

Digestibilité de la matière organique: comparaison de valeurs mesurées *in vitro* et *in vivo*

Jesse Pacheco A.¹, Audrey Pittet², Silvia Ampuero Kragten¹ et Yves Arrigo¹

¹Agroscope Posieux, Suisse, ²HAFL Zollikofen, Suisse

Renseignements: Yves Arrigo, e-mail: yves.arrigo@agroscope.admin.ch



Introduction du jus de panse dans le flacon contenant les sachets et les substances tampons sous ambiance CO₂. (Photo: Agroscope)

Introduction

Il est crucial de connaître la digestibilité de la matière organique (dMO) pour répondre aux besoins énergétiques du ruminant. En effet, la dMO est hautement corrélée avec l'énergie brute de l'aliment. La dMO apparente *in vivo*, obtenue par des essais de digestibilité avec des béliers castrés, reste la référence (Chenost 1970; Arrigo

et al. 2002). Cependant, les déterminations *in vivo* étant exigeantes et onéreuses, des solutions *in vitro* sont développées pour augmenter le nombre de déterminations et obtenir rapidement des résultats sans recourir aux essais avec des animaux. Parmi les différentes méthodes de laboratoire existantes (microbiologiques, enzymatiques ou chimiques; Schübiger 2001), les méthodes microbiologiques, mettant en œuvre la microfaune du rumen, offrent incontestablement les dMO *in vitro* les plus corrélées avec les dMO *in vivo* (Aufrère 1982; Geisert *et al.* 2007).

Pour garantir une bonne fiabilité des dMO obtenues par une méthode *in vitro*, il est indispensable d'optimiser les facteurs pouvant influencer le processus de digestion. Notamment la durée de l'incubation, la masse du substrat et le nombre de répétitions requises par la méthode (Yang 2017). L'étude présentée ici s'est focalisée sur la méthode *in vitro* d'Ankom développée pour l'incubateur Daisy[®]. Une série d'échantillons de différents types de fourrages, avec des références de dMO obtenues *in vivo*, ont été testés.

Animaux, matériel et méthode

La digestibilité *in vivo* des échantillons de la collection a été mesurée entre 1976 et 2014, sur quatre béliers castrés adultes de race Tête brune (type Oxford). Les béliers étaient alimentés de façon rationnée à raison de 0,380 MJ énergie métabolisable par kg^{0,75} × 1,1. Une teneur minimale en matière azotée (MA) de 110 g/kg matière sèche (MS) de la ration était assurée par un apport de tourteau de soja. Les moutons ont été habitués à leur fourrage 21 jours avant la période de bilan de huit jours. Les 275 échantillons de fourrages de la collection étaient conservés sous forme moulue à 1 mm dans des bocaux en verre entreposés à l'abri de la lumière, dans un local tempéré sec non climatisé. Fin 2016, l'ensemble de la collection a été analysé par spectroscopie en réflectance diffuse dans le proche infrarouge (NIRS) (Ampuero Kragten et Wyss 2014) avec un spectromètre FT-NIR

(NIRFlex N-500 de Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suisse) afin d'évaluer l'état de conservation par rapport à la composition chimique initiale.

Pour la mise en œuvre de la méthode *in vitro*, 20 échantillons d'herbe (sur 75), 20 échantillons de foin (sur 135), 20 d'ensilage d'herbe (sur 25) et 20 d'ensilage de maïs (sur 40) ont été choisis en fonction de leur teneur en MA, soit pour chaque fourrage, les cinq échantillons avec les teneurs en MA les plus élevées respectivement les plus faibles, ainsi que dix avec des teneurs intermédiaires.

Les mesures *in vitro* ont été réalisées avec l'incubateur Ankom Daisy^{II} (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA), selon la méthodologie du fabricant (Ankom Invitro 2017). Quatre flacons ont été maintenus à 39 °C en rotation continue, pour garantir une immersion permanente des fourrages ensachés dans une solution ruminale. Chaque flacon pouvait recevoir 25 sachets thermo-scellés (F57 Ankom Technology Corp, taille de 4,3 cm × 4,8 cm, taille des pores de 25 μ, composés de fibres artificielles), le liquide tampon (pH=6,8; Ankom Invitro 2017) et du jus de panse de bovin sous barbotage de CO₂ et agitation pendant toute la durée de la manipulation (Mebirouk-Boudechiche *et al.* 2015).

