

PROCESSUS DIGESTIFS DES RUMINANTS

I. — ÉTUDE IN-VITRO DE LA DIGESTION DU FOIN DE LUZERNE

PAR

G. FAUCONNEAU, A. C. FRANÇOIS, A. M. LEROY, S. Z. ZELTER (1)

Laboratoire de Recherches de Zootechnie, Institut National Agronomique,
 Paris

En 1884, TAPPEINER (1) étudia la fermentation *in vitro* de la cellulose de papier filtre sous l'influence d'un inoculum prélevé dans un rumen de bœuf. Il obtint un mélange gazeux contenant CO_2 et CH_4 et un mélange d'acides volatils parmi lesquels il identifia les acides acétique, propionique et butyrique. Il démontra ainsi le pouvoir cellulolytique de l'ensemble de la flore du rumen. La technique de digestion *in vitro* a été abandonnée après une série de travaux qui semblaient montrer qu'elle était essentiellement différente de la digestion *in vivo*. En fait, ces échecs étaient dus à la méconnaissance des conditions physico-chimiques qui règnent dans le rumen. En 1942, PHILLIPSON et Mc ANALLY (3) ont proposé une technique améliorée, qui leur a permis de montrer la formation d'acides volatils à partir de glucose et d'acide lactique.

Le contenu du rumen est un milieu très complexe dont les caractères physico-chimiques et notamment la température, le pH, le potentiel d'oxydo-réduction, sont maintenus dans des limites relativement étroites. La température de l'intérieur du rumen est voisine de 39-40°. Par ailleurs, le liquide du rumen est un milieu tamponné (MYBURG et QUIN (4)). Il est, en effet, constitué par les aliments ingérés, l'eau de boisson et la salive. Or, la production de salive est considérable : plus de 50 l en 24 h chez le bœuf. D'après Mc DOUGALL (5) une glande parotide d'ovine peut produire de 0,93 à 1,84 l par 24 h. La salive d'ovine présente une concentration élevée en phosphates et en carbonates alcalins. Pour cette raison son pH est égal à 8,3. En outre, l'absorption directe des acides gras volatils par la muqueuse du rumen contribue à la régulation du pH (6) (7). Le potentiel d'oxydo-réduction, mesuré par MARSTON (8) au moyen d'incubations *in vitro* est bas : — 0,380 v. Par ailleurs, les gaz du rumen contiennent très peu d'oxygène et d'azote, qui proviennent de l'ingestion d'air avec les

(1) Avec l'assistance technique de M^{lle} C. DUMAY, M^{mes} J. MARTIN et M. NAVILLE.

aliments. En revanche, l'atmosphère du rumen est constituée presque exclusivement de CO_2 et de CH_4 . De l'hydrogène se forme exceptionnellement (PILGRIM (9)), et la concentration en hydrogène sulfuré est faible (KLEIBER, COLE, MEAD (10)). Enfin, des mouvements continus permettent un brassage régulier de la masse.

En respectant ces conditions physico-chimiques, il a été possible de proposer des techniques d'incubation *in vitro* reproduisant assez fidèlement les conditions de la digestion *in vivo* au niveau du rumen. (MC ANALLY (11)) (PEARSON et SMITH (12)) (MARSTON (8)) (ELSDEN (13)) (BURROUGHS et coll. (14)) (GRAY et coll. (15)) (SIJPESTEIJN et ELSDEN (16)).

L'ensemencement peut s'effectuer soit au moyen du liquide du rumen filtré sur mousseline (11), (14), (15), soit par les microorganismes isolés par centrifugation fractionnée (8) (16).

Nous proposons, dans le présent mémoire une méthode de digestion *in vitro* permettant de reproduire certains phénomènes qui surviennent dans le rumen. Nous étudions en particulier la dégradation de la cellulose, des glucides réducteurs après hydrolyse, et l'apparition des acides volatils, de l'acide lactique et des gaz. Nous avons comparé certains de ces critères à ceux qui caractérisent la digestion *in vivo* du foin de luzerne. Nous comparons enfin la quantité de glucides disparus à celle des acides volatils apparus.

