

ANALYSE DES CONSTITUANTS GLUCIDIQUES DES PLANTES FOURRAGÈRES

I — FRACTIONNEMENT DES CONSTITUANTS DE LA MEMBRANE PAR LES HYDROLYSES
ACIDES.

R. JARRIGE

Avec la collaboration technique de Janine JUNG, Christiane LE GALLO et Jacqueline BILLON
*Station de Recherches sur l'Élevage,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas.*

SOMMAIRE

1° L'objet de cette étude a été de mettre au point une méthode d'hydrolyse acide des membranes qui permette d'estimer successivement, les hémicelluloses et la cellulose au cours du dosage de la lignine. L'influence de la durée de l'hydrolyse par SO_2H_4 5 p. 100 (1, 2, 3, 4, 6 et 10 heures) a été étudiée dans le but de déterminer une durée optimum permettant d'extraire la quasi totalité des hémicelluloses sans causer de dégradation appréciable de la cellulose.

2° Cette étude a été poursuivie sur vingt échantillons de feuilles et de tiges de luzerne, de ray grass, de dactyle et de fétuque (tableau 2). Les méthodes utilisées et les définitions des différents constituants sont résumées par la figure 1. La fraction hémicellulose a été estimée par le pouvoir réducteur ($\times 0,9$) de l'hydrolysat par SO_2H_4 5 p. 100 et la cellulose par le pouvoir réducteur ($\times 0,9$) de l'hydrolysat par SO_2H_4 72 p. 100. Les sucres de ces hydrolysats ont été séparés par chromatographie sur papier et mesurés par la méthode colorimétrique de SOMOGYI. Les résultats détaillés sont donnés par les tableaux 10 à 21) et les moyennes pour les feuilles et tiges de luzerne et de ray grass par les figures 3 à 6.

3° Quand la durée de l'hydrolyse par SO_2H_4 5 p. 100 a augmenté la teneur de chaque constituant des membranes a présenté une évolution relativement semblable dans tous les échantillons étudiés :

- la lignocellulose a diminué suivant une loi curvilinéaire (fig. 2) ;
- la lignine brute a diminué mais de façon très lente ;
- les hémicelluloses ont augmenté parce que SO_2H_4 5 p. 100 a hydrolysé une proportion croissante des xylanes et des hexosanes totaux (fig. 9) tandis que les arabanes sont demeurés approximativement constants ;
- la cellulose a présenté une diminution traduisant d'abord celle des xylanes résiduels puis celle des glucosanes ;
- une fraction croissante des xylanes a été détruite à partir des 4^e-6^e heures.

4° Des différences entre les échantillons ont cependant été notées avec l'espèce, l'organe et le traitement antérieur. Les xylanes des graminées ont été hydrolysés beaucoup plus rapidement que ceux de la luzerne et ont subi une destruction plus importante (tableau 6). L'extraction des substances pectiques a peu modifié l'évolution des différentes fractions membranaires des échantillons de luzerne en fonction de la durée de l'hydrolyse par SO_2H_4 5 p. 100. Le mode de dessiccation des échantillons et la méthode d'extraction des glucides cytoplasmiques ne semblent exercer qu'une influence limitée qui devra être précisée.

5° Il est apparu impossible de réaliser par les hydrolyses sulfuriques une séparation absolue entre les hémicelluloses et la cellulose des membranes étudiées. Cependant une hydrolyse de 3 heures par SO_2H_4 5 p. 100 permet d'extraire la majeure partie des xylanes (fig. 9) sans, probablement, attaquer la cellulose de façon importante ; elle permet de recouvrer une quantité maximum des

polysaccharides totaux, de limiter la destruction des xylanes et d'obtenir une lignocellulose relativement pauvre en azote. Les estimations des hémicelluloses, de la cellulose et de la lignine obtenues par ce fractionnement ont été discutées ; il a été souligné qu'il n'existait pas de méthode de référence de dosage de ces constituants et que leur définition même était très incertaine.

6° Le résidu de l'hydrolyse par SO_2H_4 5 p. 100 pendant 3 heures ou lignocellulose doit être mieux défini que la cellulose brute. Il contient la quasi totalité de la cellulose et de la lignine et a une composition moins variable d'un fourrage à l'autre. Il se rapproche de la « normal acid fibre » utilisée en Grande-Bretagne et devrait, être théoriquement un critère intéressant de la digestibilité de la plante.

INTRODUCTION

Pour étudier la composition et la valeur nutritive des plantes fourragères, il faut disposer de méthodes d'analyse satisfaisantes de leurs constituants glucidiques (50 à 75 p. 100 de la matière sèche). Ceux-ci se répartissent en deux catégories ; d'une part, les glucides du cytoplasme comprenant les sucres, les polyholosides à courte chaîne ou oligosaccharides et les polyholosides de réserve : fructosanes-amidon ; d'autre part, les glucides de la membrane, cellulose (β glucosane), hémicelluloses et substances pectiques, auxquels on rattache la lignine.

La méthode d'analyse classique, proposée voici un siècle par HENNEBERG et STOHRMAN, les sépare en deux fractions : la cellulose brute et l'extractif non azoté. Elle a permis de dégager les principales variations de la composition des fourrages et d'établir des relations entre le coefficient de digestibilité et la teneur en cellulose brute. Elle est cependant trop grossière, tant du point de vue biochimique que nutritionnel.

La cellulose brute et l'extractif non azoté sont en effet deux mélanges arbitraires et infidèles (NORMAN 1935 ; CRAMPTON et MAYNARD 1938 ; LOUW 1941 ; BONDI et MEYER 1943 ; NORDFELT et al. 1949 ; ARMSTRONG et THOMAS 1950 ; PALOHEIMO 1953 ; FAUCONNEAU et JARRIGE 1957).

La cellulose brute contient la majorité de la cellulose vraie, un résidu d'hémicelluloses et une fraction de la lignine très variable avec l'espèce et le stade de développement. L'extractif non azoté contient, à côté des glucides cytoplasmiques et des acides organiques, plus de la moitié des constituants de la membrane dont la totalité des substances pectiques, la quasi totalité des hémicelluloses et une proportion variable de la lignine : il ne présente aucune signification sinon de mesurer notre ignorance, laquelle porte sur 40 à 45 p. 100 de la matière sèche du fourrage.

Arbitraire sur le plan biochimique, cette séparation le demeure sur le plan nutritionnel, avant tout parce que la cellulose vraie est très digestible, alors que la lignine est, en principe, indigestible. Sauf dans le cas des légumineuses pures, la cellulose brute a un coefficient de digestibilité très voisin de celui de l'extractif non azoté, voire supérieur dans le cas des ensilages (cf. FAUCONNEAU et JARRIGE 1955). La teneur en cellulose brute est cependant un critère intéressant de l'âge et, par là, de la digestibilité du végétal.

Après avoir dénoncé les insuffisances de la cellulose brute, de nombreux auteurs ont proposé soit de la compléter par le dosage d'autres fractions, soit de l'abandonner pour des méthodes plus complètes. Le tableau 1 réunit les principales de ces propositions et les répartit en deux catégories, en fonction de leurs objectifs et de leurs possibilités d'utilisation :

TABLEAU I

Principales méthodes proposées pour améliorer l'analyse des fourrages et remplacer la méthode de Weende.

But de la méthode	Auteurs	Déterminations proposées	
I. — Obtention d'un résidu remplaçant la cellulose brute.	WILLIAMS & OLMSTEDT (1934)	Résidu d'une digestion pancréatique : il représenterait la somme : cellulose + lignine, considérée comme indigestible par l'homme.	
	GUILLEMET & JACQUOT (1943)	Résidu du traitement par l'acide formique 80 p. 100 : cet « insoluble formique » est un mélange de cellulose, de pentosanes et de lignines.	
	PALOHEIMO (1945)	Résidu de l'hydrolyse du fourrage dégraissé (éther) par HCl 0,05 N ₂ et diminué la teneur en matières azotées.	
	WALKER & HEPBURN (1955 a)	Résidu de l'hydrolyse du fourrage dégraissé (alcool benzène) par SO ₄ H ₂ N pendant une heure sous reflux.	
II. — Analyse plus ou moins complète des fourrages.	NORMAN (1935)	Cellulose	(NORMAN & JENKINS)
		Lignine	(NORMAN & JENKINS)
	CRAMPTON & MAYNARD (1938)	Cellulose	(CRAMPTON & MAYNARD)
		Lignine Autres glucides	(CRAMPTON & MAYNARD) Calculés par différence.
	LANCASTER (1943)	Sucres	Extrait aqueux.
		Cellulose	(CRAMPTON & MAYNARD)
		Lignine	(CRAMPTON & MAYNARD avec modifications).
	FERGUSON (1948)	Sucres et fructosanes	
		Substances pectiques	
		Cellulose	(NORMAN & JENKINS)
		Polyuronides	Dosage du furfural.
	CRAMPTON & WHITING (1948)	Lignine	(ARMITAGE et al.)
		Cellulose	(CRAMPTON & MAYNARD)
Lignine		(CRAMPTON & MAYNARD)	
NORDFELT et al. (1949)	Glucides hydrolysables		
	Cellulose		
	Lignine		
	Pentosanes		
CHARLET-LERY FRANÇOIS & LEROY (1952)	Cellulose	(KRUSCHNER)	
	Lignine		
	Pentosanes		
	Composés pectiques		
HARWOOD (1953)	Glucides hydrolyzables	(BERTRAND)	
	Sucres		
	Fructosanes		
	Lignine		
	Hemicelluloses		
	Cellulose	Fractionnement par les hydrolyses acides (SO ₄ H ₂) et dosage des sucres après séparation chromatographique.	
GAILLARD (1958)	Sucres		
	Fructosanes		
	Substances pectiques		
	Hemicelluloses		
	Cellulose		
WAITE & GORROD (1959)	Lignine		
	Glucides solubles		
	Substances pectiques		
	Hemicelluloses		
	Cellulose	Fractionnement par l'eau et KOH et dosage des sucres après séparation chromatographique.	

a) La première catégorie groupe les méthodes qui remplacent la cellulose brute par un résidu qui serait un meilleur critère, soit de la proportion des constituants membranaires, soit de la digestibilité du fourrage. Elles ont été conçues pour estimer rapidement la valeur nutritive des fourrages dans les laboratoires de contrôle. La plus prometteuse est celle de la « normal acid fibre » (WALKER et HEPBURN 1955 *a*) utilisée en Grande-Bretagne dans les études poursuivies dans les trois Instituts de ROWETT, de HURLEY et d'ABERYSTWYTH.

b) La deuxième catégorie réunit les méthodes d'analyse détaillée qui comportent la détermination des principaux constituants glucidiques, notamment de ceux des membranes. Les plus récentes d'entre elles utilisent la chromatographie sur papier pour séparer les sucres provenant de l'hydrolyse des polysaccharides (HARWOOD 1953, GAILLARD 1958 *a* ; WAITE et GORROD 1959 *b*). Ce sont des méthodes de recherches, trop longues pour les laboratoires de contrôle.

Elles comportent toutes le dosage de la lignine, considérée comme le meilleur critère de la digestibilité du fourrage. La lignine étant le résidu obtenu quand on a enlevé tous les autres constituants du fourrage, son dosage est très long et nécessite une série d'extractions successives (NORMAN et JENKINS 1935 ; ELLIS et al. 1946 ; ARMITAGE et al. 1948) :

— par les solvants organiques pour extraire les matières grasses, les pigments et une partie des autres constituants cytoplasmiques ;

— par un acide dilué (le plus souvent SO_2H_4 5 p. 100 à l'ébullition) pour extraire les hémicelluloses et la majorité des constituants cytoplasmiques résiduels ; ce traitement peut être complété par une digestion enzymatique des matières azotées ;

— par SO_2H_4 72 p. 100 qui hydrolyse les constituants celluloses.

Nous avons pensé que ces traitements représentaient un schéma logique de fractionnement progressif de la plante ; ils devraient permettre, au cours du dosage de la lignine, d'obtenir une estimation des glucides cytoplasmiques, des hémicelluloses et de la cellulose, ces trois fractions étant dosées par la méthode commune du pouvoir réducteur. Il faudrait pour cela, que l'hydrolyse par l'acide dilué permette d'extraire la totalité des hémicelluloses sans dégrader la cellulose et la lignine.

Des essais préliminaires nous ont montré que SO_2H_4 5 p. 100 (comparé à SO_2H_4 2,5 p. 100 et à SO_2H_4 10 p. 100) répondait le mieux à l'objectif recherché. Nous nous sommes alors limités à l'étude de la durée de l'hydrolyse par SO_2H_4 5 p. 100, dont nous rapportons ici les résultats.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Principes des méthodes.

La figure 1 résume les principaux traitements de la méthode de fractionnement étudiée.

Nous avons traité une quantité importante (30-35 g) de chacun des échantillons étudiés par l'eau tiède, puis par le mélange alcool-benzène. Ces deux traitements ont extraits de 22 à 52 p. 100 de la matière sèche (tableau 2) dont la totalité des glucides cytoplasmiques (sucres-fructosanes), les matières grasses et une fraction importante de matières azotées, variant de 30 à 65 p. 100 suivant les échantillons (tableau 4). Les résidus membranaires obtenus contiennent les constituants cytoplasmiques non extraits, principalement des matières azotées, et la totalité des membranes à l'exception d'une partie des substances pectiques.

Des fractions de ce résidu membranaire ont été hydrolysées par SO_4H_2 5 p. 100 (P/V) pendant six durées différentes : 1-2-3-4-6 et 10 heures. Les sucres provenant des hémicelluloses et des sub-

stances pectiques ont été dosés, d'abord globalement par le pouvoir réducteur des hydrolysats 5 p. 100, puis individuellement après séparation chromatographique sur papier.

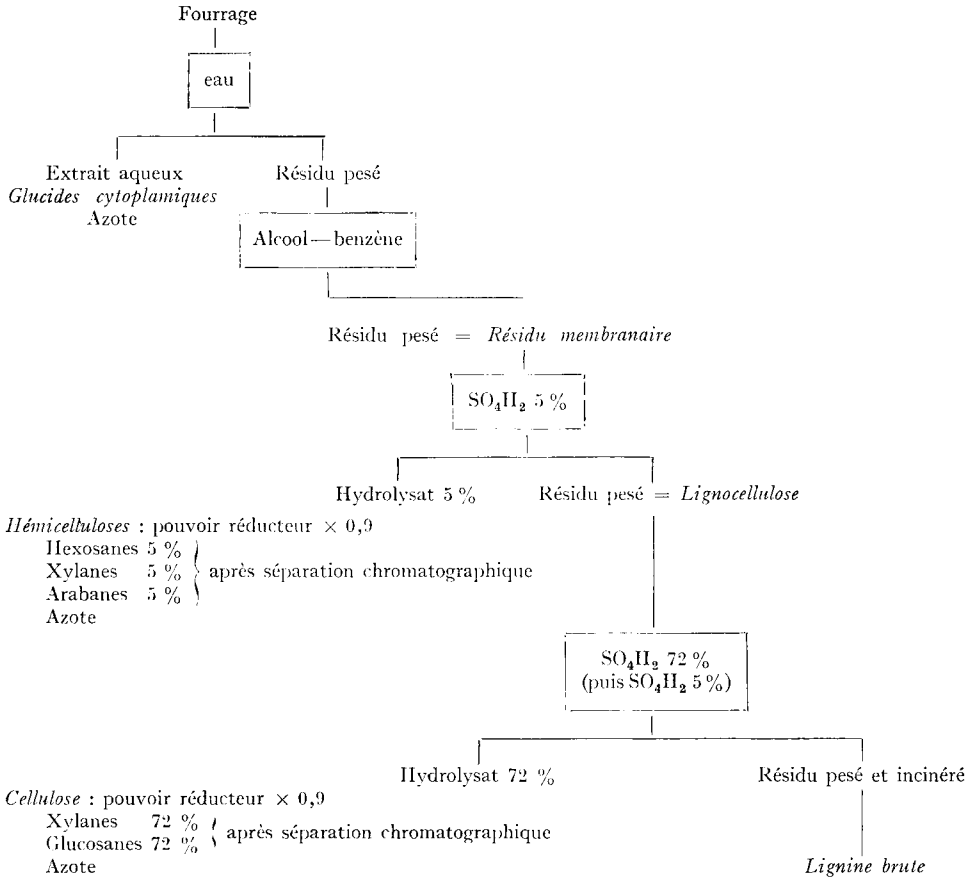


FIG. 1. — Schéma résumant le fonctionnement du fourrage et les définitions des constituants déterminés.

Dans chaque cas, le résidu de l'hydrolyse a été séché, pesé, puis hydrolysé par SO₄H₂ 72 p. 100 (P/P) qui a extrait la cellulose et les hémicelluloses restantes. Leurs sucres ont été dosés d'abord globalement par le pouvoir réducteur de l'hydrolysats 72 p. 100 puis individuellement comme dans le cas des hydrolysats 5 p. 100.

Choix des fourrages.

Nous avons voulu étudier des échantillons de plantes fourragères aussi nombreux et divers que possible, pour voir s'ils avaient un comportement semblable à l'hydrolyse. S'il en était ainsi, la méthode de fractionnement commune à tous ces échantillons, aurait les plus grandes chances d'être satisfaisante pour la majorité des fourrages utilisés sous nos climats.

Nous avons donc choisi des feuilles et des tiges des principales graminées et légumineuses fourragères prélevées à différents stades du premier cycle de croissance : luzerne (*Medicago sativa*), ray grass anglais (*Lolium perenne*), dactyle (*Dactylis glomerata*), fétuque des prés (*Festuca pratensis*). Le tableau 2 en donne la liste, les dates de récolte, ainsi que certains caractères botaniques et chimiques.

L'étude complète de la durée de l'hydrolyse par SO₄H₂ 5 p. 100 a été réalisée sur 5 tiges et 5 feuilles de luzerne, 2 tiges et 4 feuilles de ray grass, 1 tige et 1 limbe de dactyle, 1 tige et 1 limbe de

fétuque des prés. Sur une partie de certains de ces échantillons, des études annexes ont porté sur l'influence du mode de dessiccation, de la méthode d'extraction des glucides cytoplasmiques et de l'extraction des substances pectiques.

TABLEAU 2

Origine et caractéristiques des échantillons étudiés

Caractéristiques de la plante			Échantillons		Composition des échantillons en % de la matière sèche				
Espèce	Date de la coupe	Cycle n°	Nature	% dans la M. S. de la plante	Matières azotées	Extrait aqueux	Extrait alcool-benzène	Résidu membranaire	
Luzerne.....	24 avril	1955	1	Feuilles..	72	29,6	44,5	7,7	47,8
				Tiges ...	28	20,1	38,8	3,7	57,5
Luzerne.....	15 Mai	1955	1	Feuilles..	47	32,3	37,1	7,9	55,0
				Tiges ...	53	13,3	29,9	3,1	67,0
Luzerne.....	3 Juin	1955	1	Feuilles..	36	30,2	37,7	10,1	52,2
				Tiges ...	64	11,4	21,2	3,6	75,2
Luzerne	30 Juin	1955	1	Feuilles..	32	27,0	43,1	7,9	49,0
				Tiges ...	68	9,1	18,4	3,8	77,8
Luzerne.....	9 Septembre	1955	2	Feuilles..		25,1	43,6	6,1	50,3
				Tiges ...		9,7	24,3	2,0	73,7
Ray grass anglais.	19 Avril	1956	1	Feuilles..	99	17,9	46,5	5,6	47,9
Ray grass anglais.	4 Mai	1956	1	Feuilles..	94	11,8	48,5	4,3	47,2
Ray grass anglais.	17 Mai	1956	1	Feuilles..	64	8,3	45,1	3,8	51,1
				Tiges ...	36	6,2	43,1	2,4	54,5
Ray grass anglais.	13 Juin	1956	1	Feuilles..	28	8,3	31,5	4,4	64,1
				Tiges ...	72	5,8	32,7	2,6	64,7
Fétuque des prés .	27 Avril	1957	1	Limbes ..	55	23,9	38,5	5,4	56,1
Fétuque des prés .	9 Juin	1957	1	Tiges ...	50	5,0	24,4	1,2	74,4
Dactyle	27 Avril	1957	1	Limbes ..	67	32,5	34,0	8,3	57,7
Dactyle	9 Juin	1957	1	Tiges ...	40	5,4	23,2	1,7	75,1

Enfin, pour permettre une meilleure comparaison statistique, nous avons soumis à des hydrolyses pendant 3 heures et 4 heures seulement, d'autres échantillons de tiges, gaines et limbes de dactyle et de fétuque ainsi que 10 échantillons de ray grass anglais entiers et 4 échantillons d'herbe mixte de pâture.

