

Phylogeny of 4 ciliated anaerobic rumen protozoa inferred from small subunit ribosomal RNA sequence comparisons.

A Sghir¹, J Doré¹, L Millet², D David³, P Hervé⁴ (¹ INRA, Laboratoire de Nutrition et Sécurité Alimentaire, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas Cedex; ² INRA, Laboratoire de Microbiologie, 63122 Saint Genès-Champanelle Cedex; ³ CNRS, Laboratoire de Zoologie, BP 26, 63177 Aubière Cedex; ⁴ CNRS, Laboratoire de Biologie Cellulaire 4, Université Paris XI, 91405 Orsay Cedex, France)

The most common group of rumen protozoa is represented by entodiniomorphid ciliates, which digest starch from ingested food. Based on light microscopic observations, Dogiel (1947) and Lubinsky (1957) arranged the genera of the ubiquitous family Ophryoscolecidae in a lineage which may represent the evolution of the group, from the simplest to the most complex: the ancestral *Entodinium*, intermediate *Eudiplodinium* (Eu), advanced *Epidinium* (Ep), and the most advanced *Polyplastron* (Po).

The present study is among the first to include rumen protozoa in a phylogenetic analysis based on molecular data. In terms of taxonomic implications, one major advantage of the technique used is the independence from morphological and physiological traits.

Partial sequencing of 18S-like rRNA of the 4 protozoa: *Isotrica* (Is) (belonging to the vestibulifera order), Eu, Ep and Po, has been carried out using total extracts from cell pellets purified from rumen contents of sheep inoculated with single protozoal species. Dideoxynucleotide sequencing was done using reverse transcriptase and 6 oligonucleotide primers complementary to evolutionarily conserved regions of the 18S-like rRNA.

Sequences were aligned according to conserved features of primary and secondary structure. Sequence similarities were calculated using only positions of unambiguous alignment with a nucleotide in all sequences compared. These were converted to evolutionary distances using the 'neighbor-joining method'.

There is a broad diversity within the rumen ciliates based on 18S-like rRNA sequence comparison. We confirm a monophyletic assemblage of this group of ciliates, but in contrast to the

hypothesis of an evolutionary line (Dogiel and Lubinsky), the entodiniomorphid ciliates appear to have followed a bushy evolution.

Is, of the vestibulifera order, diverged early from the entodiniomorphida and within the latter, Ep diverged first from the branch Eu-Po.

Considering the difficulties encountered in culturing rumen protozoa *in vitro*, rRNA-based technologies should prove useful in the appreciation of the phylogenetic diversity and ecological role of ciliates in the ruminal microbial community, by future development of specific hybridization probes for these microorganisms.

Cinétiques de dégradation *in sacco* des constituants cellulaires des aliments concentrés et accumulation post-prandiale des AGV.

H Archimède, S Muñoz, D Sauvant (*Institut national agronomique Paris-Grignon, laboratoire INRA-INAPG associé de nutrition et alimentation, 16, rue Claude-Bernard, 75231 Paris cedex 05, France*)

Les vitesses de dégradation *in sacco* des contenus cellulaires des aliments concentrés sont très variables et il importe donc d'en connaître les conséquences sur l'accroissement post-prandial des AGV ruminiaux.

Les données expérimentales constituent un dispositif factoriel 3 x 3 associant 3 types de concentrés (amidon rapidement AR- ou lentement AL-dégradable, pavois digestibles-PD) associés à 3 fourrages de base (foin de luzerne-FL, cannes-CM, et ensilage de maïs-EM). Pour les rations à base de FL et CM, 2 niveaux d'incorporation du concentré (30 et 60%) sont étudiés alors que les régimes EM en contiennent 40%. Les régimes sont distribués sous forme de ration complète à des chèvres à l'entretien porteuses de canule ruminale. Le pH et la teneur en AGV du jus de rumen sont mesurés aux temps 0 et 2 h après le début des repas. Chaque aliment concentré a été l'objet de mesure de dégradabilité *in sacco* de la MS, et des fractions NDF et NDS, ce qui permet de calculer leur dégradabilité théorique (DT) dans le rumen. Chaque valeur prise en compte dans l'analyse statistique représente la moyenne de 3 à 5 répétitions des différentes mesures.

