

## ESSAI DE NORMALISATION D'UNE TECHNIQUE DE MESURE DE LA DIGESTION DES FOURRAGES IN VITRO ("RUMEN ARTIFICIEL")

J. L. TISSERAND et S. Z. ZELTER

Avec la collaboration technique de Christiane DUMAY et M. DUMONT SAINT-PRIEST

*Institut national de la Recherche agronomique,  
Laboratoire de Recherches sur la Conservation et l'Efficacité des Aliments,  
I.N.A. 16, rue Claude-Bernard, Paris (1<sup>e</sup>)*

---

### SOMMAIRE

Une technique de « rumen artificiel », qui assure une reproductibilité et une fidélité correcte des résultats (écarts < 5 p. 100) a été adoptée après que les points suivants aient été précisés :

— dans la limite de deux heures, l'exposition à l'air libre et à la température ambiante d'un jus de rumen ne modifie pas son activité cellulolytique ;

— la digestibilité de la cellulose vraie d'un foin de luzerne peut être évaluée correctement après vingt-quatre heures d'incubation ;

— le taux de matière sèche détermine, dans une large mesure, l'intensité de la dégradation de la cellulose et l'orientation des fermentations dans le « rumen artificiel ». Un rapport de l'ordre de 2,5 g de matière sèche par 100 ml de milieu correspondrait à un optimum. Une surcharge déprime la production d'acide acétique au profit de celle de l'acide propionique.

La technique préconisée est utilisée depuis 1963 pour la recherche de critères reliant d'une manière satisfaisante les résultats de la digestion *in vitro* à ceux de la digestibilité *in vivo* ou permettant un classement relatif acceptable des fourrages.

---

### INTRODUCTION

De très nombreuses études ont été effectuées depuis une vingtaine d'années sur les phénomènes digestifs au niveau de la panse. Elles ont fait l'objet de quelques mises au point approfondies (JARRIGE, 1953 ; ANNISON, 1959 ; LEWIS, 1961). Il en ressort que la population microbienne du rumen intervient de façon prépondérante dans la dégradation des glucides membranaires des fourrages (GRAY, 1947), et que leurs métabolites terminaux représentent pour le ruminant, la principale source d'énergie. Ces micro-organismes jouent également un grand rôle dans le métabolisme azoté (PEARSON et SMITH, 1943), et dans la synthèse des vitamines du groupe B (PORTER, 1961).

En raison de l'importance de ces phénomènes, beaucoup de chercheurs ont tenté de les reproduire *in vitro* en « rumen artificiel » pour étudier les mécanismes nutritionnels particuliers au ruminant et pour en déduire ses besoins alimentaires (MARTON, 1948 ; LOUW *et al.*, 1949 ; CHENG *et al.*, 1955 ; BLADEN et DOETSCH, 1959). D'autres ont essayé d'en dégager une méthode rapide d'estimation *in vitro* de la valeur nutritive des fourrages et de la substituer à la technique de mesure de la digestibilité *in vivo*, longue et laborieuse (ASPLUND *et al.*, 1958 ; CRAMPTON *et al.*, 1960 ; SHELTON et REID, 1960).

Les résultats obtenus sont contradictoires. Certains auteurs obtiennent de bonnes corrélations entre la disparition de la matière sèche ou de diverses fractions glucidiques en « rumen artificiel » et l'utilisation digestive *in vivo* de la matière sèche (REID *et al.*, 1959 ; WALKER, 1959 ; TILLEY *et al.*, 1960), de la matière organique (PIGDEN et BELL, 1955) ou de la cellulose brute (KAMSTRA, 1955 ; BARNETT, 1957 ; HERSBERGER *et al.*, 1959) ; d'autres nient l'existence de toute corrélation intéressante (BLADEN et DOETSCH, 1959). En particulier, la technique de rumen artificiel, mise au point autrefois dans notre laboratoire (FAUCONNEAU *et al.*, 1953 ; FRANÇOIS *et al.*, 1954 et 1955 ; ZELTER et F. LEROY, 1958), n'a pas permis de mettre en évidence une relation satisfaisante entre ses résultats et la mesure de l'utilisation digestive *in vivo* chez le mouton. Un examen critique suggère que ces contradictions proviendraient de la diversité des techniques utilisées.