Récolte et traitements préliminaires des échantillons.

Tous les fourrages utilisés pour étudier la cinétique de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 (tableau 2) ont été récoltés par beau temps, dans le milieu de la journée, immédiatement congelés et ultérieurement déshydratés sous vide, sans avoir été décongelés. C'est sur le fourrage deshydraté que nous avons séparé les feuilles et les tiges dans le cas de la luzerne et du ray grass, les limbes, les gaines et les tiges dans le cas du dactyle et de la fétuque.

Les échantillons obtenus ont été broyés puis soumis à trois extractions successives par l'eau au bain-marie à 40° ; cette température a été choisie parce qu'elle est voisine de celle du rumen (cf. JARRIGE 1961). Le liquide a été décanté entre chaque extraction ; le résidu transféré sur le filtre après la troisième extraction, a été lavé, desséché à l'étuve à 70°, pesé puis dégraissé au Soxhlet par le mélange alcool-benzène (2 : 1) pendant 16 heures.

Hydrolyses acides.

Pour chacune des durées d'hydrolyse étudiées (1, 2, 3, 4, 6 et 10 heures comptées à partir du début de l'ébullition) trois prises d'environ 300 mg de résidu membranaire ont été hydrolysées par 60 cc de SO_2H_4 5 p. 100 (P/v) (20 cc par 100 mg de produit). Les hydrolyses ont été réalisées à l'ébul-

lition sous reflux dans des Erlenmeyers à col rodé de 300 cc placés dans un bain d'huile (120°) ; quelques gouttes d'alcool octylique ont été ajoutées mais elles n'ont pas toujours empêché la formation de mousse dans le cas des feuilles de luzerne.

Les hydrolysats ont été filtrés sur des Buchners garnis d'une rondelle tarée de papier filtre sans cendres ; le résidu a été entraîné et lavé plusieurs fois par de petites quantités d'eau et séché à l'acétone. Il a été déshydraté à l'étuve, pesé, séparé du papier filtre et transféré dans un petit bécber de 30 cc ou il a été hydrolysé par de l'acide sulfurique 72 p. 100 (P/P) (2 cc p. 100 mg de résidu) à la température de la pièce pendant 4 heures. On a pris soin d'écraser complètement les particules de résidu au cours de la digestion. L'hydrolysat a été ensuite transféré dans un Erlenmeyer à col rodé, étendu par de l'eau distillée de façon à amener la concentration de l'acide sulfurique à environ 5 p. 100 (P/V) et maintenu à l'ébullition sous reflux pendant 3 heures.

Comme précédemment, la filtration a été opérée sur un buchner garni d'une rondelle de papier sans cendres ; le résidu lavé a été séché à l'étuve, pesé, puis calciné au four à 550° pendant 2 heures.

Traitements des hydrolysats.

Pour chaque durée d'hydrolyse de chacun des résidus, nous avons donc eu 3 hydrolysats 5 p. 100 et 3 hydrolysats 72 p. 100. Une partie de chacun d'eux (50 cc sur 200 cc) a été neutralisée par Na OH au pH mètre. Nous en avons déterminé, le pouvoir réducteur par la méthode iodométrique de SOMOGYI (1952).

Nous en avons, d'autre part, mélangé des fractions neutralisées égales de façon à faire l'analyse chromatographique d'un seul hydrolysat 5 p. 100 et d'un seul hydrolysat 72 p. 100 pour chaque essai. Chaque mélange a été évaporé dans des capsules à l'étuve à vide (température 40°) et les sucres extraits du résidu par de l'alcool 95 p. 100 ; la solution alcoolique a été filtrée puis évaporée à son tour et le mélange de sucres dissous par quelques cc d'eau bidistillée et filtré.

Les sucres ont été séparés sur papier Arches 302 par le mélange acétate d'éthyle (3), acide acétique (1), eau (3) (JERMYN et ISHERWOOD 1949). Les spots (en double ou en triple pour chaque mélange) ont été localisés par la révélation de bandes témoins par l'oxalate d'aniline à l'étuve à 105-110°. Nous avons découpé séparément les bandes correspondant au xylose, à l'arabinose, au glucose des hydrolysats 72 p. 100 et au glucose + galactose des hydrolysats 5 p. 100. Le solvant utilisé ne sépare pas suffisamment le glucose du galactose, ce qui n'a pas une très grande importance dans notre étude, car les galactanes sont peu abondants dans les fourrages (GAILLARD 1958) et rapidement extraits par l'acide 5 p. 100. Par contre, ce solvant présente l'avantage de séparer de façon rapide et satisfaisante le xylose de l'arabinose d'une part, l'arabinose des hexoses d'autre part.

Les sucres séparés ont été dosés par la méthode colorimétrique de NELSON-SOMOGYI, 1952 ; les lectures ont été faites au colorimètre Lumetron Photovolt (490), une courbe témoin de chaque sucre (xylose-arabinose-glucose) étant établie à chaque série. Pour exprimer la teneur de chaque sucre en pourcentage de la matière sèche du fourrage, nous avons admis que :

— les proportions relatives de chaque sucre après séparation chromatographique sont les mêmes que dans l'hydrolysat, en d'autres termes que les différents sucres subissent des pertes relatives semblables au cours des différentes opérations (concentration, extraction, filtration, chromatographie, élution, etc...).

— les sucres sont les seuls constituants réducteurs de chaque hydrolysat.

Calcul et expression des résultats.

Les tableaux 10 à 19 contiennent les résultats détaillés des hydrolyses de chaque échantillon. Les figures 3 à 6 donnent les moyennes des échantillons de chacun des types de fourrages : 5 tiges de luzerne, 5 feuilles de luzerne, 2 tiges de ray grass anglais, 4 feuilles de ray grass anglais (limbes et gaines non séparés), 2 limbes de dactyle et fétuque des prés, 2 tiges de dactyle et fétuques des prés.

Voici la définition de tous les termes utilisés, exprimés en pourcentage de la matière sèche de l'échantillon (et non du résidu membranaire) :

— résidu membranaire : résidu obtenu après extraction du fourrage par l'eau, puis par le mélange alcool-benzène ;

— lignocellulose : résidu sec de l'hydrolyse par l'acide sulfurique 5 p. 100 ; il n'a pas été calciné puisqu'il a été repris pour l'hydrolyse 72 p. 100 ; il contient donc des matières minérales ;

— lignine : résidu sec de l'hydrolyse par l'acide sulfurique 72 p. 100 (suivie de la post-hydrolyse par SO_2H_4 5 p. 100) déduction faite des cendres obtenues par calcination à 550° : il s'agit donc de la lignine brute contenant des résidus azotés.

— hémicelluloses : pouvoir réducteur de l'hydrolysat 5 p. 100 exprimé en glucose et multiplié par le facteur 0,9 admis par la plupart des auteurs ;

— cellulose : pouvoir réducteur de l'hydrolysat 72 p. 100, exprimé en glucose et multiplié par le facteur 0,9 ;

— xylanes : $0,9 \times$ teneur en xylose de chaque hydrolysat ;

— arabanes : $0,9 \times$ teneur en arabinose de l'hydrolysât 5 p. 100 ;
 — hexosanes 5 p. 100 : $0,9 \times$ teneur en (glucose + galactose) de l'hydrolysât 5 p. 100 ;
 — glucosanes 72 p. 100 : $0,9 \times$ teneur en glucose de l'hydrolysât 72 p. 100 ; il correspond à la cellulose vraie.

Il est important de souligner que nous employons le terme d'hémicelluloses dans un sens très particulier : il désigne l'ensemble des polysaccharides extraits par SO_4H_2 5 p. 100 et mesuré par le pouvoir réducteur de l'hydrolysât ($\times 0,9$). Ces polysaccharides extraits proviennent simultanément des hémicelluloses proprement dites et des substances pectiques (sauf mention spéciale) et devraient être plutôt appelés polysaccharides non cellulosiques. Nous avons préféré le terme d'hémicelluloses parce qu'il est plus facile à employer et que les substances pectiques sont très peu importantes dans le cas des graminées. Notons enfin que cette estimation des hémicelluloses à partir du pouvoir réducteur de leur hydrolysât présente un certain nombre d'insuffisances théoriques et analytiques qui seront discutées plus loin.

RÉSULTATS

Lignocellulose et lignine.

Pour comparer l'évolution de la lignocellulose des différents types de fourrages, en fonction de la durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100, nous l'avons exprimée dans la figure 2 en pourcentage du résidu membranaire.

On constate ainsi que la majeure partie de la matière sèche hydrolysable est extraite au cours de la première heure ; la lignocellulose représente alors 55 à 65 p. 100 du résidu membranaire dans les tiges, 45 à 50 p. 100 dans les feuilles de luzerne

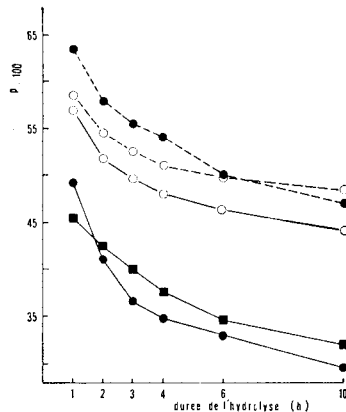


Fig. 2 — Influence de la durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 sur la teneur en lignocellulose (valeurs exprimées en pourcentage du résidu membranaire.)

- feuilles de luzerne non dépectinisées. ○---○ tiges de ray grass anglais.
- tiges de luzerne non dépectinisées. ■---■ limbes de graminées.
- feuilles de ray grass anglais.

et les limbes de graminées. Elle continue à diminuer au cours des heures suivantes mais à une vitesse décroissante ; elle diminue cependant plus vite chez les feuilles et les tiges de luzerne que chez les tiges de graminées, les limbes et les feuilles de graminées ayant un comportement intermédiaire.

Malgré ces différences entre familles dans la vitesse d'hydrolyse, il est intéressant de noter qu'on obtient des valeurs du même ordre (toujours rapportées au résidu membranaire) pour un organe donné, indépendamment de la famille. Ainsi, par exemple, les lignocelluloses obtenues après une hydrolyse de 3 heures sont de :

- 34 à 40 p. 100 dans les feuilles de luzerne ;
- 37 à 44 p. 100 dans les limbes de graminées ;
- 50 à 60 p. 100 dans les tiges de luzerne ;
- 52 à 55 p. 100 dans les tiges de graminées (dactyle -fétuque et ray grass).

Pour l'ensemble des 20 échantillons, la teneur en lignine brute diminue en moyenne quand la durée de l'hydrolyse 5 p. 100 augmente : exprimée en pourcentage des valeurs 1 heure, elle est de 93,4-90,4-90,6-85,6 et 83,4 p. 100 respectivement au bout de 2, 3, 4, 6 et 10 heures. La diminution est plus élevée au cours de la 2^e heure et au-delà de 4 heures, mais relativement faible entre 2 et 4 heures. Elle varie beaucoup d'un échantillon à l'autre dans son amplitude et dans sa régularité, comme le montre l'examen des résultats détaillés. Elle est sensiblement plus élevée et plus régulière pour les luzernes que pour les graminées. Les lignines correspondant à une hydrolyse de 3 heures sont ainsi de l'ordre de :

- 85 à 90 p. 100 pour les feuilles et tiges de luzerne ;
- 95 à 100 p. 100 pour les feuilles et limbes de graminées ;
- 85 à 90 p. 100 pour les tiges de graminées.

La fraction hémicellulose et ses constituants.

La quantité d'hémicelluloses, c'est à dire des polysaccharides extraits par l'acide sulfurique 5 p. 100, augmente avec la durée d'hydrolyse suivant une loi curvilinéaire. Elle augmente de façon très importante chez la luzerne et ceci jusqu'à la 10^e heure : elle présente alors des valeurs moyennes égales à 158 p. 100 des valeurs 1 heure dans le cas des feuilles (figure 4), à 177 p. 100 dans celui des tiges (figure 3).

Elle présente une augmentation plus limitée chez les graminées, plus particulièrement dans les tiges (figures 5 et 6) ; elle atteint au bout de 4 à 6 heures un maximum de 5 à 20 p. 100 supérieur à la valeur 1 heure ; elle diminue ensuite soit très lentement (feuilles de ray grass) soit rapidement (tiges de dactyle et de fétuque). Toujours rapportées à la valeur 1 heure, les teneurs en hémicelluloses obtenues après une hydrolyse de 3 heures sont de 130 à 140 p. 100 pour les luzernes et de 105 à 115 p. 100 pour les graminées.

Les hydrolysats de cette fraction hémicelluloses contiennent toujours quatre sucres : xylose, arabinose, glucose et galactose que nous avons dosés. En outre, nous avons souvent observé sur le chromatogramme de légers spots que nous n'avons pas identifiés : en avant du xylose (méthyl pentoses?), entre l'arabinose et le glucose (mannose?), entre le galactose et la ligne de départ. Ces derniers spots correspondent sans doute à des produits d'hydrolyse incomplète des xylanes contenant des unités uroniques et ont été fréquents dans les hydrolysats 1 heure et 2 heures, plus spécialement dans ceux des dactyles et des fétuques.

La composition de la fraction hémicelluloses extraite évolue avec la durée de l'hydrolyse (figure 7) parce que les différents polysaccharides sont hydrolysés à des vitesses variables. Chez tous les échantillons les arabanes sont en quantité relativement faible, de l'ordre de 2 à 3 p. 100 de la matière sèche. Ils sont hydrolysés en majeure partie au cours de la première heure ; par rapport à cette valeur, ils présentent en moyenne un maximum au bout de 6 heures dans les feuilles de luzerne (124 p. 100), de 4 heures dans les tiges de luzerne (117 p. 100). Chez les graminées, ils présentent au cours des trois premières heures des concentrations du même ordre avec un maximum

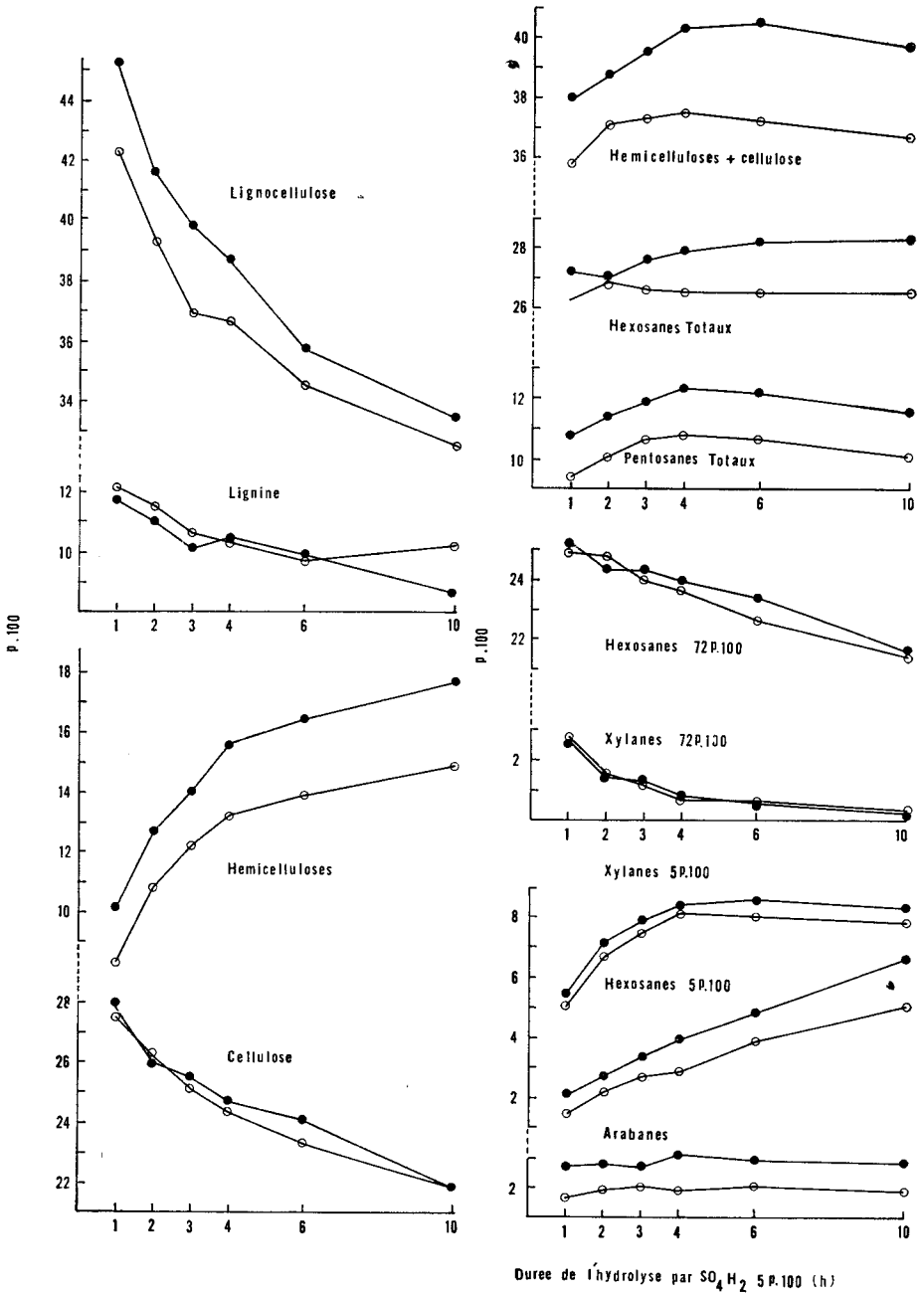


FIG. 3 — Tiges de luzerne : influence de la durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 sur les différentes fractions de la membrane (moyenne des valeurs de 5 échantillons exprimées en p. 100 de la matière sèche)

● — sans extraction préalable des substances pectiques.
 ○ — après extraction préalable des substances pectiques.