Le jus de panse a été prélevé sur des vaches fistulées en lactation, immédiatement avant la mise en route de l'incubateur. Le régime alimentaire des vaches était constant lors de tout l'exercice. Après leur incubation, les sachets ont été rincés, séchés et calcinés pour en déterminer la MS et les cendres (Ankom Invitro 2017).

Préalablement aux mesures avec l'appareil Ankom Daisy^{II}, la masse de fourrage mise dans les sachets (0,25 vs 0,50 g), la durée de l'incubation (6 vs 48 h), et le nombre d'animaux donneurs de jus de panse (1 vs 2 vaches) ont été testés avec du foin et de l'ensilage d'herbe.

Résultats

Tous les échantillons de la collection ont fait l'objet d'analyses par NIRS en décembre 2016. Les résultats af-

Résumé ■ Agroscope a comparé la digestibilité de la matière organique (dMO) mesurée *in vivo* et *in vitro*. Dans un essai réalisé en 2017 à Agroscope Posieux, la dMO de différents fourrages a été déterminée *in vitro* avec un incubateur. Les résultats ont été comparés avec ceux obtenus précédemment *in vivo* sur les mêmes échantillons, de 1976 à 2014, et conservés depuis. Les mesures ont été faites sur des échantillons d'herbe, d'ensilage d'herbe, de foin et d'ensilage de maïs (20 échantillons par fourrage). La méthode *in vitro* a été réalisée avec l'incubateur Daisy^{II} d'Ankom (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA). La comparaison des deux méthodes a montré un coefficient de détermination (R²) de 0,660 pour l'herbe, de 0,929 pour l'ensilage d'herbe, de 0,863 pour le foin et de 0,413 seulement pour le maïs. Le coefficient de détermination de l'ensemble des échantillons, à l'exclusion de ceux antérieurs à 1990, passe de 0,723 à 0,730. Les différences entre les dMO *in vitro* et *in vivo* se situaient entre 2,5 à -3,0 points de pourcentage pour le foin, l'herbe et l'ensilage de maïs et +4,0 points de pourcentage pour l'ensilage d'herbe. La méthode *in vitro* offre de bonnes perspectives pour prédire la digestibilité de la matière organique de l'herbe et de ses conserves, spécialement pour constituer des bases de données afin d'établir des modèles de prédiction de dMO par spectroscopie dans le proche infrarouge.

La dMO a été calculée avec les équations suivantes:

$$dMO_{in\ vivo} (\%) = [(MO_{ingérée} - MO_{excrétee}) / MO_{ingérée}] \times 100$$

$$\text{avec tourteau de soja} = [(MO_{ingérée} - MO_{excrétee} - MOD_{t\ soja}) / (MO_{ingérée} - MO_{t\ soja})] \times 100$$

$$dMO_{in\ vitro} (\%) = [1 - (MO_{après_in_vitro} / MO_{avant_in_vitro})] \times 100$$

où MO matière organique, MOD matière organique digestible,

MO = masse_{échantillon_sec} - CE_{échantillon_sec}, avec CE_{après_in_vitro} déterminé par calcination et CE_{avant_in_vitro} déterminé par NIRS

fichés dans le tableau 1 montrent que les teneurs analysées par NIRS (matière azotée: MA; cellulose brute: CB; lignocellulose: ADF; parois: NDF) concordent bien avec les valeurs issues d'analyses chimiques conventionnelles ($r \geq 0,82$), à l'exception de la MA dans l'ensilage de maïs. Cela laisse supposer que les échantillons d'herbe et ses conserves ne sont pas dégradés et peuvent être utilisés comme références (fig. 1). La MA du maïs par NIRS montre probablement une altération au fil du temps (fig. 2).

Résultats des essais *in vitro* préliminaires

Le temps d'incubation des sachets a un effet déterminant sur les résultats. La masse du fourrage mis dans les sachets joue également un rôle. Ces deux facteurs ont une influence sur la dMO (n:6, $p < 0,05$; fig. 3). La dMO déterminée avec le jus de panse de deux vaches ne se distingue pas statistiquement de celle obtenue avec le jus d'une seule vache. Sur la base de ces résultats et pour garantir une bonne répétabilité des mesures, nous avons opté pour 0,250 g de matériel par sachet, d'une incubation de 48 heures dans un mélange de jus de panse provenant de deux vaches (~50/50 %).

