

Mesure *in vitro* de l'effet des plantes des prairies sur l'activité microbienne du rumen

J. Scephovic

Les techniques de laboratoire surestiment généralement la valeur réelle des dicotylédones non légumineuses et des fourrages riches en dicotylédones. De nombreuses espèces prairiales inhibent l'activité des enzymes cellulolytiques et de la population microbienne du rumen. Une nouvelle méthode de laboratoire permet d'évaluer l'importance de cette action.

RÉSUMÉ

Le contenu cellulaire peut contenir certaines substances défensives du métabolisme secondaire dont l'action sur la population microbienne du jus de rumen a été étudiée pour 51 espèces des prairies permanentes. L'extrait cellulaire a été obtenu par macération de la matière végétale dans de la saline artificielle. Cet extrait est mélangé à du jus de rumen et placé dans un appareil (fermenteur) en anoxie. L'appareil permet de mesurer le volume de gaz produit par la fermentation microbienne. La mesure est effectuée après 150 minutes de fermentation ; la répétabilité est bonne. Les graminées, généralement pauvres en métabolites secondaires, exercent une faible inhibition de l'activité fermentaire. Certaines dicotylédones riches en substances phénoliques, terpéniques et alcaloïdes, ainsi que certains acides organiques toxiques, peuvent fortement diminuer l'activité microbienne du rumen.

MOTS CLÉS

Composition chimique, dicotylédone, fermentation, fourrage, graminée, jus de rumen, légumineuse, métabolite secondaire, méthode d'estimation, prairie permanente.

KEY-WORDS

Chemical composition, dicotyledon, estimation method, fermentation, forage, grass, legume, permanent pasture, rumen juice, secondary metabolite.

AUTEUR

Station fédérale de recherches en production végétale de Changins, CH-1260 Nyon 1 (Suisse).

La présence parfois importante de certaines dicotylédones riches en métabolites secondaires dans les herbages permanents peut entraîner, d'une part, une forte sélectivité du bétail au pâturage (refus) et, d'autre part, une diminution de la digestibilité et de l'ingestibilité du fourrage. Mise à part leur aptitude à inhiber l'activité des enzymes cellulolytiques (DAIBER, 1975 ; SWAIN, 1977 ; MUELLER-HARVEY, 1989 ; SCEHOVIC, 1995), **certains métabolites secondaires peuvent conduire, par leur action anti-microbienne, à une diminution de l'activité des micro-organismes du contenu du rumen** (CHENG *et al.*, 1980 ; JUNG, 1985 ; BORNEMAN *et al.*, 1986 ; LAMED *et al.*, 1987 ; SCEHOVIC, 1997). De nombreux travaux, consacrés à une meilleure compréhension de cette action et à l'estimation de son importance du point de vue alimentaire, mettent en évidence **le rôle particulier des monomères et polymères phénoliques** (CHESSON *et al.*, 1982 ; SAWAI *et al.* 1983 ; JUNG, 1985 ; STACK et COTTA, 1986 ; VAREL et JUNG, 1986). L'action des autres substances présentes dans les végétaux et inhibitrices potentielles de l'activité microbienne du rumen est en revanche relativement mal connue.

Pratiquement, tous les travaux qui s'efforcent de mettre en évidence la faculté de certaines substances d'agir sur la population microbienne du rumen ont eu recours à des produits purs issus de la synthèse ou isolés à partir de végétaux. Cette pratique ne permet alors que l'étude d'une infime partie de l'extraordinaire complexité chimique de l'organisme végétal et néglige le fait que l'action des substances séparées de leur matrice naturelle ne correspond pas forcément à celle développée dans leur environnement originel.

L'adoption sans réserve de la conception de VAN SOEST et MOORE (1966), selon laquelle la digestibilité du contenu cellulaire ou de la fraction soluble de la matière végétale est proche de 100%, conduit au fait que l'importance de cette fraction est souvent limitée à son seul aspect quantitatif. La composition chimique de la fraction soluble est très complexe ; en conséquence, une analyse chimique exhaustive est difficilement envisageable. De plus, **les concentrations en substances particulières de la fraction soluble, et plus particulièrement celles des métabolites secondaires, ne sont pas forcément proportionnelles à leur action dans le tube digestif des ruminants** (SCEHOVIC, 1990). **Par ailleurs, il n'existe pratiquement pas un seul schéma analytique qui prenne en considération l'action des métabolites secondaires lors de l'évaluation des paramètres de la qualité des fourrages.**

Nous avons développé un appareil fermenteur simple et un procédé de laboratoire rapide permettant d'étudier et de quantifier l'action potentielle des métabolites secondaires présents dans les végétaux sur la population microbienne du rumen. L'extrait végétal est obtenu à l'aide de la salive artificielle, dont la composition s'apparente au milieu existant dans le rumen. Les résultats obtenus devraient pouvoir compléter l'éventail des critères de laboratoire utilisés pour l'évaluation de la qualité des fourrages.