Nous avons donc expérimenté un nouveau dispositif de rumen artificiel. Pour assurer la reproductibilité et la fidélité de ses résultats, nous avons précisé expérimentalement l'influence des facteurs suivants sur l'intensité et l'orientation du processus de la digestion *in vitro* des constituants membranaires des fourrages :

— *le temps écoulé* entre le moment du prélèvement du jus de rumen et celui de son utilisation pour les incubations, afin de savoir dans quelle mesure ce facteur modifiait son activité. En effet, selon WARNER (1956) l'aération et le refroidissement de l'inoculum durant son conditionnement réduiraient notablement son pouvoir cellulolytique ;

— *la durée de l'incubation* dans un récipient en verre, pour connaître le moment à partir duquel l'activité cellulolytique risquait de s'affaiblir, par suite de l'accumulation des produits du métabolisme et de l'épuisement du milieu en nutriments indispensables à une croissance bactérienne continue ;

— *la teneur du milieu de rumen artificiel en substrat*, car il est raisonnable d'admettre qu'un inoculum donné possède un pouvoir cellulolytique limité.

La technique une fois normalisée, nous avons éprouvé sa fidélité et sa reproductibilité.

## MATÉRIEL, ET TECHNIQUES

### *Dispositif du Rumen Artificiel*

L'emploi d'un récipient en verre (BURROUGHS *et al.*, 1950 ; GRAY *et al.*, 1951) nous a paru mieux convenir que celui d'une membrane semi-perméable (LOUW *et al.*, 1946 ; HUHTANEN et GALL, 1953 ; WARNER, 1956) pour une évaluation rapide *in vitro* de la digestibilité d'un fourrage. D'ailleurs, les membranes semi-perméables reproduisent mal les phénomènes de dialyse sélective, propres à la paroi du rumen de l'animal (BARCROFT *et al.*, 1944).

Le dispositif adopté consiste en un tube à essai (37 mm de diamètre  $\times$  200 mm hauteur) d'une capacité de 150 ml, immergé dans un bain-marie thermostatique, à une température de  $39^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  ; un barbotage d'air comprimé distribué par une rampe centrale fixée au fond du bain-marie, assure une répartition uniforme de la température.

Le tube à essai est obturé par un bouchon étanche, porteur de deux tubulures permettant le passage, bulle à bulle, d'un courant de gaz carbonique, qui assure le brassage du milieu (SALSBURY et al., 1953) ; un micro-réfrigérant à reflux, monté sur la tubulure de sortie de gaz, supprime les pertes de substances volatiles (acides gras volatils, ammoniacque). L'alimentation individuelle de chaque « rumen artificiel » en  $\text{CO}_2$  empêche tout entraînement des substances d'un milieu à l'autre par le courant gazeux.

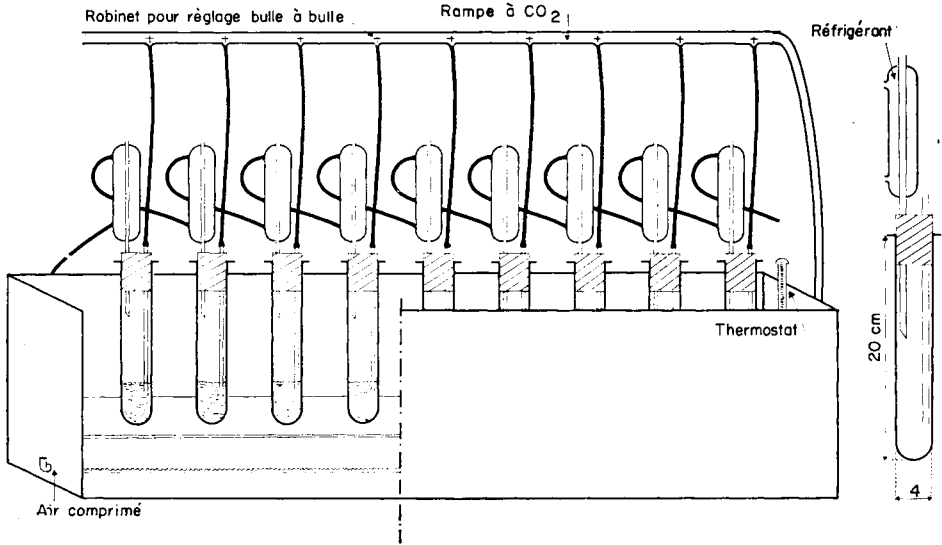


Schéma du rumen artificiel

Le substrat expérimenté est introduit dans le tube à essai, avec 20 ml de salive artificielle (formule de MAC DOUGALL, 1948) enrichie en oligo-éléments (4) et 20 ml d'inoculum.

L'inoculum est constitué par du jus de panse filtré sur 6 couches de gaze ; celui-ci est prélevé directement dans le rumen par pompage à l'aide d'une sonde gastrique ; les donneurs sont quatre moutons mâles castrés, âgés de 4 ans, nourris avec le même fourrage que celui utilisé comme substrat. L'emploi de culots bactériens obtenus par centrifugation différentielle du jus de panse (QUIN, 1943, JOHNSON et al., 1958) nous a paru contre-indiqué, vu l'objectif de nos recherches, car cette technique élimine les protozoaires (MAC NAUGHT, 1951) dont le rôle dans le métabolisme du rumen n'est pas négligeable. Cette même raison nous a fait écarter la méthode de QUICKE et al., (1950), qui consiste à préparer un inoculum à partir de la macération des particules isolées du jus de rumen dans de la salive artificielle pour en extraire les micro-organismes cellulolytiques.

