après déprotéinisation par un mélange de Ba(OH)<sub>2</sub> (0,3 N) et ZnSO<sub>4</sub> (0,3 N), centrifugation, extraction par passage sur colonne échangeuse de cations (chargée en ions H<sup>+</sup>) puis d'anions (chargée en ions HO<sup>-</sup>), puis séparation et quantification par chromatographie phase gazeuse. La phase stationnaire utilisée était une colonne polaire (FFAP 25 m de long \*0.53 mm), la phase mobile de l'hélium et le détecteur à ionisation de flamme. L'étalon interne utilisé était le 2-éthylbutyric (20 µL). Dans le cadre de ce stage, cette méthode de dosage a été validée en termes de fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire) selon les normes AFNOR V0310 (1998) (les résultats sont présentés dans **l'Annexe 3**).

## 2.7. Calculs

### 2.7.1. Quantités ingérées

Les quantités réellement ingérées par les animaux ont été déterminées par différence entre les quantités d'aliments distribués et les quantités de refus.

### 2.7.2. Débits sanguins

Tout d'abord, les débits plasmatiques ont été calculés à partir des concentrations plasmatiques de PAH et des formules suivantes (Katz et Bergman, 1969) :

**Débit plasmatique en veine (soit porte, soit sus-hépatique) (l/min)=**

$$\frac{[\text{Concentration du PAH infusé (mg/l)} \times \text{Taux d'infusion (l/min)}]}{[(\text{Concentration PAH veine} - \text{Concentration PAH artère}) \text{ (mg/l)}]}$$

**Débit plasmatique en artère hépatique (l/min) =**

Débit sanguin en veine sus-hépatique (l/min) - débit sanguin en veine porte (l/min)

Les débits sanguins ont ensuite été calculés à partir des formules suivantes :

**Débit sanguin (l/min) = Débit plasmatique (l/min) / (1 - hématocrite du vaisseau étudié)**

### 2.7.3. Flux sanguins d'acide gras volatils

Les flux (ou bilans) nets sanguins sont calculés à partir des débits sanguins et des concentrations en acides gras volatils. Ils correspondent à la différence entre flux efférent

**Tableau 3:** Equations de prédiction de l'apparition nette portale (*Loncke et al., 2009*) et des flux nets hépatiques (*Loncke, 2009*) des acides gras volatils majeurs [Acétate (C2), Propionate (C3) et Butyrate (C4)] chez la vache laitière ainsi que la liste des abréviations utilisées et des unités.

Abréviations	Description	Unité
NDFd	Neutral Detergent Fiber digestible	kg/jr
MOFI	Matière organique fermentée ingérée	kg/jr
ANP AGVT	Apparition nette portale des AGV totaux	mmol/jr/kg de PV
PMVP C2	Proportion molaire en veine porte C2	mol/100mol
PMVP C3	Proportion molaire en veine porte C3	mol/100mol
PMVP C4	Proportion molaire en veine porte C4	mol/100mol
ANP C2	Apparition nette portale C2	mmol/min
ANP C3	Apparition nette portale C3	mmol/min
ANP C4	Apparition nette portale C4	mmol/min
FNH C3	Flux net hépatique C3	mmol/h/kg PV
FNH C4	Flux net hépatique C4	mmol/h/kg PV
Modèles ANP chez des vaches laitières ( <i>Loncke et al., 2009</i> )		RMSE
ANP AGVT	$0.06^{NS} \pm 0.20 + 0,247^{***} \pm 0.022 \times \text{MOFI}$ (Equation 1)	0,243
PMVP C2	$58,7^{***} \pm 2,5 + 25,1^{***} \pm 5,1 \times 0.9\text{NDFd/MOF}$ (Equation 2)	0.023
PMVP C3	$34,0^{***} \pm 2,5 - 18,9^{**} \pm 5,0 \times 0,9\text{NDFd/MOF}$ (Equation 3)	0.022
PMVP C4	$7,9^{***} \pm 1,1 - 7,3^{**} \pm 2,1 \times 0.9\text{NDFd/MOF}$ (Equation 4)	0.011
Combinaison des modèles précédents		
ANP C2	ANP AGVT×Proportion molaire C2×100 (Equation 5)	
ANP C3	ANP AGVT×Proportion molaire C3×100 (Equation 6)	
ANP C4	ANP AGVT×Proportion molaire C4×100 (Equation 7)	
Modèle FNH chez des vaches laitières ( <i>Loncke, 2009</i> )		RMSE
FNH C3	$-0,0353^1 \pm 0.013 - 0.910^{***} \pm 0.028 \times \text{ANP-C3}$ (Equation 8)	0.027
FNH C4	$-0.0034^{NS} \pm 0.010 - 0.756^{***} \pm 0.071 \times \text{ANP-C4}$ (Equation 9)	0.01

<sup>1</sup>: Effet du stade physiologique P<0,01. L'intercept est de (-0,0025-0,0328)=-0,0353 pour la lactation

(sortant) et afférent (entrant). Un flux net positif indique une émission par le tissu alors qu'un flux net négatif indique une extraction. Ils ont été déterminés de la manière suivante :

**Bilan net du tube digestif = Apparition nette portale (mmol/min)**

= (Débit sanguin portal (l/min) × [(Concentration portale AGV (μmol/g) - (Concentration artérielle AGV (μmol/g))] × Densité du sang (g/ml))

La densité du sang est de 1,06 g/ml.

**Bilan (ou flux) net hépatique (mmol/min) =**

[(Débit sanguin sus-hépatique (l/min) × (Concentration sus-hépatique AGV (μmol/g))] - [(Débit sanguin portal (l/min) × ((Concentration portale AGV (μmol/g) + (Débit sanguin artériel (l/min) × (Concentration artérielle AGV (μmol/g)))] × Densité du sang (g/ml))

**Bilan (ou flux) net splanchnique =** Apparition nette portale + Bilan net hépatique

**Le taux d'extraction hépatique** correspond au bilan net hépatique divisé par le flux hépatique afférent.

**2.7. Equations de prédiction**

Les équations utilisées de prédiction de l'apparition nette portale et des flux nets hépatiques ont été établies par *Loncke (2009)* (**Tableau 3**).

**2.8. Analyse statistique**

L'influence du niveau azoté (Bas/Normal) et de la nature des glucides (Amidon/Parois) ainsi que l'interaction niveau azoté×nature glucides sur les variables mesurées a été testée par analyse de variances selon un schéma en carré latin avec un arrangement factoriel 2x2 des traitements en appliquant le modèle linéaire général (GLM) du logiciel SAS. Le modèle statistique était le suivant :

Y= animal + période + niveau azoté + nature glucides + niveau azoté×nature glucides + erreur

En cas d'interaction significative, les moyennes des traitements ont été comparées par test de Tukey. Certaines mesures étant manquantes, les résultats sont rapportés sous forme de LS Means. Pour comparer les valeurs de flux nets prédits et mesurés, les différences ont été calculées et testées par test t apparié de Student.



**Tableau 4 :** Teneurs moyennes des régimes expérimentaux Bas en azote et Amidon (BA), Bas en azote et Parois végétales (BP), Normal en azote et Amidon (NA) et Normal en azote et Parois végétales (NP) en matière sèche (MS), matière organique (MO), matières azotées totales (MAT), en Neutral Detergent Fiber (NDF) et en Extrait Ethéré (EE).

	Régimes			
	BA	BP	NA	NP
<b>MS</b> (g MS/100 g Matière fraîche)	81,52	69,70	86,33	66,73
<b>MO</b> (g/100 g MS)	94,97	92,73	95,22	91,99
<b>MAT</b> (g/100 g MS)	11,71	12,20	15,89	16,83
<b>NDF</b> (g/100 g MS)	32,18	46,36	31,21	46,34
<b>Amidon</b> (g/100 g MS)	34,69	5,83	34,02	4,42
<b>EE</b> (g/100 g MS)	3,52	3,35	3,30	3,54

**Tableau 5 :** Poids vif, production laitière et quantités ingérées en matière sèche (MS), matière organique (MO), matières azotées totales (MAT), Neutral Detergent Fiber (NDF), amidon, matière organique fermentée (MOF), Neutral Detergent Fiber digestible (NDFd), PDIE et UFL des vaches Jersiaises recevant des régimes Bas en azote et amidon (BA), Bas en azote et parois végétales (BP), Normal en azote et amidon (NA) et Normal en azote et parois végétales (NP). La production laitière et les quantités ingérées rapportées ont été mesurées lors de la journée de mesure sur chaque traitement. Les LS Means sont présentées.