1. Mise au point méthodologique

■ Principe de la méthode

Pour une courte durée, le niveau de fermentation, et donc la production de gaz, est une fonction linéaire de la croissance de la population microbienne (KRISHNAMOORTHY *et al.*, 1991). **En situation non limitante d'alimentation** en énergie des micro-organismes et de conditions du milieu (pH, température, anoxie, osmolarité), **la production de gaz traduit directement l'entrave possible de l'activité fermentaire du milieu par la présence dans les végétaux de substances inhibitrices.**

La quantité de gaz produite par un mélange de l'extrait végétal avec du jus de rumen durant une période d'incubation de 150 minutes est enregistrée.

■ Matière végétale

Cinquante et une espèces végétales (tableau 1), caractérisées par leur richesse plus ou moins prononcée en différents groupes de métabolites secondaires, ont été prélevées séparément dans des prairies permanentes (2 à 3 échantillons par espèce). Le choix des espèces a été effectué suivant notre propre expérience analytique (SCEHOVIC, 1990 et 1995, JEANGROS *et al.*, 1994) et d'autres sources bibliographiques qui cataloguent les végétaux d'après leur teneur en certains principes actifs (WAGNER *et al.*, 1984 ; BRUNETON, 1987). La matière végétale a été séchée à 55°C dans une étuve ventilée durant 24 heures, puis réduite en poudre (1 mm) et stockée à l'obscurité.

TABLEAU 1 : **Espèces végétales étudiées** (graminées en gras).

TABLE 1 : **Natural grassland species investigated** (in bold : grasses).

Espèce	Abréviation	Espèce	Abréviation	Espèce	Abréviation
<i>Achillea millefolium</i>	ACHMI	<i>Festuca pratensis</i>	FESPR	<i>Ranunculus bulbosus</i>	RANBU
<i>Agropyron repens</i>	AGPRE	<i>Festuca rubra</i>	FESRU	<i>Ranunculus frisianus</i>	RANFR
<i>Alchemilla vulgaris</i>	ALCVU	<i>Geranium pyrenaicum</i>	GERPY	<i>Ranunculus repens</i>	RANRE
<i>Anthriscus sylvestris</i>	ANRSY	<i>Heracleum sphondylium</i>	HERSP	<i>Rhinantus alectorolophus</i>	RHIAL
<i>Arrhenatherum elatius</i>	ARREL	<i>Hypericum maculatum</i>	HYPMA	<i>Rumex acetosa</i>	RUMAC
<i>Brachypodium pinnatum</i>	BRAPI	<i>Knautia arvensis</i>	KNAAR	<i>Rumex obtusifolius</i>	RUMOB
<i>Carum carvi</i>	CAUCA	<i>Lathyrus pratensis</i>	LATPR	<i>Salvia pratensis</i>	SALPR
<i>Centaurea jacea</i>	CENJA	<i>Leontodon hispidus</i>	LEOHI	<i>Sanguisorba minor</i>	SANMI
<i>Centaurea montana</i>	CENMO	<i>Lolium perenne</i>	LOLPE	<i>Silene dioica</i>	SILDI
<i>Centaurea scabiosa</i>	CENSC	<i>Lotus corniculatus</i>	LOTCO	<i>Silene vulgaris</i>	SILVU
<i>Chrysanthemum leucant.</i>	CHRLE	<i>Medicago sativa</i>	MEDSA	<i>Taraxacum officinale</i>	TAROF
<i>Cichorium intybus</i>	CICIN	<i>Onobrychis vicifolia</i>	ONOVI	<i>Tragopogon orientalis</i>	TRAOR
<i>Crepis biennis</i>	CREBI	<i>Picris hieracioides</i>	PICHI	<i>Trifolium pratense</i>	TRIPR
<i>Dactylis glomerata</i>	DACGL	<i>Plantago media</i>	PLAME	<i>Trifolium repens</i>	TRIRE
<i>Euphorbia cyperisias</i>	EUPCY	<i>Plantago lanceolata</i>	PLALA	<i>Veronica chamaedrys</i>	VERCH
<i>Festuca arundinacea</i>	FESAR	<i>Polygonum bistorta</i>	POLBI	<i>Vicia cracca</i>	VICCR
				<i>Vicia sativa</i>	VICSA

