ANALYSE DES CONSTITUANTS GLUCIDIQUES DES PLANTES FOURRAGÈRES

II. — LA LIGNOCELLULOSE : COMPOSITION, DOSAGE ET COMPARAISON AVEC LA CELLULOSE BRUTE

R. JARRIGE

Avec la collaboration technique de Janine JUNG,
Christiane LE GALLO et Marie-Thérèse BEAUFORT

*Station de Recherches sur l'Élevage,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise).*

SOMMAIRE

La lignocellulose est le résidu de l'hydrolyse par $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 5 p. 100 (3 heures sous reflux) du fourrage préalablement traité par l'eau, puis par le mélange alcool benzène (2 : 1). Les résultats rapportés ici permettent de préciser la composition de cette lignocellulose, de simplifier son dosage et de comparer la lignocellulose à la cellulose brute du point de vue biochimique.

La lignocellulose a une composition significativement différente dans les feuilles et dans les tiges, dans les graminées et dans les légumineuses. On peut admettre que les lignocelluloses des graminées contiennent, en moyenne, approximativement 70 p. 100 de cellulose, 20 p. 100 de lignine brute et 5-10 p. 100 de matières azotées, et celles des légumineuses 60 p. 100 de cellulose, 25 p. 100 de lignine brute et 10-15 p. 100 de matières azotées. Par rapport à la cellulose brute, la lignocellulose présente l'avantage de contenir la totalité de la lignine et l'inconvénient d'avoir une teneur plus élevée et variable en matières azotées et en constituants indéterminés.

On peut considérer la lignocellulose comme une estimation par excès de la somme cellulose + lignine, et la cellulose brute comme une estimation par excès de la cellulose vraie. Toutes deux présentent une liaison étroite avec la somme cellulose + lignine et avec les membranes totales (hémicelluloses + cellulose + lignine), mais la lignocellulose permet d'estimer ces deux paramètres avec une erreur moindre.

Ces avantages sur le plan biochimique et, probablement, sur le plan analytique, ne suffisent pas pour qu'on puisse déjà envisager de remplacer le dosage de la cellulose brute par celui de la lignocellulose. Il faut encore que la lignocellulose permette de rendre compte plus fidèlement que la cellulose brute des variations de la valeur alimentaire des fourrages.

Dans l'étude précédente sur le fractionnement des membranes, nous avons montré que l'hydrolyse par $\text{SO}_2 \text{H}_4$ 5 p. 100, pendant 3 heures, du fourrage préalablement soumis à une extraction aqueuse et à un dégraissage, laissait un résidu con-

tenant la totalité de la cellulose et de la lignine (JARRIGE, 1961). Ce résidu, nommé lignocellulose, paraissait présenter sur la cellulose brute classique l'avantage d'avoir une teneur en lignine beaucoup plus constante.

Avant d'envisager cependant de substituer la lignocellulose à la cellulose brute, il faut (a) mieux définir sa composition et son dosage, et (b) montrer qu'elle est supérieure à la cellulose brute au point de vue biochimique, analytique et nutritionnel.

Les données rapportées ici permettent de préciser le premier point et de comparer la lignocellulose et la cellulose brute sur le plan biochimique, en tant que critères de la teneur des différents constituants de la membrane.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Fourrages.

Les résultats rapportés ici ont été obtenus au cours de trois études.

a) une étude sur la composition des membranes des feuilles et des tiges (et des gaines dans le cas des graminées) des principales espèces fourragères. La luzerne et le trèfle violet ont été prélevés à différents stades des différents cycles, et les graminées, principalement ray grass, dactyle et fétuque, à différents stades du premier cycle seulement.

Tous ces échantillons (114 au total) ont été préparés aussitôt après le prélèvement de la plante, et séchés à l'étuve à 70°C à ventilation forcée.

b) une étude sur la digestibilité des membranes de 20 échantillons de ray grass S 24 et 21 échantillons de dactyle S 37, prélevés à différents stades au cours du 1^{er} cycle (12 et 13 échantillons respectivement), et ensuite tous les mois (5 échantillons) ou tous les deux mois (3 échantillons). Les fourrages ont été récoltés et immédiatement congelés au Grassland Research Institute de Hurley, où leur digestibilité a été mesurée (MINSON et al, 1960). Les échantillons qui nous ont été aimablement transmis ont été prélevés au cours de ces mesures et séchés à l'étuve à 70°C.

c) une étude sur la composition des foin de montagne; nous avons choisi 14 échantillons de premières coupes, récoltés entre 900 et 1 100 m d'altitude dans le Cantal, le Puy de Dôme, la Haute Savoie et les Hautes Alpes.

Nous pensons avoir ainsi un échantillon très large couvrant les principaux types de fourrages, des plus riches aux plus pauvres, à l'exception des ensilages qui mériteraient d'ailleurs une étude spéciale.

Méthodes d'analyse.

1^o La méthode d'analyse suivie pour obtenir et hydrolyser la lignocellulose a été précédemment exposée (JARRIGE, 1961).

Le fourrage broyé a été d'abord traité par l'eau au bain marie à 40°C (2 ou 3 extractions), séché à l'étuve à 70°C, puis dégraissé au Soxhlet par le mélange alcool-benzène (2 : 1) pendant 16 heures. Des fractions aliquotes (300 à 600 mg) du résidu membranaire ainsi obtenu ont été hydrolysées dans les Erlenmeyers par SO_4H^2 5 p. 100 (P/V; 20 cm³ par 100 mg de résidu) pendant 3 heures, sous reflux, au bain de paraffine à 120°. L'hydrolysate a été filtré sur un Buchner garni d'une rondelle tarée de papier filtre sans cendres; le résidu lavé plusieurs fois, séché à l'acétone et déshydraté à l'étuve à 70°C, est la lignocellulose non déminéralisée.

Il a été pesé, séparé du papier filtre et transféré dans un petit becher de 30 cm³, où il a été hydrolysé par SO_4H^2 72 p. 100 (P/P; 2 cm³ par 100 mg de résidu) à la température de la pièce pendant 4 heures. L'hydrolysate a été transféré dans un Erlenmeyer, étendu par 23 volumes d'eau distillée, et maintenu à l'ébullition sous reflux au bain de paraffine pendant 3 heures. L'hydrolysate a été filtré comme le précédent; le résidu lavé, séché à l'acétone puis à l'étuve à 100°C, a été calciné au four à 550°C, pendant 3 heures; la perte de poids à la calcination correspond à la lignine brute que nous n'avons pas corrigée pour sa teneur en résidus azotés.

Le pouvoir réducteur de l'hydrolysate a été mesuré par la méthode iodométrique de SOMOGYI (1952). Multiplié par 0,9, il fournit une estimation de la teneur en cellulose que nous avons précédemment discutée; cette cellulose contient en moyenne 95 p. 100 de glucosane et 5 p. 100 de xylane.

Dans ce schéma de fractionnement de la membrane, nous avons hydrolysé pour chaque échantillon, 3 prises de résidu membranaire et les 3 lignocelluloses correspondantes, et nous n'avons donc pas mesuré la teneur en cendres de la lignocellulose. Lorsque l'intérêt de la lignocellulose est apparu, nous en avons préparé une 4^e, dont nous avons déterminé la teneur en cendres. Dans l'exposé des résultats, nous distinguerons donc deux catégories d'échantillons: ceux dont on a déterminé seulement la lignocellulose non déminéralisée, et ceux dont on a déterminé également la lignocellulose (sous-entendu déminéralisée).

2° Par rapport à ce schéma d'analyse, pris comme base de référence, nous avons étudié sur un certain nombre d'échantillons, l'influence de traitements préliminaires différents : extraction alcoolique suivie ou non d'une extraction aqueuse, suppression de l'extraction aqueuse, intensité du dégraissage. Les techniques correspondantes seront exposées en même temps que les résultats.

3° Dans une dernière partie, la lignocellulose a été comparée à la cellulose brute de Weende. Celle-ci a été déterminée au Laboratoire d'essai et d'analyse des aliments, suivant la technique officielle dans laquelle le résidu est récupéré par centrifugation et non par filtration.

RÉSULTATS

Composition de la lignocellulose.

Les teneurs moyennes en cellulose, lignine brute et cellulose + lignine brute des lignocelluloses, ont été calculées pour chaque type d'échantillons. Elles sont données avec leurs écarts types dans le tableau 1 pour les lignocelluloses non déminéralisées (169 échantillons) et dans le tableau 2 pour les lignocelluloses déminéralisées (73 échantillons).

TABLEAU I

Composition de la lignocellulose non déminéralisée.