	Régimes					Probabilité		
	BA	BP	NA	NP	SEM <sup>1</sup>	Niveau azoté Bas/Normal	Nature glucides Amidon/Paroi	Interaction Niveau/Nature
<b>Poids vif moyen des 5 vaches (kg)</b>	355	367	362	371	5.682	0.09	0.88	0.14
<b>Production laitière (kg/j)</b>	16.25	15.72	18.17	17.40	0.846	0.03	0.39	0.74
<b>Quantités ingérées:</b>								
<b>MS (kg/j)</b>	14.59	14.59	14.98	15.31	0.343	0.02	0.18	0.48
<b>MO (kg/j)</b>	13.39	12.87	13.77	13.39	0.704	0.28	0.64	0.95
<b>MAT (kg/j)</b>	1.73	1.77	2.42	2.51	0.037	0.001	0.02	0.45
<b>NDF (kg/j)</b>	4.67	6.77	4.67	6.67	0.138	0.04	0.001	0.21
<b>amidon (kg/j)</b>	5.06	0.85	5.09	0.68	0.188	0.81	0.001	0.68
<b>RfOM (kg/j)</b>	7.38	8.13	7.85	9.10	0.209	0.01	0.001	0.19
<b>RdNDF (kg/j)</b>	2.34	4.76	2.34	5.09	0.112	0.04	0.001	0.15
<b>PDIE (g PDIE/j)</b>	1190	1234	1492	1507	28.001	0.001	0.07	0.86
<b>UFL</b>	14.90	14.63	14.93	15.12	0.351	0.07	0.40	0.39
<b>PDIE/UFL</b>	80	84	100	100				

<sup>1</sup>SEM (Standard Error of Mean) = (variance résiduelle/ nombre d'observations par traitement) <sup>1/2</sup> avec n=5

### 3. Résultats

#### 3.1. Animaux et cathéters

Au cours de l'expérimentation, la santé des animaux et la fonctionnalité des cathéters sont restées en bonne état. Toutefois, une vache a présenté d'importants problèmes d'aplombs arrières et d'ingestion en dernière période expérimentale (régime NP) et aucun prélèvement n'a été réalisé. Par ailleurs, la fonctionnalité du cathéter sus-hépatique a été perdue chez deux vaches, soit en dernière (vache n° 110, régime NA) ou pour les deux dernières (vache n° 117, régimes BA et NA) périodes expérimentales. Compte-tenu de ces échantillons manquants, tous les résultats obtenus sur les 5 vaches (4 prévues au carré latin + 1 supplémentaire) ont été analysés et les résultats sont rapportés sous forme de LSmeans.

#### 3.2. Composition des rations et ingestion

Le **Tableau 4** présente la composition chimique mesurée des régimes expérimentaux. La teneur en MO des régimes Amidon était légèrement plus élevée que celle des régimes Paroi (95,1 vs 92,4 g/100g MS). Comme prévu dans la formulation, le niveau azoté des régimes était plus élevé avec les régimes N vs B (16,4 vs 11,9 g/100g MS). De même, les régimes riches en Parois présentaient des teneurs en NDF supérieures (46,3 vs 31,7 g/100g MS) et en amidon inférieures (5,1 vs 34,3 g/100g MS) aux régimes riches en Amidon, conduisant à un rapport NDF/amidon de 9.1 vs 0.9. Enfin la teneur en EE était similaire entre régimes s'élevant en moyenne à 3,4 g/100g de MS.

Le poids vif moyen des vaches était de 364 kg (**Tableau 5**). La production laitière était supérieure dans les régimes Normal par rapport aux régimes Bas (17,79 vs 15.99 kg/j,  $P < 0.05$ ). Les quantités de matières organiques ingérées étaient similaires malgré des différences d'ingestion de matière sèche. Les différences observées entre la composition chimique de l'offert et de l'ingéré ne sont pas numériquement différentes. Ainsi comme planifié, les régimes à niveau azoté Normal se caractérisent par des quantités ingérées de MAT supérieures de 41% aux régimes Bas ( $P < 0.001$ ). Par contre, les quantités ingérées de MAT étaient significativement supérieures ( $P < 0.05$ ) avec les régimes Parois (2.14 kg/j) vs Amidon (2.08 kg/j), avec une tendance similaire pour les PDIE ingérées, mais avec des écarts toujours inférieurs à 5%. De même les régimes riches en Parois se caractérisent par une ingestion de NDF supérieure de 44% ( $P < 0.001$ ) et une ingestion d'amidon inférieure de 85% ( $P < 0.001$ ) à celles des régimes Amidon. Sur la base de la digestibilité des valeurs, la MOF ingérée a été calculée entre 7,4 et 9,1 kg/j avec des valeurs 14% plus élevées avec les régimes Amidon vs Parois et 7% plus élevées avec les régimes Normal vs Bas. Le NDFd ingéré était

**Tableau 6 :** Hématocrite moyenne et débits plasmatiques et sanguins (l/min) en artère hépatique, veine porte et veine sus hépatique des vaches Jersiaises recevant des régimes Bas en azote et Amidon (BA), Bas en azote et Parois végétales (BP), Normal en azote et Amidon (NA) et Normal en azote et Parois végétales. Les LS Means sont présentées.

	Régimes					Probabilité		
	BA	BP	NA	NP	SEM <sup>1</sup>	Niveau azoté Bas/Normal	Nature glucides Amidon/Paroi	Interaction Niveau/Nature
<b>Hématocrite</b>	0,24	0,24	0,25	0,26	0,008	0,08	0,62	0,58
<b>Débits plasmatiques (l/min)</b>								
AH	1,90	1,96	1,45	1,65	0,326	0,38	0,80	0,87
VP	17,42	17,94	14,48	16,78	0,910	0,07	0,18	0,38
VSH	18,83	19,81	14,26	18,58	1,162	0,10	0,18	0,31
<b>Débits sanguins (l/min)</b>								
AH	2,44	2,59	1,92	2,24	0,409	0,42	0,71	0,88
VP	22,79	23,45	19,26	22,52	1,251	0,13	0,17	0,35
VSH	24,34	25,48	18,90	25,01	1,654	0,20	0,20	0,30

<sup>1</sup>SEM (Standard Error of Mean) = (variance résiduelle/ nombre d'observations par traitement) <sup>1/2</sup> avec n=5

**Tableau 7 :** Concentrations sanguines en artère, veine porte, veine sus-hépatique, bilans nets au niveau des tissus drainés par la veine porte, du foie, et des tissus splanchniques (mmol/min), et taux d'émission ou d'extraction nette pour l'acétate, le propionate, le butyrate mesurés chez les vaches Jersiaises recevant des régimes Bas en azote et Amidon (BA), Bas en azote et Parois végétales (BP), Normal en azote et Amidon (NA) et Normal en azote et Parois végétales. Les LS Means sont présentées.

	Régimes					Probabilité		
	BA	BP	NA	NP	SEM <sup>1</sup>	Niveau azoté Bas/Normal	Nature glucides Amidon/Paroi	Interaction Niveau/Nature
<b>Acétate</b>								
Concentrations sanguines (mmol/l)								
Artère	1.70	2.02	1.55	2.19	0.095	0.90	0.01	0.15
Veine porte	2.41	2.93	2.33	3.20	0.097	0.41	0.001	0.13
Veine sus hépatique	2.41	2.87	2.26	3.07	0.098	0.86	0.01	0.22
Bilan nets (mmol/min)								
Tissus drainés par la veine porte	16.34	21.31	14.63	22.23	1.802	0.84	0.01	0.51
Foie	3.45	0.33	0.72	-0.70	1.699	0.41	0.41	0.71
Tissus splanchniques	22.18	21.84	17.63	21.48	1.568	0.26	0.48	0.35
Taux d'émission foie (%)	7.00	0.70	2.20	-0.94	0.025	0.34	0.25	0.64
<b>Propionate</b>								
Concentrations sanguines (mmol/l)								
Artère	0.07	0.08	0.08	0.07	0.007	0.99	0.81	0.19
Veine porte	0.37	0.43	0.44	0.44	0.034	0.32	0.43	0.40
Veine sus hépatique	0.07	0.09	0.08	0.09	0.007	0.81	0.39	0.46
Bilan nets (mmol/min)								
Tissus drainés par la veine porte	6.84	8.32	6.78	8.28	0.582	0.94	0.04	0.98
Foie	-6.03	-8.03	-6.65	-7.93	0.643	0.75	0.14	0.68
Tissus splanchniques	0.34	0.28	0.33	0.37	0.065	0.65	0.89	0.58
Taux extraction foie (%)	77.40	77.20	82.20	78.60	0.012	0.08	0.32	0.31
<b>Butyrate</b>								
Concentrations sanguines (mmol/l)								
Artère	0.04	0.03	0.04	0.02	0.004	0.48	0.03	0.48
Veine porte	0.15	0.10	0.16	0.10	0.008	0.57	0.001	0.55
Veine sus hépatique	0.06 <sup>a</sup>	0.04 <sup>b</sup>	0.04 <sup>b</sup>	0.03 <sup>b</sup>	0.002	0.001	0.01	0.01
Bilan nets (mmol/min)								
Tissus drainés par la veine porte	2.60	1.74	2.41	1.83	0.175	0.79	0.01	0.47
Foie	-1.90	-1.47	-1.94	-1.58	0.174	0.74	0.18	0.86
Tissus splanchniques	0.69 <sup>a</sup>	0.26 <sup>b</sup>	0.24 <sup>b</sup>	0.27 <sup>b</sup>	0.050	0.01	0.04	0.02
Taux extraction foie (%)	57.40 <sup>a</sup>	60.00 <sup>a</sup>	76.20 <sup>b</sup>	65.00 <sup>ab</sup>	0.020	0.01	0.20	0.04

<sup>1</sup>SEM (Standard Error of Mean) = (variance résiduelle / nombre d'observations par traitement) <sup>1/2</sup> avec n=5

a, b, ab :Les valeurs affectées de lettres sont significativement différentes (P<0.01)

aussi plus élevé avec les régimes Parois vs Amidon (4,9 vs 2,34 kg/j, ( $P < 0.001$ )), ainsi qu'avec les régimes Normal vs Bas (3,7 vs 3.6,  $P < 0,05$ ). Tous ces éléments seront pris en considération pour appliquer les équations de prédiction. Par conséquent et comme planifié, les quantités ingérées d'énergie nette de lactation étaient en moyenne de 15 UFL quel que soit le régime, conduisant à un rapport PDIE/UFL de l'ordre de 82% pour les régimes à Bas niveau azoté et à 99,8% pour les régimes à niveau azoté Normal.