■ Extraction de la fraction soluble

L'extraction de la fraction soluble est **effectuée par macération de la matière végétale dans de la salive artificielle** (MCDUGALL, 1948 ; SCEHOVIC, 1997) à la température de 45°C dans des conditions anaérobies. Pour assurer ces conditions, le mélange de sels composant la salive synthétique est préparé dans de l'eau contenant les agents réducteurs (0,5 g/l de thioglycolate de sodium et 0,5 g/l de hydrochlorate de L-cystéine monohydrate). Avant la fermeture hermétique des récipients utilisés pour l'extraction, l'air en est évacué par du gaz carbonique. Afin d'éviter une trop grande dilution dans la salive des substances potentiellement actives, nous avons opté pour un rapport solvant/substrat approchant le rapport moyen de la phase liquide et de la phase solide dans le rumen (2,5 g de matière végétale dans 35 ml de salive).

Après 20 heures de macération, l'extrait est séparé du résidu végétal par filtration sous vide à travers un verre fritté (porosité No 1). L'aspect du filtrat (couleur et turbidité) est pratiquement identique à celui du jus de rumen filtré.

■ Jus de rumen

Le jus de rumen a été **collecté sur des vaches fistulées** et immédiatement congelé en petites portions (80 ml) dans de l'azote liquide, puis stocké dans un congélateur à -80° C. Juste avant utilisation, le jus est décongelé durant 10 minutes dans un bain-marie à 39°C et barboté avec du gaz carbonique.

■ Incubation et fermentation dans l'appareil

L'incubation du mélange extrait + jus de rumen (dans les proportions volumiques 4 + 1) est effectuée dans un appareil (fermenteur, figure 1) dont la conception et le fonctionnement cherchent à reproduire la situation du rumen où le gaz de fermentation s'accumule dans la poche surmontant la masse fibreuse (REMOND *et al.*, 1995). L'appareil est simple et peut être monté au laboratoire.

Après avoir chassé l'air de l'appareil (CO₂), l'extrait et le jus sont introduits dans le compartiment de mélange et les deux composants sont vigoureusement mélangés. Le niveau du mélange est mis à zéro dans le tube gradué (extrémité supérieure rétrécie) par injection de CO₂ à travers l'orifice de remplissage. L'appareil est fermé hermétiquement dans l'ex-

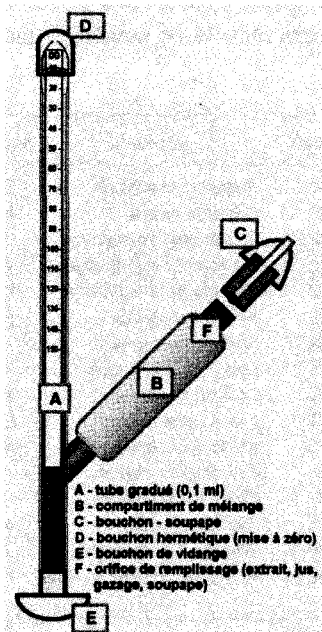
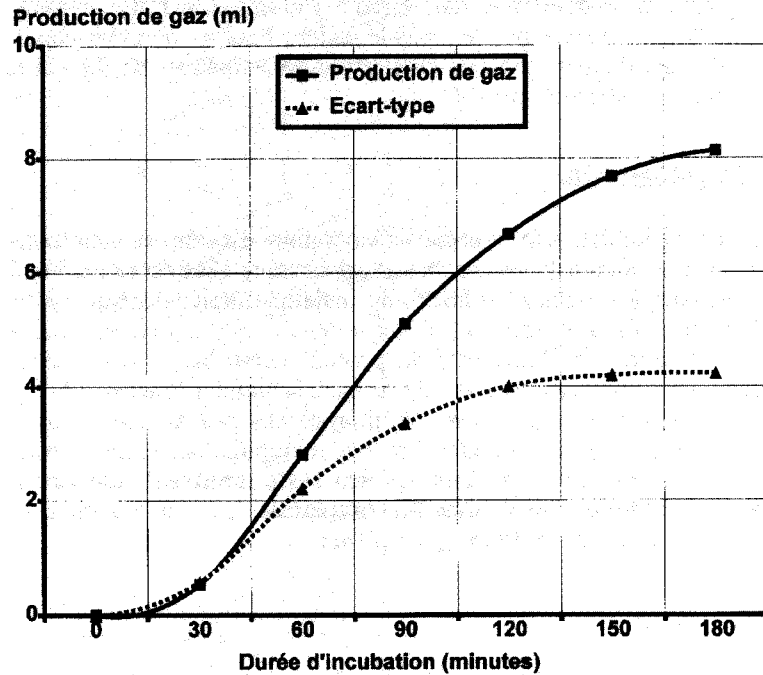


FIGURE 1 : Schéma de l'appareil utilisé pour la fermentation et la mesure de la production de gaz.