#### Critères expérimentaux et techniques analytiques

Les critères retenus sont les taux de cellulolyse et les quantités de divers acides gras volatils formés au cours de l'essai.

La cellulose vraie est dosée, selon la technique de KURSCHNER et HOFFER modifiée (CHARLET-LERY et al., 1952), sur la totalité du culot de centrifugation à 2 500 g du contenu de chaque tube ; les acides gras volatils sont déterminés sur la totalité du surnageant par chromatographie de partage gaz-liquide, selon la méthode de JAMES et MARTIN modifiée (ZELTER et LEROY, 1958).

(4) Formule de la salive artificielle en mg/litre :  $\text{CO}_3\text{HNa}$  9 240 —  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ , 12  $\text{H}_2\text{O}$  7 125 —  $\text{NaCl}$  470 —  $\text{KCl}$  450 —  $\text{MgCl}_2$  anhydre 47 —  $\text{CaCl}_2$  anhydre 55 —  $\text{SO}_4\text{Fe}$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$  75 —  $\text{SO}_4\text{Mn}$ , 11  $\text{H}_2\text{O}$  4 —  $\text{SO}_4\text{Cu}$ , 5  $\text{H}_2\text{O}$  2 —  $\text{CoCl}_2$  2 —  $\text{SO}_4\text{Zn}$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 — le pH de cette solution est environ 8.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

A l'intérieur de chaque essai, les répétitions donnent des résultats très comparables ; d'un essai à l'autre, des variations sensibles en valeur absolue sont parfois observées, mais dans le même sens. Des fluctuations éventuelles, dans le temps, de l'activité cellulolytique d'un jus de rumen, en provenance des mêmes animaux nourris au même foin pourraient en être la cause.

Une autre raison de ces variations serait la dilution plus ou moins forte par la salive, du jus de panse prélevé à la sonde gastrique : l'irritation occasionnée par son passage dans l'œsophage et la durée de l'opération stimulent la sécrétion salivaire. D'après nos expériences préliminaires, faites sur des sujets porteurs de fistule de rumen, le taux de dilution oscillerait entre 10 et 30 p. 100. Afin d'éliminer cette variable, les prélèvements de jus de panse ont été ultérieurement effectués à travers des fistules de rumen.

*Influence de la durée de séjour à l'air de l'inoculum*

Elle a été étudiée en deux expériences avec des durées d'incubation de 48 heures. Quatre traitements ont été appliqués : 20 ml de jus de rumen filtré sont ajoutés à un gramme de foin de luzerne <sup>(1)</sup>, aussitôt après avoir été prélevés (*a*), ou après une demi-heure (*b*), une heure (*c*) et deux heures (*d*) de conservation en flacon ouvert, à la température ambiante du laboratoire. Chaque essai comporte 4 répétitions par traitement.

TABLEAU I

*Influence de la durée de contact du jus de rumen avec l'air sur son activité cellulolytique*  
(Résultats moyens par rumen artificiel)

Temps d'aération	Cellulose disparue (mg)	Taux de cellulolyse (°o)	Acides gras volatils apparus			
			Acides gras volatils totaux (mg)	Répartition en g p. 100 des acides gras volatils totaux		
				Acétique	Propionique	Butyrique
Témoin .....	83,9	47,4	279	63,8	25,1	11,1
1/2 heure .....	82,7	46,7	277	61,4	27,1	11,5
1 heure .....	79,1	44,7	281	63,7	25,6	10,7
2 heures .....	82,4	46,5	287	61,0	28,6	10,4

Il est couramment admis que tout contact avec l'air ou refroidissement du jus de rumen conduit à une destruction des bactéries, et par conséquent, à l'affaiblissement de son activité. Nos essais ne mettent pas en évidence ce phénomène.

Le tableau 1 indique que, ni les quantités de cellulose digérée, ni celles d'acide

<sup>(1)</sup> M.S. 91,2 p. 100 — matières minérales 8,9 p. 100 M. S. — matières azotées 19,5 p. 100 M.S. — Cellulose WENDE 28,3 p. 100 M.S.

gras volatils formés, ne diffèrent entre les traitements : les écarts constatés, inférieurs à 5 p. 100, sont de l'ordre de la précision des techniques analytiques employées.

Dans la limite de deux heures, l'exposition du jus de rumen à l'air libre et à la température ambiante telle que nous l'avons expérimentée, n'affecte donc pas son pouvoir cellulolytique.