### 3.3.Débits sanguins

Les débits sanguins ont varié de 19,26 à 23,45 l/min au niveau portal et de 18,90 à 25,48 l/min au niveau sus-hépatique (**Tableau 6**). Par conséquent, les débits sanguins en artère hépatique étaient faibles (de 1,91 à 2,59 l/min) ne contribuant que pour 9,8% au débit hépatique total. Aucune différence significative entre traitements n'a été détectée, malgré une augmentation numérique de 2,3 et 4,3 l respectivement en veines porte et sus-hépatique avec les régimes Parois. L'augmentation numérique était due à un seul animal présentant des débits sanguins élevés avec le régime BA.

### 3.4.Concentrations sanguines, bilan et taux extraction d'AGV

Le **Tableau 7** présente les concentrations, bilans nets et taux d'émission ou d'extraction pertinents aux niveaux des tissus drainés par la veine porte, du foie et des tissus splanchniques pour les trois acides gras volatils majeurs : l'acétate, le propionate, le butyrate.

**Acétate** L'analyse GLM montre que seule la nature des glucides alimentaires (amidon/paroi) et non la teneur en PDI des régimes, a eu un effet significatif sur les résultats. Les concentrations artérielles, portales et sus-hépatiques en acétate étaient plus élevées de 20% à 38% ( $P < 0,01$ ) avec les régimes Parois par rapport aux régimes Amidon. Les différences de concentrations portales – artérielles étaient aussi 28% plus élevées avec les régimes Parois. Associées aux variations numériques de débit sanguin portal, ces différences ont conduit à une apparition nette portale d'acétate plus importante avec les régimes Parois qu'avec les régimes Amidon (21,5 vs 15 mmol/min respectivement). Au niveau hépatique, le foie émet (régimes BP et NA) ou capte (régime NP) de l'acétate en quantités non significativement différentes de zéro, 0,329, 0,721 et -0,701 mmol/min respectivement. En revanche avec le régime BA, les quantités émises sont légèrement supérieures à zéro (3.445 mmol/min) dues à une valeur de débit d'une des vaches supérieure aux autres. L'émission splanchnique d'acétate reflète l'augmentation d'apparition nette portale avec les régimes

**Tableau 8 :** Comparaison entre les résultats moyens d'apparition nette portale (ANP) prédits (les numéros d'équation se rapportent au tableau 3), et mesurés pour les AGVT, l'acétate, le propionate, le butyrate chez des vaches Jersiaises recevant des régimes Bas en azote et Amidon (BA), Bas en azote et Parois végétales (BP), Normal en azote et Amidon (NA) et Normal en azote et Parois végétales. Les LS Means sont présentées.

	Régimes				SEM <sup>1</sup>	Effets statistiques			Prédit/mesuré	
	BA	BP	NA	NP		Niveau azoté Bas/Normal	Nature glucides Amidon/Paroi	Interaction Niveau/Nature	Amidon	Paroi
<b>AGV totaux</b>										
ANP (mmol/min)										
prédit <sup>Equation1</sup>	20.15	21.25	21.03	23.54	0.406	**	***	NS		
mesuré	25.79	31.36	23.83	32.34	2.127	NS	*	NS	*	**
<b>Acétate</b>										
Proportion molaire en veine porte (mol/100mol AGVT)										
prédit <sup>Equation2</sup> α	65.86	71.93	65.43	71.33						
mesuré	63.01	68.08	61.58	68.53	2.353	NS	*	NS		
ANP (mmol/min)										
prédit <sup>Equation5</sup>	13.27	15.28	13.76	16.79	0.300	**	***	NS		
mesuré	16.34	21.31	14.63	22.23	1.802	NS	**	NS	NS	*
<b>Propionate</b>										
Proportion molaire en veine porte (mol/100mol AGVT)										
prédit <sup>Equation3</sup> α	28.61	24.04	28.93	24.49						
mesuré	26.74	26.77	28.23	26.11	2.131	NS	NS	NS		
ANP (mmol/min)										
prédit <sup>Equation6</sup>	5.77	5.11	6.08	5.77	0.098	***	**	NS		
mesuré	6.84	8.32	6.78	8.28	0.582	NS	*	NS	NS	**
<b>Butyrate</b>										
Proportion molaire en veine porte (mol/100mol AGVT)										
prédit <sup>Equation4</sup> α	5.82	4.05	5.94	4.23						
mesuré	10.26	5.15	10.19	5.36	0.552	NS	***	NS		
ANP (mmol/min)										
prédit <sup>Equation7</sup>	1.17	0.86	1.25	1.00	0.018	***	***	NS		
mesuré	2.60	1.74	2.41	1.83	0.175	NS	**	NS	***	**

<sup>1</sup>SEM (Standard Error of Mean) = (variance résiduelle / nombre d'observations par traitement) <sup>1/2</sup> avec n=5

α : Pas d'effet statistique pour les proportions molaires car le calcul est fait à partir d'un élément constant de la ration

Parois et l'émission hépatique permise par le régime BA, malgré l'absence de différences significatives, 21,7 vs 19,9 mmol /min avec les régimes Parois vs Amidon.

**Propionate** Les concentrations (artérielles, portales et sus-hépatiques) en propionate varient de 0.17 à 0.20 mmol/l sans effet régime significatif. Ces résultats associés aux variations numériques de débit sanguin génèrent un flux net de propionate en veine porte plus important de 22% avec les régimes Parois vs Amidon ( $P < 0,05$ ). Au niveau hépatique, la captation de propionate tendait à être plus importante numériquement de 26% avec les régimes Parois. La majorité du propionate apparaissant en veine porte est capté au niveau hépatique (taux moyen d'extraction de 79%), l'émission nette splanchnique est proche de zéro, 0.328 mmol/min en moyenne pour les quatre régimes.

**Butyrate** De même que pour l'acétate, les concentrations artérielles et portales en butyrate furent impactées par la nature des glucides, malgré une évolution différente : les concentrations en butyrate étaient 53% plus élevées avec les régimes Amidon vs Parois ( $P < 0,05$ ). En sus-hépatique, l'effet était plus important à Bas niveau azoté (interaction à  $P < 0,01$ ). Le bilan net de butyrate au niveau du tube digestif était supérieur ( $P < 0,01$ ) avec les régimes Amidon vs Parois (2.5 vs. 1.8 mmol/min), conduisant à une captation hépatique numériquement plus élevée de 26% (NS). Le taux d'extraction hépatique de butyrate étant élevé (65% en moyenne), peu de butyrate est émis par les tissus splanchniques (0.255 mmol/min en moyenne sauf pour le régime BA avec 0.685 mmol/min en raison du débit portal élevé d'une vache, interaction significative).

### 3.5. Comparaison aux résultats prédits

Le **Tableau 8** met en avant la comparaison entre les résultats mesurés et prédits de l'apparition nette portale (ANP) des différents AGV. Les prédictions sont basées sur les quantités ingérées des différents constituants digestibles des rations. D'un point de vue quantitatif, l'ANP des AGVT est prédite avec une sous-estimation de 24% par rapport aux valeurs mesurées, l'écart étant plus important pour les régimes Parois (-30%) vs Amidon (-17%) mais faiblement affecté par le niveau azoté des rations. En ce qui concerne les proportions molaires d'acétate et de propionate en veine porte, elles sont prédites à 5% près alors que la proportion molaire de butyrate prédite est très largement sous-estimée de 35% en moyenne ; la sous-estimation étant importante pour les régimes Amidon (-42%) et modérée pour les régimes parois (-21%). Par conséquent la sous-estimation de l'ANP de l'acétate

**Tableau 9 :** Comparaison entre les résultats moyens de flux nets hépatiques (FNH) prédits (les numéros d'équation se rapportent au tableau 3), et mesurés pour le propionate et le butyrate chez des vaches Jersiaises recevant des régimes Bas en azote et Amidon (BA), Bas en azote et Parois végétales (BP), Normal en azote et Amidon (NA) et Normal en azote et Parois végétales. Les LS Means sont présentées.

	Régimes				Effets statistiques					
	BA	BP	NA	NP	SEM <sup>1</sup>	Niveau azoté	Nature glucides	Interaction	Prédit/mesuré	
						Bas/Normal	Amidon/Paroi	Niveau/Nature	Amidon	Paroi
<b>Propionate</b>										
FNH (mmol/min)										
prédit <sup>Equation8</sup>	-6.39	-7.91	-6.39	-7.18	0.565	NS	NS	NS		
mesuré	-6.03	-8.03	-6.65	-7.93	0.643	NS	NS	NS	NS	*
<b>Butyrate</b>										
FNH (mmol/min)										
prédit <sup>Equation9</sup>	-1.99	-1.21	-1.82	-1.28	0.124	NS	**	NS		
mesuré	-1.90	-1.47	-1.94	-1.58	0.174	NS	NS	NS	NS	*

<sup>1</sup>SEM (Standard Error of Mean) = (variance résiduelle / nombre d'observations par traitement) <sup>1</sup>/<sub>2</sub> avec n=5

(-21%) et du propionate (-25%) reflète la sous-estimation de la prédiction de l'ANP des AGVT. Pour le butyrate, la sous-estimation de l'ANP prédite résulte des écarts combinés sur l'ANP des AGVT et des proportions molaires. En ce qui concerne les différences entre traitements, les différences entre régimes Amidon et Parois sont détectées comme étant significatives tant avec les prédictions qu'avec les mesures. Par contre, aucune différence significative d'ANP ne sont mesurées entre niveaux azotés alors qu'elles sont prédites. Ces divergences proviennent de faibles écarts numériques associés à des écarts types résiduels au moins 5 fois plus faibles sur les valeurs prédites.