I. — MÉTHODES

1^o Méthode d'incubation

a) **Inoculum.** — Du contenu de rumen est prélevé immédiatement après l'abatage d'un ovin. On le filtre rapidement sur deux épaisseurs de mousseline et l'on exprime le liquide de la masse. Ce liquide est maintenu à une température voisine de 37° et utilisé au plus tard une heure après sa préparation.

b) **Le milieu tampon utilisé** présente la composition suivante, voisine de celle de la salive décrite par MC DOUGALL : CO_3HNa 9,24 — PO_4HNa_2 12 H_2O , 7,125 — KCl 0,45 — Cl_2Ca 0,055 Cl_2Mg 0,047 Eau QS pour 1 000 cm^3 . Son pH est égal à 8,7.

c) **Substrat.** — Nous étudions la digestion du foin de luzerne, en mettant en présence 25 g de matière sèche de substrat, 200 cm^3 de tampon et 250 cm_2 de liquide extrait du rumen. Le milieu est saturé de CO_2 par un courant de ce gaz passant bulle à bulle dans le milieu pendant deux minutes. L'incubation est poursuivie à $39\text{-}40^\circ$ pendant 48 h dans un appareil permettant d'effectuer simultanément six incubations (fig. 1).

Un dispositif d'agitation est actionné une fois par heure. Les gaz produits sont recueillis dans des gazomètres et leur volume mesuré ; l'incubation est ainsi constamment effectuée à la pression atmosphérique.

A la fin de l'incubation, on mesure le pH du milieu, sa teneur en glucides réducteurs après hydrolyse à l'ébullition, sa teneur en cellulose, en acide acétique, en acide propionique, en acide butyrique et en acide lactique.

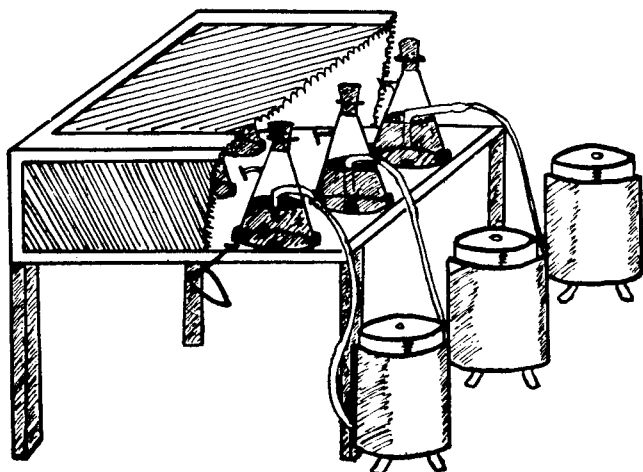


FIG. 1.

Dans chaque série d'essais, on étudie l'évolution de la composition d'un témoin constitué par 250 cm³ de liquide de rumen incubé en présence de 200 cm³ de tampon.

2^o Méthodes analytiques

a) Glucides réducteurs après hydrolyse. — On hydrolyse 100 cm³ du milieu bien homogénéisé, en présence de 2 cm³ d'acide sulfurique de densité 1,83, pendant 4 h, à l'ébullition. On centrifuge et lave deux fois le résidu. Le liquide est déféqué à l'aide de ferrocyanure de potassium et d'acétate de zinc. On dose alors les glucides réducteurs (exprimés en glucose) par la méthode de G. BERTRAND.

b) Cellulose. — Après hydrolyse de 100 cm³ de milieu par 2 cm³ d'acide sulfurique, pendant 1 h 30 à l'ébullition, la cellulose est dosée par la méthode de KURSCHNER et HOFFER (17). Une hydrolyse au moyen d'une solution de soude à 2 % précède les traitements à l'alcool nitrique.

Les mêmes méthodes sont appliquées au foin de luzerne utilisé, qui est délipidé au préalable au moyen d'extractions successives à l'alcool et à l'éther bouillants.

c) **Acides volatils.** — Les acides volatils sont isolés au moyen de la méthode de FRIEDEMANN (18) qui permet d'oxyder l'acide formique et l'acide lactique.

On sépare et dose les acides acétique, propionique et butyrique au moyen de la méthode de chromatographie de partage décrite par ELS-DEN (19). L'acide lactique, enfin, est dosé selon la méthode de LEPPER-FLIEG, sous forme d'acide acétique après oxydation sulfochromique (20).