	Nombre d'échantillons	Composition de la lignocellulose non déminéralisée		
		Cellulose %	Lignine brute %	Cellulose + Lignine brute %
Limbes de graminées	16	61,7 ± 1,15	18,4 ± 1,08	80,1 ± 1,25
Gaines de graminées	16	69,6 ± 0,70	15,7 ± 0,39	85,3 ± 0,73
Tiges de graminées	14	70,9 ± 0,69	19,9 ± 0,79	90,8 ± 0,67
Inflorescences de graminées	8	60,2 ± 1,21	23,2 ± 1,53	83,4 ± 0,47
Feuilles de luzerne	15	50,8 ± 0,92	29,0 ± 0,79	79,8 ± 1,31
Tiges de luzerne	15	64,3 ± 0,83	23,9 ± 0,54	88,2 ± 1,05
Feuilles de trèfle violet...	4	46,2 ± 1,78	30,1 ± 1,07	76,3 ± 1,41
Tiges de trèfle violet	4	64,3 ± 0,72	19,3 ± 1,32	83,7 ± 1,28
Trèfle blanc	7	55,3 ± 1,46	26,2 ± 0,65	81,5 ± 1,22
Limbes de choux	5	60,0 ± 2,00	24,9 ± 0,77	84,9 ± 1,45
Tiges (+ pétioles) de choux	5	73,0 ± 1,38	16,8 ± 1,17	89,8 ± 0,76
Choux entiers	5	69,5 ± 0,79	19,6 ± 0,40	89,1 ± 0,96
Ray grass anglais S 24 ..	20	68,1 ± 0,60	16,9 ± 0,57	85,0 ± 0,88
Dactyle S 37	21	65,2 ± 0,96	19,9 ± 0,57	85,1 ± 0,92
Foins de pré	14	59,6 ± 0,88	24,7 ± 0,67	84,3 ± 0,69

La teneur en cendres de la lignocellulose non déminéralisée (tab. 2) est relativement faible, de l'ordre de 2 p. 100 pour les feuilles, de 1 p. 100 pour les tiges de légumineuses, et de 5 p. 100 pour les graminées entières ; chez ces dernières elle a cependant présenté des valeurs plus élevées dans les repousses d'automne (7 à 8 p. 100). Ces variations n'ayant qu'une incidence très limitée, on peut généraliser à la lignocellulose (déminéralisée) les conclusions obtenues pour la lignocellulose non déminéralisée, sur un plus grand nombre d'échantillons.

TABLEAU 2

Composition de la lignocellulose déminéralisée.

	Nombre échan- tillons	Teneur en cendres de la lignocellulose non déminéralisée g/o	Composition de la lignocellulose déminéralisée		
			Cellulose g/o	Lignine brute g/o	Cellulose + lignine g/o
Ray grass anglais ...	12	4,4 ± 0,75	71,1 ± 0,70	18,8 ± 0,42	89,9 ± 0,79
Dactyle	12	4,8 ± 0,55	68,1 ± 0,95	21,1 ± 1,03	89,3 ± 1,08
Foins de pré.....	14	3,9 ± 1,24	62,1 ± 0,93	25,6 ± 0,64	87,7 ± 0,58
Trèfle blanc.....	7	2,5 ± 0,75	56,5 ± 1,34	26,9 ± 0,92	83,4 ± 0,99
Feuilles de trèfle violet	4	1,7 ± 0,53	57,1 ± 2,08	30,6 ± 0,98	77,7 ± 1,79
Tiges de trèfle violet.	4	1,0 ± 0,29	64,9 ± 0,90	19,5 ± 1,29	84,4 ± 1,28
Feuilles de luzerne ..	10	2,1 ± 0,47	51,1 ± 0,64	27,9 ± 0,59	79,0 ± 0,87
Tiges de luzerne	10	0,8 ± 0,04	65,2 ± 0,92	23,5 ± 0,51	88,7 ± 0,93

La lignocellulose a une composition relativement constante pour un organe donné, feuilles ou tiges, d'une famille botanique donnée, comme le montrent les faibles écarts types des moyennes. Par contre, cette composition varie avec l'organe, la famille et le stade de croissance de la plante.

Chez les légumineuses, la lignocellulose des feuilles contient systématiquement moins de cellulose et plus d'indéterminé et de lignine brute que celle des tiges. Cette dernière anomalie est due au fait que la lignine brute des feuilles de légumineuses est anormalement élevée (5-6 p. 100 de la matière sèche) parce qu'elle contient une proportion très importante de matières azotées résiduelles (30 à 40 p. 100) et d'autres constituants cytoplasmiques et, peut-être, cuticulaires (JOURNET et JARRIGE, résultats non publiés). En admettant que la lignine vraie ne représente que la moitié de la lignine brute que nous avons dosée dans les feuilles de légumineuses, la lignocellulose de celles-ci ne contient plus alors qu'environ 15 p. 100 de lignine vraie mais 35 p. 100 d'indéterminé. Nous n'avons malheureusement pas dosé directement la teneur en matières azotées de ces lignocelluloses, mais nous pouvons l'estimer à 20-25 p. 100 d'après les dosages séparés de l'azote des hydrolysats sulfuriques (JARRIGE, 1961) et des lignines de quelques échantillons.

Chez les graminées, la lignocellulose des limbes est également moins riche en cellulose et plus riche en indéterminé que celle des tiges, mais elle a une teneur en lignine du même ordre. Cette lignine est en effet beaucoup moins « contaminée » que celle des légumineuses en matières azotées et surtout en constituants indéterminés. La lignocellulose des feuilles de légumineuses est donc nettement plus riche en lignine brute et plus pauvre en cellulose que celle des limbes de graminées. Il en est de même dans le cas des tiges, mais les différences entre les deux familles sont moins accentuées.

Par contre, pour un organe donné ou à stade de croissance équivalent pour la plante entière, la composition de la lignocellulose apparaît très semblable entre espèces de la même famille. C'est ce que montrent notamment les comparaisons entre le trèfle violet et la luzerne, d'une part, entre le ray grass anglais et le dac-

tyl d'autre part. Cependant, la lignocellulose du dactyle est significativement plus riche en lignine ($P < 0,01$) que celle du ray grass et plus pauvre en cellulose ($P < 0,05$).

La composition de la lignocellulose de la plante entière dépend de la proportion respective des feuilles et des tiges, et varie donc au cours du développement. La proportion de cellulose augmente et la proportion d'indéterminé diminue lorsque la proportion des tiges augmente au cours des différents cycles chez les légumineuses et du 1^{er} cycle chez les graminées (graph. 1).

La lignocellulose des fourrages mixtes doit avoir une composition variable avec le stade de développement et la proportion des différentes familles botaniques. C'est notamment le cas des foin de prairies permanentes (tab. 1 et 2), où les variations

GRAPH. 1. — Évolution de la composition de la lignocellulose (non déminéralisée) au cours du 1^{er} cycle de croissance.

ont été cependant considérablement atténuées par le fait que ces foin étaient en majeure partie constitués de tiges.

Lorsqu'on reporte la composition de la lignocellulose en fonction de la teneur en lignocellulose dans le fourrage, on constate une évolution générale que schématise le graphique 2, dans le cas des organes de graminées et de légumineuses. Plus les fourrages sont riches en lignocellulose, plus leur lignocellulose est riche en cellulose et pauvre en indéterminé.

Influence des traitements préliminaires sur le dosage de la lignocellulose.

Les lignocelluloses étudiées jusqu'ici ont été obtenues à partir du fourrage préalablement traité par l'eau, puis dégraissé par le mélange alcool-benzène. Le traitement aqueux permet d'extraire la totalité des glucides et une fraction importante

des autres constituants cytoplasmiques, notamment des matières azotées. Cependant on peut être amené à utiliser des traitements différents, plus spécialement :

a) à faire une première extraction par l'alcool 80 p. 100. Ce traitement est en effet nécessaire pour séparer chez les graminées les sucres des fructosanes, lesquels sont ensuite extraits par l'eau. Par rapport à l'extraction aqueuse, il présente en outre l'avantage d'être plus adaptable à la série et d'extraire une partie des matières

GRAPH. 2. — Composition de la lignocellulose en fonction de la teneur en lignocellulose.

cellulose		lignine brute		indéterminé
F L	Feuilles de luzerne	L G	Limbes de graminées		
F T	Feuilles de trèfle violet	G G	Gainés de graminées		
T b	Trèfle blanc	T G	Tiges de graminées		
T T	Tiges de trèfle violet	T L	Tiges de luzerne		

grasses. Enfin, la quantité de matière sèche extraite par l'alcool est un critère intéressant du stade de croissance de la plante et probablement de sa digestibilité (JARRIGE, résultats non publiés).

b) à supprimer l'extraction aqueuse pour ne conserver que le dégraissage. Cette simplification permettrait de doser la lignocellulose de façon plus rapide et en plus grande série, lorsqu'on ne veut pas doser simultanément les différentes fractions glucidiques.

Nous avons donc étudié l'influence de ces différents traitements sur le dosage de la lignocellulose, par rapport à la méthode de référence comportant extraction aqueuse et dégraissage.

Influence d'une extraction alcoolique préliminaire.

1. Sur 54 échantillons (tab. 3), nous avons comparé les lignocelluloses déminéralisées obtenues après extraction alcoolique, à celles obtenues après extraction aqueuse et dégraissage.

L'extraction alcoolique a été réalisée par macération du fourrage pendant 18 heures à la température de la pièce, méthode qui donne des résultats du même ordre que l'extraction au Waring Blendor (JARRIGE, résultats non publiés). Des fractions aliquotes du résidu alcoolique séché à l'étuve à 70°C ont été soumises directement (sans dégraissage), à l'hydrolyse par $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 5 p. 100, dans les conditions précédemment exposées.