Le **Tableau 9** présente les flux nets hépatiques prédits et mesurés des AGV. Les flux nets hépatiques (extraction en cas de valeurs négatives ou émission en cas de valeurs positives) sont prédits à partir des ANP mesurées, en adéquation avec les équations utilisées. Ils ne concernent que le propionate et le butyrate pour lesquels des équations de prédiction existent. L'extraction nette hépatique de propionate est correctement prédite avec les régimes Amidon (NS) et très légèrement sous-estimée avec les régimes Parois (-6%,  $P < 0.05$ ). De même, l'extraction nette du butyrate mesurée est en adéquation avec les résultats prédits pour les régimes Amidon (NS), mais sous-évaluée avec les régimes Parois (-18%,  $P < 0.05$ ).

### 3. Discussion

Avant d'évaluer la qualité des prédictions de flux sanguins splanchniques, les principaux résultats expérimentaux et leurs conditions d'obtention sont discutés.

#### 4.1. Conditions alimentaires et production laitière

Les régimes expérimentaux et les quantités distribuées avaient été formulés sur la base des critères usuels d'alimentation (besoins en UF et PDI rapportés au poids et au niveau de production des animaux) ainsi que sur de nouveaux critères de composition de régime proposés par *Loncke (2009)* qui sont la quantité de MOF ingérée et sa teneur en NDFd et amidon. Pour mieux tester l'influence de la composition de la MOF, la contrainte d'une proportion fourrages/concentré constante pour les 4 régimes a été imposée. Elle a conduit à faire varier la nature et la proportion des ingrédients entre chaque régime. Globalement les quantités ingérées ont reflété les différences recherchées de rapports PDIE/UF entre les régimes Normal vs Bas, de NDF et NDF/amidon entre les régimes Parois vs Amidon. La MOF, critère important pour la prédiction de l'ANP des AGVT, n'a pas pu être maintenue strictement constante, elle a varié dans une plage de 20% (+9 % avec les régimes Normal et



**Tableau 10 :** Comparaison entre les valeurs minimum et maximum de l'expérimentation et celle de la plage de validité des équations de prédiction chez la vache laitière pour les quantités ingérées de MS, MOF, NDFd, pour la composition du régime en MAT, NDF, Amidon, MOF, NDFd, pour les concentrations artérielles et l'ANP en acétate, propionate et butyrate.

	Valeurs de l'expérimentation		Plage de validité des équations de prédiction chez la vache laitière	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
Quantités ingérées (g/j/kg PV)				
MS	40	41	0	37
MOF	20	24	0	17
NDFd	6	14	0	9
Composition du régime (g/kg MS)				
MAT	117	168	85	247
NDF	312	464	149	710
Amidon	44	350	0	673
MOF	505	594	417	631
NDFd	156	332	95	427
Concentrations artérielles (mM)				
Acétate	1,5	2,2	1,3	2,0
Propionate	0,07	0,08	0,04	0,10
Butyrate	0,02	0,04	0,01	0,04
ANP (mmol/h/kg PV)				
Acétate	2,4	3,6	1,9	4,9
Propionate	1,1	1,4	0,8	1,9
Butyrate	0,28	0,44	0,14	0,33

+14% avec les régimes Parois). Il est aussi important de noter que les fortes teneurs en NDF des régimes ont été obtenues en incluant des sous-produits à teneur élevée en NDF et à digestibilité de ce NDF élevée. Elles sont associées à des quantités de MOF ingérées supérieures avec les régimes Parois.

Comme attendu, la production laitière a varié avec les apports de MAT, soit une variation de 2 kg/j pour une différence de 0,7kg MAT/j. La nature des glucides n'a eu aucun effet significatif sur la production laitière mesurée. En revanche, exprimée par kg de MOF, la production laitière a augmenté de 17% avec les régimes Amidon (2,25 vs 1,92 kg lait/kg MOF), en accord avec les résultats de *Cantalapiedra-Hijar et al. (2012)* obtenus avec les mêmes régimes.

## 4.2. Flux sanguins splanchniques d'acides gras volatils

### 4.2.1. Qualité du dosage des AGV

Les résultats de validation de méthode que nous avons obtenus (**Annexe 3**) ont montré que les concentrations mesurées d'acétate étaient toujours supérieures aux limites de quantification de la méthode, celles de propionate étaient proches de ces limites alors que celles de butyrate étaient inférieures suggérant une plus grande incertitude sur les résultats de butyrate. La méthode de dosage n'est donc pas totalement satisfaisante pour mesurer les concentrations d'AGV individuels dans différents vaisseaux sanguins. Il s'agit toutefois de la méthode considérée comme étant la meilleure à l'heure actuelle (*Quetant, 2001*). Les concentrations artérielles des différents AGV sont similaires à celles de la bibliographie (résumées dans le **Tableau 10**), qui ont toutes été obtenues en appliquant cette même méthode de dosage. La fidélité de la méthode s'étant avérée par ailleurs, satisfaisante (CV de répétabilité pour l'acétate : 6%, pour le propionate et le butyrate : 19%), nous considérons que la qualité des résultats d'AGV est globalement bonne comparée à celle des autres auteurs.

### 4.2.2. Influence du niveau azoté et de la nature des glucides sur l'apparition nette portale d'AGV

D'après Journet et al. (1995), les apports azotés ont un impact sur la digestibilité et donc la proportion d'énergie sous forme d'AGV. Par contre, à énergie digestible ingérée similaire, les apports azotés ont peu d'impact sur l'apparition nette portale d'AGVT et leurs proportions molaires. C'est le cas de cette expérience où les déficits azotés dans le rumen rapportés à l'énergie (différences PDIE-PDIN) étaient inférieurs aux limites fixées par les recommandations de l'INRA. Ainsi, les principaux effets sont liés à la nature des glucides.



Comparés aux régimes Amidon, les régimes Parois se sont caractérisés par une ANP supérieure pour l'acétate, comme attendu en raison de la teneur plus élevée des régimes en cellulose (*Journet et al., 1995*), mais aussi pour le propionate en raison principalement des quantités de MOF ingérées plus élevées (58 vs 54 mmol/h/ kg MOF). Par contre, l'ANP du butyrate s'est avérée élevée, voire supérieure aux valeurs maximum rapportées dans la bibliographie (**Tableau 10**), en particulier pour les régimes Amidon, caractérisés par une ANP de butyrate significativement supérieure à celle des régimes Parois. Ces résultats suggèrent pour les régimes Amidon un profil fermentaire ruminal proche de celui noté en acidose butyrique. La proportion élevée d'amidon de maïs dans les régimes, la faible taille des particules des grains (broyés avant agglomération) et la grande fréquence des repas sont des facteurs de risque des fermentations butyriques (*Eadi et al., 1970 ; Journet et al., 1995 ; Doreau et al., 2001*). En conclusion, le profil fermentaire recherché 'plus cétogénique' des régimes Parois vs. Amidon a bien été obtenu, sur la base du rapport acétate/propionate apparaissant en veine porte (2,62 vs 2,28, soit + 15%), conformément aux connaissances sur la digestion ruminale (*Journet et al., 1995*). Mais ces différences étaient plus faibles qu'attendues, comme indiqué par le rapport (acétate+butyrate)/propionate (2,83 vs 2,63, soit +8%), en raison de fortes fermentations butyriques avec les régimes Amidon.

#### 4.2.3. Influence du niveau azoté et de la nature des glucides sur les flux nets hépatiques d'AGV

Tous traitements confondus, la grande majorité du propionate et du butyrate afférent a été extraite par le foie. Les taux moyens d'extraction (respectivement 79 et 90%) sont légèrement inférieurs aux valeurs rapportées dans la bibliographie (90% (*Majdoub, 2002*), 80% (*Bergman et Wolff, 1971*)). Cela est dû en partie à des débits en artère hépatique inférieurs à ceux rapportés dans la bibliographie avec une contribution au débit sus-hépatique de 10% au lieu de 20% en moyenne (*Loncke, 2009*). En effet, des résultats récents obtenus par *Rodriguez-Lopez et al. (2012)* dans l'équipe ont montré une acétylation du PAH au niveau hépatique, et la nécessité d'une étape de dé-acétylation dans le dosage, contrairement à ce qui a été fait jusqu'à présent. Cette correction apportée à la détermination des débits sanguins explique aussi pourquoi les flux nets hépatiques d'acétate étaient (sauf exception liée à une vache) non significativement différents de zéro au lieu d'indiquer une synthèse endogène représentant en moyenne 24% de l'ANP d'acétate chez les vaches laitières (*Loncke, 2009*). Au-delà des valeurs absolues de taux d'extraction, l'extraction hépatique de butyrate a été accrue avec le régime NA. Ce résultat est surprenant car il est associé au taux d'extraction



hépatique du propionate le plus élevé, alors que ces deux nutriments sont activés par la même enzyme hépatique (l'acétyl-CoA-synthétase) et que les fortes concentrations de l'un inhibe le métabolisme hépatique de l'autre (*Kristensen et Harmon, 2004*).

#### 4.3. Evaluation des équations de prédiction des flux splanchniques d'AGV

Les valeurs des éléments caractérisant les régimes (MAT, NDF, Amidon et MOF) sont comprises dans l'intervalle des valeurs minimum et maximum rapportées par *Loncke (2009)* (**Tableau 10**). Toutefois, les conditions d'alimentation discutées précédemment et résumées dans le **Tableau 10** se situent pour certains paramètres en dehors de la plage de validité des équations de prédiction. En particulier nos vaches recevaient un niveau d'alimentation et des teneurs en NDFd des régimes Parois supérieurs. De plus, la composition de la MOF a varié à proportion fourrage : concentré fixe alors que dans la plupart des études publiées et utilisées par *Loncke (2009)* ces deux paramètres variaient de façon concomitante. Ces conditions, raisonnées pour répondre prioritairement aux objectifs du projet européen Rednex, sont donc des conditions extrêmes pour évaluer la qualité des prédictions.