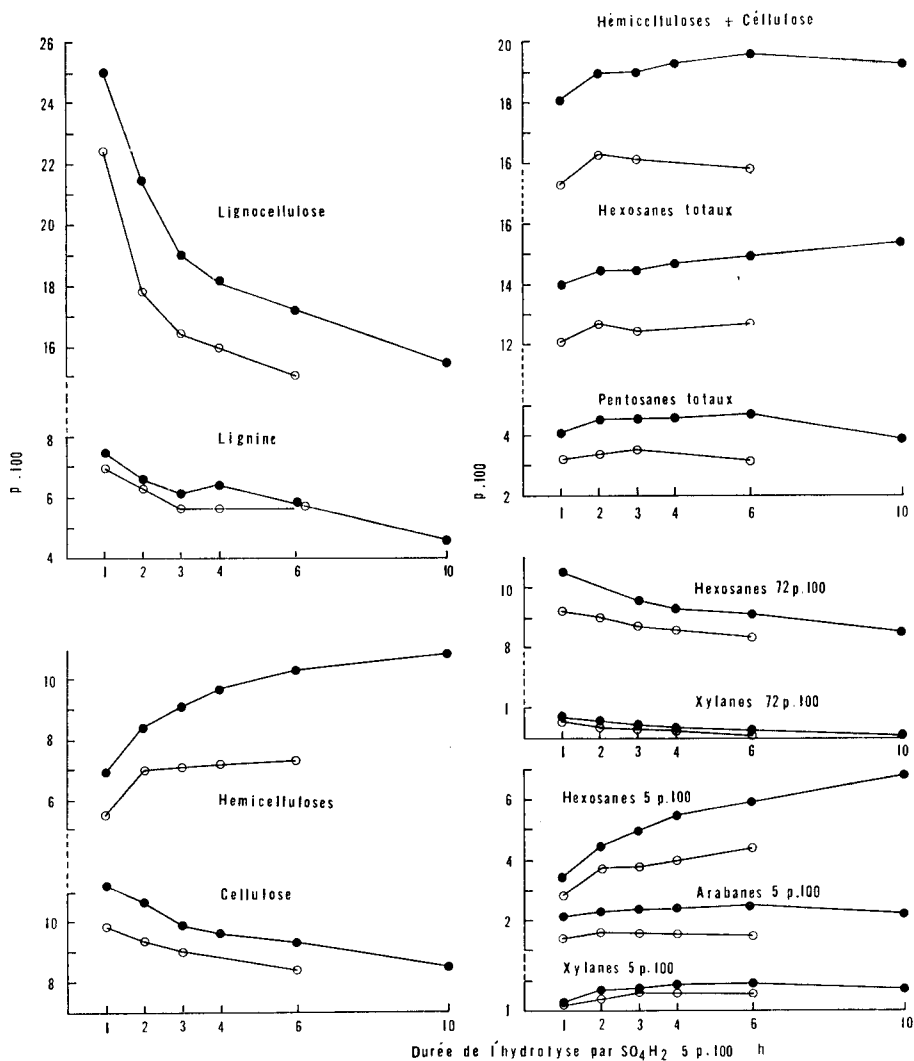


FIG. 4 — Feuilles de luzerne : influence de la durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 sur les différentes fractions de la membrane (moyenne des valeurs de 5 échantillons exprimées en p. 100 de la matière sèche.)

● — ● sans extraction préalable des substances pectiques.
 ○ — ○ après extraction préalable des substances pectiques.

à 3 heures (103 à 107 p. 100) et diminuent ensuite sensiblement. On observe aussi des variations importantes entre les échantillons à l'intérieur de chaque famille. Il faut souligner cependant que l'estimation de l'arabinose est entachée d'une erreur relative plus importante que celle des autres sucres.

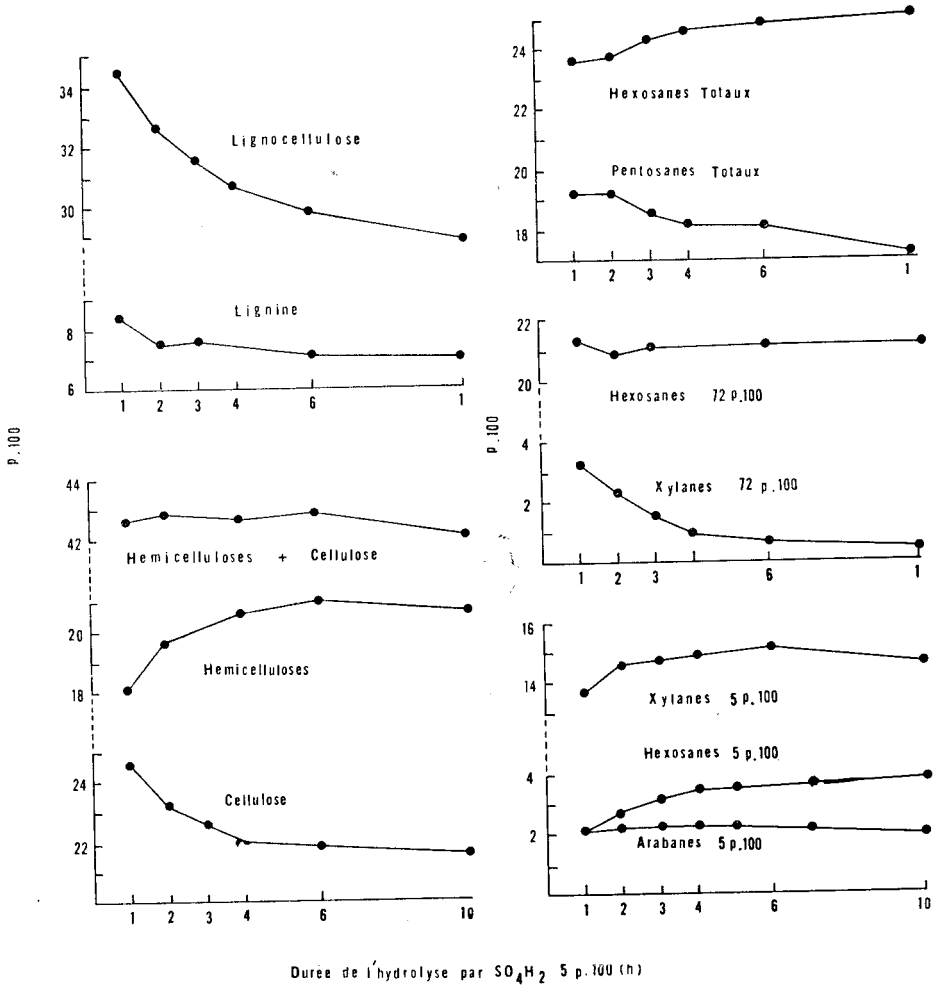


FIG. 5 — Tiges de ray grass anglais : influence de la durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 sur les différentes fractions de la membrane (moyenne des valeurs de 2 échantillons exprimées en p. 100 de la matière sèche.)

La quantité de xylanes obtenue en fonction de la durée de l'hydrolyse évolue également de façon très différente chez les luzernes (non dépectinisées) et les graminées. Elle augmente rapidement chez les luzernes et atteint au bout de 6 heures un maximum égal à 160 p. 100 et à 155 p. 100 de la valeur 1 heure, respectivement pour les feuilles et pour les tiges ; elle diminue ensuite entre 6 heures et 10 heures beaucoup plus nettement dans les feuilles que dans les tiges. Chez les graminées, au contraire, les xylanes présentent une augmentation beaucoup plus limitée : 10 à 15 p. 100

pour le ray grass, 5 p. 100 pour la fétuque, au bout de 4 à 6 heures dans les deux cas. Mieux, les xylanes diminuent avec la durée de l'hydrolyse dans le cas des tiges et des limbes de dactyle. Ils diminuent d'ailleurs chez tous les échantillons de graminées entre 6 et 10 heures, plus particulièrement pour les limbes et tiges de dactyle et de fétuques : ils présentent alors au bout de 10 heures des valeurs égales à 75 à 80 p. 100 des valeurs 1 heure.

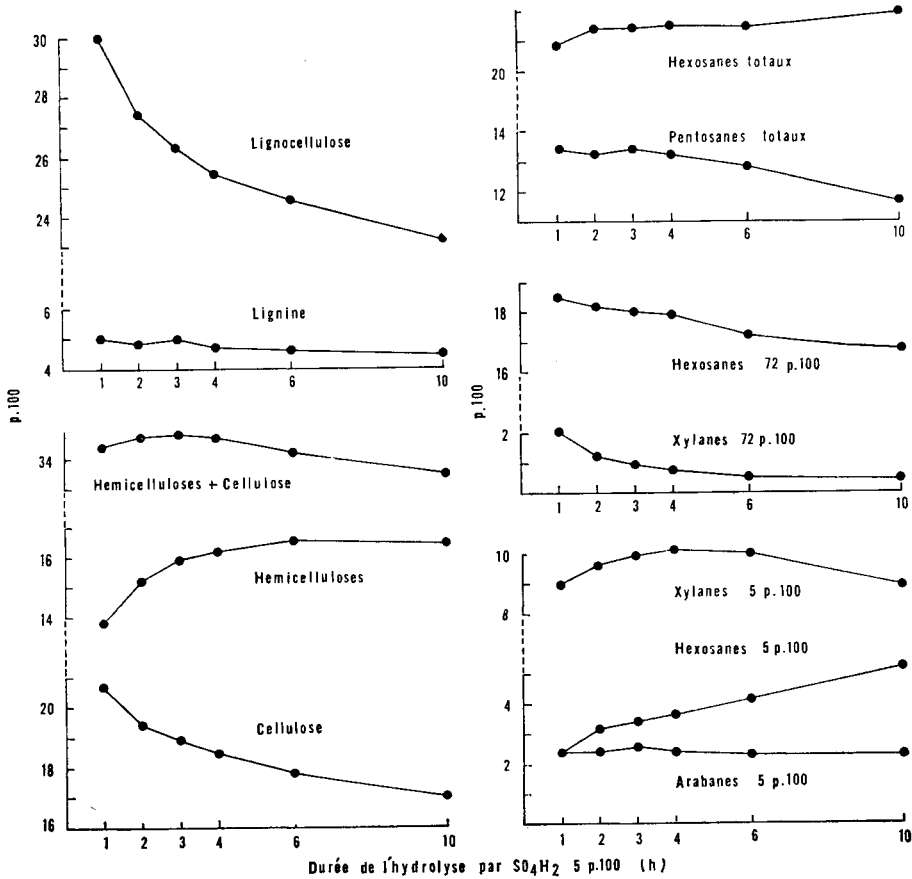


FIG. 6 — Feuilles de ray grass anglais : influence de la durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 sur les différentes fractions de la membrane (moyenne des valeurs de 4 échantillons exprimées en p. 100 de la matière sèche).

La quantité d'hexosanes augmente avec la durée de l'hydrolyse chez tous les échantillons, suivant une loi grossièrement curvilinéaire. L'augmentation relative est approximativement du même ordre pour les feuilles de luzerne, les feuilles (ou limbes) et les tiges de graminées, mais beaucoup plus élevée pour les tiges de luzerne. En p. 100 des valeurs 1 heure, les hexosanes 10 heures sont de 196, 289, 213 et 165 p. 100 respectivement pour les feuilles et les tiges de luzerne, les feuilles et les tiges de graminées.

L'évolution du pourcentage d'hémicelluloses avec la durée d'hydrolyse est essen-

tiellement la résultante de l'évolution des xylandes et de celles des hexosanes, celle des arabanes étant quantitativement peu importante. Les hémicelluloses augmentent constamment dans le cas des feuilles et tiges de luzerne parce que les hexosanes augmentent constamment et que les xylandes augmentent pendant les six premières heures

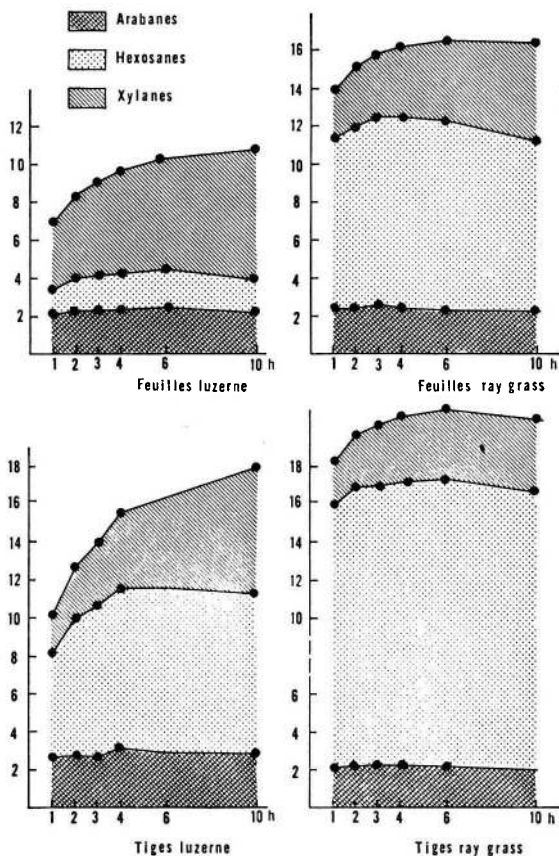


FIG. 7 — Influence de la durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p.100 sur la composition de la fraction hémicelluloses.

et diminuent ensuite très peu. L'évolution des hémicelluloses des graminées traduit avant tout celle des xylandes qui sont proportionnellement beaucoup plus importants que chez les légumineuses (cf. figure 7) ; elle passe donc par un maximum entre 4 heures et 6 heures et diminue ensuite parce que l'augmentation des hexosanes est plus faible que la diminution des xylandes.

La fraction cellulose et ses constituants.¹

Chez tous les échantillons étudiés, la fraction cellulose extraite par SO_4H_2 72 p. 100 diminue quand la durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 augmente. Outre le glucose, elle contient des traces de mannose et une quantité variable de xylose ; de plus, elle a présenté en général des traces d'arabinose dans les feuilles et

les tiges de ray grass, de dactyle et de fétuque après une hydrolyse 5 p. 100 de 1 heure à 3 heures.]

Le xylose diminue très rapidement, suivant une loi curvilinéaire assez semblable pour les différents échantillons : les valeurs 3 heures sont environ deux fois plus faibles que les valeurs 1 heure et les valeurs 10 heures, 5 à 10 fois plus. Après 10

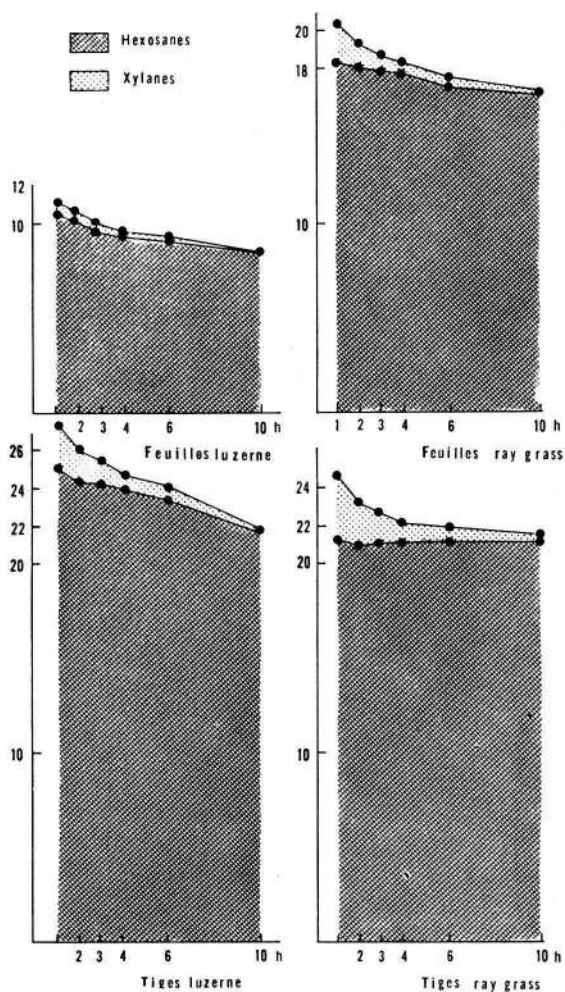


FIG. 8 — Influence de la durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 sur la composition de la fraction cellulosique.

heures d'hydrolyse 5 p. 100, les hydrolysats 72 p. 100 des feuilles de luzerne ne contiennent que des traces de xylose, décelables sur les chromatogrammes mais trop faibles pour être dosées.

Le glucose, au contraire, présente une diminution sensiblement linéaire et limitée. Celle-ci est plus faible dans les tiges que dans les feuilles ou les limbes correspondants ; elle est pratiquement nulle pour les tiges de ray grass, mais sensible dans celles de luzerne et de fétuque. De même, elle est plus faible dans les feuilles de ray grass que ;

dans celles de luzerne et de dactyle. Les différences augmentent avec la durée d'hydrolyse, mais sont déjà très sensibles au bout de 3 heures : 96 et 99 p. 100 pour les feuilles et les tiges de ray grass, 91 et 96 p. 100 pour les feuilles et les tiges de luzerne (en p. 100 des valeurs 1 heure).

Cette évolution différente du xylose et du glucose de l'hydrolysât 72 p. 100 entraîne une modification de la composition de la cellulose (figure 8) ; la proportion de xylose y diminue rapidement et n'est en moyenne que de 5 p. 100 au bout de 3 heures, les valeurs étant bien groupées (1,7 à 7,6).

Quantité totale et répartition des polysaccharides.

En fonction de la durée de l'hydrolyse 5 p. 100, la quantité totale de polysaccharides extraite par les deux hydrolyses successives (hémicelluloses + cellulose) évolue de façon différente suivant les fourrages (figures 3 à 6). Elle augmente sensiblement chez la luzerne et atteint un maximum au bout de 6 heures : en moyenne 109 p. 100 et 107 p. 100 des valeurs 1 heure, respectivement pour les feuilles et les tiges. Elle demeure remarquablement constante pendant ces six premières heures dans le cas des feuilles et des tiges de ray grass, puis diminue ensuite sensiblement comme chez les luzernes. Enfin, elle diminue chez les tiges et les limbes de graminées et de dactyle, de façon plus accentuée à partir de 3 heures.

Ces variations traduisent avant tout celles des xylanes totaux (tableau 6). Ceux-ci présentent entre 2 heures et 6 heures des valeurs égales à 110-115 p. 100 des valeurs 1 heure dans les feuilles et les tiges de luzerne ; ils diminuent ensuite, surtout dans les feuilles. A l'opposé, ils diminuent continuellement dans les limbes et les tiges de dactyle et de fétuque, surtout entre 4 heures et 10 heures ; ils présentent au bout de 10 heures des valeurs égales à 65-70 p. 100 des valeurs 1 heure, ce qui traduit une destruction d'environ un tiers. La destruction est beaucoup plus lente dans les tiges de ray grass et surtout dans les feuilles : chez ces dernières elle ne commence qu'après la 4^e heure.

La quantité d'hexosanes totaux varie beaucoup moins que celle des xylanes totaux en fonction de la durée de l'hydrolyse 5 p. 100. Elle augmente de façon lente, mais régulière, dans les feuilles et tiges de luzerne et de ray grass ; elle demeure sensiblement constante dans les limbes et tiges de dactyle et fétuque, mais diminue au-delà de 6 heures. Les valeurs atteintes au bout de 10 heures sont en moyenne de 110 p. 100 pour les feuilles de luzerne, 105 p. 100 pour les tiges de luzerne, les feuilles et tiges de ray grass, 95 p. 100 pour les limbes et les tiges de dactyle et fétuque.

La proportion des xylanes totaux qui est extraite par l'acide 5 p. 100 augmente avec la durée de l'hydrolyse, mais à une vitesse décroissante, beaucoup plus élevée au cours des quatre premières heures. Par ailleurs, elle augmente plus pour les luzernes que pour les graminées (figure 9 a) : l'hydrolyse 1 heure n'extrait en effet que 65 à 70 p. 100 des xylanes des feuilles et tiges de luzerne, au lieu de 80 à 89 p. 100 pour les feuilles et tiges de ray grass de fétuque et de dactyle. Au bout de 10 heures, cette proportion dépasse 95 p. 100 pour tous les fourrages et se rapproche de 100 p. 100 pour les feuilles de luzerne.