TABLEAU 3

*Influence des extractions préliminaires sur la teneur en lignocellulose :
comparaison entre une extraction par l'alcool 80 p. cent et une extraction aqueuse
suivie d'un dégraissage.*

Échantillons		Lignocellulose (déminéralisée)	
Nature	Nombre	Échantillons traités par l'alcool 80 %	Échantillons traités par l'eau puis dégraissés
Feuilles de légumineuses	8	15,9*	18,6
Tiges de légumineuses	8	32,1*	34,3
Trèfle blanc	7	22,6	25,6
Ray grass anglais	12	28,2*	29,6
Dactyle	12	30,6*	32,0
Foins de pré	7	36,2	35,8
Ensemble des échantillons	54	27,8**	29,5

* Différences significatives $P < 0,05$.

** Différences significatives $P < 0,01$.

Les lignocelluloses obtenues après extraction alcoolique ont été presque toujours plus faibles que celles obtenues après extraction aqueuse et dégraissage (tab. 3). Les différences ont été hautement significatives ($P < 0,01$) pour l'ensemble des 54 échantillons (en moyenne 1,7 point) et significatives ($P < 0,05$) pour les ray grass anglais, les dactyles, les feuilles et les tiges de légumineuses ; elles ont été maximum pour les légumineuses, relativement limitées pour les graminées et pratiquement nulles pour les foins de pré.

Les deux séries de lignocelluloses d'une partie des échantillons (36) ont été hydrolysées pour déterminer la cellulose et la lignine brute. Les résultats reportés au graphique 3 montrent que le traitement alcoolique a entraîné une augmentation hautement significative ($P < 0,01$) de la lignine (0,75 point) et une diminution hautement significative ($P < 0,01$) de la cellulose (1,9 point). Cette diminution de la cellulose a été proportionnellement beaucoup plus forte pour les feuilles que pour les tiges, pour les légumineuses que pour les graminées, et maximum pour les feuilles de trèfle violet. Elle a rendu compte approximativement de la diminution de la lignocellulose.

GRAPH. 3. — Influence du mode d'extraction préliminaire sur les teneurs en cellulose et en lignine brute.

GRAPH. 4. — Influence de la durée du dégraissage sur la quantité de matière sèche extraite (moyenne de 6 échantillons).

● — Rythme rapide
○ — Rythme lent.

Le dosage des sucres après séparation chromatographique (cf. JARRIGE, 1961) a montré que cette diminution portait essentiellement sur la fraction glucosane et non sur les xylanes résiduels, et qu'une partie de ce glucose était recouverte dans la fraction hémicelluloses. Ce recouvrement a été particulièrement net pour les feuilles et tiges de trèfle, qui ont justement présenté la diminution la plus importante de la cellulose. La quantité supplémentaire de glucose recouverte dans la fraction hémicelluloses a cependant été beaucoup plus faible que la quantité de glucose manquant dans la fraction cellulose, d'autant plus qu'une partie a pu provenir des substances pectiques qui ne sont pas extraites par l'alcool.

Le recouvrement plus faible de la cellulose dans les fourrages traités seulement par l'alcool par rapport à ceux traités par l'eau et dégraissés, pourrait s'expliquer essentiellement par une hydrolyse partielle et une destruction partielle au cours de l'hydrolyse par $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 5 p. 100 ; de plus, il n'est pas impossible qu'une autre partie de la cellulose soit transformée au point de n'être plus hydrolysée en glucose par $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 72 p. 100. Nous avons en effet remarqué que les résidus de l'extraction alcoolique se mouillaient difficilement et avaient tendance à « mousser » au cours de l'hydrolyse 5 p. 100, malgré la présence d'alcool octylique ou de silicone et le lavage des parois avec de petites quantités de liquide. Des particules de fourrages demeuraient donc fréquemment collées aux parois de l'Erlenmeyer et pouvaient y être détruites. Les lignocelluloses étaient souvent compactes après dessiccation, et difficiles à disperser dans $\text{SO}_4 \text{H}_2$ 72 p. 100, ce qui pouvait gêner une attaque complète de la cellulose.

Cette diminution de la mouillabilité et cette formation de mousse ont dû jouer un rôle prépondérant et ont été effectivement les plus élevées pour les feuilles de légumineuses, lesquelles ont systématiquement présenté le recouvrement le plus incomplet de la cellulose. Comme ces difficultés sont caractéristiques des fourrages traités seulement par l'alcool 80 p. 100 et n'apparaissent pas pour les fourrages traités par l'eau et dégraissés, on peut les attribuer :

- soit au traitement alcoolique lui-même,
- soit à l'absence du traitement aqueux qui aurait extrait des produits moussants, tels que les saponines et une partie des substances pectiques, dont les légumineuses sont particulièrement riches,
- soit à l'absence du dégraissage par le mélange alcool-benzène,
- soit à l'action combinée de plusieurs de ces facteurs.

2. Pour mesurer l'importance de ces différentes possibilités, nous avons soumis des fractions des résidus alcooliques soit à une extraction aqueuse, soit au dégraissage, soit aux deux traitements successivement, ces traitements étant identiques à ceux effectués directement sur le fourrage. Les lignocelluloses ont été dosées sur les trois résidus ainsi obtenus, de telle sorte que nous avons pu comparer au total les lignocelluloses obtenues après cinq traitements préliminaires différents à partir de 11 échantillons (tab. 4).

Les lignocelluloses obtenues après les nouveaux traitements ont été plus élevées que celles obtenues directement à partir du résidu alcoolique, mais plus faibles que les lignocelluloses de référence, obtenues après extraction aqueuse et dégraissage. Sur la base de 100 pour celles-ci, les valeurs moyennes ont été de 91,5 – 93,1 – 96,4 et 95,9 pour les lignocelluloses obtenues respectivement après alcool seul, alcool + eau, alcool et dégraissage, alcool, eau et dégraissage. L'augmentation du dégraissage a été nettement plus élevée que celle due à l'extraction aqueuse.

TABLEAU 4

*Influence des extractions préliminaires sur la teneur en lignocellulose :
comparaison entre 5 modalités.*

Traitements → Échantillons ↓	Alcool	Alcool Dégraissage	Alcool Eau	Alcool Eau Dégraissage	Eau Dégraissage
Tiges de luzerne	44,8	42,7	43,0	43,1	45,6
Tiges de luzerne	32,7	33,1	32,5	33,5	34,5
Tiges de trèfle violet	22,2		24,6	23,9	26,1
Tiges de trèfle violet	34,6	35,6	36,8	36,1	37,8
Feuilles de luzerne	16,2	17,2	15,8	16,3	18,0
Feuilles de trèfle violet ..	14,7	17,6	15,0	16,9	17,9
Limbes de trèfle blanc ..	14,5	17,6	14,5		18,5
Ray grass anglais	27,0	28,5	27,7	28,5	29,0
Ray grass anglais	33,0	34,4	33,7	34,9	35,2
Dactyle	26,0	28,4	27,8	28,7	29,8
Dactyle	37,8	39,5	37,5	38,6	39,3

Comme précédemment, les variations doivent s'expliquer en majeure partie par les variations de la teneur en cellulose, tout au moins dans les échantillons de feuilles et de tiges de trèfles dont nous avons dosé la cellulose obtenue après les 5 traitements (tab. 5). Le dégraissage du résidu alcoolique, avec ou sans extraction aqueuse

TABLEAU 5

Influence des extractions préliminaires sur la teneur en cellulose des trèfles.

Traitements → Échantillons ↓	Alcool	Alcool Dégraissage	Alcool Eau	Alcool Eau Dégraissage	Eau Dégraissage
Tiges de trèfle violet	11,7		15,6	15,8	16,4
Tiges de trèfle violet	21,5	24,3	24,4	24,1	24,4
Feuilles de trèfle violet ..	5,4	8,1	6,4	8,1	8,7
Limbes de trèfle blanc ..	6,0	7,7	6,5		9,1

intermédiaire, a permis d'obtenir une teneur en cellulose nettement plus élevée que la cellulose-alcool, très semblable à la cellulose obtenue après extraction aqueuse et dégraissage dans les tiges, mais plus faible que celle-ci dans les feuilles.

Il semble donc que le fait que la « lignocellulose-alcool » soit plus faible que la « lignocellulose eau-dégraissage » est dû :

— pour une part importante à l'absence du dégraissage, lequel a extrait environ 2,5 p. 100 de la matière sèche initiale dans les résidus alcooliques et 2 p. 100 dans les résidus alcool-eau ;

— pour une faible part, à l'absence d'extraction aqueuse qui ne doit jouer qu'un

rôle très limité, comme le confirmera plus loin l'étude sur la suppression de l'extraction aqueuse ;

— pour une part importante au traitement alcoolique lui-même dont le mode d'action demeure à préciser.

Réduction des traitements préliminaires au seul dégraissage.

Si la lignocellulose s'avère être un critère intéressant de la valeur nutritive du fourrage, elle doit être déterminée de façon aussi rapide et économique que possible dans les laboratoires de contrôle. Pour cela, il faudrait pouvoir supprimer l'extraction aqueuse, et n'effectuer qu'un simple dégraissage, comme c'est le cas pour la détermination de la cellulose brute et de la « normal acid fibre » (WALKER et HEP-

TABLEAU 6

Influence des extractions préliminaires sur la teneur en lignocellulose : comparaison entre un dégraissage seul et une extraction aqueuse suivie d'un dégraissage analyse de la variance.