Ces différentes déterminations sont effectuées également sur le liquide extrait du rumen et servant à ensemencer le milieu. Par ailleurs, nous avons comparé les valeurs obtenues au cours des digestions *in vitro* à celles que l'on observe *in vivo* en utilisant des foins de composition sensiblement identiques (G. CHARLET-LÉRY, A. FRANÇOIS, A. M. LÉROY (21)).

Le pH est mesuré à l'aide de l'électrode de verre.

II. — RÉSULTATS OBTENUS

a) **Composition du liquide de rumen.** — La composition des différents échantillons de liquide de rumen utilisés comme inoculum est indiquée dans le tableau I.

TABLEAU I

Composition de liquide de rumen en g par litre

Essai N°	Matière sèche	Cendres	Glucides réducteurs	Cellulose vraie	Azote	Acide acétique	Acide propionique	Acide butyrique	Total	Acide lactique	pH
1	31,2	11,4	1,40	0,32	0,56	1,52	0,380	0,370	2,270	0,41	—
2	22,9	8,3	1,39	0,39	0,84	1,40	0,295	—	1,695	0,30	7,45
3	21,6	8,3	1,37	0,36	0,56	2,99	0,615	0,360	3,965	0,22	7,10
4	22,2	11,3	1,47	0,42	0,63	1,73	0,535	0,255	2,520	0,27	7,00
5	24,9	8,8	1,37	0,39	0,49	2,71	0,695	0,665	4,070	0,50	7,15
6	20,3	9,7	1,31	0,38	0,49	0,62	0,870	0,240	1,730	—	7,05
7	28,2	8,3	2,00	0,46	0,84	3,44	1,065	0,710	5,215	0,07	7,30
8	19,4	11,3	0,79	0,25	0,56	0,80	0,215	0,200	1,215	0,06	7,30
9	25,9	12,0	1,70	0,41	0,49	1,67	0,475	0,67	2,810	0,40	7,75
10	—	—	2,20	0,41	—	4,02	1,185	1,100	6,300	0,30	7,10

A l'exception de l'échantillon n° 6, la répartition des acides volatils est relativement constante. Les taux moyens des acides acétique, propionique et butyrique sont les suivants :

Acide acétique	65,7 %
Acide propionique	19,9 %
Acide butyrique	14,4 %

Après une incubation de 48 h selon la méthode décrite précédemment, la composition du milieu est la suivante (tableau II).

TABLEAU II

Composition du milieu après incubation, en g par litre

Essai N°	Acide acétique	Acide propionique	Acide butyrique	Total	pH
1	4,870	2,960	0,990	8,820	5,65
2	6,636	5,021	1,391	13,048	6,15
3	7,980	3,900	1,620	13,500	—
4	7,800	3,757	1,200	12,757	5,50
5	9,326	4,911	1,450	15,687	5,70
6	9,150	4,550	1,870	15,570	5,60
7	9,700	3,440	3,200	16,340	5,90
8	9,486	3,024	1,438	13,948	5,40
9	9,302	3,553	1,706	14,561	5,75
10	11,160	4,298	1,410	16,868	5,55
Moyenne	8,541	3,941	1,627	14,109	5,7

La répartition des acides volatils est la suivante :

Acide acétique	60,60
Acide propionique	28,00
Acide butyrique	11,50

b) **Glucides disparus.** — Les dosages de cellulose et de glucides réducteurs après hydrolyse à l'ébullition permettent d'étudier la disparition de ces substances pendant la digestion *in vitro*. Les résultats sont consignés dans le tableau III.

TABLEAU III

Disparition des glucides pendant la digestion in vitro

Essai N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Moyenne
Glucides réducteurs p. 100	70,7	69,2	70,7	61,2	67,4	69,0	74,3	54,0	66,9	56,7	66,0
Cellulose p. 100 ...	40,6	46,8	43,6	48,0	37,6	—	42,7	38,2	44,4	42,6	42,7

III. — INTERPRÉTATION ET DISCUSSION

En premier lieu, les données du tableau I mettent en évidence la teneur élevée en cendres du liquide de rumen. Le taux atteint, en effet, presque 50 % de la matière sèche.

a) **Répartition des acides organiques.** — Les inoculum contiennent toujours très peu d'acide lactique, qui disparaît totalement après l'incu-

bation. La proportion des différents acides volatils dosés dans le liquide de rumen est en bon accord avec les résultats de ELSDEN (13) et de GRAY et coll. (15). Ceci est d'autant plus remarquable que ces échantillons ont été prélevés sur des animaux de provenance inconnue et dont le régime alimentaire n'a pu être déterminé avec précision.