La proportion des hexosanes totaux qui sont hydrolysés par l'acide 5 p. 100, augmente également avec la durée de l'hydrolyse (figure 9 b). L'augmentation est sensiblement plus rapide au cours des premières heures ; elle demeure élevée dans les feuilles et les tiges de luzerne et dans les feuilles ou limbes de graminées, mais devient

très limitée dans les tiges de graminées. Pour une durée donnée, la proportion est plus élevée dans les feuilles que dans les tiges, plus particulièrement dans le cas des luzernes. Il est intéressant de noter que pour les tiges de luzerne, la proportion d'hexo-

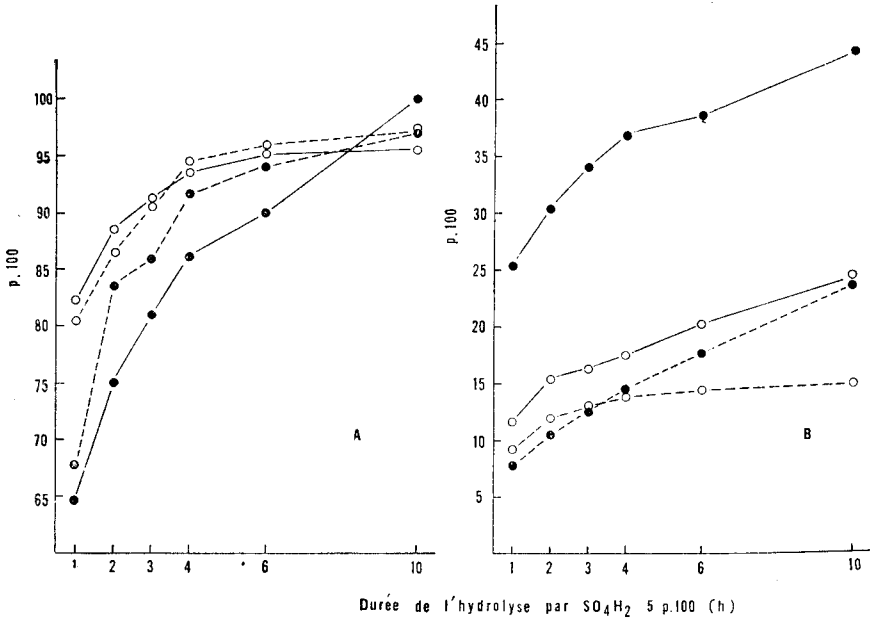


FIG. 9 — Influence de la durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 sur la proportion des xylanes totaux (fig. 9A) et des hexosanes totaux (fig. 9B) qui est extraite par SO_4H_2 5 p. 100.

- feuilles de luzerne non dépectinisées.
- tiges de luzerne non dépectinisées.
- feuilles de ray grass anglais.
- tiges de ray grass anglais.

sanes solubles dans l'acide 5 p. 100 est plus élevée au premier prélèvement et diminue ensuite au cours du développement. On note la même tendance pour les feuilles de ray grass, où elle est probablement due à l'augmentation de la proportion de gaines.

Influence de l'extraction des substances pectiques.

Les résidus membranaires dont nous venons d'étudier l'hydrolyse contenaient, en plus de la cellulose, des hémicelluloses et de la lignine, les substances pectiques insolubles dans l'eau. Celles-ci sont en quantité très faible dans les graminées, mais relativement importantes dans les légumineuses. Nous les avons donc extraites du résidu membranaire de chaque échantillon de luzerne par l'oxalate d'ammonium 0,5 p. 100 (WEIHE et PHILLIPS, 1947). Nous avons soumis les résidus ainsi obtenus aux mêmes traitements que les précédents, sauf pour certains échantillons de feuilles où nous n'avons étudié que quatre durées de l'hydrolyse 5 p. 100 : 1 heure, 2 heures, 3 heures et 6 heures.

Les figures 3 et 4 montrent que, en fonction de la durée de l'hydrolyse 5 p. 100, les résidus traités par l'oxalate ont un comportement parallèle à celui des résidus non traités. C'est notamment le cas pour la lignocellulose, la lignine, la cellulose, les hexosanes 5 p. 100, les xylanes 72 p. 100... Il faut noter, cependant, quelques différences

sensibles dans l'évolution de certains constituants. Les hémicelluloses, les xylanes 5 p. 100, les arabanes et les pentosanes totaux des feuilles dépectinisées atteignent leur maximum au bout de 2-3 heures au lieu de 6 heures pour les feuilles non dépectinisées. Il en est de même pour les hexosanes totaux, aussi bien dans les feuilles que dans les tiges : ils sont maximum au bout de deux heures dans les résidus dépectinisés, alors qu'ils augmentent de façon continue jusqu'à 10 heures dans les résidus non traités.

TABLEAU 3

*Influence de l'extraction des substances pectiques,
sur le comportement des feuilles et des tiges de luzerne.*

(moyenne de 5 échantillons dans chaque cas) ; les résultats exprimés en p. 100 de la matière sèche sont les différences entre les valeurs obtenues sur le fourrage non dépectinisé et sur le fourrage dépectinisé.)

Durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 (heures)	Tiges						Feuilles			
	1	2	3	4	6	10	1	2	3	6
Lignocellulose	2,9	2,1	2,9	1,9	1,2	0,9	2,6	3,6	2,6	2,2
Lignine	-0,4	-0,5	-0,5	0,2	0,1	-1,6	0,5	0,3	0,5	0,2
Hémicelluloses	1,98	1,89	1,73	2,57	2,41	3,10	1,42	1,69	2,12	2,98
Cellulose	0,28	-0,40	0,36	0,41	0,80	0,08	1,41	1,25	0,88	0,87
Hémicelluloses + cel- lulose	2,1	1,7	2,2	2,8	3,3	3,0	2,8	2,7	2,9	3,8
Hémicelluloses :										
Xylanes	0,39	0,47	0,41	0,29	0,61	0,58	0,09	0,31	0,14	0,38
Arabanes	1,03	0,86	0,67	1,23	0,88	0,97	0,70	0,69	0,80	1,06
Hexosanes	0,56	0,56	0,65	1,05	0,92	1,55	0,63	0,69	1,18	1,54
Cellulose :										
Xylanes	-0,07	-0,04	0,14	0,09	0,01	-0,08	0,16	0,19	0,03	0,14
Hexosanes	0,35	-0,36	0,32	0,32	0,81	0,16	1,25	1,06	0,85	0,73
Xylanes totaux	0,32	0,43	0,55	0,38	0,60	0,50	0,25	0,52	0,17	0,52
Pentosanes totaux	1,35	1,29	1,22	1,61	1,48	1,47	0,95	1,21	0,97	1,58
Hexosanes totaux	0,91	0,20	0,97	1,37	1,73	1,71	1,88	1,75	2,03	2,27

Pour mesurer l'influence de l'extraction des substances pectiques par le traitement à l'oxalate, nous avons reporté (tableau 3) pour chaque constituant la différence (valeur obtenue sans traitement à l'oxalate — valeur obtenue après traitement à l'oxalate). Ces différences nous donnent une estimation de la fraction polysaccharidique des substances pectiques (en dehors des acides uroniques). Elle représente environ 3 p. 100 de la matière sèche aussi bien dans les feuilles que dans les tiges, soit approximativement :

- 0,5 p. 100 de xylanes ;
- 1 p. 100 d'arabanes ;
- 1,5 à 2 p. 100 d'hexosanes.

Dans les échantillons non traités par l'oxalate, ces substances pectiques sont en majeure partie hydrolysées par l'acide sulfurique 5 p. 100 et se retrouvent donc dans la fraction hémicelluloses. Cette dernière est de 2 à 3 points plus élevée que dans le fourrage dépectinisé, la différence croissant avec la durée de l'hydrolyse. Il est probable cependant qu'une partie des substances pectiques n'est pas extraite par l'hydrolyse 5 p. 100, même prolongée, et se retrouve ainsi dans la fraction cellulose.

On constate, en effet, que celle-ci est sensiblement plus élevée que dans les échantillons non dépectinisés : en gros, de 0,5 point dans les tiges et de 1 point dans les feuilles, la différence provenant surtout des hexosanes et, dans une très faible mesure, des xylanes. Ce fait explique en partie pourquoi la lignocellulose est plus élevée dans les échantillons non dépectinisés, de 2 à 3 points au cours des premières heures, la différence diminuant ensuite avec la prolongation de l'hydrolyse. Par contre, la teneur en lignine semble peu modifiée par le traitement à l'oxalate d'ammonium.

Influence du mode de dessiccation.

Tous les échantillons étudiés jusqu'ici ont été congelés au moment de leur prélèvement et lyophilisés afin de conserver au mieux la composition et le comportement de la plante verte. Il était donc important de voir si la dessiccation de la plante, à l'air ou à l'étuve, modifiait son comportement à l'hydrolyse. C'est ce que nous avons étudié sur l'échantillon de luzerne prélevé en septembre ; il a été séparé en quatre fractions :

— la première a été congelée et deshydratée sous vide comme tous les échantillons étudiés ci-dessus ;

— la deuxième a été séchée au soleil ;

— la troisième a été deshydratée rapidement dans une étuve à infra-rouges.

Tous les échantillons de feuilles et de tiges séparées ainsi obtenus ont été extraits par l'eau, dégraissés et soumis au même traitement que les échantillons précédents : hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 pendant 1, 2, 3, 4, 6 et 10 heures, aussi bien avant qu'après extraction des substances pectiques par l'oxalate d'ammonium.

Nous avons réuni les résultats obtenus sur les échantillons non dépectinisés dans le tableau 4 qui permet de comparer directement les différents traitements pour chacune des durées d'hydrolyse.

Dans l'ensemble, le mode de dessiccation ne modifie pas l'évolution des constituants en fonction de la durée de l'hydrolyse 5 p. 100. C'est notamment le cas pour les hémicelluloses et leurs différents constituants, pour les pentosanes totaux, et pour la répartition des hexosanes entre deux hydrolysats. On note cependant un certain nombre de différences de détail dont voici les plus intéressantes :

— la lignocellulose est nettement plus élevée dans l'échantillon, séché à l'air que dans celui qui a été lyophilisé ; les différences maximum sont pour les tiges de 3 points (1 heure et 2 heures), pour les feuilles de 2,5 points (1 heure) ;

— la lignine est, elle aussi, plus élevée dans les échantillons séchés à l'air, surtout pour les durées d'une heure d'une part, de six et dix heures d'autre part.

— la proportion des xylanes totaux extraite par SO_4H_2 5 p. 100 est à partir de 4 heures sensiblement plus faible pour les échantillons lyophilisés ; corrélativement, la proportion de xylanes est plus élevée dans la cellulose de ces échantillons, surtout pour les feuilles. Par contre, la proportion des hexosanes totaux extraite par l'acide 5 p. 100 est plus élevée pour les échantillons lyophilisés.

Nous avons également étudié l'influence de l'ensilage aux acides (AIV) sur une quatrième partie du prélèvement de la luzerne de septembre, laquelle a été ensilée dans une cuve en grès. Après une conservation de plusieurs mois, nous avons séparé un échantillon de tiges qui a été deshydraté et soumis au même traitement que les autres échantillons. Les résultats reportés au tableau 4 montrent que les principaux groupes de constituants présentent la même évolution en fonction de la durée de

TABLEAU 4

Influence du mode de dessiccation sur l'hydrolyse des résidus membranaires des tiges et des feuilles d'une luzerne non dépectinée.

Durée hydro-lyse	Mode dessiccation	Ligno-cellulose	Lignine	Hémi-celluloses	Cellulose	Hémi-celluloses + Cellulose	Hémicelluloses			Cellulose		Pento-sanes totaux	Hexo-sanes totaux
							Xylanes	Ara-banes	Hexo-sanes	Xylanes	Glucosanes		
TIGES													
1 heure	Lymphillisation	48,3	43,7	10,1	30,1	40,2	5,9	2,4	1,8	2,9	27,2	41,2	29,0
	Air	51,6	44,7	10,2	31,2	41,4	6,8	1,8	1,6	3,0	28,2	41,6	29,8
	Infra-rouges (Ensilage)	52,3	43,8	10,0	31,4	41,4	5,7	2,6	1,7	3,6	27,8	41,9	29,5
2 heures	Lymphillisation	44,7	43,5	13,6	27,8	41,4	7,7	2,7	3,2	1,7	26,1	42,1	29,2
	Air	47,8	44,1	12,4	28,8	41,2	8,1	1,7	2,6	1,9	26,9	41,7	29,5
	Infra-rouges (Ensilage)	47,5	44,0	12,9	29,8	42,7	7,7	2,5	2,8	1,9	27,9	42,1	30,7
3 heures	Lymphillisation	43,8	42,5	14,7	27,7	42,4	9,0	2,5	3,2	1,6	26,1	43,1	29,3
	Air	45,6	42,9	14,4	27,9	42,2	8,9	2,3	3,2	1,4	26,5	42,6	29,7
	Infra-rouges (Ensilage)	46,7	43,4	14,1	29,2	43,3	8,4	3,0	2,7	1,5	27,7	42,9	30,4
4 heures	Lymphillisation	55,4	49,5	14,6	34,5	49,1	11,5	0,6	2,5	2,2	32,3	44,3	34,8
	Air	42,3	43,3	16,1	27,5	43,6	9,9	2,7	3,4	1,2	26,3	43,8	29,7
	Infra-rouges (Ensilage)	42,2	42,3	16,3	26,1	43,4	9,6	2,3	4,4	0,7	25,4	42,6	29,8
6 heures	Lymphillisation	34,0	43,0	16,2	27,0	43,2	9,1	3,1	4,0	0,7	26,3	42,9	30,3
	Air	51,7	47,2	16,0	32,5	48,5	12,4	0,5	3,1	2,1	30,4	44,3	33,5
	Infra-rouges (Ensilage)	40,6	41,8	16,3	26,4	42,7	9,1	2,2	5,0	1,2	25,2	42,5	30,2
10 heures	Lymphillisation	40,9	43,2	16,6	25,6	42,2	9,7	2,0	4,9	0,3	25,3	42,0	30,2
	Air	41,8	43,8	16,7	25,4	42,1	8,7	3,0	5,0	0,6	24,8	42,3	29,8
	Infra-rouges (Ensilage)	51,2	48,5	17,1	31,6	48,7	13,1	0,6	3,4	1,7	29,9	45,4	33,3
10 heures	Lymphillisation	36,8	40,5	17,9	23,5	41,4	9,2	2,4	6,3	0,3	23,2	41,9	29,5
	Air	39,5	43,3	17,4	25,7	43,1	9,7	1,8	5,9	0,3	25,4	41,8	31,3
	Infra-rouges (Ensilage)	38,4	43,8	17,6	24,1	41,7	9,3	2,5	5,8	0,4	23,7	42,2	29,5
		49,4	45,8	18,1	30,7	49,8	13,8	0,7	3,6	1,0	29,7	45,5	33,3

TABLEAU 4 (suite)

Durée hydrolyse	Mode dessiccation	Ligno-cellulose	Lignine	Hémi-celluloses	Cellulose	Hémi-celluloses + Cellulose	Hémicelluloses			Cellulose		Pentosanes totaux	Hexosanes totaux
							Xylanes	Ara-banes	Hexosanes	Xylanes	Glucosanes		
FEUILLES													
1 heure	LyoPhillisation	23,8	7,2	8,7	9,9	18,6	1,9	2,4	4,4	0,8	9,1	5,1	13,5
	Air	26,2	9,1	7,4	10,9	18,3	4,5	2,1	3,8	0,9	10,0	5,4	13,8
	Infra-rouges	24,3	6,8	7,3	9,6	16,9	1,3	2,1	3,9	0,6	9,0	4,0	12,9
2 heures	LyoPhillisation	20,7	6,9	9,9	9,5	19,4	2,2	2,0	4,7	0,5	8,9	4,7	14,6
	Air	21,4	7,4	8,7	10,4	19,1	1,8	2,3	4,6	0,6	9,8	4,7	14,4
	Infra-rouges	20,0	6,8	8,9	8,7	17,6	1,6	2,3	5,1	0,5	8,2	4,4	13,3
3 heures	LyoPhillisation	18,5	6,6	10,4	9,1	19,5	2,4	2,1	4,9	0,6	8,5	5,1	14,4
	Air	20,0	6,8	10,3	9,6	19,9	2,0	2,4	5,9	0,3	9,3	4,7	15,2
	Infra-rouges	19,9	6,1	9,4	8,7	18,1	1,6	2,3	5,5	0,3	8,4	4,2	13,9
4 heures	LyoPhillisation	17,2	6,3	10,7	8,7	19,4	2,1	2,4	6,2	0,4	8,2	4,9	14,5
	Air	19,4	6,0	10,3	9,6	19,9	2,1	1,9	6,3	0,3	9,3	4,3	15,6
	Infra-rouges	17,4	5,7	9,6	8,5	18,1	1,7	2,2	5,6	0,3	8,2	4,2	13,8
6 heures	LyoPhillisation	16,1	5,5	11,8	8,7	20,5	2,1	2,2	7,5	0,5	8,2	4,8	15,7
	Air	18,4	6,9	11,1	8,2	19,3	2,5	2,3	6,3	traces	8,2	4,8	14,5
	Infra-rouges	16,3	5,4	11,0	8,3	19,3	1,9	1,9	6,2	0,3	8,0	4,1	15,2
10 heures	LyoPhillisation	15,1	5,9	11,8	8,6	20,4	1,6	2,0	8,2	0,2	8,4	3,8	16,6
	Air	15,2	6,7	11,6	7,6	19,2	2,0	2,2	7,4	traces	7,6	4,2	15,0
	Infra-rouges	15,0	4,8	10,8	7,6	18,4	1,6	2,1	7,1	traces	7,6	3,7	14,7

l'hydrolyse dans l'échantillon ensilé que dans les échantillons deshydratés. Par contre, ils ont des teneurs ou des compositions différentes :

— la lignocellulose est plus élevée d'environ 10 points et la lignine d'environ 5 points ;

— les hémicelluloses ont une composition différente : la proportion de xylanes est beaucoup plus élevée au détriment des arabanes (environ 4 fois moins) et des hexosanes ;

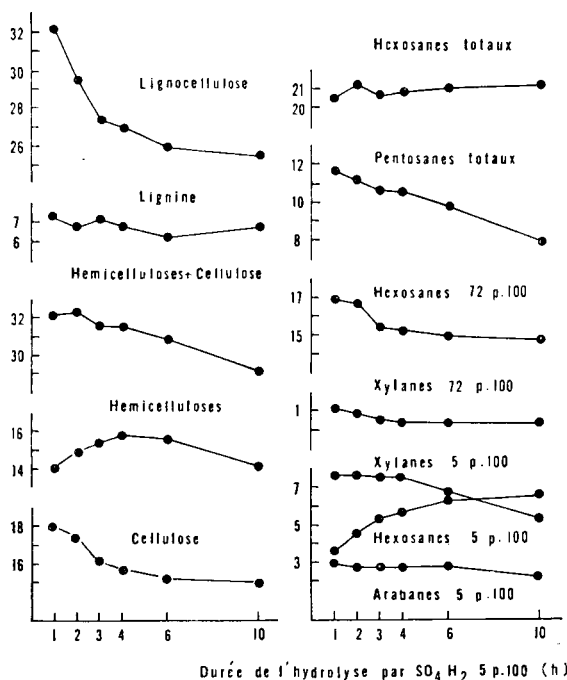


FIG. 10 — Influence de la durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 sur les différentes fractions de la membrane des limbes de graminées extraits successivement par l'alcool 80 p. 100 et par l'eau. Moyenne des valeurs de 4 échantillons exprimées en p. 100 de la matière sèche.