FIGURE 1 : Sketch of the fermentation apparatus used to measure gas production.

FIGURE 2 : Evolution de la production de gaz en relation avec la durée d'incubation (moyenne des 120 échantillons).

FIGURE 2 : *Relationship between gas production and time of incubation (average of 120 samples).*



trémité supérieure du tube gradué. L'orifice de remplissage est muni d'un dispositif (soupape) permettant de régler la pression créée par la production de gaz tout en empêchant l'accès de l'air. Les manipulations terminées, l'appareil est placé dans un incubateur réglé à la température de 39°C. Le gaz de fermentation s'accumule dans la partie supérieure du tube gradué et repousse le niveau du liquide vers le bas. **On procède à la lecture des résultats après 150 minutes d'incubation** en enregistrant la hauteur de la colonne de liquide restant dans le tube gradué. Aucun calibrage n'est nécessaire. La seule condition pour obtenir une excellente répétabilité est la stricte standardisation des dimensions des appareils.

L'observation de la cinétique de production de gaz (figure 2) a permis de déterminer la durée minimale d'incubation nécessaire correspondant aux conditions bien définies de notre procédé (ressources énergétiques, évolution du pH, volume du milieu de fermentation, etc.). La répétabilité de la vitesse initiale de la fermentation peut être influencée par la durée des manipulations de mise en marche et de la température ambiante lors de ces manipulations. Après 150 minutes d'incubation, l'évolution de la production de gaz est stoppée ou insignifiante et la répétabilité des résultats est maximale.

Etant donné que, dans notre procédé, l'extrait végétal fait office de solution nutritive pour la population microbienne du jus de rumen, la croissance de celle-ci est tributaire de la composition chimique et de la disponibilité des ressources énergétiques dans l'extrait. L'addition de glucose dans l'extrait des échantillons les plus pauvres en glucides rapidement fermentescibles a eu pour conséquence une légère augmentation de la vitesse initiale de fermentation sans influencer signifi-

cativement la production totale de gaz à 150 minutes. Cette observation indique que l'énergie n'est pas le facteur limitant dans les conditions définies de notre procédé (rapports salive/substrat, extrait/jus et fermentation de courte durée).

■ Répétabilité

La répétabilité d'un procédé de laboratoire est une des conditions fondamentales pour le succès de son application. Cela est notamment valable pour les procédés utilisant du matériel microbiologique, particulièrement fragile et exigeant. Deux séries de tests ont été effectuées pour déterminer la répétabilité du procédé décrit (s_r : écart type de répétabilité) ; nous avons testé, d'une part, la standardisation et la fiabilité des instruments de mesure (huit appareils avec le même extrait) et, d'autre part, la répétabilité due aux manipulations (huit extraits d'une même espèce). **Les résultats des tests montrent une excellente répétabilité aussi bien instrumentale** ($s_r = 0,093$ ml avec $x = 11,05$ ml) **qu'analytique** ($s_r = 0,21$ ml).

■ Témoin

Chaque série d'échantillons est accompagnée d'un témoin pour lequel on dispose d'une quantité suffisante pour une utilisation répétée. Nous avons utilisé un mélange constitué de deux légumineuses et de trois graminées. **Le rôle du témoin est de détecter d'éventuelles différences dans l'activité microbienne**, dues à l'utilisation de plu-

Détermination	Moyenne	Déviaton standard	Maximum	Minimum
- Analyse des végétaux (n = 120)				
Matières azotées totales	14,1	4,7	28,3	4,5
Parois (NDF)	36,4	11,2	75,8	16,0
Lignocellulose (ADF)	27,4	6,9	42,8	12,9
Lignine	7,7	2,9	15,5	2,7
Cellulose vraie	19,5	4,6	33,5	10,0
Monosaccharides	9,2	3,7	19,1	2,4
Polysaccharides	3,8	2,1	18,6	1,4
Glucides solubles totaux	12,9	4,5	25,5	3,8
Phénols solubles	3,54	2,26	12,65	0,86
Acides phénol. estérifiés	0,74	0,34	2,06	0,36
Phénols polymérisés	0,77	1,10	4,68	0,00
Substances terpéniques*	3,70	5,54	26,83	0,35
Indice d'Action Négative Potentielle	101,2	58,1	291,1	21,0
- Analyse de l'extrait + jus de rumen				
Glucides solubles (extrait)	8,9	3,5	19,0	3,5
pHe (extrait)	6,95	0,42	7,76	6,48
pH (jus de rumen barboté avec du CO ₂)	6,17	0,09	6,31	6,06
pHf (mélange après fermentation)	6,03	0,54	6,73	5,04
* terpènes exprimés en unités relatives, densité optique entre 210 et 380 nm terpenoids expressed in relative units, optical density across the region 210 - 380 nm				

TABLEAU 2 : **Statistique descriptive** (120 échantillons) **des résultats analytiques** (exprimés en % de la matière sèche).