Après l'incubation *in vitro*, la répartition des acides volatils est quelque peu modifiée : la proportion d'acide propionique s'accroît, tandis que les taux d'acides acétique et butyrique diminuent. Ce fait a déjà été signalé par GRAY et coll. (15) (22) qui montrent que la fermentation du foin de luzerne *in vivo* produit également des quantités importantes d'acide propionique. Toutefois, pour GRAY (22) la vitesse d'absorption de l'acide propionique serait plus élevée que celle de l'acide acétique ; ainsi, la proportion relative d'acide propionique s'accroîtrait au cours des digestions *in vitro*. ELSDEN (13) a également signalé que le rapport $\frac{\text{acide acétique}}{\text{acide propionique}}$ est minimum, 3 h 30 après l'ingestion de glucose par une brebis.

Or, les prélèvements de liquide de rumen sur des animaux d'abattoir ne permettent pas de connaître avec précision le temps écoulé entre le dernier repas et le prélèvement. La différence essentielle entre la composition en acides volatils des liquides obtenus *in vivo* et *in vitro* réside vraisemblablement dans ce fait.

Mais on peut également concevoir que l'abaissement du pH provoque une modification de la flore du rumen, qui entraînerait une formation accrue d'acide propionique, le pH moyen à la fin de l'incubation étant, en effet, voisin de 5,7. Cette valeur n'est pas incompatible avec celle que l'on trouve *in vivo* : 5,5 à 6,8 d'après GRAY (22), les minima de pH s'observant *in vivo* peu de temps après le repas. Mais la digestion *in vivo* peut produire par ailleurs des taux d'acide propionique élevés ; en effet GRAY et coll. (24) trouvent, par exemple, dans le rumen de moutons contenant du foin de luzerne, un mélange ayant les compositions extrêmes suivantes : acide acétique 62 à 70 % ; acide propionique 16 à 27 % ; acide butyrique 6 à 11 %. Les valeurs que nous obtenons *in vitro* ne sont donc pas en opposition avec les valeurs obtenues *in vivo*.

b) **Glucides disparus.** — Le critère de la disparition des glucides réducteurs après hydrolyse à l'ébullition n'est pas entièrement satisfaisant car les différents glucides ainsi dosés présentent des pouvoirs réducteurs différents (21). Un travail ultérieur nous permettra de vérifier si la dégradation atteint simultanément les divers glucides ou bien si la fermentation de chacun d'entre eux s'effectue selon une vitesse différente. Par ailleurs, on sait que les microorganismes contiennent des glucides. Toutefois, ces glucides microbiens ne peuvent que diminuer la quantité

de glucides disparus *in vitro*, par rapport à la quantité disparue *in vivo*. Or, nous avons comparé les taux de disparition des glucides réducteurs et de la cellulose vraie *in vitro*, aux valeurs obtenues au cours de la digestion *in vivo* de foins de luzerne de composition sensiblement identique (21). La détermination des quantités ingérées et excrétées permettait d'établir, par la méthode des bilans, la digestibilité des différents principes.

Le tableau IV résume les résultats obtenus.

TABLEAU IV

Digestibilité comparée du foin de luzerne in vivo et in vitro
Quantités disparues (p. 100)

	Glucides réducteurs après hydrolyse à l'ébullition	Cellulose
In vivo.....	66,0	52,8
In vitro.....	66,0	42,7

Les glucides non cellulosiques sont dégradés en quasi totalité dans le rumen (HALE, DUNCAN, HUFFMANN (25)). En revanche la digestion de la cellulose se poursuit dans le cœcum et dans le côlon. D'après HALE et coll, 78,9 % de la cellulose digestible serait dégradée dans le rumen de la vache. Pour GRAY (26) ce taux serait de 70 % dans le rumen, 13 % dans le côlon et 17 % dans le cœcum du mouton. Ainsi, la digestion *in vitro* ne reproduit qu'une partie de la dégradation des glucides : celle qui survient dans le rumen. Notons que les données du Tableau IV permettent de constater que la digestibilité de la cellulose *in vitro* représente 80,9 % de la digestibilité globale *in vivo*, valeur très voisine de celle déterminée par HALE et coll. (25) chez la vache. Si l'on calcule la digestibilité totale à partir de nos données *in vitro*, en appliquant le coefficient trouvé par ces derniers auteurs, on aboutit à une digestibilité de 54,1 %, ce qui est en accord avec les résultats *in vivo* cités précédemment. En appliquant le coefficient rapporté par GRAY, on aboutit, par contre, à une digestibilité totale de 61 %. L'intensité de la cellulolyse *in vitro* dans les conditions de notre expérience est sensiblement égale à celle que l'on observe *in vivo*.