— la cellulose est plus élevée, l'augmentation portant à la fois sur la cellulose vraie et sur les xylanes associés.

Ces différences proviennent de deux causes : d'une part, la disparition d'une partie des constituants solubles, qui entraîne automatiquement une augmentation de la proportion des constituants membranaires ; d'autre part, des modifications des membranes comprenant une extraction importante de certains polysaccharides (arabanes et, peut-être, certains hexosanes) et un durcissement des autres qui les rend moins accessibles à l'hydrolyse.

Influence du mode d'extraction des constituants cytoplasmiques.

Pour tous les échantillons étudiés, nous avons extrait les constituants cytoplasmiques par l'eau, puis par le mélange alcool-benzène. Cependant, lorsqu'on veut fractionner les glucides cytoplasmiques on traite le fourrage d'abord par l'alcool 80 p. 100 (sucres), puis par l'eau (fructosanes). Il était donc intéressant de voir si les résidus

membranaires alcool-eau avaient le même comportement à l'hydrolyse que les résidus eau-alcool-benzène. Nous avons donc soumis à la série d'hydrolyses 1 heure — 10 heures les échantillons suivants préalablement traités par l'alcool 80 p. 100 au Waring Blandor puis par l'eau froide :

— 2 échantillons de limbes de dactyle prélevés respectivement le 27 avril et le 8 juin ;

— 2 échantillons de limbes de fétuque prélevés respectivement le 27 avril et le 8 juin ;

— 2 échantillons de tiges prélevés le 8 juin : un de fétuque et un de dactyle.

La moyenne des résultats pour les 4 limbes, est présentée dans la figure 10 ; en fonction de la durée de l'hydrolyse 5 p. 100, les constituants de ces résidus membranaires alcool-eau présentent la même évolution que ceux des résidus eau-alcool benzène. On retrouve notamment la destruction d'une fraction croissante des xylanes, alors que les hexosanes totaux demeurent sensiblement constants.

Il apparaît cependant quelques différences lorsqu'on considère seulement les deux échantillons de limbes du 27 avril et les deux échantillons de tiges du 8 juin qui, seuls, ont été soumis aux deux catégories d'extraction.

Par rapport aux résidus eau-alcool benzène, les résidus alcool-eau présentent notamment :

— des valeurs sensiblement plus faibles pour le xylose 5 p. 100 et le xylose total ;

— des valeurs plus élevées pour la proportion des hexosanes totaux qui est extraite par l'acide 5 p. 100 ;

— par voie de conséquence, une fraction hémicelluloses relativement plus pauvre en xylanes et plus riches en hexosanes et une fraction cellulose plus faible.

Il semble donc que le traitement par l'alcool 80 p. 100 ait une action limitée, mais sensible, sur les constituants membranaires : d'une part, soit il extrairait une partie des xylanes, soit il permettrait leur extraction par le traitement aqueux, soit il les rendrait plus sensibles à la dégradation par SO_2H_4 5 p. 100 ; d'autre part, il pourrait diminuer la résistance des hexosanes à l'hydrolyse par les acides dilués. Le problème se pose de savoir si ces modifications sont dues au traitement alcoolique en lui-même ou à la dilacération réalisée par Waring Blandor dans lequel ce traitement a été fait. Nous nous proposons de poursuivre sur un plus grand nombre d'échantillons cette étude de l'influence des méthodes l'extraction sur les constituants membranaires.

Hydrolyse des matières azotées.

Nous avons dosé les matières azotées sur le fourrage initial, l'extrait aqueux, l'hydrolysats 5 p. 100 et l'hydrolysats 72 p. 100 mais non sur le résidu membranaire, la lignocellulose et la lignine.

L'eau extrait une fraction importante des matières azotées totales (tableau 5) atteignant 45 p. 100 dans les tiges de ray grass et près de 60 p. 100 dans celles de luzerne. Le traitement par le mélange alcool benzène en extrait une nouvelle fraction que nous n'avons malheureusement pas mesurée.

Quand la durée de l'hydrolyse sulfurique 5 p. 100 augmente, l'azote de l'hydrolysats 5 p. 100 augmente, l'azote de l'hydrolysats 72 p. 100 diminue et la quantité totale d'azote extraite par les deux hydrolysats augmente légèrement. Les deux premières variations sont importantes, rapides pendant les 3 premières heures et plus lentes

TABLEAU 5

Pourcentages des matières azotées du fourrage extraits par l'eau, par SO_4H_2 5 p. 100 pendant 3 heures et par SO_4H_2 72 p. 100.

	Nombre d'échantillons	Eau	SO_4H_2 5 p. 100 -3 heures	SO_4H_2 72 p. 100
Feuilles de luzerne non dépectinisées	5	42,5	42,7	7,5
Tiges de luzerne non dépectinisés	5	59,6	33,2	9,9
Feuilles de ray grass	4	34,6	40,6	7,0
Tiges de ray grass	2	45,6	34,5	7,0
Ray grass entiers	13	33,2	43,9	8,4
Limbes de fétuque et de dactyle (alcool-eau)	4	54,3*	34,8	5,2

(*) Il s'agit de la proportion de l'azote total extraite par les deux traitements alcool puis eau.

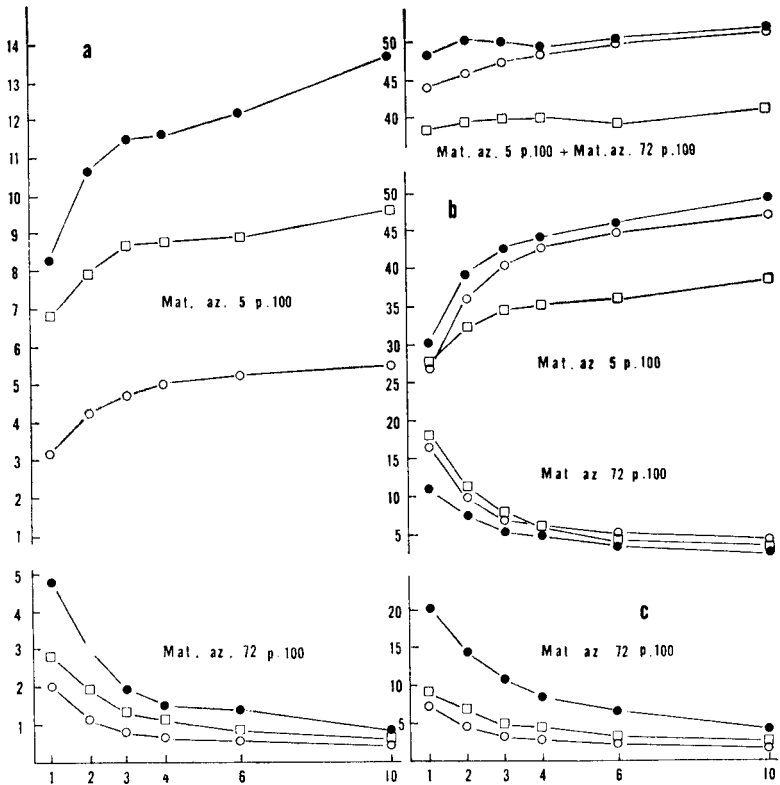


FIG. 11 — Quantités de matières azotées extraites par les hydrolyses par SO_4H_2 5 p. 100 et par SO_4H_2 72 p. 100. Valeurs exprimées en p. 100 de la matière sèche (fig. 11a), en p. 100 des matières azotées totales (fig. 11b) et en p. 100 de la lignocellulose (fig. 11c) :

● — ● feuilles de luzerne non dépectinisées. □ — □ limbes de graminées extraits par l'alcool puis l'eau.
 ○ — ○ feuilles de ray grass anglais.

ensuite ; la troisième est beaucoup plus limitée et régulière. C'est ce que montrent les figures 11, dans lesquelles nous avons exprimé les matières azotées, soit en pour-

centage de la matière sèche, soit en pourcentage des matières azotées totales. Les quantités de matières azotées extraites par SO_2H_4 5 p. 100 (toujours en p. 100 des matières azotées totales) sont pratiquement identiques dans les tiges de luzerne et les tiges de ray grass, mais systématiquement plus faibles que dans les feuilles.

Ainsi, lorsque la durée de l'hydrolyse 5 p. 100 augmente, la teneur en azote diminue rapidement dans la lignocellulose et de façon lente, mais sensible, dans la lignine.

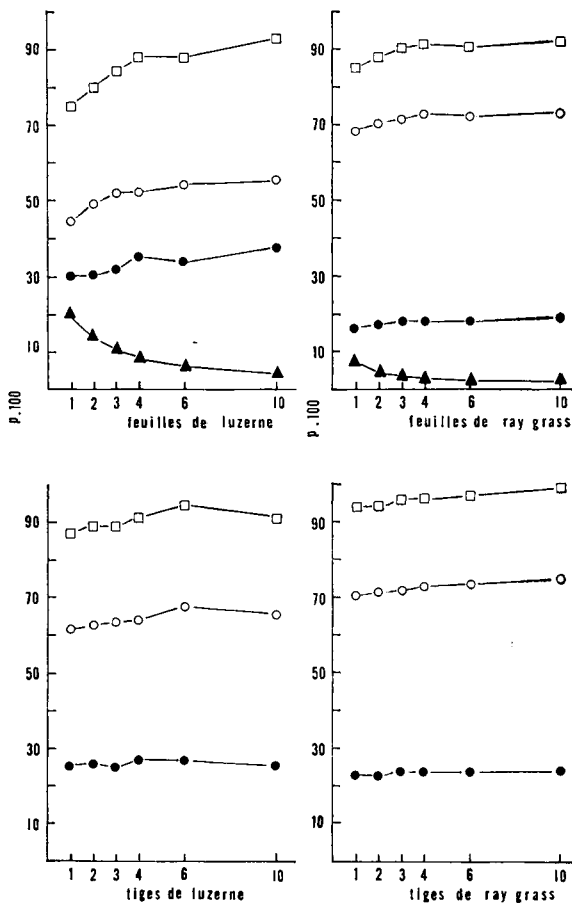


FIG. 12 — Influence de la durée de l'hydrolyse par SO_2H_4 5 p. 100 sur la composition de la lignocellulose non déminéralisée :

- cellulose.
- lignine brute.
- cellulose + lignine brute.
- ▲—▲ matières azotées extraites par SO_2H_4 72 p. 100.

Cette dernière variation explique en partie la diminution de la teneur en lignine notamment dans les feuilles de luzerne.

D'un échantillon à l'autre, il y a certaines variations dans la répartition de l'azote entre les différents extraits, mais on constate une relation inverse entre la quantité d'azote extraite par l'eau et celle extraite par SO_2H_4 . On retrouve cette même compensation dans les différences entre les traitements préliminaires pour un même fourrage. Ainsi dans les feuilles et tiges de luzerne déshydratée aux infra-rouges, l'eau

extrait nettement moins d'azote et SO_2H_4 nettement plus que dans les mêmes échantillons lyophilisés ou séchés à l'air ; cependant, la compensation est incomplète pendant les deux premières heures et la lignocellulose contient alors nettement plus de matières azotées.

Composition de la lignocellulose.

Pour tous les échantillons étudiés, nous avons calculé la composition de la lignocellulose non déminéralisée, à savoir sa teneur en lignine, en cellulose et en matière azotées, cette dernière étant estimée par défaut par les matières azotées extraites par SO_2H_4 72 p. 100. La figure 12 donne, pour les différents types de fourrage, l'évolution moyenne de cette composition en fonction de la durée de l'hydrolyse et le tableau 9 les valeurs moyennes correspondant à une hydrolyse de 3 heures.

Lorsque la durée de l'hydrolyse augmente, les proportions de cellulose et d'hexosanes augmentent ; la proportion de lignine demeure sensiblement constante, sauf dans les feuilles de luzerne où elle augmente nettement ; les proportions de xylanes, d'indéterminés (y compris les cendres) et de matières azotées diminuent. Entre 1 heure et 10 heures, la teneur en matières azotées de la lignocellulose (figure 11 c) passe de 20 à 4 p. 100 dans les feuilles de luzerne, de 7 à 2 p. 100 dans celles de ray grass, de 9 à 2-3 p. 100 dans les limbes de dactyle et de fétuque ; plus de la moitié de cette diminution est réalisée entre 1 heure et 3 heures.

Pour une même durée de l'hydrolyse 5 p. 100 et un organe donné, feuilles ou tiges, la lignocellulose des luzernes est plus riche en lignine et en matières azotées et plus pauvre en cellulose que celle des graminées. Ce fait est particulièrement net pour les feuilles de luzerne dont la teneur en lignine de la lignocellulose est beaucoup plus élevée que celle de tous les autres échantillons : cette lignine brute contient une proportion importante de matières azotées et, probablement, de certains autres constituants qui ne seraient pas extraits par SO_2H_4 72 p. 100. Par ailleurs, la proportion d'indéterminé (cendres comprises) est la plus élevée dans les limbes de graminées et dans les feuilles de luzerne, c'est-à-dire dans les organes les plus riches en constituants cytoplasmiques.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Dans le présent travail, nous avons étudié la cinétique de l'hydrolyse des membranes des plantes fourragères par SO_2H_4 5 p. 100 pour voir :

- si des échantillons aussi différents que des feuilles et des tiges de graminées et de légumineuses présentaient un comportement semblable à l'hydrolyse ;
- s'il était possible de déterminer une durée d'hydrolyse optimum permettant d'extraire la majeure partie des hémicelluloses sans dégrader la trame cellulosique ;
- s'il était possible d'en déduire des méthodes d'analyse des membranes communes aux principales plantes fourragères.

Similitude dans le comportement des différents échantillons.

1° Quand la durée de l'hydrolyse par SO_2H_4 5 p. 100 augmente, la teneur de chaque constituant des membranes présente une évolution relativement semblable chez tous les échantillons étudiés :

- la lignocellulose diminue suivant une loi curvilinéaire (figure 2),
 - la lignine brute diminue, mais de façon très lente ;
 - les hémicelluloses augmentent parce que SO_2H_4 5 p. 100 hydrolyse une proportion croissante des xylanes et des hexosanes totaux (figure 9) tandis que les arabanes demeurent approximativement constants ;
 - la cellulose présente une diminution traduisant d'abord celle des xylanes résiduels, puis celle des glucosanes ;
 - une fraction croissante des xylanes est détruite à partir des 4^e-6^e heures ;
 - la quantité d'hexosanes totaux demeure relativement constante.
- 2^o Entre les catégories d'échantillons, il existe cependant des différences dans l'amplitude des variations de certains constituants en fonction de la durée de l'hydrolyse. Elles relèvent de l'espèce, de l'organe et du traitement antérieur.

TABLEAU 6

*Comportement des xylanes dans les différentes catégories d'échantillons.
(les résultats sont exprimés en p. 100 des valeurs obtenues au bout d'une hydrolyse de 1 heure.)*

	Xylanes de l'hydrolysate 5 p. 100			Xylanes totaux		
	3 h	6 h	10 h	3 h	6 h	10 h
<i>Luzerne :</i>						
Feuilles non dépectinisées ...	148	165	144	111	113	90
Feuilles dépectinisées.....	141	137		115	95	
Tiges non dépectinisées	147	160	155	116	116	109
Tiges dépectinisées.....	155	166	160	113	115	107
<i>Ray grass :</i>						
Feuilles	110	110	99	100	97	86
Tiges	107	111	107	95	93	89
<i>Dactyles et fétuques :</i>						
Limbes.....	102	91	78	95	81	69
Tiges	103	90	80	92	77	66

Les différences entre les graminées et les légumineuses portent essentiellement sur le comportement des xylanes au cours de l'hydrolyse par SO_2H_4 5 p. 100. Les xylanes des graminées sont hydrolysés beaucoup plus rapidement que ceux de la luzerne ; chez les graminées la fraction hémicelluloses présente donc en fonction de la durée de l'hydrolyse 5 p. 100, une augmentation plus limitée que chez la luzerne (tableau 6) et la séparation entre hémicelluloses et cellulose y est meilleure (figure 7). Les xylanes des graminées subissent également une destruction plus importante que ceux des luzernes (tableau 6), et apparaissent ainsi beaucoup plus sensibles à l'action des acides. Il est probable que la destruction porte plutôt sur les xylanes eux-mêmes que sur le xylose provenant de leur hydrolyse. En effet, à l'ébullition en milieu sulfurique, le xylose est entièrement recouvré au bout de deux heures et ne subit ensuite que des pertes limitées : 3-4 p. 100 dans SO_2H_4 5 p. 100 (HARWOOD (1953) et 10 p. 100 dans SO_2H_4 2*n* (MONTREUIL et SCHEPPLER 1959) au bout de 6 heures.

L'évolution des divers constituants de la membrane en fonction de la durée de l'hydrolyse par SO_2H_4 5 p. 100 est semblable dans les tiges et dans les feuilles de la même espèce. Ce fait mérite d'être souligné car les membranes des deux organes ont

une composition très différente : celles des feuilles sont plus pauvres en xylanes et ont une proportion d'hexosanes extractibles par SO_2H_4 5 p. 100 beaucoup plus élevée (figure 9) que celles des tiges.

Le mode de dessiccation des échantillons et la méthode d'extraction de leurs constituants cytoplasmiques exercent une influence nette mais limitée sur la sensibilité des pentosanes et des hexosanes de la membrane à l'hydrolyse 5 p. 100. L'accessibilité des xylanes (xylanes 5 p. 100/xylanes totaux) semble être augmentée à la fois par le séchage à l'air et par le traitement à l'alcool 80 p. 100. Celle des hexosanes (hexosanes 5 p. 100/hexosanes totaux) est diminuée par le séchage à l'air, mais augmentée par le traitement alcoolique. Enfin, dans le seul échantillon d'ensilage étudié nous avons noté une augmentation générale de la résistance à l'hydrolyse des xylanes et des hexosanes. Dans tous les cas précédents, il s'agit de conclusions provisoires qu'il faudrait étayer sur un plus grand nombre de données.

Ces différences sont mineures si on considère qu'il s'agit d'échantillons et de traitements très différents. On peut donc admettre que la cinétique de l'hydrolyse acide des membranes est très semblable dans les feuilles et les tiges de graminées et de luzerne ; on peut espérer *a fortiori* qu'elle sera la même pour les mélanges de graminées-légumineuses que sont la majorité de nos fourrages.

Impossibilité de séparer parfaitement les hémicelluloses de la cellulose.

Dans quelle mesure d'hydrolyse par SO_2H_4 5 p. 100 permet-elle d'extraire les hémicelluloses sans dégrader la cellulose ?