Par ailleurs, la détermination de la dMO dans les 20 échantillons d'ensilage d'herbe avec le jus de panse de trois paires différentes de vaches donne un r de respectivement 0,941, 0,902 et 0,942. La moyenne des trois répétitions permet de réduire l'incertitude causée par la composition microbienne propre à chaque jus de panse. L'influence du jus de panse se traduit aussi par une pente différente pour chaque répétition (fig. 4). Les résultats sont donnés par la suite sous la forme de moyenne de trois répétitions.

Résultats dMO *in vivo* vs *in vitro*

Les quatre types de fourrage obtenaient des dMO *in vivo* moyennes oscillant entre 67 et 75 %. Les plus grands écarts (dMO_{min} à dMO_{max}) ont été observés dans le foin (49,3 % à 82,7 %) et les plus faibles dans l'herbe (65,6 à 85,1 %).

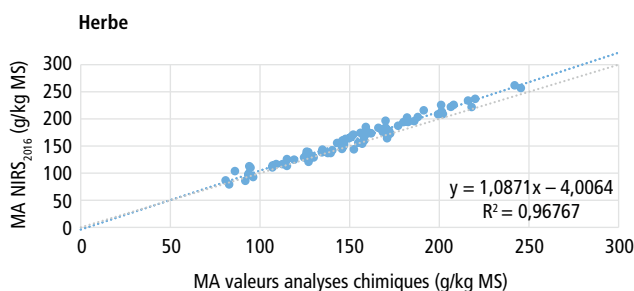


Figure 1 | Teneurs en matière azotée de l'herbe analysées chimiquement vs par NIRS en 2016.

Tableau 1 | Teneurs issues d'analyses chimiques conventionnelles vs teneurs obtenues par NIRS et coefficients de détermination de la collection dMO *in vivo* d'Agroscope (g/kg MS).

	n	MA an. chim.	MA NIRS ₂₀₁₆	R ²	Années
Herbe	74	151 ± 39	161 ± 42	0,961	1984–2001
Ensilage herbe	24	158 ± 38	154 ± 33	0,939	1991–2002
Foin	135	120 ± 41	121 ± 45	0,931	1986–2004
Ensilage maïs	38	83 ± 4	82 ± 4	0,132	1984–1995

	n	CB an. chim.	CB NIRS ₂₀₁₆	R ²
Herbe	74	239 ± 54	251 ± 46	0,925
Ensilage herbe	24	260 ± 54	245 ± 62	0,984
Foin	135	281 ± 61	281 ± 53	0,935
Ensilage maïs	39	212 ± 43	226 ± 48	0,811

	n	ADF an. chim.	ADF NIRS ₂₀₁₆	R ²
Herbe	74	272 ± 53	290 ± 44	0,885
Ensilage herbe	24	285 ± 64	308 ± 59	0,900
Foin	135	326 ± 66	323 ± 55	0,937
Ensilage maïs	39	243 ± 50	252 ± 54	0,795

	n	NDF an. chim.	NDF NIRS ₂₀₁₆	R ²
Herbe	75	424 ± 98	464 ± 93	0,868
Ensilage herbe	24	411 ± 97	444 ± 101	0,959
Foin	135	509 ± 98	512 ± 95	0,953
Ensilage maïs	39	471 ± 66	459 ± 59	0,670

MA: matière azotée; CB: cellulose brute; ADF: lignocellulose; NDF: parois.
R² coefficient de détermination.
an. chim.: analyse chimique.

Les valeurs obtenues avec la méthode *in vitro* Ankom pour l'herbe et ses conserves sont bien corrélées avec les dMO *in vivo* (tabl. 2, fig. 5). Les résultats de trois échantillons de seigle en vert, de fétuque des prés (3^e cycle) et de mélange standard 108 (2^e coupe) ont donné lieu à un R² plus faible pour l'herbe fraîche que pour les conserves d'herbe. Ces fourrages avaient été conservés par congé-

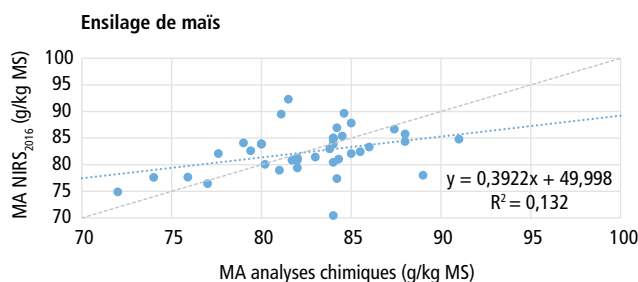


Figure 2 | Teneurs en matière azotée des ensilages de maïs analysées chimiquement vs analysées par NIRS en 2016.