TABLE 2 : **Descriptive statistics** (120 samples) **of analytical results** (results expressed in % of dry matter).

sieurs lots de jus de rumen d'origines différentes. **Les résultats sont exprimés par rapport au témoin** (témoin = 100).

■ Autres analyses

La fraction soluble dans la salive artificielle a été extraite de 120 échantillons représentant 51 espèces de plantes des prairies permanentes. Les résultats d'analyses chimiques (tableau 2) sont l'illustration de la diversité des végétaux étudiés. Ils ont été utilisés dans la recherche d'éventuels critères explicatifs des différences en activité fermentaire enregistrées *in vitro*.

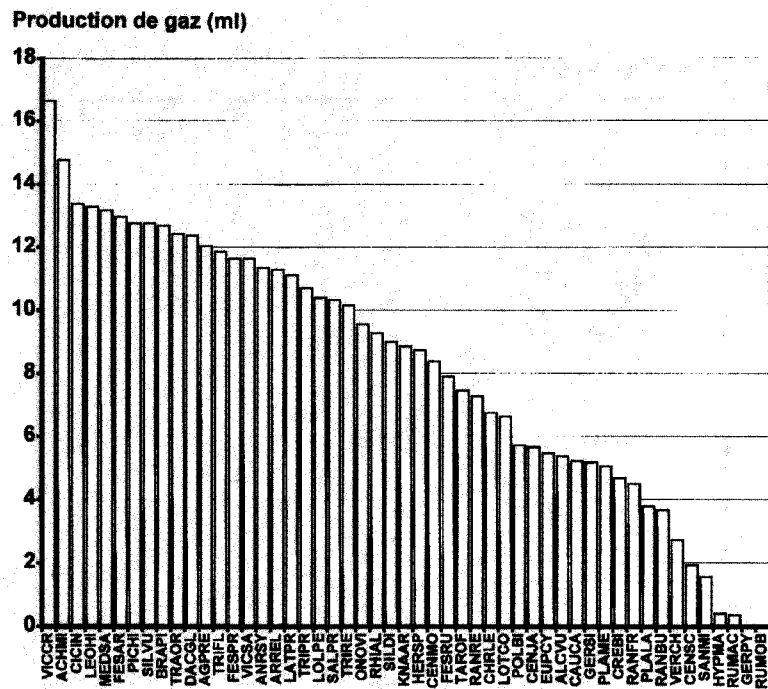
2. Résultats et discussion

■ Espèces végétales

Les tests effectués sur les diverses espèces végétales révèlent des différences importantes, non seulement interspécifiques (figure 3), mais aussi au sein d'une espèce. A l'exception de *Festuca rubra*, **les graminées généralement pauvres en métabolites secondaires exercent une faible inhibition sur la population microbienne** et les différences intraspécifiques sont insignifiantes. **Les différences sont plus importantes chez les légumineuses et parfois très impor-**

FIGURE 3 : Effet des espèces végétales sur l'activité *in vitro* de la population microbienne du jus de rumen (valeurs moyennes de plusieurs échantillons par espèce ; abréviations voir tableau 1)

FIGURE 3 : Influence of different plant species on the activity of rumen fluid microbial population (average values of several samples per species ; for abbreviations see Table 1).



tantes chez les autres plantes, avec des valeurs extrêmes observées chez *Anthriscus sylvestris*, *Centaurea jacea*, *Chrysanthemum leucanthemum*, *Heracleum sphondylium* et *Taraxacum officinale*. La position moyenne de *Lolium perenne* (figure 3) par rapport aux autres graminées est assez surprenante. Cela peut être probablement expliqué par la grande richesse de cette espèce en glucides solubles rapidement fermentescibles. Leur présence stimule la formation d'acide lactique, au détriment des produits gazeux (BEUVINK et SPOELSTRA, 1992 ; VERMOREL, 1995).