	Nombre de degrés de liberté	Somme des carrés	Carrés moyens
Variation totale	95	1 974,2	20,78
Variation entre échantillons	15	1 829,6	121,97 ⁽¹⁾
Variation entre méthodes	1	6,9	6,90
Interaction méthode-échantillon ...	15	20,3	1,35
Variation résiduelle	64	117,4	1,83

(¹) Différence significative $P < 0,01$.

BURN, 1955 a). Il est donc nécessaire (a) de vérifier que la suppression de l'extraction aqueuse ne modifie pas la teneur en lignocellulose et (b) de préciser les conditions du dégraissage.

1. *Influence de la suppression de l'extraction aqueuse.* — Nous avons comparé les teneurs en lignocellulose (déminalisée) obtenues à partir du fourrage simplement dégraissé, à celles obtenues à partir du fourrage traité par l'eau et dégraissé (cf. Méthodes). Dans les deux cas, le dégraissage a été effectué par le mélange alcool-benzène (2 : 1) au Soxhlet pendant 16 heures. Cette comparaison a porté sur 16 échantillons de plantes entières, représentant les principaux types de fourrages : 3 foin de pré, 2 foin de luzerne, 2 trèfle blanc, 4 dactyles et 5 ray grass, prélevés à différents stades de développement (de 23 à 39 p. 100 de lignocellulose).

Les déterminations de la lignocellulose ont été effectuées en triple (sur 600 mg de résidu) et tous les résultats utilisés dans l'analyse de la variance (tab. 6). Celle-ci montre qu'il n'y a pas eu d'interaction entre les méthodes et les échantillons, et que les deux méthodes n'ont pas donné de résultats significativement différents. Les valeurs moyennes pour les 16 échantillons ont été de :

— avec extraction aqueuse : 31,71,

— sans extraction aqueuse : 31,55,

et l'écart maximum de 1,9 point dans le cas d'un ray grass.

On peut donc déterminer la lignocellulose après un simple dégraissage, sans extraction aqueuse préalable ; corrélativement, on peut extrapoler aux lignocelluloses ainsi obtenues, les résultats obtenus au cours du fractionnement des constituants glucidiques, notamment les relations entre le coefficient de digestibilité et la teneur en lignocellulose.

2. *Influence de l'intensité du dégraissage.* — Le dégraissage demeurant le seul traitement préliminaire dans la détermination de la lignocellulose, il est important d'en préciser les conditions. Dans toutes les déterminations rapportées jusqu'ici, nous avons dégraissé les échantillons au Soxhlet pendant 16 heures, à un rythme d'environ un siphonnage toutes les 30-40 minutes, ce rythme n'étant d'ailleurs pas contrôlé avec précision. La durée de 16 heures avait été choisie parce qu'elle était préconisée par l'A.O.A.C. pour le dosage de la cellulose brute, et qu'elle correspond à la moyenne de celles adoptées pour le dosage de la lignine : de 1 heure à 30 heures (cf.

TABLEAU 7

Influence des extractions préliminaires sur la teneur en lignocellulose : comparaison entre un dégraissage de 4 heures et un dégraissage de 32 heures.

	Quantité de matière sèche extraite par le dégraissage		Lignocellulose	
	4 heures	32 heures	4 heures	32 heures
Foin de luzerne	6,2	12,2	38,3	38,0
Foin de pré	7,5	15,6	32,0	31,8
Foin de pré	5,5	10,9	36,6	35,7
Ray grass	9,4	14,5	24,3	24,3
Dactyle	7,1	14,5	33,3	33,2
Trèfle blanc	11,4	19,3	25,8	23,0
Trèfle blanc	8,4	13,9	33,4	32,3

THOMAS et ARMSTRONG, 1949 — MOON et ABOU RAYA, 1952) ; ces durées de dégraissage ont d'ailleurs souvent été fixées sans études suffisantes et sans préciser la vitesse de siphonnage.

Sur 6 échantillons de plantes entières (tab. 7) nous avons comparé 4 durées de dégraissage, 4, 8, 16 et 32 heures, et 2 rythmes de siphonnage : un toutes les 25 minutes et un toutes les 50 minutes. Ces dégraissages ont été faits au Soxhlet, chacun sur 2 prises de 5 g de fourrage et la quantité de matière sèche extraite a été déterminée par différence.

Pour chaque fourrage, la quantité de matière sèche extraite a augmenté avec la durée du dégraissage suivant une loi curvilinéaire (graph. 4) : sur la base 100 pour une durée de 16 heures, elle a été approximativement de 60 p. 100 pour 4 heures, 80 p. 100 pour 8 heures et 120 p. 100 pour 32 heures. Pour une durée donnée, elle a été plus élevée avec le rythme de siphonnage rapide mais la différence a été relativement faible, même pour une durée de 4 heures. Dans les conditions de nos mesures, le rythme de siphonnage n'a donc eu qu'une influence très limitée, beaucoup plus faible que celle observée par MOON et ABOU RAYA (1952), avec des rythmes plus rapides.

Il s'agissait de savoir si ces différences dans la quantité de matière sèche extraite avec l'intensité du dégraissage, avaient une influence sur la teneur en lignocellulose. Nous avons donc déterminé les lignocelluloses correspondant aux durées extrêmes de dégraissage (4 heures et 32 heures) ; pour chacune de ces durées les 4 résidus (2 lents et 2 rapides) ont été mélangés et les lignocelluloses déterminées sur 3 prises de 600 mg.

Malgré les grandes différences dans la quantité de matière sèche extraite par le dégraissage, en gros du simple au double, les teneurs en lignocelluloses (tab. 7) n'apparaissent pas significativement différentes d'après l'analyse de la variance de toutes les données. Il semble donc que, dans les limites étudiées, la durée et l'intensité du dégraissage n'aient eu qu'une influence très limitée sur la détermination de la lignocellulose ; il est possible cependant que cette influence puisse être significative à l'échelle d'un plus grand nombre d'échantillons, de trèfles notamment puisqu'ils sont riches en constituants extractibles au dégraissage.

Un dégraissage de 8 heures paraît être le plus avantageux ; il permet d'extraire 30 p. 100 de matière sèche de plus qu'un dégraissage de 4 heures et de ne pas contrôler de façon très précise le rythme des siphonnages (environ un toutes les 30 minutes) ; enfin, il est réalisable en une journée au lieu de deux, dans la méthode adoptée jusqu'ici. Cette durée est d'ailleurs celle qui a été adoptée dans la détermination de la « normal acid fibre » (WALKER et HEPBURN, 1955 a). De toute façon, le dégraissage est nécessaire : en son absence les échantillons se mouillent mal et les résultats sont moins reproductibles et plus élevés (RAYMOND et al, 1955 — Mc DOUGALL, 1958).

Le dosage de la lignocellulose se réduit donc maintenant à un dégraissage de 8 heures par le mélange alcool-benzène, suivi d'une hydrolyse de 3 heures par l'acide sulfurique 5 p. 100 ou normal. Il ne diffère donc de celui de la « normal acid fibre » que par la durée d'hydrolyse (trois fois plus longue).

Comparaison entre la lignocellulose et la cellulose brute.

La lignocellulose et la cellulose brute sont deux résidus comparables. La lignocellulose est une estimation par excès de la somme cellulose + lignine ; la cellulose brute est plutôt un critère de cette somme puisqu'elle contient la quasi totalité de la cellulose et une fraction variable de la lignine (cf. discussion). De plus, toutes deux peuvent être considérées comme des critères de la cellulose, de la lignine et de l'ensemble des membranes. Il s'agit de savoir quelle est celle qui rend compte avec le plus de fidélité des variations de ces différents paramètres membranaires, puisque ces derniers déterminent dans une large mesure la digestibilité du fourrage.

Pour examiner ce problème, nous avons déterminé la cellulose brute de 58 échantillons de feuilles et de tiges, et de 75 échantillons de plantes entières (tab. 8) choisis parmi ceux dont nous avons étudié la lignocellulose. Ces derniers constituent un échantillonnage très représentatif des différents stades de croissance pour le ray grass anglais, le dactyle, la luzerne et les trèfles ; par contre, les foin représentent uniquement des premières coupes et ont une amplitude de variation beaucoup plus étroite, malgré leurs provenances très diverses et leurs dates de récolte sensiblement différentes. Il faut noter que la composition des plantes entières de luzerne et de trèfle violet n'a pas été déterminée directement, mais calculée à partir de la composition et de la proportion respective des feuilles et des tiges.

Pour chacune des 5 catégories de plantes entières et pour l'ensemble des graminées, l'ensemble des légumineuses et l'ensemble des échantillons, nous avons calculé (tab. 9) les équations de régression entre chacun des deux critères, lignocellulose et

GRAPH. 5. — Droites de régression entre les teneurs en lignocellulose et cellulose brute et la teneur en membranes (Somme hemicelluloses + cellulose + lignine brute).