Les divergences notées entre mesures et prédictions portent principalement sur deux points : 1) la sous-estimation de l'ANP-d'AGVT à partir de la MOF et 2) la sous-estimation de la proportion molaire de butyrate dans les AGV apparaissant en veine porte à partir du ratio NDFd/MOF. En ce qui concerne la MOF, les valeurs utilisées dans ce rapport sont des valeurs tirées des Tables INRA d'Alimentation (*2007*). Elles supposent une composition du régime non affectée par les refus pour quelques animaux. Elles sont utilisées de façon préliminaire en attente de la fin des analyses de laboratoire par l'équipe Amuvi. Des calculs théoriques indiquent que la MOF pourrait varier de 25% (*Canataliedra-Hijar G*, communication personnelle). Les incertitudes sur le calcul de la MOF avaient déjà été mises en avant par *Loncke (2009)* d'autant plus qu'il s'agit de valeurs calculées et non mesurées. La sous-estimation était plus importante avec les régimes Parois. Dans ces conditions expérimentales, les incertitudes étaient effectivement plus élevées en raison de l'emploi d'ensilage d'herbe (de digestibilité variable) et d'ingrédients peu utilisés en pratique, tels que la pulpe de citrus et les coques de soja.

Pour ce qui est de la sous-estimation de la proportion molaire prédite de butyrate, on peut supposer qu'elle est associée à l'emploi d'un seul prédicteur (NDFd/MOF). Le NDFd ne serait pas un critère suffisant, la vitesse de dégradation ruminale à la fois du NDF et de l'amidon, ainsi que les teneurs éventuelles en glucides solubles devraient sans doute être prises en considération (*Journet et al, 1995*). Les résultats d'ANP de butyrate mesurés dans



cette étude étant plus élevés que les valeurs maximum publiées (et synthétisées par *Loncke et al., 2009*), un effort particulier devrait être porté pour analyser et prédire l'ensemble des facteurs de risque favorisant les fermentations butyriques. Pour les expérimentations futures, l'amélioration de la sensibilité du dosage du butyrate (avec une baisse de sa limite de quantification) est un pré-requis pour établir de nouvelles relations plus fiables entre les conditions alimentaires et l'ANP de butyrate.

En ce qui concerne les proportions molaires d'acétate et de propionate en veine porte, les prédictions sont correctes pour tous les régimes, confirmant le choix du prédicteur. Au niveau hépatique, les écarts entre valeurs mesurées et prédites semblent partiellement liés au biais identifié dans la détermination du débit en artère hépatique. Les équations de prédiction devraient être corrigées pour en tenir compte.





## Conclusion et Perspectives

L'expérimentation Rednex a permis d'obtenir de nouvelles données d'ANP, flux nets hépatiques et émission nette splanchnique des principaux AGV : acétate, propionate, butyrate. Les résultats obtenus sont satisfaisants dans la mesure où en comparaison avec d'autres résultats expérimentaux, ils se situent dans la même plage de variation.

Dans cette expérimentation, l'ANP des AGV n'a pas été impactée par le niveau azoté. En revanche, la nature des glucides, et plus précisément les régimes Parois ont entraîné une ANP pour l'acétate et le propionate supérieure aux régimes Amidon. La particularité s'est portée sur l'ANP du butyrate qui s'est révélée plus élevée avec les régimes Amidon. Le propionate et le butyrate ont été captés très fortement par le foie. Ainsi les régimes Parois ont bien conduit à un profil d'AGV en veine porte plus cétogénique, bien que ces différences aient été atténuées par les fermentations ruminales très butyriques notées avec les régimes Amidon.

La comparaison des résultats mesurés avec les résultats obtenus à partir des équations de prédiction a permis d'identifier les équations qui ont abouties à des prédictions justes et celles pour lesquelles des divergences existent. Les équations conduisant à de faibles divergences entre valeurs mesurées et prédites sont celles qui prédisent les proportions molaires d'acétate et de propionate en veine porte, ainsi que l'extraction hépatique de propionate et de butyrate. Par contre, la surestimation de l'ANP des AGVT et des proportions molaire de butyrate en veine porte est mise en avant avec les prédictions. Ainsi, les écarts majeurs entre valeurs mesurées et prédites ont été observés lorsque les prédicteurs reflètent des caractéristiques des rations, calculées et non mesurées, alors que les flux d'AGV à travers le foie sont prédits à partir de critères mesurés et moins variables. L'amélioration des équations de prédiction passe par l'étude d'une meilleure évaluation de la MOF ingérée et des facteurs de risques des déviations fermentaires butyriques. Enfin, si de nouvelles expérimentations sont mises en place la méthode de dosage des AGV sanguins devra être améliorée afin de baisser très fortement les limites de quantification de ces molécules afin de les quantifier plus précisément.



## Références bibliographiques

- AOAC.** 2005. Official Methods of Analysis. 18th ed. Assoc. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Ash R and Baird GD.** 1973. Activation of volatile fatty acids in bovine liver and rumen epithelium. Evidence for control by autoregulation. *Biochemical Journal.* 136: 311-319.
- Arnaud P.**1975. Cours de chimie organique. Gauthier-Villars Ed., 9ème édition. 273-280.
- Balch DA and Rowland SJ.** 1957. Volatile fatty acids and lactic acid in the rumen of dairy cows receiving a variety of diets. *British Journal Nutrition.* 11: 288-298.
- Bergman EN.**1990. Energy contributions of volatile fatty acid from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews.*70,2,567-590.
- Bergman EN and Wolf JE.** 1971. Metabolism of volatile fatty acid by liver and portal-drained viscera in sheep. *American Journal of Physiology* 221 (2):586-592
- Bugaut M.** 1987. Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology B.* 86: 439-72.
- Cantalapiedra-Hijar G, Peyraud JL, Lemosquet S, Molina-Alcaide E, Boudra H, Noziere P, and Ortigues-Marty I.** 2012. Dietary energy source modifies the efficiency of N utilization in late lactation Jersey cows at two protein to energy ratio level. *Journal of Dairy Science* (soumis).
- Danfaer A.** 1994. Nutrient metabolism and utilization in the liver. *Livestock Production Science.* 39 : 115-127.
- Doreau M, Ollier A and Michalet-Doreau B.** 2001. Un cas atypique de fermentations ruminales associées à une cétose chez la vache en début de lactation. *Revue de Médecine Vétérinaire* 152 :301-306.
- Eadie JM, Hyldgaard-Jensen J, Mann SO, Reid RS and Whitelaw FG.** 1970. Observations on the microbiology and biochemistry of the rumen in cattle given different quantities of a pelleted barley ration. *British Journal Nutrition* 24:157-177.
- Giesecke D, Becke U, Wiesmayr S and Stangassinger M.** 1979. The effect of rumen epithelial development on metabolic activities and ketogenesis by the tissue in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology.*62:459-463
- Hamburger J, Ryckewaert, Duizend et Argand.** 1948. Microdosage de l'acide para-amino-hippurique dans le sang et l'urine. *Annales de Biologie Clinique*, vol.6, pages 358-362.
- INRA.**1987. Alimentation des ruminants : révision des systèmes et des tables de l'INRA. *Bulletin Technique Du C.R.Z.V. Theix, INRA.*222pages.
- INRA.**1988. Alimentations des Bovins, Ovins et Caprins. Edition R. Jarrige. INRA Paris.476 pages.



**INRA.** 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux-Valeurs des Aliments. Editions Quae. Versailles.

**Jouany JP and Thivend P.** 1972. Evolution post prandiale de la composition glucidique des corps microbiens du rumen en fonction de la nature des glucides du régime, II, les bactéries. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique.* 12 :679-683.

**Journet M, Huntington G et Peyraud JL.** 1995. Le bilan des produits terminaux de la digestion. *Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion.* Jarrige edition. INRA Paris.

**Katz ML et Bergman EN.** 1969. Simultaneous measurements of hepatic and portal venous blood flow in the sheep and dog. *American Journal of Physiology.* 216, 946-952.

**Kirata D, Matsudab Y, Yamashikib N and Kato S.** 2007. Expression, cellular localization, and functional role of monocarboxylate transporter 4 (MCT4) in the gastrointestinal tract of ruminants. *Gene.* 391: 140-149.

**Kristensen NB and Harmon DL.** 2006. Splanchnic metabolism of short chain fatty acids in ruminant. In digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress (Ed K Sejrsen, T Hvelplund and MO Nielsen). Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. 249-268.

**Kristensen NB and Danfaer A.** 2004. Effect of increasing ruminal butyrate absorption on splanchnic metabolism of volatile fatty acids absorbed from the washed reticulorumen of steers. *Journal of Animal Science.* 82:3549-3559.

**Kristensen NB, Pierzynowski SG and Danfaer A.** 2000. Portal-drained visceral metabolism of 3-hydroxybutyrate in sheep. *Journal of Animal Science.* 78: 2223-2228.

**Lobley GE, Connel A, Lomax MA, Brown DS, Milne E, Calder AG, Farningham DAH.** 1995.

Hepatic detoxification of ammonia in the ovine liver: possible consequences for amino acid catabolism. *British Journal of Nutrition.* 73, 667-685.

**Loncke C.** 2009. Modélisation des relations entre l'alimentation et les flux splanchniques de nutriments énergétiques chez le ruminant. Thèse. INRA, Unité de Recherches sur les Herbivores.