Cette constatation s'accorde avec celle de DOETSH *et al.*, (1952), qui, procédant à des dénombrements bactériens après aération et agitation du jus de rumen pendant 3, 4 et 8 heures, n'observent pas de grosses modifications par rapport à l'échantillon examiné dès le prélèvement. Cependant, dans notre expérience, le jus de rumen est mis au contact de l'air pendant quelques minutes lors du pompage et de la filtration. Il se pourrait que cette manipulation inévitable, dont nous n'avons pu mesurer l'effet, ait instantanément modifié quelque peu l'activité cellulolytique ; mais l'allongement ultérieur de la durée d'aération ne l'influence pas.

#### *Influence de la durée de l'incubation*

Les durées expérimentées sont 12, 24, 36 et 48 heures ; trois essais, comportant chacun deux répétitions ont été réalisés avec un gramme de foin de luzerne.

Le tableau 2 indique que les quantités de cellulose dégradée en 12 heures et 24 heures représentent respectivement 62 p. 100 et 91 p. 100 de celle disparue en 48 heures. Entre 24 et 48 heures, la cellulolyse se poursuit très faiblement, elle n'augmente plus que de 9 p. 100. Les quantités d'acides gras volatils formés s'accordent étroitement avec l'intensité de la cellulolyse.

TABLEAU 2

*Effet de la durée d'incubation sur l'intensité de la cellulolyse*  
(Résultats moyens par rumen artificiel)

Durée de l'essai	Cellulose disparue (mg)	Taux de cellulolyse (%)	Valeur relative par rapport à l'essai de 48 h	Acides gras volatils apparus				
				Acides gras volatils totaux		Répartition en g p. 100 des acides gras volatils totaux		
				en mg	en valeur relative par rapport à 48 h	Acétique	Propionique	Butyrique
48 heures . . . . .	85,3	48,2	100	294	100	59,5	27,2	13,3
36 heures . . . . .	81,3	46,0	95,4	277	94,2	62,4	26,0	11,6
24 heures . . . . .	77,4	43,8	90,9	256	87,1	59,8	29,3	10,9
12 heures . . . . .	52,6	29,7	61,6	208	70,4	59,7	30,7	9,6

Le ralentissement très net de l'activité cellulolytique de l'inoculum après 24 heures peut avoir plusieurs raisons : diminution de la quantité de cellulose disponible dans le milieu ou ralentissement de l'activité bactérienne, ou encore l'action conjuguée de ces deux facteurs.

Pour des études comparées de la valeur nutritive des fourrages, MEISTRE *et al.* (1958), BAUMGARDT *et al.* (1959) préconisent une durée de 24 heures. STANLEY

et KESLER (1959), DONEFER et al. (1960) la limitent à 16 et 12 heures respectivement. Avec notre dispositif expérimental, la quantité de cellulose dégradée en 12 heures, bien qu'importante, semble relativement faible par rapport à celle disparue en 48 heures pour rendre correctement compte de la digestion *in vitro* d'un foin de luzerne. L'écart (9 p. 100), constaté entre incubations de 24 et de 48 heures, pourrait faire hésiter sur le choix entre ces deux durées. Mais, selon WARNER (1956) l'accumulation des produits de fermentation dans un récipient en verre commence déjà à exercer des effets de modification et d'inhibition sur la population bactérienne après huit heures d'incubation. Tout allongement de la durée de l'essai risque de modifier le facies fermentaire ; il se pourrait que cet inconvénient puisse être évité partiellement avec un système fonctionnant en continu (BARNETT et RIED, 1958 ; ELSHAZLY et al., 1960). Mais un tel dispositif n'est pas adapté à notre objectif. Nos résultats permettent de penser qu'avec notre appareil, il est souhaitable de limiter à 24 heures la durée de l'incubation.

#### *Influence de la concentration en substrat*

Quatre doses de substrat ont été expérimentées avec 20 ml d'inoculum : 0,5 g — 1,0 g — 1,5 g et 2,0 g de foin de luzerne. Trois essais à quatre répétitions d'une durée de 24 heures, ont été réalisés.

Lorsque la concentration de matière sèche de substrat passe de 1,15 à 2,30 g (220 et 440 mg de cellulose vraie) pour 100 ml de milieu (50 ml d'inoculum + 50 ml de salive), la capacité cellulolytique du jus de rumen double en valeur absolue, mais reste inchangée en valeur relative (tabl. 3). Avec une concentration de 3,45 g de matière sèche (660 mg de cellulose vraie), cette capacité croît en valeur absolue, mais s'abaisse en valeur relative (94,8 mg et 35,8 p. 100 au lieu de 74,2 mg et 42,1 p. 100). Lorsque la teneur en substrat s'élève davantage (4,60 g soit 880 mg de cellulose vraie) les intensités cellulolytiques absolues et relatives s'affaiblissent notablement (88,9 mg et 25,1 p. 100 contre 94,8 mg et 35,8 p. 100).