■ Substances potentiellement responsables

Les métabolites secondaires ont apparemment une forte influence sur le déroulement du processus de fermentation *in vitro*. Les espèces végétales connues pour leur faible acceptabilité par les ruminants domestiques figurent en queue de classement des espèces étudiées (figure 3). Il s'agit des espèces les plus riches en substances phénoliques et terpéniques, en divers acides organiques toxiques, en alcaloïdes, en glycosides cardiaques et autres substances développant une action antimicrobienne. **Les polymères phénoliques sont les substances dont l'action inhibitrice de la fermentation digestive est la plus importante.** L'indice IANP (Indice d'Action Négative Potentielle, SCHEVOCIC, 1995) est le critère de laboratoire qui exprime l'importance de l'action inhibitrice de l'extrait végétal sur l'hydrolyse enzymatique d'un substrat fibreux. Il explique le mieux ($r = -0,641$; $P < 0,001$) les différences inter- et intra-spécifiques (figure 4). Cela est particulièrement valable pour les espèces riches en polymères phénoliques.

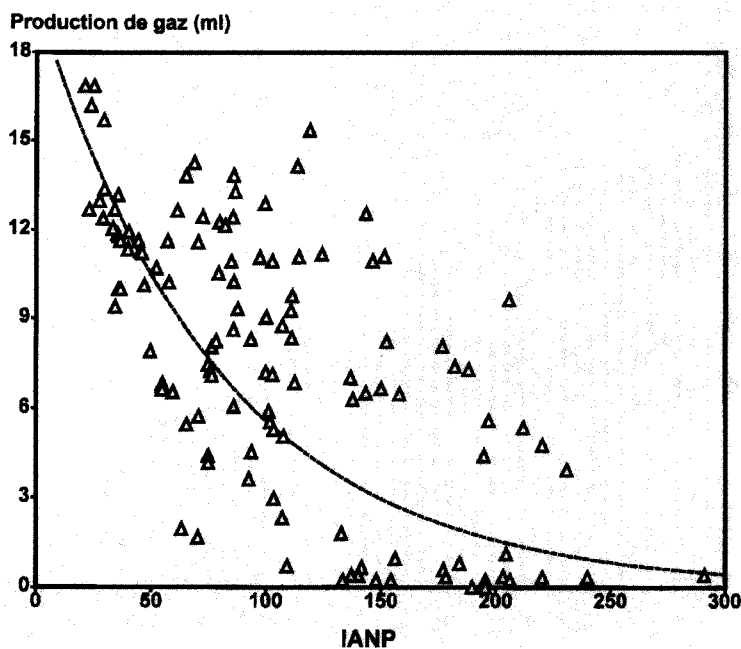


FIGURE 4 : Relation entre l'activité fermentaire et l'indice d'action négative potentielle (IANP) des végétaux étudiés.

FIGURE 4 : Relationship between fermentation activity and index of potential negative action (IANP) of plants studied.

■ Milieu de fermentation

Pour s'assurer que la présence, plus ou moins importante, des glucides solubles dans l'extrait ne masque pas l'action des autres substances, nous avons calculé la production de gaz par unité de concentration glucidique dans l'extrait. Après cette opération, le classement des espèces demeure quasi identique ($r = 0,953$; $P < 0,001$).

Le pH du milieu de fermentation est un facteur d'importance primordiale pour l'évolution qualitative et quantitative des micro-organismes du rumen. Les valeurs de pH observées, en relation négative ($P < 0,001$) avec la production de gaz, sont la conséquence et non la cause des différences entre les espèces. Le pH devient la "cause" lorsque l'extrait végétal affiche une valeur basse ($\text{pH} < 6$) avant fermentation. Le pH de plusieurs lots de jus de rumen utilisés n'affiche que peu de variabilité. Tandis que **le pH des extraits végétaux variait entre 6,5 et 7,6 ; il a été inférieur à 6,0 dans quelques cas exceptionnels**, ce qui avait pour conséquence une production de gaz très faible ou nulle. Cela correspondrait à l'information de REMOND *et al.* (1995) qui signale la diminution de la croissance de la plupart des bactéries entre pH 6,0 et pH 5,0.

■ Autre application du procédé

Nous avons examiné la possibilité d'appliquer le procédé décrit pour étudier l'action de substances isolées d'intérêt spécifique.