Il ne semble pas que l'accumulation des produits acides dans le milieu ait freiné la dégradation des glucides, bien que LOUW et coll. (27), en réalisant une incubation *in vitro* dans un appareil permettant la dialyse des acides apparus, obtiennent une cellulolyse plus intense que lorsque la digestion est réalisée sans dialyse.

Ainsi, la méthode que nous utilisons permet de reproduire, d'une façon satisfaisante, les phénomènes digestifs qui ont lieu dans le rumen des ovins. Les critères choisis : dégradation glucidique, d'une part, apparition d'acides volatils, d'autre part, sont sensiblement identiques *in vivo*

et *in vitro*. Toutefois, la digestion *in vitro* perturbe quelque peu la répartition des différents acides volatils.

c) **Rapport des quantités d'acides volatils formés à celles des glucides disparus.** — Les glucides ne sont pas les seuls précurseurs d'acides volatils dans le rumen. EL SCHAZLY (28) a montré récemment que la désamination des protides peut également provoquer la formation d'acides volatils. Toutefois, les glucides demeurent les sources quantitativement les plus importantes de ces acides.

Dans le tableau V, nous avons comparé les quantités de glucides disparus aux quantités d'acides volatils apparus.

TABLEAU V

*Disparition des glucides et formation des acides volatils
par 25 g de matière sèche de foin de luzerne*

	Glucides hydrolysables	Cellulose	Total	Acides volatils totaux
	(1)	(2)	(3)	(4)
1	3,235	2,681	5,916	3,836
2	3,152	3,098	2,650	4,902
3	3,217	2,880	6,097	5,086
4	2,811	3,177	5,988	4,729
5	3,698	2,714	6,412	6,211
6	3,616	4,947	8,563	6,576
7	4,023	2,814	6,837	6,046
8	3,020	2,796	5,816	6,250
9	3,880	3,514	7,394	5,967
10	3,359	2,991	6,350	6,360
Moyenne	4,40	3,16	6,56	5,60

Il se forme en moyenne 5,60 g d'acides volatils pour 25 g de matière sèche de foin de luzerne, soit 224 g par kilogramme (minimum 153,4 — maximum 263,4). GRAY et coll. (15) obtiennent des valeurs du même ordre de grandeur.

Les données du tableau V permettent d'établir que le rapport du poids d'acides volatils apparus au poids des glucides totaux dégradés atteint 83,8 %, valeur très voisine de celle obtenue par MARSTON (85 % pour la cellulose). Ainsi, la majeure partie de l'énergie des glucides se retrouve sous forme d'acides volatils. Toutefois, une fraction de ces acides peut avoir une origine différente des glucides. Soulignons que la digestion du foin de luzerne dans le rumen produit des quantités considérables d'acides volatils dont l'utilisation physiologique pose un certain nombre de problèmes qui ont été évoqués récemment par JARRIGE (29).

La présente méthode de digestion *in vitro* est actuellement utilisé

pour l'étude de l'influence des associations alimentaires sur les fermentations de rumen ; pour l'étude de la synthèse des acides aminés et de l'influence des antibiotiques sur les phénomènes digestifs des ruminants.

IV RÉSUMÉ

1° Au moyen d'une technique de digestion *in vitro*, il a été possible de reproduire certaines transformations chimiques qui s'effectuent dans le rumen. La dégradation des glucides et la formation d'acides volatils ont été particulièrement étudiées. Il disparaît 66 % des glucides réducteurs après hydrolyse à l'ébullition et 42,7 % de la cellulose du foin de luzerne.

2° La proportion d'acide propionique obtenue *in vitro* est plus élevée que celle que l'on obtient *in vivo*.