Avant d'examiner ce problème, objet principal de cette étude, il est nécessaire de préciser la définition et la nature des hémicelluloses car ce terme a un sens très différent suivant les auteurs (cf. NORMAN 1937-1943 — WHISTLER et SMART 1953 a — WHISTLER et SANNELLA 1958). Au sens le plus large, que nous avons adopté, les hémicelluloses sont les polysaccharides de la membrane végétale, autre que les substances pectiques et que la cellulose, cette dernière étant définie, dans son sens le plus étroit, comme le polymère linéaire de glucose. Ces définitions demeurent théoriques car la séparation entre les hémicelluloses et la cellulose est imprécise et repose en définitive sur des différences de solubilité : les hémicelluloses sont extraites par les solutions alcalines diluées à froid ou à chaud et hydrolysables par les acides dilués à chaud. Ces hémicelluloses sont un mélange de différents types de polysaccharides, chacun d'eux pouvant se présenter à des degrés de polymérisation différents ; ce mélange varie avec le végétal et la méthode d'extraction ; selon JERMYN (1955), il peut contenir typiquement :

- a) « des glucosanes à courte chaîne, soit extraits des fibrilles de cellulose, soit existant en dehors des fibrilles dans les polysaccharides incrustants ;
- b) des polymères du xylose, de l'arabinose, du mannose, du galactose et, éventuellement, d'autres sucres ; dans la plupart des cas on ne sait pas encore si ces chaînes sont faites d'unités semblables ou d'unités différentes ;
- c) des polymères mixtes de sucres et d'acides uroniques, généralement méthylés et parfois acétylés ;
- d) des polysaccharides pectiques résiduels lorsqu'ils n'ont pas été préalablement extraits de façon complète ; la séparation des arabanes et galactanes des substances pectiques de ceux des hémicelluloses est presque toujours arbitraire. »

Dans tous les échantillons que nous avons étudiés, SO_2H_4 5 p. 100 extrait un

mélange de polysaccharides donnant du xylose, de l'arabinose, du galactose et du glucose ; les trois premiers proviennent des hémicelluloses (et des substances pectiques), tandis que le glucose peut provenir simultanément des hémicelluloses et de la cellulose.

1° On peut donc mesurer l'extraction des hémicelluloses par la proportion du xylose, de l'arabinose et du galactose totaux qui est extraite par SO_2H_4 5 p. 100.

Elle est quasi totale dès la première heure, ou les deux premières heures, dans le cas des arabanes et, probablement, des galactanes : nous n'avons pas dosé ceux-ci mais nous n'avons pratiquement jamais observé de galactose sur les chromatogrammes des hydrolysats 72 p. 100. Il n'en est pas de même pour les xylanes : même au bout de 10 heures, une fraction des xylanes n'est pas hydrolysée et se retrouve dans la fraction cellulose ; elle est trop faible pour être dosée dans les feuilles de luzerne mais représente approximativement 3 à 4 p. 100 des xylanes totaux des autres échantillons.

Il semble très difficile, pour ne pas dire impossible, de définir une hydrolyse acide permettant d'extraire la totalité des xylanes sans attaquer la cellulose, tout au moins lorsqu'on n'a pas préalablement extrait la lignine. Les extractions alcalines ne le permettent pas non plus ; nous avons observé sur l'holocellulose d'un certain nombre d'échantillons que le double traitement par Na OH 4 p. 100 et par Na OH 17, 5 p. 100 n'extrayait pas la totalité du xylose et même de l'arabinose. De même GAILLARD (1958 *b*) constate que le résidu de l'extraction de l'holocellulose par KOH 5 p. 100 et KOH 24 p. 100 contient du xylose et de l'arabinose extractibles par SO_2H_4 *n* (1 heure) : cette fraction représente approximativement 12 à 15 p. 100 de l'arabinose total et 5 p. 100 du xylose total des pailles.

Tout se passe donc comme si une partie des hémicelluloses, plus spécialement des xylanes, était difficile à extraire, à séparer de la cellulose. D'ailleurs HAWLEY et NORMAN (1932) et NORMAN (1937-1943) distinguaient deux groupes d'hémicelluloses : d'une part les « hémicelluloses polyuronides », amorphes, inscrustantes, contenant en général des unités uroniques ; d'autre part les « cellulosanes », associés à la cellulose, orientés dans la structure micellaire et ne semblant pas contenir d'acides uroniques. Cette séparation apparaissait au cours des traitements de la méthode de dosage de la cellulose naturelle (CROSS et BEVAN, NORMAN et JENKINS) : les hémicelluloses polyuronides sont solubilisées alors que les cellulosanes demeurent avec la cellulose.

Dans l'état actuel de nos connaissances, il ne semble plus nécessaire de postuler l'existence de deux types aussi distincts d'hémicelluloses ou de combinaisons chimiques entre les xylanes et la cellulose. Il apparaît en effet que les xylanes ont la même structure que la cellulose ; la cellulose est une chaîne d'unités β -D-glucopyranose liées en 1-4 ; de même, tous les xylanes isolés jusqu'ici de matériaux aussi différents que les bois durs, les bois tendres, les pailles de céréales, les algues, les poires... ont une chaîne principale d'unités β -D-xylopyranose liées en 1-4. (cf. HIRST 1955, WHISTLER et SANNELA 1958) ; ils diffèrent entre eux seulement par la taille des molécules, la nature, le nombre et le mode de liaison des unités (sucres, acides uroniques) attachées en chaînes latérales. ¶ « Comme la chaîne du xylane est semblable à la chaîne de la cellulose, les molécules de xylanes peuvent probablement se rassembler en groupes denses, hautement associés ou peuvent s'insérer dans la matrix cellulosique et se substituer aux molécules de cellulose. Dans ces conditions, il peut exister un grand nombre de forces secondaires qui lient étroitement les molécules de xylanes entre elles ou les molécules

de xylanes aux molécules de cellulose. Ceci peut expliquer pourquoi il n'est pas facile de séparer les xylanes de la matrix cellulosique par les extractions aux solvants » (WHISTLER et SMART 1953 *b*, p. 135).

2° L'hydrolysats par SO_2H_4 5 p. 100 contient toujours du glucose et du galactose que nous avons dosés ensemble. Le galactose est en faible quantité et doit être extrait en totalité dès la première heure puisque nous n'en avons jamais retrouvé sur les chromatogrammes des hydrolysats par SO_2H_4 72 p. 100. C'est donc la quantité de glucose hydrolysée qui augmente avec la durée de l'hydrolyse ; elle peut provenir simultanément de trois catégories de polysaccharides :

— des hémicelluloses proprement dites c'est-à-dire extractibles par les solutions alcalines : on a trouvé du glucose dans les hémicelluloses du dactyle (BINGER et al. 1954) du brome (ROUTLEY et SULLIVAN 1958), des pailles de céréales et des fourrages de prairie mixte (GAILLARD 1958), des ray grass, de la fléole et du dactyle (WAITE et GORROD 1959).

— de glucosanes insolubles dans les solutions alcalines mais extractibles par SO_2H_4 *n* (1 heure) ; cette fraction est en gros deux fois plus importante que la précédente dans les pailles de céréales (GAILLARD 1958) et deux fois moins dans les ray grass la fléole et le dactyle (WAITE et GORROD 1959).

— de la cellulose vraie elle-même.

Au bout d'une heure, la proportion des hexosanes totaux qui sont extraits par SO_2H_4 5 p. 100 dans nos échantillons de graminées correspond relativement bien à celle extraite par les traitements alcalins et SO_2H_4 *n* dans les échantillons correspondants étudiés par GAILLARD (1958) et WAITE et GORROD (1959). Elle devient nettement plus élevée lorsque la durée de l'hydrolyse croît sans qu'il soit possible de distinguer entre les différentes sources de glucose, plus spécialement entre les deux dernières, et de savoir s'il y a une attaque de la cellulose et à partir de quel moment elle se produit. NORMAN (1936) a étudié l'hydrolyse par SO_2H_4 des celluloses isolées de la paille d'avoine et du bois de chêne (suivant la méthode de) NORMAN et JENKINS). Il a notamment constaté que SO_2H_4 5 p. 100 en extrayait des hexosanes en même temps que des xylanes et que la quantité d'hexosanes extraits augmentait avec la durée d'hydrolyse mais à une vitesse décroissant rapidement. Il ne s'agirait pas, selon lui, de produits de dégradation de la cellulose mais bien d'hexosanes à courte chaîne déposés en même temps que les longues chaînes de la cellulose vraie.

Cette explication est insuffisante pour l'ensemble de nos échantillons, notamment pour les feuilles et tiges de luzerne, les feuilles ou les limbes de graminées car la quantité d'hexosanes extraits augmente de façon approximativement linéaire avec la durée d'hydrolyse. Nous devons donc supposer provisoirement que la cellulose vraie subit une certaine attaque par SO_2H_4 5 p. 100 lorsqu'on prolonge la durée d'hydrolyse au-delà d'un certain nombre d'heures afin d'extraire la quasi totalité des xylanes.

En nous fixant comme objectif de séparer les hémicelluloses de la cellulose par une hydrolyse acide, nous avons admis implicitement que ces deux fractions étaient bien définies, parfaitement séparables et en quelque sorte juxtaposées dans la membrane : la cellulose était un polymère de glucose semblable à celui du coton ; les hémicelluloses étaient l'ensemble des autres polysaccharides (en dehors des substances pectiques). Or ce schéma est malheureusement trop simpliste car :

— les celluloses isolées de presque tous les végétaux contiennent des xylanes en

raison des possibilités d'association physique entre les deux chaînes ; loin d'être typique la cellulose du coton est presque une exception ;

— il n'existe pas une cellulose mais des celluloses de longueur différentes à l'intérieur de la même plante. FRANÇOIS (1953) a constaté que le degré de polymérisation moyen (D. P.) des celluloses des foins de luzerne est de 300 pour les jeunes feuilles et de 1 200 pour les tiges ; la cellulose d'un foin ayant un D. P. moyen de 1050 est par exemple un mélange en proportions variables de chaînes dont le D. P. varie de 220 à 2 480.

— en dehors de la cellulose, il existe dans les membranes des glucosanes de solubilité variable dont la structure, la longueur et l'importance sont pour l'instant inconnues ; dans ces conditions on ne peut pas savoir si on a à faire à des glucosanes existants dans la plante ou à des produits d'hydrolyse de la cellulose ;

— nous avons analysé des feuilles et des tiges séparées mais ces organes sont eux mêmes des mélanges de différents tissus : parenchymes, sclérenchymes, tissu libéroligneux... Il est probable que les membranes de ces différents tissus ont des celluloses de longueur différente et des hémicelluloses de nature différente ; dans ces conditions nous sommes en présence de mélanges de celluloses et de mélanges d'hémicelluloses.

Il ne semble donc pas y avoir de frontière parfaitement nette entre les hémicelluloses et la cellulose, tout au moins sur le plan analytique. Il est donc impossible de réaliser une séparation rigoureuse entre les deux fractions aussi bien par les hydrolyses acides que, probablement, par d'autres solvants.

Choix d'une durée optimum d'hydrolyse.

Dans ces conditions, nous devons nous contenter d'un compromis et définir une durée d'hydrolyse optimum qui permette d'extraire la majorité des polysaccharides non cellulosiques sans provoquer de dégradation appréciable des constituants cellulosique. De plus, cette durée doit répondre à d'autres conditions :

— elle doit nous permettre le recouvrement maximum des polysaccharides de la membrane, pentosanes totaux et hexosanes totaux ; elle doit donc éviter notamment ou limiter au maximum la destruction des xylanes ;

— elle doit extraire la majeure partie des matières azotées de façon à laisser un résidu qui ne contienne que de la cellulose et de la lignine ;

— elle doit convenir à la majorité des échantillons examinés pour permettre de généraliser l'utilisation de la méthode. On ne peut retenir qu'une seule durée d'hydrolyse commune à tous les fourrages et non une pour chaque famille ou pour chaque espèce.

Ces critères nous amènent à éliminer immédiatement les durées trop courtes d'une part et les durées trop longues d'autre part ;

— les durées trop courtes (1 heure et même 2 heures) ne permettent pas une extraction suffisante des xylanes, des matières azotées (figure 11) et, peut-être, des glucosanes non cellulosiques. Elles présentent d'autre part l'inconvénient de se situer dans une phase d'évolution rapide des principaux constituants et groupes de constituants. C'est pourquoi une variation de la durée d'hydrolyse, notamment par suite d'une mauvaise appréciation du début de l'ébullition, peut entraîner des erreurs assez importantes ;

— les durées trop longues (6 heures et surtout 10 heures) sont à rejeter pour des

raisons entièrement différentes ; elles permettent bien une extraction presque complète des hémicelluloses mais aussi une attaque partielle des constituants cellulosiques. Par ailleurs, elles entraînent la destruction d'une partie croissante des xylanes : cette destruction est relativement limitée dans les luzernes mais très importante dans les graminées, surtout dans les tiges.

Il apparaît donc que la durée optimum (parmi celles que nous avons étudiées) soit de 3 heures ou de 4 heures. Nous avons donc comparé, par la méthode des couples, les valeurs 3 heures et 4 heures en ce qui concerne la lignocellulose, les hémicelluloses, la cellulose, la somme hémicelluloses + cellulose et les pentosanes totaux (xylanes 5 p. 100 + arabanes + xylanes 72 p. 100). Nous avons utilisé les résultats de tous les échantillons précédents et ceux fournis par 18 échantillons supplémentaires de limbes, gaines et tiges de dactyle et de fétuque, 4 échantillons d'herbe de pâture (dactyle — trèfle blanc) et 13 échantillons de ray grass anglais (plantes entières), comprenant des prélèvements au cours du premier cycle de croissance et des repousses. Le tableau 7 donne les valeurs moyennes et la signification des différences pour les différentes catégories d'échantillons.

TABLEAU 7

Influence de la durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 : comparaison entre 3 et 4 heures.

italique : différence significative au seuil 5 p. 100
 gras : différence significative au seuil 1 p. 100

Espèce	Nature des échantillons	Nombre	Ligno- cellulose		Hémi- celluloses		Cellulose		Hémi - celluloses + cellulose	
			3 h	4 h	3 h	4 h	3 h	4 h	3 h	4 h
<i>Luzerne</i>	Tiges non dépectinisées ...	7	41,60	39,73	14,04	15,75	26,37	25,24	40,41	41,13
	Tiges dépectinisées.....	7	38,45	37,76	12,11	13,23	25,75	24,85	37,86	37,95
	Feuilles non dépectinisées .	7	19,28	18,20	9,30	<i>9,76</i>	9,72	9,42	19,01	19,19
	Ensemble	21	33,11	31,90	11,81	12,91	20,61	19,83	32,43	32,75
<i>Ray grass an- glais.</i>	Feuilles et tiges séparées...	6	28,01	27,12	17,32	17,67	20,11	19,69	37,43	37,38
	Plantes entières	13	24,60	24,03	15,68	16,06	16,62	<i>16,37</i>	32,30	32,43
	Ensemble	19	25,68	25,00	16,20	16,57	17,72	17,42	33,92	33,99
<i>Dactyle</i>	Limbes, gaines et tiges sé- parées	10	32,16	31,77	18,17	18,62	21,45	21,47	39,62	40,10
<i>Fétuque des prés</i>	Limbes, gaines et tiges sé- parées	10	32,92	31,81	18,69	18,79	22,77	22,28	41,46	41,06
<i>Herbe de pâture</i>	Mélange ray grass anglais- dactyle trèfle blanc	4	29,00	27,55	15,58	15,80	17,05	15,98	32,63	31,78

Dans la plupart des cas, les valeurs 3 heures sont significativement plus élevées pour la lignocellulose et la cellulose et significativement plus faibles pour les hémicelluloses que les valeurs 4 heures. Les valeurs 4 heures de la somme hémicelluloses

+ cellulose sont sensiblement plus élevées dans les luzernes non dépectinisées, surtout dans les tiges (différence significative au seuil 1 p. 100). Elles sont pratiquement égales pour les luzernes dépectinisées, les ray grass anglais, les dactyles. Par contre, elles sont nettement plus faibles pour les fétuques, surtout les gaines et les tiges, et pour les herbes de pâture à cause de la destruction des xylanes ; celle-ci doit d'ailleurs devenir intense dans la plupart des échantillons lorsque la durée de l'hydrolyse dépasse 4 heures.

Il semble donc plus prudent de limiter la durée de l'hydrolyse 5 p. 100 à 3 heures, d'autant plus que cette réduction présente un avantage pratique : elle permet de faire aisément deux séries, ou même trois, par jour. Elle n'en reste pas moins un compromis : elle n'élimine pas complètement les pertes de xylanes chez les graminées, puisque les pentosanes totaux sont maximum pour une durée d'une heure. Au contraire, elle ne permet pas un recouvrement maximum des pentosanes et des hexosanes des luzernes non dépectinisées.

Malgré ces réserves, nous pensons que l'étude précédente a porté sur un nombre d'échantillons suffisamment étendu, varié et représentatif pour conclure que l'hydrolyse des résidus membranaires par l'acide sulfurique 5 p. 100 pendant trois heures représente un compromis intéressant pour séparer les hémicelluloses de la cellulose des plantes fourragères. Elle présente le très gros intérêt de pouvoir être utilisée dans les deux catégories de méthodes d'analyse des fourrages ;

— d'une part, dans les méthodes d'analyse approfondie utilisées dans les laboratoires de recherches pour étudier les variations de la composition et de la valeur nutritive des fourrages ;

— d'autre part, dans les méthodes d'analyse rapide utilisées dans les laboratoires de contrôle, pour estimer la valeur nutritive des fourrages récoltés par les agriculteurs et en déduire des plans de rationnement.

On peut résumer de la façon suivante les caractéristiques principales de cette hydrolyse 3 heures :

	Luzernes non dépectinisées		Graminées	
	Feuilles	Tiges	Feuilles ou limbes	Tiges
<u>Xylanes 5 p. 100</u>	81	86	91	90
Xylanes totaux				
<u>Hexosanes 5 p. 100</u>	34	12	22	12
Hexosanes totaux				
<u>Matières azotées 5 p. 100</u>	43		40	35
Matières azotées du fourrage				
<u>Matières azotées 72 p. 100</u>	11		4	
Résidu 5 p. 100				

Application de la méthode de fractionnement à l'analyse des fourrages dans les laboratoires de recherche.

Dans ce cas, le résidu obtenu après extraction des glucides cytoplasmiques et de graissage est soumis successivement aux deux hydrolyses acides par SO₄H₂ 5 p. 100 pendant 3 heures, puis par SO₄H₂ 72 p. 100. On dose les hémicelluloses et la cellulose

par le pouvoir réducteur des hydrolysats et on obtient une lignine comme résidu (fig. 1) ; on peut, en outre, doser les différents sucres des deux hydrolysats après séparation chromatographique. C'est un schéma semblable à celui proposé par HARWOOD (1953), avec cette différence fondamentale que la durée de l'hydrolyse 5 p. 100 est de 3 heures au lieu d'une heure et que les traitements préliminaires sont différents. Il s'agit de discuter notre méthode de dosage par rapport aux autres méthodes proposées, dans le cas de chacune des trois fractions : hémicellulose, cellulose et lignine.

Hémicelluloses. L'estimation des hémicelluloses (ou des polysaccharides non cellulosiques selon qu'on extrait ou non les substances pectiques) à partir du pouvoir réducteur de l'hydrolysat par SO_2H_4 5 p. 100 3 heures présente deux avantages : d'une part, elle est rapide et réalisable en série, d'autre part elle permet d'obtenir sur la même prise une mesure ultérieure de la cellulose et de la lignine. Par contre, en dehors de la séparation incertaine entre les hémicelluloses et la cellulose, cette estimation comporte un certain nombre d'insuffisances :

- elle ne tient pas compte des acides uroniques dont la teneur est très variable d'une plante à l'autre : 2 à 4 p. 100 dans les feuilles et les tiges de graminées (WAITE et GORROD 1959), 10-12 p. 100 dans les feuilles et 7-10 p. 100 dans les tiges de luzerne (HIRST et al. 1959) ;

- les xylanes extraits ne sont pas toujours entièrement hydrolysés en xylose : une partie peut être dégradée, une partie peut demeurer liée à l'acide glucuronique, par exemple sous forme d'acides aldobiuroniques ;

- certains de ces produits d'hydrolyse incomplète ou de dégradation des xylanes et des acides uroniques peuvent être réducteurs.