*In vivo*, le pourcentage de matière sèche est de l'ordre de 10 à 15 p. 100 dans le rumen (BURROUGHS et al., 1950) ; une telle concentration ne permet guère le fonctionnement d'un rumen artificiel. *In vitro*, l'absence de brassage intense et de rumination réduit fortement les contacts entre micro-organismes et substrat par rapport à ce qu'ils sont *in vivo*. Le taux optimum de matière sèche adopté pour le rumen artificiel varie de 0,5 à 5 p. 100 selon les auteurs. Dans le cas des récipients en verre les concentrations de 1 à 2 p. 100 sont les plus couramment employées. Il semble que ce taux soit conditionné par le dispositif de rumen artificiel. Il est également plausible que la « charge » en cellulose exerce un effet plus prononcé que celle en matière sèche. DONEFER (1960) considère en effet que la teneur optimum en cellulose est de 400 mg pour 100 ml. De plus, il est certain qu'une surcharge en éléments membranaires incrustés (lignine), diminue l'utilisation digestive des aliments *in vivo*. Le maintien d'un taux optimum de matière sèche approprié au dispositif pourrait éviter de fausser la comparaison entre fourrages de richesses différentes en substances membranaires. Dans notre technique, l'activité cellulolytique maximum d'un inoculum semble être atteinte pour une concentration de 2,5 p. 100 de matière sèche. Ce taux est également retenu par d'autres expérimentateurs (JOHNSON et DEHORITY,

TABLEAU 3  
*Influence de la quantité de substrat introduite dans le rumen artificiel sur son activité cellulolytique*  
 (Résultats moyens de 12 essais d'une durée de 24 heures par traitement)

Quantité de foin de luzerne en g		rapportée à 100 g de milieu		Cellulose disparue (mg)	Taux de cellulolyse (%)	Acides gras volatils apparus				Rapport $\frac{\text{acide acétique}}{\text{acide propionique}}$		
		matière sèche (%)	cellulose vraie (mg)			Acides gras volatils totaux en mg	Répartition en g p. 100 d'acides gras volatils totaux		pondéral	molaire		
introduite en rumen artificiel						Acétique	Propionique	Butyrique				
0,5		1,15	220	37,0	41,9	66,4 ± 6,8	26,2 ± 3,9	9,1 ± 2,5	2,8 ± 0,6	3,9 ± 0,3		
1		2,30	440	74,2	42,1	67,1 ± 3,5	23,5 ± 3,6	9,6 ± 4,4	2,9 ± 0,6	3,6 ± 0,7		
1,5		3,45	660	96,8	35,8	57,7 ± 4,9	31,5 ± 0,9	10,9 ± 4,6	1,8 ± 0,2	2,3 ± 0,2		
2		4,60	880	88,9	25,1	57,9 ± 1,1	33,1 ± 2,3	8,6 ± 1,2	1,8 ± 0,1	2,2 ± 0,1		

1958). Il se trouve qu'à ce taux, le foin de luzerne utilisé dans nos essais apporte une quantité de cellulose vraie (440 mg), qui correspond également à l'optimum admis par DONEFER (1960).

Une autre constatation intéressante ressort du tableau 3 : avec l'optimum de concentration de matière sèche, la répartition des acides gras volatils calculée pour 100 g d'acides gras volatils totaux formés est, dans notre rumen artificiel proche de celle notée habituellement *in situ* chez un ruminant consommant un fourrage long ; toute surcharge en matière sèche déprime, par contre, fortement la formation d'acide acétique au profit de l'acide propionique : les rapports acide acétique/acide propionique passent de 2,8/1 à 1,8/1 (rapport pondéral) et de 3,6/1 à 2,2/1 (rapport molaire). Ces différences sont hautement significatives ; la finesse des particules du substrat ne peut en être la cause puisque le même stock de foin de luzerne broyée a été utilisé.

TABLEAU 4

*Reproductibilité des résultats obtenus en rumen artificiel*  
(1 g de substrat. Durée de l'incubation 24 heures)  
(Résultats moyens)

Date	Nombre de répétitions	Cellulolyse	g. A.G.V. totaux	Observations
17 juin 1964 . . . . .	16	44,0 ± 2,1	0,20 ± 0,02	Le dosage des acides gras volatils est effectué sur un échantillon obtenu en mélangeant 2 tubes.
8 juillet 1964 . . . . .	16	41,5 ± 1,6	0,22 ± 0,01	
17 juin et 8 juillet 1964 . . . . .	32	42,7 ± 2,1	0,21 ± 0,02	
Ensemble des essais 1961 . . . . .	18	42,7 ± 3,7	0,26 ± 0,05	Six essais : 3 comportant 2 répétitions et 3 comportant 4 répétitions.
Ensemble des essais 1961 et 1964 . . . . .	50	42,7 ± 2,7	0,22 ± 0,02	