F Foins de pré
R Ray grass anglais
D Dactyle
L Luzerne
T Trèfles

cellulose brute, et chacun des paramètres membranaires : cellulose, lignine, somme cellulose + lignine et membranes ; ces dernières ont été estimées par la somme hémicelluloses + cellulose + lignine. Nous n'avons pas fait ces calculs pour les feuilles et les tiges en raison du faible nombre d'échantillons de chaque catégorie, et de la distribution non normale de l'ensemble. Nous avons par contre calculé pour chacune des catégories, les rapports lignocellulose/cellulose + lignine et cellulose brute/cel-

lulose + lignine (tab. 8) ; ils nous permettent d'interpréter les variations des coefficients de régression des plantes entières.

Relation avec les membranes totales et avec la somme cellulose + lignine.

Pour chacune des 4 espèces et des 2 familles étudiées (tab 9), la lignocellulose et la cellulose brute présentent toutes deux des liaisons extrêmement étroites ($r > 0,95$) avec les membranes totales et avec la somme cellulose + lignine ; les liaisons sont sensiblement moins étroites pour les foins de pré et pour l'ensemble des échantillons (graph. 6 et 7).

TABLEAU 8

Rapport entre la cellulose brute ou la lignocellulose et la somme cellulose + lignine.

	Nombre échantillons	Rapport Cellulose brute	Rapport Lignocellulose
		Cellulose + lignine	Cellulose + lignine
<i>Plantes entières :</i>			
Foins de pré.....	14	97,8 $\pm$ 1,34	114,1 $\pm$ 0,78
Ray grass anglais.....	20	98,5 $\pm$ 0,72	113,5 $\pm$ 1,11
Dactyle.....	20	96,2 $\pm$ 1,23	112,2 $\pm$ 1,01
Luzerne ⁽¹⁾	10	108,5 $\pm$ 1,61	115,5 $\pm$ 1,46
Trèfle violet ⁽¹⁾	4	96,1 $\pm$ 4,74	121,6 $\pm$ 2,08
Trèfle blanc.....	7	84,8 $\pm$ 1,56	119,7 $\pm$ 1,42
Ensemble des échantillons.....	75	97,7 $\pm$ 0,85	114,5 $\pm$ 0,57
<i>Feuilles et tiges :</i>			
Limbes de graminées.....	8	92,4 $\pm$ 1,89	121,0 ⁽¹⁾
Gaines de graminées.....	6	104,4 $\pm$ 2,68	116,6 ⁽¹⁾
Tiges de graminées.....	6	98,9 $\pm$ 2,31	108,7 ⁽¹⁾
Feuille de luzerne.....	10	92,7 $\pm$ 0,97	126,6 $\pm$ 1,39
Tiges de luzerne.....	10	112,8 $\pm$ 1,11	112,7 $\pm$ 1,22
Feuilles de trèfle violet.....	4	74,9 $\pm$ 1,32	129,0 $\pm$ 3,00
Tiges de trèfle violet.....	4	104,7 $\pm$ 3,83	118,5 $\pm$ 1,84
Limbes de choux.....	5	94,0 $\pm$ 3,05	117,9 ⁽¹⁾
Tiges (+ pétioles) de choux.....	5	112,1 $\pm$ 2,57	111,3 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Lignocelluloses non déminéralisées

Les coefficients de régression sont toujours plus élevés pour la cellulose brute que pour la lignocellulose. Ces différences en général significatives, surtout chez les légumineuses ($P < 0,01$), s'expliquent par le fait que l'augmentation des constituants membranaires traduit essentiellement l'augmentation de la proportion de tiges. Or, le rapport de la cellulose brute aux membranes ou à la somme cellulose + lignine (tab. 8) est beaucoup plus élevé pour les tiges que pour les feuilles et augmente donc avec la proportion de tiges. Au contraire, le rapport de la lignocellulose aux membranes ou à la somme cellulose + lignine est sensiblement plus élevé pour les feuilles que pour les tiges, en raison de leur plus forte teneur en indéterminé ; il a donc tendance à diminuer quand la proportion de tiges augmente.

La dispersion des valeurs autour de la droite de régression a été estimée par le carré moyen des écarts (tab. 9) qui est une mesure de l'erreur commise en estimant le paramètre à l'aide de la régression. La lignocellulose permet d'estimer les membranes

totales et la somme cellulose + lignine, avec une erreur systématiquement plus faible que la cellulose brute ; ces différences sont notamment très significatives ($P < 0,01$) pour les légumineuses et, plus encore, pour l'ensemble des 75 échantillons.

Les graphiques 5 6 et 7 illustrent bien ces différences de dispersion aussi bien pour les valeurs individuelles que pour les droites de régression intra catégories.

GRAPH. 6. — *Liaison entre la teneur en lignocellulose et la somme cellulose + lignine brute.*

- Foins de pré
- Ray grass anglais
- Dactyles
- Luzernes
- ▲ Trèfles

C'est ainsi que, pour une valeur donnée des membranes ou de la somme cellulose + lignine, les valeurs de la cellulose brute sont nettement plus élevées pour les luzernes et les légumineuses que pour les graminées. Cela traduit probablement le fait que la cellulose brute des luzernes contient une proportion beaucoup plus élevée de la lignine totale que celle des graminées (cf. discussion) ; elle est même supérieure à la somme cellulose + lignine dans les tiges (tab. 8). De même, les rapports cellulose brute/somme cellulose + lignine sont beaucoup plus variables que les rapports lignocellulose/somme cellulose + lignine : $97,7 \pm 0,85$ et $114,5 \pm 0,57$ pour l'ensemble des 75 échantillons (tab. 8).

Relations avec la cellulose et avec la lignine.

La lignocellulose et la cellulose brute présentent toutes deux des liaisons extrêmement étroites avec la cellulose pour chacune des espèces ou des familles étudiées

($r > 0,95$) et pour l'ensemble des échantillons ($r = 0,908$ et $0,919$) et un peu moins étroites pour les foins de pré (tab. 9).

Comme précédemment, les coefficients de régression sont plus élevés pour la cellulose brute que pour la lignocellulose. Ces différences sont significatives pour l'ensemble des graminées et les luzernes ($P < 0,05$) et hautement significatives pour l'ensemble des légumineuses et des échantillons ($P < 0,01$). Elles tiennent également

TABLEAU 9
Liaisons entre lignocellulose et cellulose brute et les différents paramètres membranaires

r = coefficient de corrélation b = constante de la droite de régression ; d = carré moyen des écarts par rapport à la droite de régression. Différences significatives : $P < 0,05$ (*) $P < 0,01$ (**).