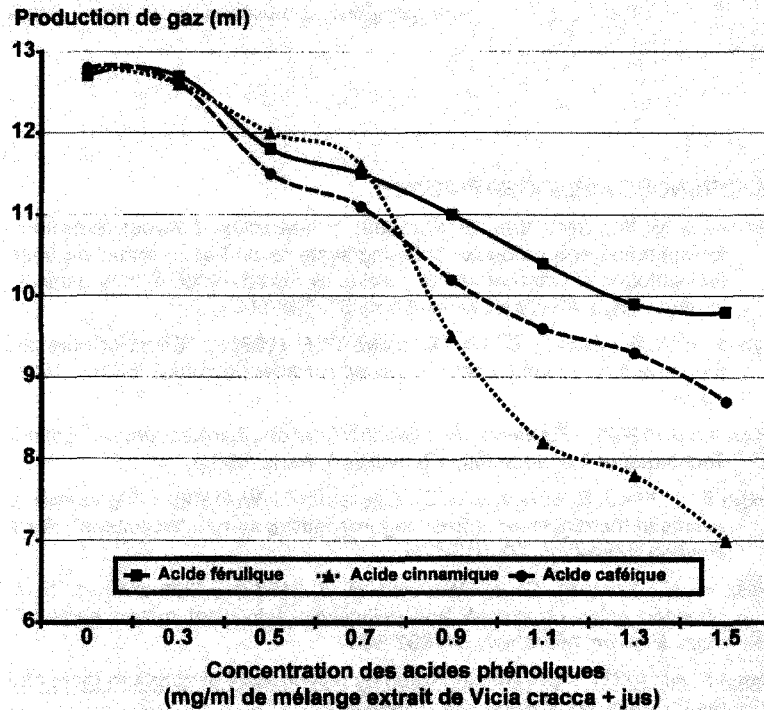


FIGURE 5 : Inhibition de la fermentation microbienne par quelques acides phénoliques présents dans les fourrages.

FIGURE 5 : Inhibition of microbial fermentation by some phenolic acids usually found in forages.

Nous avons testé l'effet d'acides phénoliques, présents dans des végétaux, dont les propriétés antibiotiques sont bien connues (HARTLEY, 1972 ; CHESSON *et al.*, 1982 ; SAWAI *et al.*, 1983 ; JUNG, 1985). Trois acides phénoliques (figure 5), dissous en concentrations croissantes dans de la salive synthétique, ont été mélangés avec l'extrait salivaire de *Vicia cracca* et du jus de rumen. Le classement respectif des acides phénoliques, selon le niveau d'inhibition de l'activité fermentaire, correspond parfaitement à celui obtenu par JUNG (1985) à l'aide d'un procédé beaucoup plus complexe (figure 5).

Conclusions

L'acquis majeur de cette étude est de présenter une nouvelle manière d'aborder le problème de l'appréciation de la qualité des fourrages par les méthodes de laboratoire. Un appareil de mesure simple à réaliser et à utiliser, l'emploi de jus de rumen congelé ainsi que la rapidité et la bonne répétabilité du procédé rendent cette technique facilement applicable, tout en évitant les contraintes souvent associées aux méthodes microbiologiques.

Le but de cette étude n'était pas de définir avec précision les structures chimiques et leurs concentrations nécessaires au déclenchement du processus d'inhibition de la fermentation. La comparaison des espèces végétales permet, d'une part, d'observer l'action de substances bien déterminées dont on connaît la présence dans les végétaux particuliers et, d'autre part, de quantifier l'action négative de certains métabolites secondaires sur l'activité fermentaire du rumen.

Accepté pour publication, le 20 février 1998

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BEUVINK J. M. W., SPOELSTRA S. F. (1992) : "Interaction between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gaz production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms in vitro", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 505-509
- BORNEMAN W. S., AKIN D. E., VAN ESELTINE W. P. (1986) : "Effect of phenolic monomers on ruminal bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, 52 (6), 1331-1339.
- BRUNETON J. (1987) : *Éléments de phytochimie et de pharmacognosie*, Éditeur Technique et Documentation (Lavoisier), Paris, 585 p.
- CHENG K. J., FAY J. P., HOWARTH R. E., COSTERTON J. W. (1980) : "Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 613-625.
- CHESSON A., STEWART C. S., WALLACE R. J. (1982) : "Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 597-603.
- DAIBER K. H. (1975) : "Enzyme inhibition by polyphenols of sorghum grain and malt", *J. Sci. Food Agric.*, 26, 1399-1411.