3° La dégradation de la cellulose et celle des glucides réducteurs après hydrolyse à l'ébullition sont sensiblement identiques *in vitro* et *in vivo*. On retrouve, sous forme d'acides volatils, en moyenne 83,4 % des glucides disparus.

4° Par kilogramme de matière sèche de foin ingéré, il se forme en moyenne 224 g d'acides volatils.

(Reçu pour publication le 7 mai 1953).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) TAPPEINER (H.). — *Ztschr. f. Biologie*, 1884, **20**, 52.
- (2) TAPPEINER (H.). — *Ztschr. f. Biologie*, 1888, **24**, 105.
- (3) PHILLIPSON (A. T.), Mc ANALLY (R. A.). — *J. Exp. Biol.*, 1942, **19**, 199-214.
- (4) MYBURG (S. J.), QUIN (J. I.). — *Onderstepoort J. Vet. Sc.*, 1943, **18**, 119.
- (5) Mc DOUGALL (E. J.). — *Bioch. J.*, 1948, **43**, 99-109.
- (6) BARCROFT (J.), Mc ANALLY (R. A.), PHILLIPSON (A. T.). — *J. Exp. Biol.*, 1944, **20**, 120-129.
- (7) DANIELLI (J. F.), HITCHCOCK (M. W. S.), MARSHALL (R. A.), PHILLIPSON (A. T.). — *J. Exp. Biol.*, 1945, **22**, 75-84.
- (8) MARSTON (H. R.). — *Bioch. J.*, 1948, **42**, 564-574.
- (9) PILGRIM (A. F.). — *Austr. J. Sci. Res.*, 1948, **1**, 130-138.
- (10) KLEIBER (M.), COLE (H. H.), MEAD (S. W.). — *J. Dair. Sc.*, 1943, **26**, 929-933.
- (11) Mc ANALLY (R. A.). — *Bioch. J.*, 1942, **36**, 392-399.
- (12) PEARSON (R. M.), SMITH (A. B.). — *Bioch. J.*, 1943, **37**, 153.
- (13) ELSDEN (S. R.). — *Proc. Nutr. Soc.*, 1945, **3**, 243-247.
- (14) BURROUGHS (W.), NORMA (A. F.), GERLAUGH (P.), BETHKE (R. M.). — *J. Nutr.*, 1950, **40**, 9-24.
- (15) GRAY (F. V.), PILGRIM (A. F.), WELLER (A. R.). — *J. Exp. Biol.*, 1951, **28**, 74-82.
- (16) SIJPESTEIJN (A. K.), ELSDEN (S. R.). — *Bioch. J.*, 1952, **52**, 41-45.
- (17) KURSCHNER (K.), HOFFER (A.). — *Techn. Chem. Paper Zellstoff. Fab.*, 1929, **26**, 125-139, 1934, **31**, 14.

- (18) FRIEDEMANN (T. E.). — *J. Biol. Chem.*, 1938, **123**, 165.
(19) ELSDEN (S. R.). — *Bioch. J.* 1946, **40**, 252-256.
(20) LEPPER (W.). — *Tierernähr. u. Futtermitt.*, 1938, **1**, 187.
(21) CHARLET-LÉRY (G.), FRANÇOIS (A.), LEROY (A. M.). — *Ann. Zoot.*, 1952, **1**, n° 3, 45-61.
(22) GRAY (F. V.), PILGRIM (A. F.). — *J. Exp. Biol.*, 1951, **28**, 83-90.
(23) GRAY (F. V.). — Thesis, University of Adelaide in (22).
(24) GRAY (F. V.), PILGRIM (A. F.), RODDA (H. J.), WELLER (R. A.). — *J. Exp Biol.*, 1952, **29**, 57-65.
(25) HALE (E. B.), DUNCAN (C. W.), HUFFMAN (C. F.). — *J. Nutr.*, 1947, **34** 733-745.
(26) GRAY (F. V.). — *J. Exp. Biol.*, 1947, **24**, 15-19.
(27) LOUW (J. G.), WILLIAMS (H. A.), MAYNARD (L. A.). — *Science*, 1949, **110**, 478-480.
(28) EL SHAZLY. — *Bioch. J.*, 1952, **51**, 640 et 647.
(29) JARRIGE (R.). — *Ann. Nutr. Alim.*, 1953, **7**, 245.
-