**Loncke C, Nozière P, Amblard S, Léger S, Vernet J, Lapierre H, Sauvant D and Ortigues-Marty I.** 2009a. From metabolisable energy to energy of absorbed nutrients : quantitative comparison of models. *Modelling Nutrient Digestion and utilisation in farm animals.* 4: 233-242.

**Loncke C, Ortigues-Marty I, Vernet J, Lapierre H, Sauvant D and Nozière P.** 2009b. Empirical prediction of net portal appearance of volatile fatty acids, glucose, and their metabolite (<sup>2</sup>-hydroxybutyrate, lactate) from dietary characteristics in ruminants: A meta-analysis approach. *Journal of Animal Science.* 87, 253-268.



**Majdoub L.** 2002. Orientation propionique du profil fermentaire ruminal : conséquence sur le métabolisme splanchnique des nutriments énergétique et sur la fourniture et l'utilisation du glucose par le muscle chez l'agneau recevant du fourrage vert. Thèse. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes.

**Masson MJ and Phillipson AT.** 1951. Absorption of acetate, propionate and butyrate from the rumen of sheep. *Journal of Physiology*. London. 113: 189-206.

**Nozière P. and Hoch T.** 2005. Nutrient digestion and utilization in farm animals: modelling approaches. CABI Publishing. Wallingford UK.

**Nozière P, Glasser F, Martin C and Sauvant D.** 2007. Predicting in vivo production of volatile fatty acids in the rumen from dietary characteristics by meta-analysis: description of available data. In *Energy and Protein Metabolism and Nutrition*. Publication no 124:158-167.

**Nozière P, Ortigues-Marty I, Loncke C and Sauvant D.** 2010. Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: from feed starch and fibre to nutrients available for tissues. *Animal*. 4:7. 1057-1074.

**Ortigues I, Durand D, Lefavre J.** 1994. Use of para-amino hippuric acid to measure blood flows through portal-drained-viscera, live rind hindquarters in sheep. *Journal of Agricultural Science*. 122, 299-308.

**Quetant N.** 2001. Contribution à la mise au point du dosage des acides gras volatils du sang par extraction sur colonnes échangeuses d'ions et par chromatographie en phase gazeuse. Rapport de stage de fin d'études d'IUT. Université d'Auvergne Clermont I.

**Rémésy C et Demigne C.** 1974. Determination of volatile fatty acids in plasma after ethanolic extraction. *Biochemical Journal*. 141, 85-91.

**Reynolds CK.** 2000. Feed evaluation for animal production. Pages 87-108 in *Feeding Systems and Feed Evaluation Models*. Theodoron MK and France J. Edition CABI Publ., London, UK.

**Reynolds PJ, Huntington GB et Reynolds CK.** 1986. Determination of volatile fatty acids, lactate and  $\beta$ -hydroxybutyrate in blood by ion exchange cleanup and gas chromatography. *Journal of Animal Science*. 63 (suppl1), 424.

**Reynolds CK, Harmon DL, Prior RL and Tyrrell HF.** 1994. Effects of mesenteric vein L-alanine infusion on liver metabolism of organic acids by beef heifers fed diets differing in forage: concentrate ratio. *Journal of Animal Science*. 72: 3196-3206.

**Rodríguez-López JM, Cantalapiedra-Hijar G, Durand D, Thomas A, Ortigues-Marty I.** 2012. Changes in net hepatic flux of nutrients by the deacetylation of p-aminohippuric acid in dairy cows, EAAP Annual Meeting 2012, Bratislava, Slovakia (accepted).

**Sauvant D and Mertens D.** 2008. Use of meta-analysis to build a mechanistic model of responses of rumen digestion of dietary fibre in cattle. In *Modeller's Meeting of the ADSA*. Can. Journal Animal Science.





**Seal CJ and Reynolds CK.** 1993. Nutritional implications of gastrointestinal and liver metabolism in ruminants. *Nutrition Research Reviews.* 6:185-208.

**Stevens CE and Stettler BK.** 1966. Factors affecting the transport of volatile fatty acids across rumen epithelium. *American Journal of Physiology.* 210. 365-372.

**Sutton JD.** 1985. Digestion and absorption of energy substrates in the lactating cow. *Journal Dairy Science.* 68:3376-3393.

**Somogyi M.** 1945. Determination of blood sugar. *Journal Biology Chemical.* 160: 69-73.

**Thomas PC and Rook JAF.** 1981. Manipulation of rumen fermentation. In: W. Haresign and DJA Cole (eds). *Recent developments in Ruminant Nutrition.* Butterworths, London. 157-183.

**Vérité R et Journet M.** 1975. Alimentation des vaches laitières avec de l'ensilage de maïs : influence de la nature de l'ensilage, de la suralimentation énergétique et de la nature de la complémentation azotée. II : Digestion dans le rumen. *Annales de Zootechnie.* 24 : 109-116.

**Vermorel M and Coulon JB.**1998. Comparaison of the National Reseach Council energy system for lactating cows with four European systems. *Journal Dairy Science.* 81:846-855

**Vernet J and Ortigues-Marty I.** 2006. Conception and development of a bibliographic database of blood nutrient fluxes across organs and tissues in ruminants. Data gathering and management prior to meta-analysis. *Reproduction Nutrition Development.*46:527-546

**Wiltrout DW and Satter LD.** 1972. Contribution of propionate to glucose synthesis in the lactating and nonlactating cow. *Journal of Dairy Science.*55:307-317.



# **ANNEXES**



## Annexe 1

Composition chimique et valeur alimentaire des aliments composant les quatre régimes expérimentaux estimées d'après les Tables INRA (2007)

Aliment	Code INRA	% MS	Energie	Azote			Encombrement	Constituants organiques				
			UF/kg	g/kg			UE/kg	g/kg				
			UFL	PDIA	PDIN	PDIE	UEL	MO	MAT	NDF	ADF	Amidon
<i>Fourrage</i>												
<b>Par kg de matière sèche/par kg de produit brut</b>												
<b>Ensilage d'herbe<sup>1</sup></b>	FE0720	18.5	0.91 0.17	25 5	90 17	75 14	1.06	925	146	528	318	0
<b>Foin</b>	FF0510	85	0.63 0.54	28 24	58 49	72 61	1.11	919	88	637	360	0
<b>Mais déshydraté<sup>2</sup></b>	CD0070	91	0.91 0.83	22 20	45 41	81 74	0	954	72	450	215	300
<b>Paille de blé broyé avec mélasse</b>	FP0020	88	0.42 0.37	11 10	22 19	44 39	1.60	920	35	798	504	0
<i>Concentré</i>												
<b>Mais<sup>3</sup></b>	CC0060	91	0.88 0.80	23 21	48 44	81 74	0	950	223	496	247	170
<b>Orge</b>	CC010	86.7	1.09 0.95	34 30	79 69	101 87	0	974	116	216	63	602
<b>Son de Blé tendre</b>	CS0060	87.1	0.94 0.82	38 33	108 94	91 80	0	942	170	455	136	227
<b>Blé tendre</b>	CC0050	86.8	1.18 1.02	30 26	81 70	102 89	0	982	121	143	36	698
<b>Coque de soja</b>	CF0080	89.4	1.01 0.90	45 40	84 75	109 98	0	947	134	631	452	0
<b>Pulpe de citrus</b>	CF0160	89.3	1.10 0.98	25 22	50 45	96 86	0	930	71	216	154	33
<b>Pulpe de betterave déshydratée</b>	CF0170	89.1	0.99 0.89	41 37	66 59	109 97	0	923	91	454	231	0
<b>Tourteau de soja tanné</b>	CT0290	87.8	1.21 1.06	384 337	443 389	426 374	0	927	516	139	83	0
<b>Urée</b>	CV0010	98	0	1472	0	0	0	0	2875	0	0	0
<b>Palmitostéarine</b>	CG0030	100	2.73 2.73	0	0	0	0	1000	0	0	0	0
<b>Mélasse de canne</b>	CF0140	73.7	0.86 0.63	0	32 23	62 46	0	860	55	0	0	0

1 : Prairie permanente, demi-montagne (Auvergne) fané au sol par beau temps, 1<sup>er</sup> cycle, floraison

2 : Stade vitreux

3 : Stade laiteux



## Annexe 2

### *Dosage des acides gras volatils à partir d'échantillon sanguin d'après la méthode de Reynolds et al.(1986)*

La méthode de dosage des acides gras volatils (AGV) permet de déterminer les concentrations des AGV [acide acétique (C2), acide propionique (C3), acide butyrique (C4), acide iso-butyrique (IsoC4), acide valérique (C5), acide iso-valérique (IsoC5)] dans le sang.

Le principe du dosage est le suivant. Tout d'abord le sang est déprotéinisé selon la méthode de *Somogyi (1945)* afin de séparer les acides gras volatils des protéines du sang. Les AGV sont ensuite purifiés et extraits par chromatographie échangeuse d'ion ( $\text{Na}^+$  et  $\text{Zn}^+$ ). Une première colonne échangeuse de cations capte les cations du surnageant issu de la déprotéinisation et une seconde colonne échangeuse d'anions piège les AGV sous la forme de  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ . Les AGV ainsi piégés par la colonne sont ensuite élués avec de la soude. La colonne qui a une grande affinité pour les bases fortes et en particulier pour les anions  $\text{OH}^-$  va capter les ions et libérer les AGV. Les AGV ainsi récupérés sont évaporés à sec puis repris en milieu acide (pH voisin de 1) ce qui permet de les séparer, identifier et quantifier par chromatographie en phase gazeuse.