Une concentration excessive de matière sèche de luzerne (rapport inoculum/substrat, faible) oriente différemment avec notre technique, le métabolisme des micro-organismes de la panse. Cela pourrait expliquer en partie le fait que tous les auteurs qui ont utilisé *in vitro* des taux de substrat élevé, ont noté une production plus importante d'acide propionique et moindre d'acide acétique que celle observée *in vivo*, avec des fourrages non broyés (MARSTON, 1948 ; FAUCONNEAU *et al.*, 1953 ; FRANÇOIS *et al.*, 1955 ; ZELTER *et al.*, 1958).

Outre les facteurs connus (richesse en sucres et structure physique du fourrage) l'abaissement de la concentration en matière sèche peut également favoriser en rumen artificiel, la formation d'acide propionique au dépens de l'acide acétique.

#### *Reproductibilité et fidélité de la technique*

Pour éprouver ces qualités, 4 essais d'une durée de 24 heures comportant 16 répétitions chacun, ont été effectués. 1 g du même foin de luzerne a été introduit



dans le « rumen artificiel » avec 20 ml de salive artificielle et 20 ml de jus de panse filtré sur gaze, provenant d'un seul et même mouton consommant du foin de luzerne.

Dans le tableau 4 sont comparés les résultats des essais réalisés en 1961 et 1964.

La reproductibilité et la fidélité des données de la cellulolyse sont très satisfaisantes. L'écart-type des valeurs à l'intérieur de chaque essai et entre essais est inférieure au degré de précision du dosage de la cellulose ( $\pm 5$  p. 100). D'autre part, les valeurs obtenues à trois ans d'intervalle (1961-1964) avec le même substrat, confirment la fidélité de la méthode.

Les valeurs d'acides gras volatils, très comparables dans les expériences de 1964, diffèrent légèrement de la valeur moyenne obtenue en 1961.

L'étude d'autres facteurs est en cours (moment du prélèvement du jus de rumen après le repas, conditionnement de l'inoculum, état physique du substrat...). Elle doit permettre de préciser les conditions d'emploi les plus favorables de notre dispositif de rumen artificiel afin d'aboutir à des résultats aussi cohérents que possible.

Mais, dès à présent, la technique préconisée permet d'opérer avec 30 rumens artificiels par essai. Son dispositif est simple, peu coûteux et n'exige pas de contrôle laborieux en cours de fonctionnement.

Sa reproductibilité et sa fidélité nous paraissent particulièrement intéressantes pour la mise au point, actuellement à l'étude, d'un test convenable de prévision de la valeur nutritive et surtout de classement relatif des fourrages.

*Reçu pour publication en novembre 1964.*

## SUMMARY

### AN ATTEMPT TO STANDARDIZE THE TECHNIQUE OF MEASURING THE DIGESTION OF FODDERS « IN VITRO » (ARTIFICIAL RUMEN)

An artificial rumen technique which ensures the production of results that are reproducible and reliable (deviations  $< 5$  p. 100, table 4) has been chosen in order to arrive at a method of estimating *in vitro* the digestive utilization of fodders. The device adopted consists of an experimental tube of 150 ml capacity immersed in a thermostatic water bath at a temperature of  $39^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ . The tube is closed by a cork stopper through which pass two pipes which enable a current of carbon dioxide to be passed through in the form of single bubbles; each tube has a separate supply of the gas. A reflux micro-refrigerator mounted on the tube system from which the gas emerges obviates the loss of volatile substances (see schema). The experimental substrate is introduced into the tube together with 20 ml of artificial saliva and 20 ml of sheep rumen fluid filtered through gauze.

Before adopting this technique the following points were ascertained:

— Within the limit of two hours, exposure to the open air and to room temperature does not modify the cellulolytic activity of rumen fluid (table 1).

— The digestibility of the true cellulose of lucerne hay can be correctly evaluated after incubation for 24 hr (table 2).

— The dry-matter content plays a large part in determining the intensity of degradation of the cellulose and the direction of the fermentations taking place in the artificial rumen. A proportion in the order of 2.5 g of dry matter per 100 ml of medium would represent about the optimum (table 3). An excess depresses the production of acetic acid in favour of that of propionic acid.