Les autres méthodes de dosage des hémicelluloses présentent elles aussi de sérieux inconvénients. La plus utilisée est le dosage du furfural obtenu par distillation chlorhydrique (12 p. 100). Elle fournit une estimation par excès des pentosanes, car une partie du furfural provient des acides uroniques, et une estimation par défaut des hémicelluloses : en effet, elle ne tient pas compte de leurs hexosanes et les acides uroniques fournissent une quantité de furfural qui n'est que de 35 à 40 p. 100 des valeurs théoriques.

Ces deux faits expliquent la majeure partie des différences observées (tableau 8) sur nos échantillons, entre les teneurs en hémicelluloses et en pentosanes totaux déterminés à partir des hydrolyses acides d'une part, et les teneurs en pentosanes calculés à partir du dosage du furfural (AOAC) d'autre part :

- les hémicelluloses (SO_4H_2 5 p. 100, 3 heures) sont plus élevées que les pentosanes (furfural) d'environ 10 p. 100 dans le cas des feuilles de ray grass, des ray grass entiers, des limbes et des gaines de dactyle et de fétuque, parce qu'elles rendent compte des hexosanes ; elles sont plus faibles dans les tiges de fétuque et de dactyle, probablement à cause de la destruction d'une partie des xylanes ;

- par contre, la somme (xylanes totaux + arabanes totaux) est très inférieure aux pentosanes (furfural) dans les tiges et les feuilles de luzerne ; ce doit être dû au furfural provenant des acides uroniques présents en quantité élevée dans les légumineuses surtout avant l'extraction des substances pectiques (HIRST et al. 1959).

Dans les méthodes de référence, les hémicelluloses sont extraites par les solutions alcalines ; elles peuvent être pesées après précipitation (PREECE 1931, WEIHE

TABLEAU 8

Comparaison entre les teneurs en hémicelluloses (SO_4H_2 5 p. 100, 3 heures), pentosanes vrais (xylanes 5% + arabanes 5% + xylanes 72%) et les teneurs en pentosanes obtenues par dosage du furfural (méthode A O A C : valeurs exprimées en xylanes, sauf pour les feuilles de luzerne).

Nature des échantillons	Nombre d'échantillons	hémicelluloses	pentosanes vrais
		« pentosanes furfural »	« pentosanes furfural »
Feuilles de luzerne non dépectinisées	5	101,8	50,8
Feuilles de luzerne dépectinisées . . .	5	140,2	66,8
Tiges de luzerne non dépectinisées . .	5	81,4	68,6
Tiges de luzerne dépectinisées	5	91,8	79,7
Feuilles de ray grass	4	112,2	93,8
Tiges de ray grass	2	103,9	95,0
Ray grass entier	10	115,0	94,4
Limbes de dactyle	4	110,5	
Limbes de fétuque	4	107,5	
Gaines de dactyle	4	115,0	
Gaines de fétuque	4	101,0	
Tiges de dactyle	2	90,2	
Tiges de fétuque	2	90,6	

et PHILLIPS 1947) ou hydrolysées par SO_4H_2 et leurs sucres dosés après séparation chromatographique (GAILLARD 1958, WAITE et GORROD 1959). Ces méthodes permettent de fractionner les hémicelluloses, limitent les risques de destruction des xylanes et évitent d'attaquer les constituants cellulotiques. Par contre, elles présentent l'inconvénient d'être longues et conventionnelles et de ne pas assurer une extraction complète des hémicelluloses (cf. plus haut) ; le choix des solvants est arbitraire et très variable d'un auteur à l'autre. Elles ne semblent pas apporter d'améliorations sensibles par rapport aux hydrolyses acides : GAILLARD (1958) obtient pratiquement les mêmes quantités totales des différents polysaccharides (xylanes-glucosanes...) par la double hydrolyse acide (SO_4H_2 5 p. 100 pendant 1 heure et SO_4H_2 72 p. 100) que par sa propre méthode comportant des extractions successives par KOH 5 p. 100, KOH 24 p. 100 et SO_4H_2 n.

Dans ces conditions, nous pouvons penser que l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 pendant 3 heures permet une estimation et une analyse des hémicelluloses aussi satisfaisante que les autres méthodes, surtout si elle est complétée par un dosage des acides uroniques. Elle devrait permettre d'aborder l'étude de la composition et de la valeur nutritive des fourrages en attendant la mise au point de réelles méthodes de référence de dosage des hémicelluloses.

Cellulose. — Le pouvoir réducteur ($\times 0,9$) de l'hydrolysate 72 p. 100 du résidu de l'hydrolyse sulfurique 5 p. 100 pendant 3 heures, fournit une estimation de la teneur en cellulose vraie du fourrage. Cette estimation comporte une erreur par excès par suite de la présence d'une petite quantité de xylanes résiduels et, éventuellement, deux erreurs par défaut : la première parce que SO_4H_2 5 p. 100 aurait peut-être hydrolysé une fraction de la cellulose, la deuxième parce qu'une faible proportion de la cellulose et du xylane pourrait être détruite au cours de l'hydrolyse par SO_4H_2 72 p. 100 (5 à 7 p. 100 suivant HARWOOD 1953). Ces erreurs doivent être relativement faibles ; l'estimation

de la cellulose vraie ainsi obtenue (surtout après déduction de ces xylanes résiduels) paraît au moins aussi bien définie que celles que donnent les deux types de méthodes les plus employées dans l'analyse des fourrages :

— la méthode de NORMAN et JENKINS (1933) dérivée de celle de CROSS et BEVAN, qui isole la « cellulose naturelle » (cellulose vraie + celluloses) et alternant les oxydations par ClO₂ et les traitements par SO₃HNa ; la cellulose vraie est obtenue par différence après soustraction des « celluloses » mesurés par distillation chlorhydrique et dosage du furfural ;

— la méthode de KURSCHNER qui isole une cellulose vraie à la suite d'une attaque par l'acide nitrique concentré en solution dans l'alcool. CRAMPTON et MAYNARD (1938) ont modifié cette méthode en substituant l'acide acétique à l'acide nitrique.

Ces deux catégories de méthodes sont assez conventionnelles (concentration des solvants — nombre de traitements — durées) et ne s'appuient pas sur une étude systématique de la composition des celluloses vraies obtenues dans les principaux types de fourrages. Elles n'en ont pas moins permis des études très intéressantes sur la composition et l'utilisation digestive des fourrages.

Lignine. — En ce qui concerne le dosage de la lignine, la méthode proposée diffère de la méthode classique de NORMAN et JENKINS (1934) par les traitements préliminaires et par la durée de l'hydrolyse 5 p. 100 : trois heures au lieu d'une heure.

Selon nos résultats, cet allongement se traduit par une diminution sensible de la lignine brute obtenue : 10-15 p. 100 pour les feuilles et les tiges de luzerne et pour les tiges de graminées, 5 p. 100 pour les feuilles et les limbes de graminées. Cette diminution peut s'expliquer par deux mécanismes :

— d'abord par la diminution des substances interférentes, insolubles dans les traitements utilisés, plus spécialement dans SO₄H₂ 72 p. 100 ou dans SO₄H₂ 5 p. 100. De ce point de vue, l'allongement de la durée de l'hydrolyse sulfurique 5 p. 100 doit avoir simultanément des actions assez contradictoires ; d'une part, il permet d'extraire une plus grande quantité d'azote total (fig. 11) donc de diminuer la teneur en azote de la lignine brute ; d'autre part, il peut entraîner l'apparition de produits insolubles dans les traitements ultérieurs, comme l'ont montré MOON et ABOU RAYA (1952). C'est ce qui doit se passer dans les graminées soumises à une hydrolyse de 10 heures : l'augmentation de la teneur en lignine pourrait être due à une contamination par des substances provenant de la destruction des xylanes ;

— ensuite par une dégradation partielle de la lignine (MOON et ABOU RAYA 1952) ou d'autres constituants de la plante qui échapperaient en partie aux différents traitements, des constituants épidermiques par exemple. Ces deux derniers aspects demeurent assez hypothétiques tant qu'on ne connaît pas de façon satisfaisante la constitution des lignines des différentes plantes fourragères.

Cette diminution de la lignine brute que nous observons en allongeant la durée de la première hydrolyse a été obtenue par d'autres auteurs grâce à un traitement enzymatique : digestion pepsique avant les deux hydrolyses acides (ELLIS et al., 1946) ou digestion tryptique entre les deux hydrolyses (ARMITAGE et al., 1948). Par rapport à la méthode de NORMAN et JENKINS, ces méthodes permettent de diminuer la teneur en azote de la lignine brute et d'obtenir une lignine vraie plus faible et pratiquement indigestible (BALCH et al. 1954). Les études en cours nous permettront de voir si la lignine obtenue par notre schéma d'analyse est satisfaisante pour les

études nutritionnelles : pour cela, elle doit avoir une digestibilité nulle et présenter si possible une liaison étroitement négative avec le coefficient de digestibilité du fourrage.

Tous les auteurs qui ont étudié la composition et la digestibilité des fourrages ont proposé de déterminer la cellulose, la lignine et éventuellement les hémicelluloses (pentosanes) par des méthodes spécifiques sur des prises séparées (Tableau 1). Le schéma que nous proposons permet, au cours du dosage de la lignine, d'obtenir une estimation de trois fractions glucidiques fondamentales : glucides cytoplasmiques-hémicelluloses et cellulose. Elles sont dosées par la méthode commune du pouvoir réducteur et peuvent être fractionnées par chromatographie sur papier. Cette méthode de fractionnement progressif présente donc l'avantage d'être à la fois plus rapide et plus polyvalente que les techniques classiques. Il n'est malheureusement pas facile de tester directement la valeur des estimations qu'elle fournit pour les hémicelluloses, la cellulose et la lignine : il n'existe pas, en effet, de méthode de référence parfaitement satisfaisante pour chacune de ces fractions qui sont encore trop mal connues, tout au moins dans le cas des plantes fourragères.

Application de la méthode de fractionnement à l'analyse rapide des fourrages.

Pour obtenir une estimation rapide et économique de la valeur énergétique des fourrages dans les laboratoires de contrôle, on ne peut pas déterminer toutes les fractions glucidiques. On a surtout besoin d'une détermination qui soit un critère de la proportion des constituants membranaires, ou plus particulièrement de la teneur en lignine, laquelle fixe, dans une large mesure, la digestibilité du fourrage.

La lignocellulose (résidu de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 pendant 3 heures) doit répondre à ces conditions, puisqu'elle est constituée essentiellement de cellulose et de lignine, comme le montre le tableau 9. Nous y avons, en effet, calculé sa composition dans tous les fourrages étudiés, avec les deux réserves suivantes ; d'une part, il s'agit de la lignocellulose non déminéralisée ; d'autre part, les matières azotées sont celles hydrolysées par SO_4H_2 72 p. 100 ; elles ne tiennent donc pas compte de celles qui passent éventuellement dans la lignine. Si on excepte les feuilles de luzerne, la lignocellulose brute est formée d'environ :

- 60 à 70 p. 100 de glucosane (cellulose vraie) ;
- 2 à 5 p. 100 de xylanes ;
- 15 à 25 p. 100 de lignine ;
- 1 à 4 p. 100 de matières azotées.

La cellulose vraie et la lignine réunies représentent de 85 à 90 p. 100 du total dans la plupart des cas, jusqu'à 95 p. 100 dans les tiges de ray grass et les ray grass entiers, mais seulement 82 à 83 p. 100 dans les limbes de dactyle et de fétuque pour des raisons discutées précédemment.

Cette lignocellulose ne doit pas présenter les deux inconvénients principaux de la cellulose weende qui apparaissent lorsqu'on compare des fourrages différents, plus spécialement des graminées et des légumineuses.

a) Elle contient la quasi totalité de la cellulose totale (dans la mesure où nous avons pu la séparer des hémicelluloses) et de la lignine totale dans tous les fourrages étudiés, pourtant très divers. Ce n'est pas le cas de la cellulose brute qui rend compte d'une fraction variable de la lignine totale (et de la cellulose totale) beaucoup plus

TABLEAU 9

Composition de la lignocellulose non déminéralisée obtenue après une hydrolyse de 3 heures.

Nature des échantillons	Nombre d'échantillons	en p. 100 de la lignocellulose						
		Matières azotées	Lignine	Cellulose	Xylanes	Hexosanes	Lignine + cellulose	Lignine + cellulose + matières azotées
Feuilles de luzerne non dépectinisées	5	11,9	32,3	52,1	2,2	49,9	84,5	96,4
Feuilles de luzerne dépectinisées	5	10,2	34,4	55,0	2,1	52,9	89,4	96,4
Tiges de luzerne non dépectinisées	5	3,4	25,0	63,6	3,4	60,5	88,6	92,0
Tiges de luzerne dépectinisées	5	3,0	28,1	68,3	3,2	65,1	96,4	99,4
Feuilles de ray-grass	4	3,2	18,7	71,7	3,6	68,1	90,4	93,6
Tiges de ray-grass	2	1,2	23,7	72,0	4,8	67,2	95,7	96,9
Ray grass entiers	5	3,8	20,9	68,6	2,5	66,1	89,5	93,3
Limbes de dactyles	4		23,3	60,5			83,9	
Limbes de fétuques	4		16,6	64,9			81,5	
Gaines de dactyle	4		15,0	70,0			85,0	
Gaines de fétuque	4		15,4	71,2			86,6	
Tiges de dactyle	2		20,2	70,5			90,7	
Tiges de fétuque	2		16,9	72,8			89,7	

élevée dans les légumineuses que dans les graminées. D'après les études de NORMAN (1935), LOUW (1941), BONDI et MEYER (1943), NORDFELT et al. (1949), ARMSTRONG et al. (1950), la cellulose brute contient, en général, les pourcentages suivants :

	Graminées	Légumineuses
— de la cellulose naturelle totale	60-75 %	75-85 %
— de la lignine totale	15-25 %	35-70 %

Cette différence provient du traitement alcalin de la méthode de Weende, qui extrait une fraction très variable de la lignine, beaucoup plus élevée dans les graminées que dans les légumineuses (NORMAN 1935).

b) La lignocellulose a une composition relativement constante (tableau 9) dans les fourrages, pourtant on ne peut plus divers, que nous avons étudiés. Elle présente cependant un certain nombre de variations : dans les feuilles de luzerne, elle contient une proportion très élevée d'une lignine (32 p. 100) qui doit être « contaminée » par une proportion importante de résidus azotés et, vraisemblablement, par d'autres substances insolubles dans SO_4H_2 72 p. 100. Par ailleurs, sa composition évolue sensiblement au cours de la croissance : les teneurs en azote et en indéterminé (comprenant les cendres) diminuent au profit de la lignine et de la cellulose, dont la somme passe de 88 à 94 p. 100 dans les feuilles de ray grass, de 85 à 97 p. 100 dans les tiges de luzerne, en deux mois, entre la fin avril et la fin juin. La cellulose brute doit être un mélange beaucoup plus variable que la lignocellulose ; elle contient moins d'azote, mais 4 à 5 fois

plus de pentosanes (10 à 15 p. 100). Fait plus important, elle est beau coup plus riche en lignine et plus pauvre en cellulose naturelle dans les légumineuses que dans les graminées : NORMAN 1935, LOUW 1941, BONDI et MEYER 1943, NORDFELT et al. 1949, ARMSTRONG et al. 1950). D'après les résultats de ces auteurs, on peut admettre la composition suivante :

	Graminées	Légumineuses
— Cellulose naturelle.....	90-95 %	75-85 %
— Lignine	4-7 %	15-20 %

Ainsi la lignocellulose semble un mélange mieux défini et plus fidèle que la cellulose brute ; elle doit conserver une composition beaucoup plus constante d'un fourrage à l'autre et contient la quasi totalité de la lignine et de la cellulose vraie. Elle devrait donc permettre une meilleure estimation de la digestibilité des fourrages que la cellulose brute.

Cette proposition de remplacer la cellulose brute par le résidu d'une hydrolyse acide n'est pas nouvelle. Dès 1935, après avoir montré que les insuffisances de la cellulose brute provenaient surtout du traitement alcalin, NORMAN suggérait en effet de supprimer celui-ci et d'augmenter à la fois la durée de l'hydrolyse acide (1 heure au lieu de 30 minutes) et sa concentration (5 p. 100 au lieu de 1,25 p. 100).

Cette idée a été reprise par HALLS WORTH (1950) selon lequel « on pourrait s'attendre à ce qu'une détermination de la cellulose brute comportant uniquement une digestion acide présente une corrélation bien meilleure avec la digestibilité de l'aliment et une liaison beaucoup plus étroite avec la valeur amidon » (que la cellulose brute Weende). En s'appuyant sur des résultats préliminaires de NEVILLE et de GODDEN, HALLSWORTH proposait une hydrolyse pendant 1 heure par SO_2H_4 5 p. 100 ou 7,5 p. 100. C'est finalement WALKER et HEPBURN (1954-1955 a) qui ont mis en pratique ces propositions dans une étude poursuivie au Rowett Research Institute sur la composition et la digestibilité par le mouton de 24 foins. Ces auteurs ont utilisé une hydrolyse d'une heure par SO_2H_4 5 p. 100 dans les mêmes conditions pratiques que la détermination de la cellulose brute suivant la méthode AOAC. A la suite de la publication préliminaire des résultats obtenus (1954), la mise au point de la méthode a été poursuivie en collaboration par WALKER et HEPBURN (1955 b), RAYMOND et al. (1955) et GRIFFITH et THOMAS (1955). Elle a abouti à la normalisation de la méthode dite de la « normal acid fibre » (WALKER et HEPBURN 1955 b) ; on a remplacé SO_2H_4 5 p. 100 par SO_2H_4^n qui est une solution standard des laboratoires, ce changement ne modifiant pas les valeurs obtenues ; l'hydrolyse est réalisée dans des erlenmeyers ou dans des matras Kjeldahl pendant 1 heure sur des échantillons de 1 g. préalablement dégraissés au Soxhlet par le mélange alcool-benzène.

Selon ses promoteurs la « normal acid fibre » présente sur la cellulose brute plusieurs avantages pratiques : elle est plus rapide et plus simple donc plus facile à standardiser et mieux adaptée à l'utilisation en série ; elle est plus reproductible soit entre les doubles, soit d'un jour à l'autre, soit d'un laboratoire à l'autre, ce qui est très important pour utiliser les équations de régression établies dans un seul laboratoire. Sur le plan nutritionnel, la « normal acid fibre » est un meilleur critère de la digestibilité que la cellulose brute dans le cas des herbes de pâturage (RAYMOND et al. 1955) et des ensilages (WALKER et HEPBURN, 1956), mais seulement du même ordre dans le cas des foins (WALKER et HEPBURN, 1955) et des fourrages étudiés à

Aberystwyth (GRIFFITH et THOMAS 1955). La « normal acid fibre » est maintenant utilisée dans toutes les études sur la digestibilité et la consommation des fourrages poursuivies à HURLEY et dans la sélection des plantes fourragères à ABERYSTWYTH.