La chromatographie en phase gazeuse est une technique qui permet de séparer des composés gazeux ou susceptibles d'être volatilisés par chauffage sans être décomposés. Le mélange à analyser est introduit au niveau de l'injecteur par une microsiringue, où il sera vaporisé. Les solutés sont transportés par une phase mobile appelée gaz vecteur et retenus par la phase stationnaire en fonction de leur affinité. Les solutés présents dans l'échantillon seront séparés à des vitesses différentes caractérisées par la notion de temps de rétention. Les composés brûlés dans le détecteur à ionisation de flamme (FID) génèrent une différence de potentiel qui sera amplifiée et transformée pour tracer le chromatogramme, puis transmis à un système d'enregistrement à partir duquel il sera possible d'analyser les données. Le graphique représentant la réponse du détecteur (signal) en fonction du temps d'éluion est appelé chromatogramme.





Organisation du dosage :

Une série de dosage est caractéristique d'une vache donnée, pour un régime donné. Elle est constituée théoriquement de 12 échantillons au total sachant que pour chaque vaisseau (artère, veine porte, veine sus hépatique et veine du lait dont les résultats n'ont pas été exploités dans ce stage) il y a trois échantillons à analyser (H1+H2, H3+H4, H5+H6). Suite à des prélèvements manquants, les séries de dosage étaient constituées de 8 à 11 échantillons. Etant donné que nous avons 14 colonnes à notre disposition par série de dosage, chacune des séries a été complétée, suivant le nombre de places restantes, soit avec 3 échantillons de référence (échantillon sanguin prélevé sur une vache avant le début des analyses, conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ ) auquel fut ajouté la surcharge (SF4), soit 3 échantillons de référence, 2 échantillons non surchargés (uniquement échantillon sanguin sans surcharge) et 1 échantillon surchargé uniquement avec du C2 (l'objectif étant de déterminer le taux de récupération du C2). Toute série de dosage s'échelonne sur 2 jours : le premier été consacré à la déprotéinisation et l'extraction et le deuxième à la reprise des échantillons et l'injection dans le chromatographe. L'analyse des AGV est réalisée selon les étapes décrites dans le mode opératoire n°03V2 et résumées ci-après.

**1- Décongélation:** Les échantillons, une fois prélevés sur héparine, ont été conservés à moins  $80^{\circ}\text{C}$ . La décongélation a été effectuée en plaçant les échantillons au réfrigérateur à  $+4^{\circ}\text{C}$  la veille de leur dosage.

**2-Prise d'essai :** La quantité nécessaire pour le dosage des AGV est de 2g par analyse (Reynolds, 1986). Pour limiter le volume de sang total prélevé sur chaque vache, il avait été décidé de ne prélever qu'un ml de sang de chaque vaisseau pour chaque heure de prélèvement, et de pooler les échantillons par deux : H1 + H2, H3 + H4 et H5 + H6 de manière à obtenir des prises d'essai suffisantes pour le dosage. Ainsi, pour chaque échantillon prélevé, une prise d'essai de 1g a été pesée avec une balance au mg.



**Figure 1 :** Pesée des échantillons



**3-Déprotéinisation :** Le sang est déprotéinisé selon la méthode de *Somogyi (1945)*. L'objectif est de séparer les AGV des protéines car c'est sous la forme libre que les AGV sont volatils (*Arnaud, 1975*). Les échantillons sanguins sont conservés dans la glace tout le long de la déprotéinisation afin d'éviter toutes modifications de la composition en acide gras volatils. Un volume de 20 $\mu$ l d'étalon interne, le 2-éthylbutyrique (25Mm/L), est ajouté à l'échantillon sanguin pesé précédemment dans un tube de centrifugation de 30ml. L'étalon interne doit présenter les caractéristiques suivantes : ne pas être présent naturellement dans l'échantillon, ne pas être coelué avec les AGV d'intérêt et permettre de tenir compte des pertes au cours du processus analytique. Il est utilisé pour calculer la quantité des différents AGV présents dans l'échantillon. Puis 7ml d'un détergent (triton X-100) a été ajouté dans le but d'améliorer la déprotéinisation et de limiter les particules en suspension. Ensuite, 4ml d'une solution de Ba(OH)<sub>2</sub> (0.3N) puis 4ml d'une solution de ZnSO<sub>4</sub> (0.3N) sont ajoutés au mélange. L'objectif de cette étape est d'engendrer la formation de sels d'acides carboxyliques qui puissent être retenus par la colonne échangeuse d'anions. Entre chaque étape, le mélange est agité au vortex. Le mélange final est centrifugé 20 minutes à 10 000 tours/minute à 4°C. Après centrifugation, le surnageant contenant les sels d'AGV est récupéré.



**Figure 2a :**  
Ajout de l'étalon interne, le 2-éthylbutyrique



**Figure 2b :**  
Ajout du triton X-100



**Figure 2c :**  
Ajout du Ba(OH)<sub>2</sub>



**Figure 2d :**  
Ajout du ZnSO<sub>4</sub>





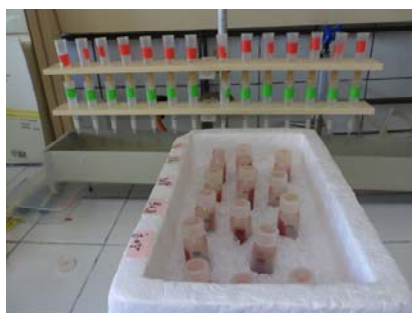
**Figure 2e :** Les échantillons ayant subit les différentes étapes de la déprotéinisation sont conservés dans la glace



**Figure 2f :**

Les échantillons placées dans la centrifugeuse durant 20 min à 10000 tours/minutes

**4-Passage sur colonne échangeuse d'ions :** L'utilisation de deux types de colonnes est requise : une colonne échangeuse de cations et une colonne échangeuse d'anions. Le schéma de préparation de ces deux types de colonnes est similaire. La colonne échangeuse de cation est superposée sur la colonne échangeuse d'anion et le surnageant issu de la centrifugation est versé en totalité sur la colonne échangeuse de cations. La colonne échangeuse de cations capte les ions  $Ba^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  présents dans le surnageant. Pour un ion capté, deux ions  $H^+$  sont libérés. Les sels sont ainsi dissociés et les AGV sont libérés et piégés par la colonne échangeuse d'anions. Pour un AGV capté sous la forme  $COO^-$ , un ion  $HO^-$  est libéré. Les colonnes sont ensuite rincées avec de l'eau distillée ultra pure afin de récupérer la totalité des AGV. Les AGV piégés dans la colonne anionique sont ensuite élués avec une solution de NaOH à 25mmol/L (Reynolds et al.; 1986).



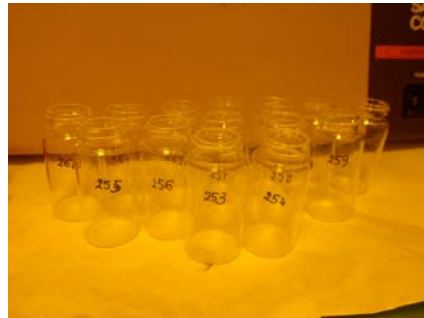
**Figure 3 :** Le surnageant des échantillons est versé à travers les deux colonnes.



**5-Evaporations des échantillons :** L'éluent est récupéré dans un flacon à scintillation destiné à être évaporé à sec dans un Brickman sous vide à une température de 55°C pendant une nuit. A ce stade, les AGV sont sous forme de sel (*Rémésy et Demigné, 1974*).



**Figure 4a :**  
Brickman sous vide dans lequel  
sont placés les échantillons



**Figure 4b :**  
Echantillons évaporés

**6-Reprise des échantillons :** Lorsque les échantillons sont évaporés, ils sont repris avec 300µL d'une solution d'acide phosphorique, puis transférés dans un vial préalablement identifié pour être injectés dans le chromatographe. Les échantillons doivent être repris en milieu acide ( $\text{pH} < 3$ ) afin que les AGV puissent être volatilisés au moment de l'injection dans le chromatographe (*Arnaud, 1975*).



**Figure 5 :** Les échantillons sont repris avec l'acide phosphorique puis transférés dans un vial fermé avec un bouchon par l'intermédiaire d'une pince à sertir.

**7-Injection des échantillons dans le chromatographe :** Les AGV ainsi préparés sont ensuite analysés par chromatographie phase gazeuse à l'aide d'un chromatographe Peri 2000 afin de séparer les différents AGV de l'échantillon, les identifier et les quantifier. Les échantillons sont injectés grâce à un passeur automatique d'échantillon au niveau du four, ils sont entraînés par un gaz vecteur, l'hélium, et séparés au niveau de la colonne capillaire de 25m de long et 0.53mm de diamètre. La température de l'injecteur s'élève à 200°C et celle du détecteur à 260°C. La température du four est programmée avec trois paliers entre 90°C et 155°C. Après avoir traversé la colonne, chaque AGV est brûlé au niveau du détecteur à





ionisation de flamme qui génère une différence de potentiel qui sera transformée et amplifiée en un signal qui sera enregistré sous le système d'acquisition Winilab III. Le résultat final est un chromatogramme comprenant un pic par AGV (C2, C3, C4, IsoC4, C5, IsoC5 et EI) pour chaque échantillon.