The technique in question has been employed since 1963 in the search for criteria giving satisfactory relationship between the results of digestion *in vitro* and those *in vivo*, or enabling an acceptable relative classification of fodders to be made.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANNISON E. F., LEWIS D., 1959. *Metabolism in the rumen*, p. 184, Methuen London.
- ASPLUND J. M., BERG R. T., MAC ELROY L. W., PIGDEN W. J., 1958. Dry matter loss and volatile fatty acid production in the artificial rumen as indices of forage quality. *Canad. J. Anim. Sci.*, **38**, 171-179.
- BARCROFT J., MAC ANALLY R. A., PHILLIPSON A. T., 1944. Absorption of volatile acids from the alimentary tract of the sheep. *J. Exp. Biol.*, **20**, 120-128.
- BARNETT A. J. G., REID R. L., 1957. Studies on the production of volatile fatty acids from grass by rumen liquor in an artificial rumen. *J. Agric. Sci.*, **48**, 315-321.
- BARNETT A. J. G., 1957. Studies on the digestibility of the cellulose fraction of grassland products. I. The relation between the digestibility of silage cellulose as determined *in vitro* and silage crude fiber digestibility determined by feeding trial. *J. Agric. Sci.*, **59**, 467-473.
- BAUMGARDT B. R., TAYLOR M. W., CASON J. C., 1959. A simplified artificial rumen procedure for estimating the digestible energy content of hays. *J. Anim. Sci.*, **18**, 1538.
- BLADEN H. A., DOETSCH R. N., 1959. Rumen biochemistry physiological activities of rumen mixed cellulose suspensions. *J. Agric. Food Chem.*, **7**, 791.
- BLAKE J. T., ALLEN R. S., JACOBSON N. L., 1957. The influence of various factors on surface tension and pH of rumen fluid. *J. Anim. Sci.*, **16**, 190-200.
- BURROUGHS W., FRANK N. A., GERLAUGH P., BETHKE R. M., 1950. Preliminary observations upon factors influencing cellulose digestion by rumen microorganisms. *J. Nutr.*, **40**, 9-24.
- CHARLET-LÉRY G., FRANÇOIS A. C., LEROY A. M., 1952. L'analyse des aliments destinés aux animaux et l'interprétation des résultats qu'elle fournit. *Ann. Zootech.*, **1**, 45-61.
- CHENG E. W., HALL G., BURROUGHS W., 1955. A method for the study of cellulose digestion by washed suspensions of rumen microorganisms. *J. Dairy Sci.*, **38**, 1225-1230.
- CRAMPTON E. W., DONEFER E., LLOYD L. E., 1960. A nutritive value index for forages. *Proc. VIIIth. Intern. Grassland Congress*, 462-466.
- DOETSCH R. N., ROBINSON R. Q., SHAW J. C., 1952. Techniques employed in cultural investigations of the bacteriology of bovine rumen contents. *J. Anim. Sci.*, **11**, 536-543.
- DONEFER E., CRAMPTON E. W., LLOYD L. E., 1959. *In vitro* rumen fermentation data as indices of effective nutritive value of forages. *J. Anim. Sci.*, **18**, 1538.
- DONEFER E., CRAMPTON E. W., LLOYD L. E., 1960. Prediction of the nutritive value index of a forage from *in vitro* rumen fermentation data. *J. Anim. Sci.*, **19**, 545-552.
- EL SHAZLY K., DEHORITY B. A., JOHNSON R. R., 1960. A comparison of the all-glass, semi permeable membrane and continuous flow of apparatus for *in vitro* rumen fermentations. *J. Dairy Sci.*, **43**, 1445-1450.
- FAUCONNEAU G., FRANÇOIS A. C., LEROY A. M., ZELTER S. Z., 1953. Processus digestifs des ruminants. I. Étude *in vitro* de la digestion du foin de luzerne. *Ann. Zootech.*, **2**, 275-284.
- FRANÇOIS A. C., LEROY A. M., ZELTER S. Z., 1954. Processus digestif des ruminants. II. Influence des antibiotiques sur la digestibilité *in vitro* du foin de luzerne. *Ann. Zootech.*, **3**, 9-16.
- FRANÇOIS A. C., LEROY A. M., ZELTER S. Z., 1955. Processus digestif des ruminants. III. Étude *in vitro* de quelques phénomènes de digestibilité associative. *Ann. Zootech.*, **4**, 2, 103-109.
- GRAY F. V., 1947. The digestion of cellulose by sheep; the extent of cellulose digestion at successive levels of the alimentary tract. *J. Exp. Biol.*, **24**, 15-19.
- GRAY F. V., PILGRIM A. F., WELLER R. A., 1951. The production of volatile fatty acids and methane during fermentation of wheaten hay and lucerne hay *in vitro* by microorganisms from the rumen. *J. Exp. Biol.*, **28**, 195.
- HERSHBERGER T. V., LONG T. A., HARTSOOK E. W., SWIFT R. W., 1959. Use of the artificial rumen technique to estimate the nutritive value of forages. *J. Anim. Sci.*, **18**, 770-777.
- HUITANEN C. N., GALL L. S., 1952. The miniature artificial rumen and its uses. *J. Anim. Sci.*, **11**, 766.
- JARRIGE R., 1953. Utilisation des glucides alimentaires par les ruminants. *Ann. Nutr.*, **7**, 245-302, 339-401.
- JOHNSON R. R., DEHORITY B. A., BENTLEY O. G., 1958. Studies on the *in vitro* rumen procedure. Improved inoculum preparation and the effects of volatile fatty acids in cellulose digestion. *J. Anim. Sci.*, **17**, 841-849.
- KAMSTRA L. D., 1955. Digestion of cellulose from different sources by rumen microorganisms. *Ph. D. Thesis Ohio State Univ.*
- LEFEVRE C. F., KAMSTRA L. D., 1960. A comparison of cellulose digestion *in vitro* and *in vivo*. *J. Anim. Sci.*, **19**, 867-871.
- LEWIS D., 1961. *Digestive physiology and nutrition of the ruminant*. P. 297, Butterworths, London.
- LOWE J. G., WILLIAMS H. H., MAYNARD L. A., 1949. A new method for the study *in vitro* of rumen digestion. *Science*, **110**, 478-480.