- HARTLEY R. D. (1972) : "p-Coumaric and ferulic acid components of cell walls of ryegrass and their relationships with lignin and digestibility", *J. Sci. Food Agric.*, 23, 1347-1354.
- JEANGROS B., BERTHER V., SCEHOVIC J. (1994) : "Plantes herbacées dicotylédones : une contribution à la biodiversité des prairies permanentes", *Revue suisse Agric.*, 26 (3) : 151 - 166.
- JUNG H. G. (1985) : "Inhibition of structural carbohydrate fermentation by forage phenolics", *J. Sci. Food Agric.*, 36, 74-80.
- KRISHNAMOORTHY U., STEINGASS H., MENKE K. H. (1991) : "Preliminary observations on the relationship between gas production and microbial protein synthesis in vitro", *Arch. Anim. Nutr.*, Berlin 41 (5), 521-526.
- LAMED R., NAIMARK J., MORGENSTERN E., BAYER E. A. (1987) : "Specialized cell surface structures in cellulolytic bacteria", *J. Bacteriol.*, 169, 3792-3800.
- MCDUGALL E. I. (1948) : "Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva", *Biochem. J.*, 42, 99-109.
- MUELLER-HARVEY I. (1989) : "Identification and importance of polyphenolic compounds in crop residues", *Physico-chemical characterisation of plant residues for industrial and food use*, A. Chesson, E. R. Orskow Eds. Elsevier Applied Science, NY, USA, 88-107.
- REMOND B., BRUGERE H., PONCET C., BAUMONT R. (1995) : "Le contenu du reticulo-rumen", *Nutrition des ruminants domestiques*, Éditeurs Jarrige, Ruckebusch, Demarquilly, Farce, Journet, INRA, Paris, 253-298.
- SAWAI A., KONDO T., ARA S. (1983) : "Inhibitory effects of phenolic acids esters on degradability of forage fibers", *J. Jpn. Grassl. Sci.*, 29, 175-179.
- SCEHOVIC J. (1990) : "Tanins et autres polymères phénoliques dans les plantes de prairie : détermination de leur teneur et de leur activité biologique", *Revue suisse Agric.*, 22 (3), 179-184.
- SCEHOVIC J. (1995) : "Étude de l'effet de diverses espèces de plantes des prairies permanentes sur l'hydrolyse enzymatique des constituants pariétaux", *Ann. Zootech.*, 44, 87-96.
- SCEHOVIC J. (1997) : "Effet in vitro de diverses plantes de prairies permanentes sur la population microbienne du rumen", *Revue suisse Agric.*, 29 (2), 91-96.
- STACK R. J., COTTA M. A. (1986) : "Effect of 3-phenylpropanoic acid on growth and cellulose utilisation by cellulolytic ruminal bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 209-210.
- SWAIN T. (1977) : "Secondary compounds as protective agents", *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 28, 479-501.
- VAN SOEST P.J., MOORE L.A. (1966) : "New chemical methods for analysis of forages for the purpose of predicting nutritive value", *Proc. 9th Intern. Grassl. Congr. Sao Paulo (Brasil)*, 783-789.
- VAREL V. H., JUNG H. G. (1986) : "Influence of forage phenolics on ruminal fibrolytic bacteria and in vitro fibres degradation", *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 275-280.
- VERMOREL M. (1995) : "Productions gazeuses et thermiques résultant des fermentations digestives", *Nutrition des ruminants domestiques*, Éditeurs Jarrige, Ruckebusch, Demarquilly, Farce, Journet ; INRA, Paris, 650-670.
- WAGNER H., BLADT S., ZGAINSKI E. M. (1984) : *Plant drug analysis*, Éditeur Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 320 p.

SUMMARY

In vitro measurement of rumen microbial activity in the presence of extracts from natural grassland species.

Due to the general acceptance of Van Soest's concept based on the assumption that the plant cellular content (or soluble fraction) is 98% digestible, the importance of this fraction is considered only quantitatively. Its qualitative aspect is rather neglected. The plant cellular content may contain some of the plant defensive compounds (secondary plant metabolites) of which the inhibitory potential on the microbial population of the rumen fluid was investigated.

One hundred and twenty samples corresponding to 51 natural-grassland species were collected separately. The choice of species was based on both their agronomic interest and their secondary metabolite composition. The rumen fluid was obtained from rumen fistulated lactating cows, immediately frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at a temperature of -80°C . The plant extract was obtained by maceration of plant material in McDougall's artificial saliva (20h at 45°C) under anaerobic conditions. In order to prevent an important dilution of potentially active plant principles in artificial saliva, the sample/solvent ratio (2,5 g in 35 ml of saliva) was close to the rumen solid/fluid phase ratio. The plant extract mixed with strained rumen fluid (ratio : 4 + 1), rapidly thawed in a 39°C water bath, was carried out in an anaerobic fermentation apparatus and incubated at 39°C in a ventilated incubator. A simple fermentation apparatus which may be assembled in any laboratory was developed. It works on the principle that the gas produced during microbial fermentation is accumulated in the upper part of a graduated tube. The reading of the gas production volume was done after 150 minutes of incubation. The natural grassland species known for their poor palatability appear at the end of the observed species classification. These species are rich in secondary metabolites with anti microbial properties (phenolic and terpenoid compounds, toxic organic acids, alkaloids, cardiac glycosides and others).