**Figure 6 :** Chromatographe Peri 2000

**8-Calcul :** Le calcul des concentrations des AGV se réalise en plusieurs étapes. Tout d'abord les différents pics sont intégrés afin de déterminer l'aire sous la courbe. Puis le temps de rétention (qui correspond à la vitesse de déplacement du composé à travers la colonne) de ces pics est comparé à ceux d'un mélange standard afin de faire correspondre un pic à un acide gras volatil parmi le C2, le C3, l'Iso C4, le C4, l'Iso C5 et le C5. Le standard (SF4) est constitué d'un mélange des six acides gras présents dans les échantillons dans des concentrations proches des échantillons. Ces deux premières étapes sont réalisées à l'aide du logiciel Winilab III. Enfin pour chaque AGV, un coefficient de réponse ( $K_c$ ) est calculé à partir de la formule suivante :

$$K_c = \frac{Q_c * S_i}{S_c * Q_i}$$

$Q_c$  : Concentration du constituant dans la solution injectée (mM/l)

$S_c$  : Surface du pic du constituant

$Q_i$  : Concentration de l'étalon interne dans la solution injectée (mM/l)

$S_i$  : Surface du pic de l'étalon interne

Le  $K_c$  s'exprime sans unité.

Une fois le  $K_c$  calculé, il est possible de déterminer la concentration en AGV dans l'échantillon sanguin à partir de la formule suivante :



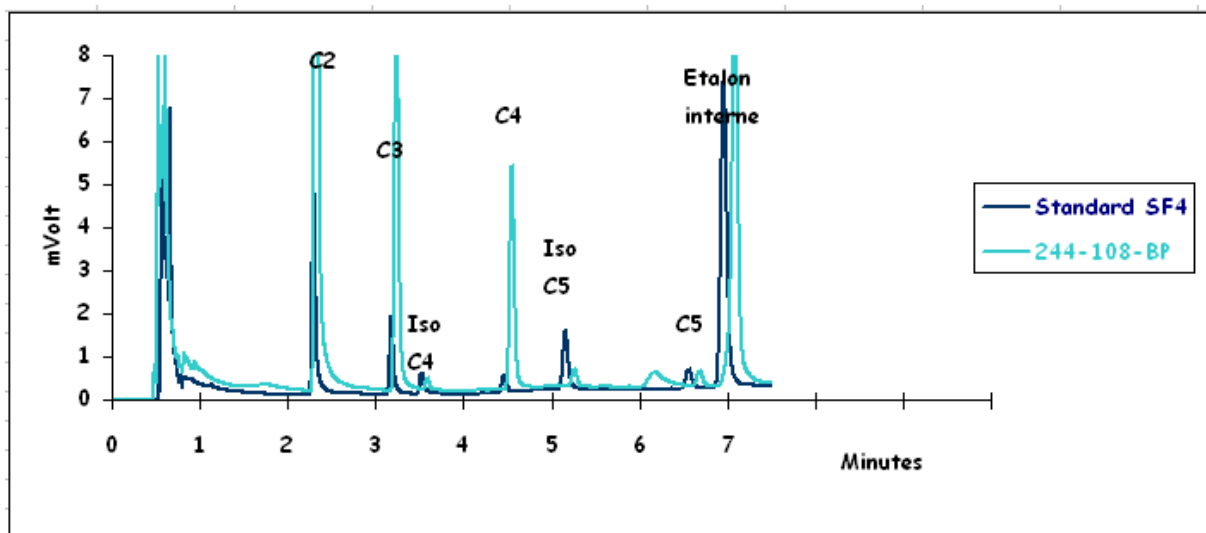
$$Q_c = \frac{K_c \cdot S'_c \cdot Q'_i}{S'_i}$$

$S'_c$  : Surface du pic du constituant  
 $Q'_i$  : Quantité de l'étalon interne dans l'échantillon (mmol)  
 $S'_i$  : Surface du pic de l'étalon interne  
 La  $Q_c$  s'exprime en mmol/l.

Enfin connaissant le poids de l'échantillon, la concentration en AGV a été ramenée en mmol/g à partir de la formule suivante :

$$Q_c' = Q_c / P$$

$Q_c$  : Concentration en AGV (mmol/l)  
 $P$  : Poids (gramme)  
 La  $Q_c'$  s'exprime en mmol/g.



**Figure 7 :** Chromatogramme

Les six acides gras volatils (C2, C3, IsoC4, C4, IsoC5, C5) présents dans l'échantillon 244 provenant de la veine porte de la vache 108 ayant reçu le régime BP sont identifiés par comparaison avec les temps de rétention obtenus pour le mélange standard SF4.



### Annexe 3

Tableau récapitulatif des résultats de validation de la méthode de dosage des AGV par CPG

<b>Acétate (C2)</b>	<b>2001</b>		<b>2011</b>			<b>2012</b>
<b>Linéarité<sup>1</sup></b>	<b>testée</b>		<b>testée</b>			<b>non testée</b>
Domaine d'application (mmol/l)	0-5	0-7.5	0-5			
Nombre de niveaux	5	7	11			
Nombre de jours	5	5	5			
Limite de détection <sup>2</sup> (LOD) (mmol/l)	0.235	0.335	0.107			<b>non testée</b>
Limite de Quantification <sup>3</sup> (LOQ) (mmol/l)	0.692	1.09	0.405			<b>non testée</b>
<b>Fidélité<sup>4</sup></b>						
Nombre de niveaux	1		3			1
Nombre de répétitions x jours	3 x 8		3 x 8	3 x 8	3 x 8	3 x 20
Concentration testée	5.3 > LOQ 2001		2.62 > LOQ 2011	3.31 > LOQ 2011	4.17 > LOQ 2011	0.76 > LOQ 2001 (n=5) et à 2011)
Répétabilité <sup>5</sup>	14.10%		18.90%	7.70%	20.00%	5.60%
Fidélité intermédiaire <sup>6</sup>	14.70%		22.70%	30.20%	30.50%	10.90%

<b>Propionate (C3)</b>	<b>2001</b>		<b>2011</b>			<b>2012</b>
<b>Linéarité<sup>1</sup></b>	<b>testée</b>		<b>testée</b>			<b>non testée</b>
Domaine d'application (mmol/l)	0-1.2	0-1.8	0-1.2			
Nombre de niveaux	5	7	7			
Nombre de jours	5	5	5			
Limite de détection <sup>2</sup> (LOD) (mmol/l)	0.057	0.054	0.034			<b>non testée</b>
Limite de Quantification <sup>3</sup> (LOQ) (mmol/l)	0.187	0.197	0.120			<b>non testée</b>
<b>Fidélité<sup>4</sup></b>						
Nombre de niveaux	1		3			1
Nombre de répétitions x jours	3 x 8		3 x 8	3 x 8	3 x 8	3 x 20
Concentration testée	0.141 < LOQ 2001		0.107 < LOQ 2011	0.451 > LOQ 2011	0.505 > LOQ 2011	0.047 < LOQ de 2001 et 2011
Répétabilité <sup>5</sup>	21.10%		11.60%	14.80%	22.20%	18.30%
Fidélité intermédiaire <sup>6</sup>	20.90%		21.10%	24.70%	22.40%	24.90%



Butyrate (C4)	2001		2011			2012
<b>Linéarité<sup>1</sup></b>	<b>testée</b>		<b>testée</b>			<b>non testée</b>
Domaine d'application (mmol/l)	0-0.15	0-0.225	0-1.2			
Nombre de niveaux	5	7	6			
Nombre de jours	5	5	5			
Limite de détection <sup>2</sup> (LOD) (mmol/l)	0.021	0.016	0.005			<b>non testée</b>
Limite de Quantification <sup>3</sup> (LOQ) (mmol/l)	0.057	0.049	0.015			<b>non testée</b>
<b>Fidélité<sup>4</sup></b>						
Nombre de niveaux	1		3			1
Nombre de répétitions x jours	3 x 8		3 x 8	3 x 8	3 x 8	3 x 20
Concentration testée	0.141 > LOQ 2001		0.032 > LOQ 2011	0.108 > LOQ 2011	0.125 > LOQ 2011	0.006 < LOQ 2001
Répétabilité <sup>5</sup>	21.10%		14.60%	15.20%	19.10%	18.30%
Fidélité intermédiaire <sup>6</sup>	20.90%		17.80%	24.20%	24.10%	24.90%

**Définitions** selon Vocabulaire International de Métrologie (VIM) (Guide ISO/CEI 99 :2007)

<sup>1</sup> : **Linéarité** : Etablissement qu'il existe une relation linéaire entre les quantités retrouvées (ou quantifiées) dans les échantillons et leurs valeurs de référence. La linéarité de la méthode ne doit pas être confondue avec la linéarité de la fonction de réponse de l'appareillage de mesure qui caractérise la seule réponse instrumentale lors de l'étalonnage et qui n'est pas indispensable pour obtenir une quantification exacte.

<sup>2</sup> : **Limite de détection** : Valeur mesurée, obtenue par une procédure opératoire donnée, pour laquelle la probabilité de déclarer faussement l'absence d'un constituant dans un matériau est  $\beta$ , étant donnée la probabilité  $\alpha$  de déclarer faussement sa présence. La notation  $\beta$  utilisée dans cette définition représente un risque d'erreur (dit de seconde espèce) et ne doit pas être confondue avec la proportion  $\beta$  de la définition de l'intervalle de tolérance.

<sup>3</sup> : **Limite de quantification** : Plus petite et/ou plus grande concentration de l'analyte pouvant être quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

<sup>4</sup> : **Fidélité** : Etroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées et une valeur de référence

<sup>5</sup> : **Répétabilité** : Fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de répétabilité (indique l'incertitude entre répétitions au sein d'une même journée)

<sup>6</sup> : **Fidélité intermédiaire** : Fidélité de mesure selon un ensemble de condition de fidélité intermédiaire (indique l'incertitude entre répétitions entre différentes journées)