	Nombre	Membranes		Cellulose + Lignine		Cellulose		Lignine	
		Lignocellulose	Cellulose	Lignocellulose	Cellulose brute	Lignocellulose	Cellulose brute	Lignocellulose	Cellulose brute
Foins de pré ...	14	$r = 0,919$	$r = 0,834$	$r = 0,910$	$r = 0,844$	$r = 0,742$	$r = 0,827$	$r = 0,425$	$r = 0,121$
		$b = 0,63$	$b = 0,85$	$b = 0,88$	$b = 1,22$	$b = 0,75$	$b = 1,25$	$b = 0,83$	$b = 0,36$
		$a = + 5,18$	$a = - 10,69$	$a = + 8,23$	$a = - 7,61$	$a = + 19,25$	$a = + 2,97$	$a = + 28,41$	$a = + 27,66$
		$d = 0,70^{**}$	$d = 2,93$	$d = 0,91^*$	$d = 2,60$	$d = 4,30$	$d = 2,67$	$d = 12,03$	$d = 16,74$
Ray grass anglais.	20	$r = 0,967$	$r = 0,957$	$r = 0,950$	$r = 0,977$	$r = 0,963$	$r = 0,963$	$r = 0,878$	$r = 0,906$
		$b = 0,59$	$b = 0,66$	$b = 0,88$	$b = 1,02$	$b = 1,31$	$b = 1,48$	$b = 2,40$	$b = 2,80$
		$a = + 3,83$	$a = - 2,78$	$a = + 6,53$	$a = - 0,80$	$a = + 2,24$	$a = - 4,90$	$a = + 16,57$	$a = + 10,87$
		$d = 1,06$	$d = 1,43$	$d = 1,35$	$d = 0,69$	$d = 0,93$	$d = 1,47$	$d = 18,73$	$d = 9,63$
Dactyle	20	$r = 0,961$	$r = 0,988$	$r = 0,998$	$r = 0,973$	$r = 0,986$	$r = 0,964$	$r = 0,791$	$r = 0,857$
		$b = 0,65^*$	$b = 0,79$	$b = 0,93^*$	$b = 1,08$	$b = 1,15$	$b = 1,34$	$b = 2,79$	$b = 3,59$
		$a = + 2,06$	$a = - 8,57$	$a = + 5,32$	$a = - 3,35$	$a = + 6,73$	$a = - 1,90$	$a = + 13,09$	$a = + 3,48$
		$d = 1,59$	$d = 2,71$	$d = 1,01^*$	$d = 2,27$	$d = 1,96$	$d = 2,54$	$d = 16,01$	$d = 9,67$
Luzerne	10	$r = 0,988$	$r = 0,987$	$r = 0,992$	$r = 0,989$	$r = 0,985$	$r = 0,981$	$r = 0,951$	$r = 0,955$
		$b = 0,81^*$	$b = 1,06$	$b = 0,97^{**}$	$b = 1,27$	$b = 1,23^*$	$b = 1,62$	$b = 3,86$	$b = 5,41$
		$a = - 0,32$	$a = - 11,81$	$a = + 4,95$	$a = - 4,94$	$a = + 7,36$	$a = - 1,97$	$a = + 1,75$	$a = - 9,56$
		$d = 0,61^{**}$	$d = 4,61$	$d = 1,27$	$d = 1,82$	$d = 2,90$	$d = 1,88$	$d = 2,49$	$d = 4,40$
Trèfles	11	$r = 0,975$	$r = 0,950$	$r = 0,991$	$r = 0,940$	$r = 0,966$	$r = 0,978$	$r = 0,878$	$r = 0,693$
		$b = 0,73$	$b = 0,87$	$b = 1,03$	$b = 1,20$	$b = 1,35$	$b = 1,67$	$b = 2,99$	$b = 2,89$
		$a = + 1,97$	$a = - 9,13$	$a = + 3,66$	$a = - 6,52$	$a = + 5,71$	$a = - 5,59$	$a = + 6,06$	$a = + 0,20$
		$d = 1,07^*$	$d = 5,50$	$d = 0,79^{**}$	$d = 4,92$	$d = 2,69$	$d = 2,64$	$d = 5,83$	$d = 15,11$
Légumineuses ...	21	$r = 0,986$	$r = 0,955$	$r = 0,996$	$r = 0,967$	$r = 0,985$	$r = 0,978$	$r = 0,924$	$r = 0,839$
		$b = 0,79^{**}$	$b = 1,14$	$b = 0,98^{**}$	$b = 1,41$	$b = 1,21^{**}$	$b = 1,83$	$b = 3,75$	$b = 5,06$
		$a = + 0,24$	$a = - 10,54$	$a = + 4,72$	$a = - 9,97$	$a = + 7,27$	$a = - 7,09$	$a = + 1,77$	$a = - 11,80$
		$d = 0,83^{**}$	$d = 14,90$	$d = 1,34^{**}$	$d = 9,06$	$d = 3,88$	$d = 5,84$	$d = 4,41^{**}$	$d = 23,84$
Graminées	40	$r = 0,961$	$r = 0,977$	$r = 0,987$	$r = 0,971$	$r = 0,970$	$r = 0,964$	$r = 0,831$	$r = 0,838$
		$b = 0,64^*$	$b = 0,74$	$b = 0,92^*$	$b = 1,03$	$b = 1,23^*$	$b = 1,38$	$b = 2,40$	$b = 2,75$
		$a = + 2,11$	$a = - 6,24$	$a = + 5,47$	$a = - 1,45$	$a = + 4,36$	$a = - 2,75$	$a = + 16,11$	$a = + 10,10$
		$d = 1,56$	$d = 2,02$	$d = 1,37$	$d = 1,48$	$d = 1,69$	$d = 1,96$	$d = 22,3$	$d = 13,8^*$
Ensemble	75	$r = 0,919$	$r = 0,891$	$r = 0,985$	$r = 0,954$	$r = 0,908$	$r = 0,919$	$r = 0,780$	$r = 0,688$
		$b = 0,61^*$	$b = 0,71$	$b = 0,96^{**}$	$b = 1,12$	$b = 1,15^*$	$b = 1,41$	$b = 2,10$	$b = 2,24$
		$a = + 4,86$	$a = - 3,64$	$a = + 4,86$	$a = - 3,70$	$a = + 7,61$	$a = - 1,88$	$a = + 16,16$	$a = + 11,27$
		$d = 4,66$	$d = 7,90$	$d = 1,50$	$d = 3,80$	$d = 6,49$	$d = 5,80$	$d = 28,16$	$d = 27,86$

au fait que la proportion de cellulose dans la lignocellulose augmente (aux dépens de la proportion d'indéterminé) en même temps que la proportion de tiges (cf. tab. 1 et 2). Par contre, les dispersions par rapport aux droites de régression sont du même ordre pour la lignocellulose et la cellulose brute. Les droites lignocellulose-cellulose des

GRAPH. 8. — *Liaison entre la teneur en lignocellulose et la teneur en cellulose.*

- Foins de pré
- Ray grass anglais
- ★ Dactyles
- Luzernes
- ▲ Trèfles

légumineuses sont nettement au-dessus de celles des graminées (graph. 8), parce que la lignocellulose des légumineuses est plus pauvre en cellulose.

Avec la lignine brute, la lignocellulose et la cellulose brute présentent des liaisons systématiquement moins étroites qu'avec les autres paramètres membranaires : dans le cas des foins de pré, le coefficient de corrélation entre la cellulose brute et la lignine n'est même pas significatif. Il n'existe pas de différences significatives entre la lignocellulose et la cellulose brute dans la valeur des coefficients de régression avec

la lignine (graph. 10), ni dans l'erreur commise, sauf dans le cas des graminées pour lesquelles la cellulose brute permet une erreur plus faible. Les erreurs commises dans l'estimation de la lignine sont d'ailleurs toujours beaucoup plus élevées que dans l'estimation des autres constituants membranaires.

GRAPH. 9. — *Liaison entre la teneur en cellulose brute et la teneur en cellulose.*

- Foins de pré
- Ray grass anglais
- ★ Dactyles
- Luzernes
- ▲ Trèfles

DISCUSSION

La détermination de la cellulose brute a fait l'objet de très nombreuses critiques (cf. FAUCONNEAU et JARRIGE, 1957) ; elle continue cependant à être universellement employée, d'abord parce qu'elle a été utilisée dans les très nombreuses

études de la composition et de la digestibilité des aliments et ensuite, parce qu'on n'a pratiquement pas proposé de détermination qui lui soit supérieure à tout point de vue.

Pour être substituée à la cellulose brute, toute nouvelle méthode doit en effet lui être supérieure sur trois plans :

a) Sur le plan biochimique, elle doit être plus fidèle et mieux rendre compte des variations des teneurs en constituants de la membrane.

b) Sur le plan analytique, elle doit être aussi rapide, tout en étant plus facile à standardiser et à adapter aux analyses de série.

c) Sur le plan nutritionnel, elle doit permettre une meilleure estimation de la digestibilité et de la valeur alimentaire du fourrage.

GRAPH. 10. — Liaison entre les teneurs en lignocellulose et cellulose brute et la teneur en lignine.

F Foins de pré
R Ray grass anglais
D Dactyles
L Luzernes
T Trèfles

Les critères analytiques permettent d'écarter toutes les méthodes d'analyse plus ou moins complètes de la membrane, comportant nécessairement un dosage de la lignine (cf. JARRIGE, 1961) : ce sont là des méthodes pour les laboratoires de recherches. Seules peuvent être comparées à la cellulose brute sur le plan analytique, les déterminations rapides d'un critère de la teneur en membranes. Plusieurs ont été proposées dès le siècle dernier (cf. PALOHEIMO et PALOHEIMO, 1948), mais on peut ne retenir que les quatre plus récentes à notre connaissance : résidu d'une hydrolyse pancréatique (WILLIAMS et OLMSTEDT, 1934), « indice formique » (GUILLEMET et JACQUOT, 1943), « substances membranaires totales » (PALOHEIMO, 1945), « normal acid fibre » (WALKER et HEPBURN, 1955a, 1955b).

Les deux premières n'ont malheureusement pas fait l'objet d'études comparées avec la cellulose brute sur les différents plans ; les « substances membranaires » non plus, mais elles ont été utilisées dans certaines études scandinaves sur la composition des fourrages (KIVIMAE, 1959). La normal acid fibre a été définie de façon assez empirique (cf. JARRIGE, 1961) sur le plan biochimique. Par contre, elle a fait l'objet d'une comparaison approfondie avec la cellulose brute sur les deux autres plans (WALKER et HEPBURN, 1955a, 1955b, 1956 — RAYMOND et al, 1955 — GRIFFITH et THOMAS, 1955) ; elle a fourni une estimation de la digestibilité meilleure que la cellulose brute dans le cas des herbes de pâturage et des ensilages, mais seulement du même ordre dans le cas des foin ; elle s'est surtout montrée nettement plus facile à standardiser et à adapter à l'utilisation en série, avantages considérés comme les plus importants par ses promoteurs.

Nos résultats nous permettent de comparer la lignocellulose et la cellulose brute, surtout sur le plan biochimique et en partie sur le plan analytique.

TABLEAU 10

*Composition moyenne approximative de la lignocellulose
et de la cellulose brute des graminées et des légumineuses.*

		Graminées	Légumineuses
Lignocellulose	Cellulose	70	60
	Lignine brute	20	25
	Matières azotées	5 — 10	10 — 15
Cellulose brute ⁽¹⁾	Cellulose naturelle ⁽²⁾	90 — 95	75 — 85
	Lignine	4 — 8	15 — 20
	Matières azotées	0,5 — 1,5	2 — 2,5

⁽¹⁾ Valeurs déduites des résultats de NORMAN (1935), LOUW (1941), BONDI et MEYER (1943), NORDFELT, SVANBERG et CLAESSON (1949), ARMSTRONG, COOK et THOMAS (1950), STALLCUP (1958).