La DT de la fraction NDS ($69,0 \pm 4,1\%$) est significativement ($P < 0,0001$) plus importante pour le concentré AR (91,1%) que PD (78,3%) et AL (51,5%), elle n'est pas influencée par la nature du fourrage et le niveau de concentré. La solubilisation initiale de la fraction NDS des 3 concentrés ($55,4 \pm 6,2\%$) traduit les mêmes tendances que celles observées pour la DT avec des valeurs de : 66,2%, 45,6% et 20,0% pour AR, PD et AL respectivement. L'accroissement de la teneur en AGV ($42,2 \pm 21,2$ mmol/l) est significativement ($P < 0,001$) plus élevé pour FL (64,3 mmol/l) que pour EM (45,8 mmol/l) et CM (23,58 mmol/l). La nature et la proportion de concentré n'ont, en revanche, pas d'influence sur ce paramètre. Les variations du pH ($-0,50 \pm 0,17$) traduisent globalement les mêmes tendances avec une chute plus importante pour FL ($-0,69$) que EM ($-0,56$) et CM ($-0,42$).

Ces résultats révèlent une indépendance entre les cinétiques de dégradation des contenus cellulaires des aliments concentrés et leur aptitude à entraîner une accumulation post-prandiale des AGV.

Extraction des *n*-alcanes par saponification directe. Effets de la durée d'action et de la concentration en KOH.
G Béchet, R Ferrer, M Petit (*INRA-Theix, laboratoire d'adaptation des herbivores aux milieux, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France*)

L'extraction des alcanes (utilisés comme marqueurs digestifs) à partir des fourrages et des fèces de ruminant est facilitée par une saponification directe par la KOH éthanolique à 90°C. Nous avons précisé les effets sur l'extraction de 3 durées de saponification (4, 8 et 16 h) avec 1,5 moles KOH/litre, et de 3 concentrations en KOH (0,5, 1,5 et 3 M/l), pour la durée 16 h. On a utilisé 4 échantillons moyens : une herbe (H) et un foin (F) de la même prairie naturelle offerts à 6 vaches, et les fèces FH (d'herbe) et FF (de foin) correspondants prélevés durant 10 j. Ces vaches recevaient par ailleurs l'alcane C32 comme marqueur externe. Chaque échantillon a été extrait en triple, et chaque sous-échantillon a été analysé en double par chromatographie (CPG).

Le sous-échantillonnage a un effet significatif ($P < 0,05$) sur les teneurs en C31 et C32 (le plus souvent), mais pas en C33. Cet effet peut résul-

ter en partie de variations dans la fréquence d'agitation durant l'extraction.

Les effets du traitement sont le plus souvent significatifs dans le cas des C31, 32 et 33, alcanes les plus utilisés. La durée de saponification a un effet différent selon la nature de l'échantillon. Pour les fourrages F et H respectivement, et par rapport à la moyenne des 3 traitements, les teneurs en alcanes sont plus élevées à 16 h (1,5 M) qu'à 8 h et surtout qu'à 4 h sur C31 (+6 et +4%, $P < 0,05$), C32 (+120 à +44%, $P < 0,001$) et C33 (+4 et +2%, NS). Notons que les teneurs en C32 des fourrages sont faibles, de l'ordre ici de 10mg/kg MS. Pour les fèces FF et FH respectivement, l'extraction est maximale à 8 h, soit par rapport à la moyenne pour C31 (+4 et +2%, $P < 0,01$ et NS), C32 (+10 et +8%, $P < 0,01$ et $P < 0,05$) et C33 (+7 et +4%, $P < 0,01$ et $P < 0,05$). Elle est le plus souvent plus faible à 16 h, parfois significativement (cas de FF, $P < 0,05$).

Après 16 h de traitement, l'extraction est plus efficace à la concentration 1,5 M qu'à 0,5 ou 3 M de KOH. Cet effet est le plus souvent significatif pour le C31 (+2 à +6%), seulement dans le cas des fourrages pour le C32 (+ de 100%), et dans le cas de l'herbe pour le C33 (+6%).

En conclusion, 16 h de saponification semblent nécessaires pour extraire les alcanes des fourrages alors que 8 h suffisent pour ceux des fèces. L'extraction à 1,5 M de KOH paraît meilleure qu'à 0,5 M, mais aussi parfois qu'à 3 M, ce qui reste difficile à interpréter.

Étude du rôle de la paroi végétale sur la variabilité de la dégradation *in sacco* de la luzerne.
P Chapoutot, D Sauvart (*Institut national agronomique Paris-Grignon, laboratoire associé de nutrition et alimentation INRA-INAPG, 16, rue Claude-Bernard, 75231 Paris cedex 05, France*)

Les paramètres de la dégradation *in sacco* des matières azotées (MAT) et des parois végétales (NDF) d'échantillons de luzerne en vert lyophilisée (LV), de foin de luzerne (FL), de luzerne déshydratée (LD) et de luzerne d'extraction enrichie en urée (LU) ont été interprétés (respectivement 1 LV, 3 FL, 4 LD et 2 LU pour MAT ; 2 FL, 3 LD et 2 LU pour NDF) afin d'expliquer la variabilité de comportement de ces constituants dans le rumen. La méthodologie utilisée sur vaches ou chèvres