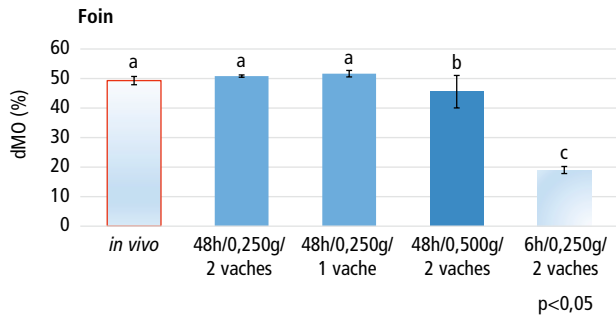


Figure 3 | Digestibilité de la matière organique *in vitro* en fonction de la masse incubée, du temps d'incubation et du nombre de vaches donneuses.

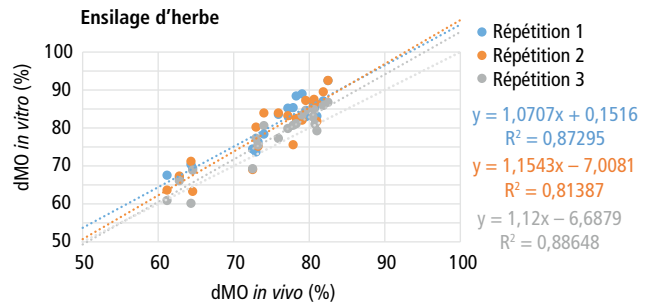
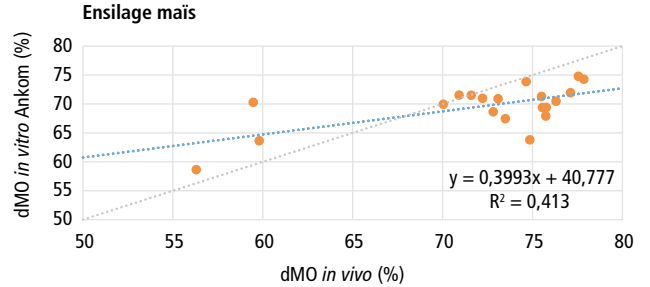
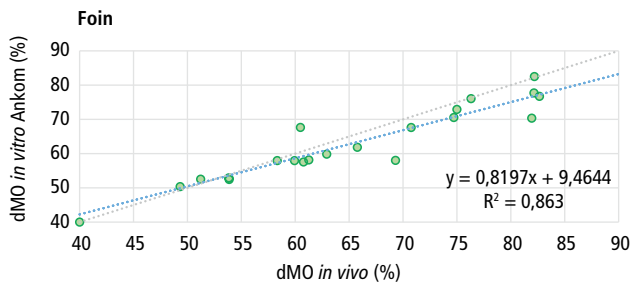
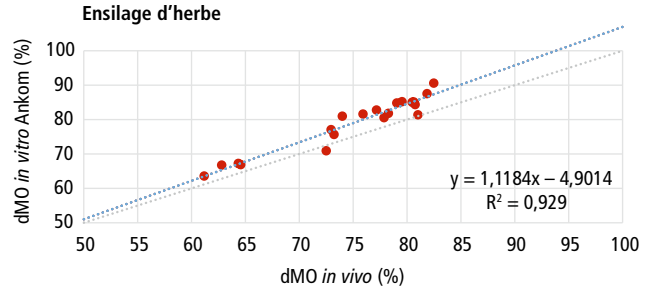
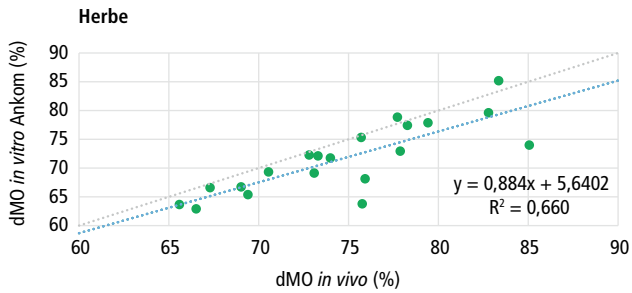


Figure 4 | Influence du jus de panse sur la digestibilité *in vitro*.