⁽²⁾ Cellulose naturelle déterminée suivant la méthode de NORMAN et JENKINS.

Aspect biochimique. — La lignocellulose et la cellulose brute sont toutes deux des mélanges constitués de cellulose et de lignine, auxquelles s'ajoutent des hémicelluloses résiduelles et une fraction indéterminée. La tableau 8 permet de comparer leur composition approximative pour un échantillon moyen de graminées et de légumineuses représentant les principaux stades de croissance. La composition de la cellulose brute n'a malheureusement pas été déterminée sur nos échantillons, mais déduite des résultats très concordants, obtenus par différents auteurs. Cette confrontation permet de mettre en évidence deux faits intéressants.

La lignocellulose présente sur la cellulose brute l'avantage de contenir la totalité de la lignine du fourrage, et d'avoir ainsi une teneur en lignine beaucoup plus constante, malgré des variations apparentes liées au fait que la lignine brute que nous avons déterminée est « contaminée » par des résidus cytoplasmiques. L'inconvénient biochimique majeur de la cellulose brute est en effet de contenir une fraction variable de la lignine totale du fourrage, beaucoup plus élevée dans les légumineuses (35 à 70 p. 100) que dans les graminées (15 à 25 p. 100) (NORMAN, 1935 — LOUW, 1941 — BONDI et MEYER, 1943 — NORDFELT, SVANBERG et CLAESSON, 1949 — ARMSTRONG, COOK et THOMAS, 1950 — STALLCUP, 1958).

Par contre, la lignocellulose présente l'inconvénient d'avoir une proportion d'indéterminés nettement plus élevée, constituée en partie par des matières azotées, en partie par d'autres constituants non identifiés. Nous n'avons malheureusement pas dosé l'azote des lignocelluloses mais seulement celui des hydrolysats sulfuriques (JARRIGE, 1961) et de la lignine brute d'un certain nombre d'échantillons (JOURNET et JARRIGE, résultats non publiés). D'après ces résultats fragmentaires, on peut admettre que la lignocellulose contient de façon très approximative, 2 à 5 p. 100 de matières azotées dans les tiges de graminées et de légumineuses, 12-15 p. 100 dans les feuilles de graminées, et 20-25 p. 100 dans les feuilles de légumineuses. Les proportions d'indéterminés sont beaucoup plus faibles dans la cellulose brute, tout au moins dans celle des plantes entières ; cette diminution est due à l'hydrolyse alcaline qui présente donc simultanément l'avantage, peu apprécié jusqu'ici, d'extraire la majeure partie des constituants cytoplasmiques, et l'inconvénient, tant critiqué, de solubiliser une fraction variable de la lignine. C'est pour les feuilles de légumineuses que les traitements alcalins sont les plus efficaces : des études en cours montrent qu'une macération dans $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ très dilué (0,25 p. 100 pendant 18 heures à 38°C) permet d'extraire jusqu'à 30 p. 100 de la matière sèche de la lignocellulose du trèfle blanc, et 10 p. 100 de celle des foins de légumineuses et des graminées jeunes (JOURNET et JARRIGE, résultats non publiés).

Il faut également mentionner que la cellulose brute contient une proportion assez élevée de polysaccharides non cellulosiques : de l'ordre de 15 p. 100 de « pentosanes » classiques dans les échantillons étudiés par NORMAN, 10 p. 100 et 15 p. 100 d'hémicelluloses (xylanes-arabanes-glucosanes-galactanes) respectivement dans les échantillons d'herbe et de foin étudiés par GAILLARD (1958). La lignocellulose en contient beaucoup moins : environ 3 p. 100 de xylanes pour les plantes entières (JARRIGE, 1961) ; nous les avons comptés dans la cellulose au cours des calculs précédents.

On peut, en définitive, considérer la lignocellulose comme une estimation par excès de la somme cellulose + lignine, et la cellulose brute comme une estimation par excès de la cellulose. Le problème principal reste cependant de savoir laquelle de ces deux déterminations rend le plus fidèlement compte des variations de la teneur des fourrages en membranes totales ou en leurs principaux constituants membranaires. La lignocellulose apparaît comme un critère plus fidèle des membranes totales et de la somme cellulose + lignine, puisqu'elle a permis d'estimer ces paramètres avec une erreur plus faible pour toutes les catégories d'échantillons étudiés ; par contre, elle n'est pas généralement plus fidèle que la cellulose brute dans l'estimation de la cellulose et de la lignine. La lignocellulose accuse moins les différences entre les échantillons pauvres (ex. les feuilles) et les échantillons riches en membranes (ex. les tiges), que ne le fait la cellulose brute (graph. 6 à 9). En effet, quand la teneur en membranes augmente, l'augmentation de la lignocellulose est atténuée par la diminution de sa teneur en indéterminé.

Cette « sensibilité » plus faible de la lignocellulose comptant relativement peu auprès de sa plus grande fidélité, on peut admettre que la lignocellulose est supérieure à la cellulose brute comme critère de la teneur en membranes du fourrage ou de la teneur en cellulose + lignine (laquelle représente 60 à 65 p. 100 des membranes). Il faut remarquer cependant que nous avons testé la lignocellulose et la cellulose brute par rapport aux teneurs en cellulose, lignine et membranes totales déterminées,

suivant notre schéma d'analyse, dont la lignocellulose n'est qu'une étape. Il resterait à vérifier que les conclusions obtenues demeurent également valables lorsque ces constituants sont déterminés suivant d'autres méthodes.

Aspect analytique. — Sur le plan analytique, toute détermination rapide d'un critère membranaire doit :

- a) Être suffisamment simple pour être facile à standardiser et à réaliser en série.
- b) Fournir des résultats reproductibles d'un laboratoire à l'autre d'une part, et d'un jour à l'autre dans le même laboratoire.

Bien qu'utilisée et étudiée depuis un siècle, la détermination de la cellulose brute ne semble pas encore remplir ces conditions de façon entièrement satisfaisante, en raison de sa standardisation insuffisante. Il suffit de comparer les méthodes officielles des différents pays européens, comme l'a fait FRANÇOIS (1955), pour constater déjà des variations importantes, notamment (a) dans le dégraissage obligatoire dans certains pays (Grande Bretagne) mais non dans la plupart des autres ; (b) dans la méthode de chauffage ; (c) dans la récupération du résidu : filtration sur amiante, sur toile, sur papier, sur sable, sur coton de verre, centrifugation.

Cependant, lorsqu'elles sont appliquées rigoureusement, ces différentes méthodes donnent des résultats plus comparables qu'on aurait pu l'espérer, comme le montrent par exemple les résultats de la chaîne d'analyses internationale organisée par le Laboratoire hollandais d'Oosterbeek, à laquelle participent une vingtaine de laboratoires d'Europe Occidentale : Pays-Bas, Allemagne, Suisse, Autriche, Danemark, Suède, France. Pour les 9 échantillons de fourrages étudiés de 1956 à 1959, les coefficients de variation des résultats entre laboratoires ont été seulement de l'ordre de 3 p. 100 pour la cellulose brute (de 1,7 à 4,7 p. 100), mais toutefois sensiblement plus élevés que ceux des matières azotées (environ 2 p. 100). On peut cependant observer des variations plus larges, à l'intérieur d'un même pays, entre laboratoires n'appliquant pas strictement la méthode officielle dans tous ses détails.

Ces variations introduisent des erreurs lorsqu'on compare la composition des aliments, et lorsqu'on calcule la valeur nutritive du fourrage à partir de sa teneur en cellulose brute à l'aide de relations statistiques, surtout si celles-ci ont été établies dans d'autres pays.

Du point de vue strictement analytique, la difficulté de standardiser le dosage de la cellulose brute est due essentiellement au fait qu'il comporte deux hydrolyses et deux récupérations de résidu.

Nous n'avons pas encore fait d'étude systématique sur les conditions de standardisation du dosage de la lignocellulose ni, à fortiori, de comparaison avec la cellulose brute à ce point de vue. Cependant, grâce à la suppression de l'extraction aqueuse longue et peu reproductible, le dosage de la lignocellulose est réduit à la seule hydrolyse acide après le dégraissage. En faisant l'économie de l'hydrolyse alcaline, il apparaît plus simple que le dosage de la cellulose brute, donc, théoriquement, plus facile à standardiser et à réaliser en série. Il reste à démontrer effectivement cette supériorité supposée après avoir précisé l'action d'un certain nombre de facteurs, tels que le rapport acide/ matière sèche, les conditions de chauffage, le mode de réfrigération, la récupération du résidu... de façon à définir de façon très précise tous les détails du dosage. C'est alors qu'il sera possible de voir si la méthode fournit des résultats reproductibles entre les laboratoires.

A l'avantage de la lignocellulose, il faut encore porter le fait qu'elle peut être

obtenue au cours du fractionnement complet du fourrage, lorsqu'on veut déterminer successivement les glucides solubles, les hémicelluloses, la cellulose et la lignine. La présence d'une extraction aqueuse n'a aucune influence significative; la présence d'une extraction alcoolique initiale n'a qu'une influence très limitée lorsqu'elle est suivie d'un dégraissage.