- MAC DOUGALL E. I., 1948. Studies on ruminant saliva ; I. The composition and out put of sheep's saliva, *Biochem. J.*, **43**, 99-109.
- MAC NAUGHT M.L., 1951. The utilisation of non protein nitrogen in the bovine rumen. VII. A qualitative and quantitative study of the breakdown of carbohydrate which accompagnies protein formation in bovine rumen contents during *in vitro* incubation. *Biochem. J.*, **49**, 325-332.
- MARSTON H. R., 1948. The fermentation of cellulose *in vitro* by organisms from the rumen of sheep. *Biochem. J.*, **42**, 564-574.
- MEITES S., BURRELL R. C., SUTTON T. S., 1951. Factors influencing the *in vitro* digestion of cellulose by rumen liquor in the presence of an antiseptic. *J. Anim., Sci.*, **10**, 203-210.
- MEISKE J. C., SALSURY R. L., HOEFER J. A., LUECKE R. W., 1958. The effect of starvation and subsequent refeeding on some activities of rumen microorganisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, **17**, 774.
- MYBURGH S. J., QUIN J. I., 1943. Studies on the alimentary tract of *Merino* Sheep in south Africa. *Onderstepoort J. Vet. Sci.*, **18**, 119-127.
- PEARSON R. M., SMITH J. A. B., 1943. The utilisation of urea in the bovine rumen. *Biochem. J.*, **37**, 148-157.
- PIDGEN W. J., BELL J. M., 1955. The artificial rumen as a procedure for evaluating forage quality. *J. Anim. Sci.*, **14**, 1239.
- PORTER W. J., LEWIS D., 1961. *Digestive physiology and nutrition of the ruminant*. Betterworths, London, 226-233.
- QUICKE G. V., BENTLEY O. G., SCOTT H. W., MOXON A. L., 1959. Cellulose digestion *in vitro* as a measure of the digestibility of forage cellulose in ruminants. *J. Anim. Sci.*, **18**, 275-286.
- QUIN J. L., 1943. Studies on the alimentary tract of *Merino* Sheep in south Africa. *Onderstepoort J. Vet. Sci.*, **18**, 91-112.
- REID R. L., SHELTON D. C., WELCH J. A., JUNG G. A., 1959. Pasture quality as determined by *in vitro* and *in vivo* techniques. *J. Anim. Sci.*, **18**, 1537.
- SALSURY R. L., SMITH C. K., HUFFMAN C. F., 1956. The effect of high levels of cobalt on the *in vitro* digestion of cellulose by rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.*, **15**, 863-868.
- SHELTON D. C., REID R. L., 1960. Measuring the nutritive value of forages using *in vitro* rumen technique. *Proc. VIIIth Intern. Grassland Congr.*, 524-528.
- STANLEY R. W., KESLER E. M., 1959. Preparation and some basic properties of cell-free cellulolytic extract of rumen fluid. *J. Dairy Sci.*, **42**, 127-136.
- TILLEY J. M. A., DERIAZ R. E., TERRY R. A., 1960. The *in vitro* measurement of herbage digestibility and assessment of nutritive value. *Proc. VIIIth Intern. Grassland Congr.*, 533-537.
- WALKER D. M., 1959. The *in vitro* digestion of roughage dry matter. *J. Agric. Sci.*, **53**, 192-196.
- WARMER A. C. I., 1956. Criteria for establishing the validity of *in vitro* studies with rumen microorganisms in so-called artificial rumen systems. *J. Gen. Microbiol.*, **14**, 733-748.
- ZELTER S. Z., LEROY F., 1958. Azote urique et activité bactérienne *in vitro* au niveau du rumen. *Ann. Zootech.*, **7**, 173-182 et 185-191.
-