Figures 5 | Digestibilité de la matière organique *in vivo* vs *in vitro* (en %).

Tableau 2 | Digestibilité de la matière organique (en %) et R² *in vivo* – *in vitro*

	n	dMO <i>in vivo</i>	dMO <i>in vitro</i>	R ²	n. 1990+ ¹	R ²
Herbe	20	74,7 ± 5,6	71,7 ± 6,1	0,660	11	0,685
Ensilage d'herbe	20	75,0 ± 6,8	79,0 ± 7,9	0,929	20	0,929
Foin	20	66,6 ± 11,0	64,1 ± 9,8	0,863	14	0,887
Ensilage de maïs	20	72,0 ± 6,2	69,5 ± 3,9	0,413	12	0,194

dMO: digestibilité de la matière organique; R²: coefficient de détermination.
11990+: échantillons considérés depuis 1990.

lation pour les essais *in vivo*. L'ensilage de maïs n'obtient qu'un coefficient R^2 de 0,413. La méthode *in vitro* a tendance à sous-estimer la dMO (-2,5 à -3,0 points de pourcentage) excepté pour l'ensilage d'herbe (+4,0 points %).

Sur l'ensemble des échantillons, en excluant ceux antérieurs à 1990, le coefficient de corrélation passe de 0,723 à 0,730.

Discussions

La méthode *in vitro* Ankom est assez simple d'utilisation, mais l'équipement Daisy^{II} requiert une meilleure isolation thermique pour maintenir la température de l'incubateur. Pour cela, il est impératif de le mettre en fonction 24h avant l'emploi.

Le type de fourrage joue un rôle sur la précision et la dispersion des résultats. L'herbe et ses conserves offrent de meilleures approches de la dMO *in vivo* que le maïs. Les valeurs NIRS₂₀₁₆ des échantillons de maïs se distinguaient déjà des valeurs originales analysées chimiquement, ce qui pourrait expliquer la faible concordance avec les dMO *in vivo*. Ces échantillons ont pu évoluer, notamment les nutriments sensibles comme l'amidon. D'autre part, l'homogénéité d'un échantillon de maïs est délicate du fait des teneurs différentes des épis, tige ou feuilles rencontrées sur une même plante.

Les valeurs dMO *in vivo* légèrement supérieures pourraient s'expliquer par le fait que, durant l'essai, la faune microbienne du rumen était mieux adaptée à la ration et que son besoin en azote était assuré par un apport de tourteau de soja. Dans la méthode *in vitro*, l'échantillon est incubé dans du jus de panse dont la

microfaune n'est pas forcément en adéquation avec l'échantillon à déterminer, ce qui peut entraîner une moins bonne digestion. Pour obtenir des mesures comparables, il est impératif d'opter pour une alimentation standardisée (à définir) des animaux donneurs de jus de panse. Par ailleurs, la taille des pores des sachets Ankom F57 de 25 μm ne permet pas le passage de tous les microorganismes (protozoaires ciliés 20–150 μm) ce qui pourrait être aussi un facteur réducteur des dMO obtenues.

Conclusions

- Pour déterminer la dMO *in vitro* avec la méthodologie Ankom, il est nécessaire de respecter les points suivants:
 - la masse de l'échantillon (0,250g),
 - le temps d'incubation (48h),
 - l'utilisation de jus de panse provenant de deux vaches
 - la réalisation de trois répétitions,
 - tout comme il est important d'utiliser du jus de panse provenant de vaches alimentées avec une ration standardisée.
- Si la méthode offre de bonnes perspectives pour prédire la dMO de l'herbe et de ses conserves, elle n'a pas confirmé, dans le cadre de cette étude, la validité de la prédiction pour l'ensilage de maïs.
- Ce type de méthode *in vitro* de détermination de la dMO offre la possibilité de créer des bases de données pour l'herbe et ses conserves afin d'établir des modèles de prédiction de la dMO avec la spectroscopie dans le proche infrarouge (NIRS). ■

Riassunto

Digeribilità della sostanza organica determinata *in vivo* e *in vitro* con l'incubatore Ankom Daisy[®]