Cependant, il ne suffit pas que la lignocellulose présente sur la cellulose brute des avantages sur le plan biochimique, ce qui nous semble démontré, et sur le plan analytique, ce qui n'est pour l'instant que supposé. Il faut encore qu'elle permette d'estimer la digestibilité et plus généralement, la valeur alimentaire des fourrages de façon au moins aussi satisfaisante et, si possible, plus fidèle que ne le fait la cellulose brute. Le but de ces études sur l'analyse et la composition des fourrages demeure en effet d'établir des lois reliant la composition chimique à la valeur alimentaire et permettant d'expliquer et de prévoir les variations de celle-ci. Si, malgré ses avantages éventuels sur d'autres plans, la lignocellulose s'avérait inférieure à la cellulose brute sur le plan nutritionnel, il vaudrait mieux ne pas généraliser son utilisation pour conserver la cellulose brute jusqu'à ce qu'une autre détermination soit proposée. La cellulose brute présente en effet le très gros intérêt d'avoir été utilisée pratiquement dans toutes les mesures de digestibilité des fourrages: c'est là un « capital » considérable, qui a d'ailleurs été exploité de façon très insuffisante.

Reçu en mai 1961.

SUMMARY

ANALYSIS OF THE CARBOHYDRATE CONSTITUENTS OF FODDER PLANTS — II —

1° Lignocellulose is the residue left after hydrolysis with 5 per cent H^2SO^4 (3 hours under reflux) of forage previously extracted with water and ethanol-benzene (JARRIGE, 1961). The object of this study was (a) to establish the composition of lignocellulose, (b) to measure the influence of the preliminary extractions on the subsequent determination of lignocellulose, and (c) to compare lignocellulose with crude fibre.

2° The cellulose and crude lignin contents of lignocellulose have been determined on 169 samples of non-demineralised lignocellulose (tab. 1) and on 73 samples of demineralised lignocellulose (tab. 2).

The composition of lignocellulose was shown to be relatively constant for a given organ (such as the leaves or stem), of a given botanical family. On the other hand there were important differences between leaves and stems, between grasses and legumes and at different stages of growth (graph. 1 and graph. 2). On average, the lignocellulose of grasses contains approximately 70 per cent cellulose, 20 per cent crude lignin and 5-10 per cent crude protein, and that of legumes contains 60 per cent cellulose, 25 per cent crude lignin and 10-15 per cent crude protein.

3° The influence of pretreatment before hydrolysis with 5 per cent H^2SO^4 was studied.

a) The lignocellulose obtained after only an extraction with 80 per cent aqueous ethanol was significantly lower than the control lignocellulose on the 54 samples studied (tab. 3). This decrease concerned mostly the cellulose (graph. 3); it was greatest for the samples of leaves of legumes, but was negligible for the samples of meadow hays. It was due mostly to the absence of defatting (tab. 4) and partly to the ethanol treatment itself.

b) The lignocellulose obtained after defatting without the water extraction was not significantly different from the control lignocellulose (tab. 6) when measured on 16 samples representing the principle types of forage. Within the limits studied (from 4 to 32 hours) the length of time of defatting seemed to have no significant effect (tab. 7) on the lignocellulose content, but only a few (7) samples were examined.

In consequence, it is proposed that lignocellulose be determined without previous aqueous extraction by hydrolysis with 5 per cent H^2SO^4 , directly after an 8 hours ethanol-benzene treatment.

4° Statistical relations were studied between the contents of lignocellulose or crude fibre and

cellulose, lignin, the sum cellulose + lignin and the sum hemicellulose + cellulose + lignin (cell walls) for the different categories of samples.

The lignocellulose and crude fibre contents both showed correlation coefficients which were very high with the cell walls, the sum cellulose + lignin and the cellulose, but which were lower and more variable with the lignin (tab. 9). The coefficients of regression were higher for the crude fibre than for the lignocellulose, but with the latter it was possible to estimate the cell walls and the sum cellulose + lignin with a smaller error (graph. 5 to 9).

Lignocellulose can be considered as an estimation in excess of the sum cellulose + lignin, and crude fibre as an estimation in excess of true cellulose.

5° The results were discussed. It was emphasised that in order to replace crude fibre analysis, lignocellulose or any other method must be superior to it from biochemical, analytical and nutritional aspects.

From the biochemical point of view, lignocellulose has an advantage over crude fibre in that it contains all of the lignin, and is a more faithful criterion of the content of cell walls and of the sum cellulose + lignin; it has the disadvantage of containing a higher and more variable proportion of nitrogenous and undetermined constituents, due to the absence of alkaline treatment.

From the analytical point of view, the determination of lignocellulose is simpler than that of crude fibre but it must be standardised. Finally it is not yet known whether lignocellulose makes possible the estimation of the digestibility of forage more accurately than crude fibre.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARMSTRONG D.G., COOK H., THOMAS B., 1950. The lignin and cellulose contents of certain grassland species at different stages of growth. *J. Agric. Sci.*, **40**, 93-99.
- BONDI A. H., MEYER H., 1943. On the chemical nature and digestibility of roughage carbohydrates. *J. Agric. Sci.*, **33**, 123-128.
- FAUCONNEAU G., JARRIGE R., 1957. Composition chimique et valeur nutritive de l'herbe. *Bull. Tech. Ing. Serv. Agric.*, **118**, 173-214.
- FRANÇOIS A. C., 1955. (*Troisième réunion sur les problèmes d'alimentation animale en Europe. F.A.O. — F.E.Z. Göttingen.*) Rapport préliminaire sur la standardisation des méthodes d'analyse des aliments destinés aux animaux.
- GUILLENET R., JACQUOT R., 1943. Essai de détermination de l'indigestible glucidique. *C.R. Acad. Sci.*, **216**, 508-510.
- GRIFFITH G. Ap, THOMAS D. C., 1955. The use of normal-acid fibre and A.O.A.C. fibre determinations for the estimation of herbage digestibility. *Agric. Progr.*, **30**, 124-128.
- GAILLARD Blanche D.E., 1958b. A detailed summative analysis of the crude fibre and nitrogen free extractives fractions of roughages. II. The analysis of straw, hay, grass and mangold. *J. Sci. Fd. Agric.*, **9**, 346-353.
- JARRIGE R., 1961. Analyse des constituants glucidiques des plantes fourragères. I. Fractionnement des constituants de la membrane par les hydrolyses acides. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **1**, 163-212.
- KIVIMAE A., 1959. Chemical composition and digestibility of some grassland crops. *Acta Agric. Scand.*, **9**, Sup. 142 p.
- LOUW J. G., 1941. The relative digestibility of the constituents of the carbohydrate complex of grasses at successive stages of growth with reference to their partition into crude fibre and nitrogen free extract according to the standard method for feeding stuff analysis. *Onderstepoort J. Vet. Sci.*, **17** (1-2), 165-179.
- MINSON D. J., RAYMOND W. F., HARRIS C. E., 1960. Studies in the digestibility of herbage. VIII. The digestibility of S 37 cocks foot, S 23 rye grass and S 24 rye grass. *J. Brit. Grassland Soc.*, **15**, 174-180.
- Mc DOUGALL H. W., 1958. Observations on crude fibre estimation by acid digestion. *J. Sci. Fd. Agric.*, **9**, 1.
- MOON F. E., ABOU-RAYA A. K., 1952. The lignin fraction of animal feeding stuffs. III. The détermination of total lignin. *J. Sci. Fd. Agric.*, **3**, 595-608.
- NORDELT S., SVANBERG O., CLAESON O., 1949. Studies regarding the analysis of crude fibre. *Acta Agric. Suec.*, **3**, 135-177.
- NORMAN A. G., 1935. The composition of crude fibre. *J. Agric. Sci.*, **25**, 529-540.
- PALOHEIMO L., 1945. Détermination of total quantity of cell wall constituents. *Maataloust. Aikakausk.*, **17**, 19-21.
- PALOHEIMO L., 1953. Some persistent misconceptions concerning the crude fibre and the nitrogen-free extract. *Maataloust. Aikakausk.*, **25**, 16-22.
- RAYMOND W. F., JONES E. C., HARRIS C. E., 1955. Factors affecting the accuracy of normal acid fibre determinations, and its use as a faecal index component. *Agric. Progr.*, **30**, 120-124.
- SOMOGYI M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.
- STALLCUP O. T., 1958. Composition of crude fibre in certain roughages. *J. Dairy Sci.*, **41**, 963-968.
- WALKER D. M., HEPBURN W. R., 1955 a. The analysis of roughages by the normal acid fibre method, and its use for predicting the digestibility of roughages by sheep. *Agric. Progr.*, **30**, 118-119.

- WALKER D. M., HEPBURN W. R., 1955 *b*. The nutritive value of roughages for sheep. I. The relationship between the gross digestible energy and the chemical composition of hays. *J. Agric. Sci.*, **45**, 298-310.
- WALKER D. M., HEPBURN W. R., 1956. The nutritive value of roughages for sheep. II. The relationship between the gross digestible energy and the chemical composition of silages. *J. Agric. Sci.*, **47**, 172-186.
- WILLIAMS R. D., OLMSTED W. H., 1935. A biochemical method for determining indigestible residue (crude fiber) in feces : lignin, cellulose and non water soluble hemicelluloses. *J. Biol. Chem.*, **108**, 653-666.