Un paragone tra la digeribilità *in vivo* e *in vitro* è stato realizzato su campioni di foraggio verde, insilato d'erba, fieno e insilato di mais (n=20 per foraggio) in cui la digeribilità della sostanza organica (dSO) *in vivo* era stata determinata precedentemente presso Agroscope a Posieux dal 1976 al 2014, la dSO è stata successivamente determinata *in vitro* con un metodo sviluppato da Ankom (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA). Dal confronto tra i due metodi, è risultato un coefficiente di determinazione (R^2) di 0,660 per i foraggi verdi, di 0,929 per gli insilati d'erba, di 0,863 per il fieno e di 0,413 per gli insilati di mais. Il coefficiente di determinazione della totalità dei campioni è di 0.723, mentre, escludendo i campioni raccolti prima del 1990, esso sale a 0.730. Le differenze tra i dSO *in vitro* e *in vivo* si sono attestate tra -2,5 e -3,0 punti percentuali per il fieno, il foraggio verde e l'insilato di mais e a +4,0 punti percentuali per l'insilato d'erba. Il metodo *in vitro* offre un'alternativa valida per valutare la digeribilità della sostanza organica del foraggio verde e delle conserve di foraggio grezzo. Può anche essere utilizzato per creare banche dati a costi ridotti per lo sviluppo di modelli di stima dSO mediante spettroscopia nel vicino infrarosso.

Summary

In vivo and *in vitro* organic matter digestibility determined with the Ankom Daisy[®] Incubator

A comparison of organic matter digestibility (OMd) determined *in vivo* and *in vitro* was conducted with samples of grass, grass silage, hay, and maize silage (n=20 per feed) from the Agroscope Posieux collection. The *in vitro* method was carried out with the Ankom «Daisy[®]» Incubator (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA). The coefficients of determination (R^2) were 0.660, 0.929 and 0.863 for grass, grass silage and hay, respectively. For maize silage a R^2 of OMD of 0.413 was obtained. The overall R^2 , excluding the samples before 1990, went from 0.723 to 0.730. Differences between the *in vitro* and *in vivo* OMD ranged from -2.5 to -3.0 %-points for hay, grass and maize silage, and stood at +4.0 %-points for grass silage. The tested *in vitro* method offers good prospects for predicting the organic matter digestibility of fresh and conserved herbage, especially for setting up a database for OMD prediction models by near-infrared spectroscopy.

Key words: digestability, *in vivo*, *in vitro*, organic matter.

Bibliographie

- Ankom Invitro, 2017. In vitro true digestibility using the DAISY incubator. Accès: http://www.ankom.com/media/documents/IVDMD_0805_D200.pdf. https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_3_Invitro_D200_D200I.pdf
- Ampuero Kragten S., Wyss U., 2014. Les fourrages à la lumière du proche infrarouge. *Recherche Agronomique Suisse* 5 (5), 204–211.
- Arrigo Y., Daccord R., Schubiger F. X., Lehmann J., Jeangros B. & Scehovic J., 2002. Comparaison de méthodes pour estimer la digestibilité de la matière organique des fourrages. *Schriftenreihe aus dem Institut für Nutztierwissenschaften der ETH Zürich* (23), 83–84.
- Aufrère J., 1982. Etude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique. *Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences* 31 (2), 111–130.
- Chenost M., 1970. Utilisation de la technique de digestibilité *in vitro* pour prévoir la valeur alimentaire des fourrages. *Ann Zootech.* 19 (3), 243–253.
- Geisert B. G., Klopfenstein T. J., Adams D. C. & MacDonald J. C., 2007. Comparison of *in vivo* digestibility to *in vitro* digestibility of five forages fed to steers. *Nebraska Beef Cattle Reports* 95, 109–111.
- Mebirouk-Boudechiche L., Abidi S., Cherif M., Bouzouraa I., 2015. Digestibilité *in vitro* et cinétique de fermentation des feuilles de cinq arbustes fourragers du nord-est algérien. *Revue Méd. Vét.* 166 (11–12), 350–359.
- Schubiger F. X., 2001. Valeur nutritive des plantes de prairie. 5: Digestibilité de la matière organique. *Revue suisse d'Agriculture* 33 (6), 275–279.
- Yang W. Z., 2017. Factors Affecting Rumen Fermentation Using Batch Culture Technique. *Fermentation Processes*, Dr. Angela Jozala (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/64207. Accès: <https://www.intechopen.com/books/fermentation-processes/factors-affecting-rumen-fermentation-using-batch-culture-technique>