Partant de considérations différentes, mais dans un but identique, nous avons fait, somme toute, une étude théorique de la « normal acid fibre » : en effet celle-ci correspond au résidu de l'hydrolyse par SO_2H_4 5 p. 100 pendant une heure, à cette différence que nous avons procédé à une extraction aqueuse avant le traitement au mélange alcool-benzène. Dans ces conditions, sur le plan analytique, il apparaît que la « normal acid fibre » présente quelques insuffisances par rapport à la lignocellulose 3 heures :

— elle contient une proportion d'hémicelluloses notables et, surtout, assez variable d'un échantillon à l'autre ;

— elle présente une teneur en matières azotées élevée dans les matériaux qui en sont riches : 20 p. 100 dans les feuilles de luzerne ; 9 p. 100 dans les limbes de graminées. Les valeurs réelles dans les « normal acid fibre » correspondantes doivent être plus élevées car il n'y a pas d'extraction aqueuse ;

— enfin, il est possible qu'elle contienne une plus grande proportion de résidus cytoplasmiques autres que les matières azotées : « dans le cas des échantillons d'herbe quelques 10-20 p. 100 de la matière sèche de la « normal acid fibre » ne sont pas de la lignine, de la cellulose et des matières azotées » (RAYMOND et al. 1955).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus récemment sur 4 fourrages par l'un des promoteurs de la « normal acid fibre » (WALKER 1959). La lignocellulose semble donc être un résidu mieux défini que la « normal acid fibre » ; nous pouvons donc théoriquement espérer qu'elle permettra une estimation au moins aussi bonne du coefficient de digestibilité. Avant de vérifier cette hypothèse nous préciserons la nature, l'intérêt et l'influence des différents traitements préliminaires extrayant les constituants cytoplasmiques. Nous en déduirons la méthode définitive de dosage de la lignocellulose, dont la présente étude n'a dégagé que les principes.

Reçu en mai 1960.

SUMMARY

ANALYSIS OF THE CELL WALL CONSTITUENTS BY A METHOD OF ACID HYDROLYSIS

1) The aim of this investigation has been to devise a method of acid hydrolysis of the cell walls enabling the successive estimation of hemicelluloses and cellulose, during the estimation of lignin. The influence of the length of hydrolysis with 5 p. 100 H_2SO_4 (1, 2, 3, 4, 6 and 10 hours) has been studied in order to determine the optimum length needed to extract all the hemicelluloses without degrading the cellulose.

2) Twenty samples of leaves and stems of lucerne, rye grass, cocksfoot and meadow fescue have been studied (table 2). Figure 1 summarizes the methods used and the definitions of the constituents determined. The reducing power of hemicellulose sugars in the 5 p. 100 H_2SO_4 hydrolysate and of cellulose sugars in the 72 p. 100 H_2SO_4 hydrolysate has been used to give a quantitative estimation of these fractions. The sugars in these hydrolysates were separated by means of paper chromatography and measured by SOMOGYI's colorimetric method. The detailed results are given in Tables 10 to 29 and the averages for the leaves and stems of lucerne and of rye grass in fig. 3 to 6.

3) There was a characteristic change in the amount of each constituent or group of constituents with the time of hydrolysis, which was relatively similar in all the materials studied: a) there was a curvilinear decrease in lignocellulose (fig. 2) and a slow decrease in crude lignin; b) the

hemicellulose fraction increased, due to the hydrolysis of an increasing proportion of the total xylans and hexosans (fig. 9) while the arabans remained approximatively constant; c) the cellulose fraction decreased; d) an increasing fraction of the xylans was destroyed after 4-6 hours.

4) Differences between the samples depending on the species, organ and preliminary treatment were, however, noticed. The xylans of the grasses were much more rapidly hydrolyzed than those of lucerne and underwent greater destruction (table 6). Extraction of pectic substances only slightly modified the changes obtained in the amounts of the various cell wall fractions of lucerne samples with an increasing length of 5 p. 100 H₂SO₄ hydrolysis. The method of drying the samples and of extracting the soluble carbohydrates appears to have a small but definite influence on the results, which remains to be determined.

5) It was impossible to obtain a clear cut separation between non cellulosic polysaccharides and cellulose with 5 p. 100 H₂SO₄. However a relatively satisfactory separation was obtained in the various crops that were studied by means of hydrolysis for 3 hr. : a) the major part of the xylans were extracted probably without the cellulose being degraded very much ; b) a maximum quantity of the total membrane polysaccharides was recovered ; c) the destruction of xylans was relatively small ; d) the lignocellulose obtained was relatively poor in nitrogen.

The estimations of hemicelluloses, cellulose and lignin resulting from this fractionation have been discussed, and it has been emphasized that there is no reference method for estimating these constituents and that even their definition is very uncertain.

6) The lignocellulose (which remains, after hydrolysis with 5 p. 100 H₂SO₄ for 3 h), in contrast to crude fibre is better defined and more constant. It is less variable in composition from one crop to the other and contains all the lignin. It is comparable to the normal acid fibre that is determined in Great Britain. It should give theoretically, a valuable estimation of the digestibility of herbage.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARMITAGE E. R., ASHWORTH R. de B., FERGUSON W. S., 1948. The determination of lignin in plant material of high protein content. *J. Soc. Chem. Industr.*, **67**, 241-243.
- 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.
- BALCH D. A., BALCH C. C., ROWLAND S. J., 1954. The influence of the method of determination of lignin on the lignin-ratio technique for digestibility in the cow. *J. Sci. Fd Agric.*, **5**, 584-588.
- BINGER H. P., SULLIVAN J. T., JENSEN C. O., 1954. Forage crop constituents. The isolation and analysis of hemicelluloses from orchard grass. *J. Agric. Fd Chem.*, **2**, 696-700.
- BONDI A. H., MEYER H., 1943.—On the chemical nature and digestibility of roughage carbohydrates. *J. Agric. Sci.*, **33**, 123-128.
- BUSTON H. W., 1934. The polyuronide constituents of forage grasses. *Biochem. J.*, **28**, 1028.
- CHARLET-LÉRY G., FRANÇOIS A. C., LEROY A. M., 1952. L'analyse des aliments destinés aux animaux et l'interprétation des résultats qu'elle fournit. *Ann. Zool.*, **1**, 45-63.
- CRAMPTON E. W., MAYNARD L. A., 1938. The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animal feeds. *J. Nutrit.*, **15**, 383-395.
- CRAMPTON E. W., WHITING F., 1943. A proposed scheme of feeding stuffs analysis. *J. Anim. Sci.*, **2**, 278-284.
- ELLIS C. H., MATRONE G., MAYNARD L. A., 1946. A 72 p. 100 H₂SO₄ method for the determination of lignin and its use in animal nutrition studies. *J. Anim. Sci.*, **5**, 285-297.
- FAUCONNEAU G., JARRIGE R., 1957. Composition chimique et valeur nutritive de l'herbe. *Bull. Tech. Ing. Serv. Agric.*, **118**, 173-214.
- FERGUSON W. S., 1948. The analysis of plant material with particular reference to structural constituents. *Agric. Progr.*, **23**, 129-137.
- FLANDERS C. A., 1952. Hemicelluloses and summative analysis of timothy hay. *Arch. Biochem. Biophys.*, **36**, 421-424.
- FRANÇOIS A. C., 1954. Corrélation entre le taux de lignine, le taux de cellulose et le degré de polymérisation de la cellulose de la luzerne. *O. E. C. E. Conférence européenne des Herbages, juin 1954*, 299-301.
- GAILLARD Blanche D. E., 1958 a. A detailed summative analysis of the crude fibre and nitrogen free extractives fractions of roughages. I. Proposed scheme of analysis. *J. Sci. Fd Agric.*, **9**, 170-177 ; 346-353.
- GAILLARD Blanche D. E., 1958 b. 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.
- 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.
- GUILLET R., JACQUOT R., 1943. Essai de détermination de l'indigestible glucidique. *C. R. Acad. Sci.*, **216**, 508-510.
- HALLSWORTH E. G., 1950. The crude fibre determination and its alternatives. *Agric. Progr.*, **25**, 39-49.
- HARWOOD V. D., 1954. Analytical studies on the carbohydrates of grasses and clovers. V. Development of a method for the estimation of cell-wall polysaccharides. *J. Sci. Fd Agric.* **5**, 270-275.

- HAWLEY L. F., NORMAN A. G., 1932. The differentiation of hemicelluloses. *Ind. Eng. Chem.*, **24**, 1190-1194.
- HIRST E. L. 1955. Some problems in the chemistry of hemicelluloses. *J. Chem. Soc.*, 2974-2984.
- HIRST E. L., MACKENZIE D. J., WYLLAM C. B. 1959. Analytical studies on the carbohydrates of grasses and clovers. IX. Changes in carbohydrate composition during the growth of lucerne. *J. Sci. Fd. Agric.* **10**, 19.
- JERMYN M. A., 1955. — in PAECH K., TRACEY M. V. Modern methods of plant analysis. *Springer Verlag, Berlin*, **2**, 197-225..
- JERMYN M. A., ISHERWOOD F. A., 1949. Improved separation of sugars on the paper partition chromatogram. *Biochem. J.*, **44**, 402-407.
- LANCASTER R. J., 1943. Metabolism trials with New-Zealand feeding-stuffs. IV. The relative significance of lignin cellulose and crude fibre in the evaluation of foods. *N. Z. J. Sci. Techn. A*, **25**, 137-151.
- LOUW J. G., 1951. 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 extracts according to the standard method for feeding stuff analysis. *Onderstepoort J. Vet. Sci.*, **17**, 165-179.
- MONTREUIL J., SCHEPPLER N., 1959. Chromatographie quantitative des oses constituants des glycoprotéides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **41**, 13-28.
- MOON F. E., ABOU-RAYA A. K., 1952. The lignin fraction of animal feedingsstuffs. 1. Preliminary examination of lignin determination procedures. 2. Investigation of lignin determination procedures and development of a method for « acid-insoluble lignin ». *J. Sci. Fd. Agric.*, **3**, 399-406 ; 407-418.
- NORMAN A. G., 1935. The composition of crude fibre. *J. Agric. Sci.*, **25**, 529-540.
- NORMAN A. G., 1936. The association of xylan with cellulose in certain structural celluloses. *Biochem. J.*, **30**, 2054-2072.
- NORMAN A. G., 1937. The biochemistry of cellulose, the polyuronides, lignin, etc. *Oxford: Clarendon Press*.
- NORMAN A. G., 1946. in WISE L. E. Wood Chemistry. *Reinhold, New-York*, 252-271.
- NORMAN A. G., JENKINS S. H., 1933. A new method for the determination of cellulose, based upon observation on the removal of lignin and other incrusting materials. *Biochem. J.*, **27**, 818-831.
- NORMAN A. G., JENKINS S. H., 1934 a. The determination of lignin. I. Errors induced by the presence of certain carbohydrates. *Biochem. J.*, **28**, 2147-2159.
- NORMAN A. G., JENKINS S. H., 1934 b. The determination of lignin. II. Errors induced by the presence of proteins. *Biochem. J.*, **28**, 2160-2168.
- NORDFELT S., SVANBERG O., CLAESSON O., 1949. Studies regarding the analysis of crude fibre. *Acta Agric. Suec.*, **3**, 135-177.
- PALOHEIMO L., 1945. Determination of total quantity of cell wall constituents in foods and feeds. *Maataloust. Aikakausk.*, **17**, 19-21.
- PALOHEIMO L., 1933. Some persistent misconceptions concerning the crude fibre and the nitrogen-free extract. *Maataloust. Aikakausk.*, **25**, 16-22.
- PREECE I. A., 1931. Studies on hemicelluloses. IV. The proximate analysis of box wood, and the nature of its furfuraldehyde-yielding constituents. *Biochem. J.*, **25**, 1304-1318.
- 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.
- ROUTLEY D. G., SULLIVAN J. T., 1958. The isolation and analysis of hemicelluloses of brome grass. *J. Agric. Fd. Chem.*, **6**, 687-692.
- SOMOGYI M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.
- THOMAS B., ARMSTRONG D. G., 1949. A study of some methods at present used for the determination of lignin. *J. Agric. Sci.*, **39**, 335.
- WAITE R., GORROD A. R. N., 1959 a. The structural carbohydrates of grasses. *J. Sci. Fd. Agric.*, **10**, 308-317.
- WAITE R., GORROD A. R. N., 1959 b. The comprehensive analysis of grasses. *J. Sci. Fd. Agric.*, **10**, 317-326.
- WAKSMAN S. A., STEVENS K. R., 1960. A system of proximate chemical analysis of plant materials. *Ind. Eng. Chem.*, **2**, 167-73.
- WALKER D. M., 1959. A note on the composition of normal acid fibre. *J. Sci. Fd. Agric.*, **10**, 415.
- 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 silage. *J. Agric. Sci.*, **47**, 172-186.
- WEIHE H. D., PHILLIPS M., 1947. The quantitative estimation of hemicelluloses by direct isolation. *J. Agric. Res.*, **74**, 77-85.
- WHISTLER R. L., SMART C. J., 1953. Polysaccharide chemistry. *Academic Press, New York*.
- WHISTLER R. L., SANNEIA J. L., 1958. Hemicelluloses. *Proc. IV th Intern. Congress of Biochemistry*, **1**, 1-14. *Pergamon Press*.
- WILLIAMS R. D., OLMSTED W. H., 1935. A biochemical method for determining indigestible residue (crude fibre) in feces : lignin, cellulose and non water soluble hemicelluloses. *J. Biol. Chem.*, **108**, 653-666.

TABLEAU IO à 29

Résultats détaillés sur l'influence de la durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 % sur la proportion des différents constituants.

(exprimés en pourcentage de la matière sèche de l'échantillon).

D	: Durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 %
L. C.	: Lignocellulose résidu de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 %
L	: Lignine
H	: Hémicelluloses
C	: Cellulose
H + C	: Somme Hémicelluloses + Cellulose
X 5 %	: Xylanes de l'hydrolysate 5 %
A 5 %	: Arabanes " "
H 5 %	: Hexosanes " "
X 72 %	: Xylanes " 72 %
H 72 %	: Hexosanes " "
ΣX	: Xylanes totaux
ΣP	: Pentosanes totaux = Xylanes totaux + Arabanes
ΣH	: Hexosanes totaux
$X\ 5\ \%/ \Sigma X$: Rapport Xylanes 5 % / Xylanes totaux
$H\ 5\ \%/ \Sigma H$: Rapport Hexosanes 5 % / Hexosanes totaux

TABLEAU IO
Feuilles de luzerne 25 avril (non dépectinisées)

D	L.C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H
1 h.....	23,3	8,4	6,5	9,4	15,9	4,2	2,2	3,4	0,5	8,9	4,7	3,9	12,0	71,6	25,6
2 h.....	19,9	6,8	8,2	8,9	17,1	4,6	2,5	4,1	0,3	8,6	1,9	4,4	12,7	81,3	32,3
3 h.....	17,6	6,2	8,6	8,4	17,0	4,5	2,6	4,5	0,2	8,2	1,7	4,3	12,7	89,5	33,5
4 h.....	17,1	6,2	9,9	8,4	18,3	4,8	2,8	5,3	0,1	8,3	1,9	4,7	13,6	93,8	38,9
6 h.....	15,5	6,2	10,4	8,0	18,4	4,7	2,5	6,2	0,3	7,7	2,0	4,5	13,9	86,5	44,2
10 h.....	15,7	6,2	10,8	7,8	18,6	4,4	2,5	6,9	traces	7,8*	1,4*	3,9*	14,7*	86,5	46,9*

TABLEAU II
Feuilles de luzerne 15 mai (non dépectinisées)

D	L.C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H
1 h.....	26,9	5,9	5,8	12,8	18,6	4,4	4,5	3,2	0,8	12,0	4,9	3,4	15,2	56,3	21,1
2 h.....	22,7	6,4	8,9	14,7	20,6	4,6	2,5	4,8	0,8	10,9	2,4	4,9	15,7	66,1	30,5
3 h.....	18,9	5,4	9,2	10,9	20,1	4,5	2,5	5,2	0,8	10,4	3,3	4,8	15,3	63,7	34,0
4 h.....	18,5	6,4	9,4	10,3	19,7	4,6	2,3	5,5	0,7	9,6	2,3	4,6	15,1	70,3	36,5
6 h.....	16,7	6,2	10,0	9,8	19,8	4,9	2,7	5,4	0,3	9,5	2,2	4,9	14,9	84,4	36,4
10 h.....	15,8	5,3	10,4	8,9	19,3	4,5	2,4	6,5	traces	8,9	1,5	3,9	15,4	84,4	41,9

TABLEAU IZ
Feuilles de luzerne 3 juin (non dépectinisées)

S	L.C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 82 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	H 5 %/Σ H	H 5
1 h.....	25,9	6,3	5,8	13,3	19,1	0,8	2,2	2,7	0,8	12,6	1,6	3,8	15,3	52,5	17,6
2 h.....	21,5	7,0	7,1	12,3	19,4	4,5	2,6	3,0	0,6	11,7	2,1	4,7	14,7	70,1	20,1
2 h.....	19,8	6,6	7,8	14,7	19,5	4,9	2,5	3,4	0,3	11,4	2,2	4,7	14,8	85,3	23,3
4 h.....	19,4	6,5	8,6	19,5	19,1	2,2	2,4	4,0	0,2	10,3	2,4	4,8	14,3	92,9	27,9
6 h.....	19,1	5,0	8,8	10,2	19,0	2,1	3,0	3,7	0,1	10,1	2,2	5,2	13,8	97,2	26,8
10 h.....	16,4	5,8	9,2	9,0	18,2	2,1	2,0	5,0	traces	9,0	2,1	4,1*	14,1*	97,2	35,8*

TABLEAU I3
Feuilles de luzerne 30 juin (non dépectinisées)

D	L.C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	I	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H I	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H
1 h....	25,1	9,9	7,8	10,6	18,4	4,5	2,2		4,2	0,8	9,8	2,3	4,4	14,0	64,6	29,9
2 h....	22,2	6,0	8,1	10,4	18,6	1,7	1,8		4,6	0,4	10,0	2,1	3,9	14,7	78,7	31,5
3 h....	20,3	5,8	9,4	9,7	19,1	1,6	2,1		5,7	0,2	9,5	1,8	3,9	15,2	90,8	37,4
4 h....	18,5	6,7	9,8	9,9	19,7	1,7	2,0		6,1	0,2	9,7	1,9	3,9	15,8	91,7	38,7
6 h....	18,8	5,9	10,7	9,8	20,5	2,0	2,1		6,6	traces	9,8*	2,0*	4,1*	16,4*	40,2*	40,2*
10 h....	14,4	5,8	11,6	8,1	19,8	1,7	2,1		7,8	traces	8,1*	1,7*	3,8*	15,9*	49,1*	49,1*

TABLEAU I4
Feuilles de luzerne 9 septembre (non dépectinisées)

D	L.C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H	
																A 5 %
1 h....	23,8	7,2	8,7	9,9	18,6	1,8	2,4		4,4	0,8	9,1	2,6	5,0	13,5	70,8	32,7
2 h....	20,7	6,9	9,9	9,5	19,4	2,2	2,0		5,6	0,5	8,9	2,8	4,8	14,6	80,5	38,7
3 h....	18,5	6,6	10,4	9,0	19,4	2,4	2,1		5,9	0,6	8,5	3,0	5,1	14,4	80,8	40,9
4 h....	17,2	6,3	10,7	8,7	19,4	2,1	2,4		6,2	0,4	8,3	2,5	4,9	14,5	83,0	42,9
6 h....	16,2	5,5	11,8	8,6	20,4	2,1	2,2		7,5	0,4	8,2	2,5	4,7	15,7	82,0	47,8
10 h....	15,1	5,9	11,9	8,6	20,5	1,6	2,0		8,2	0,2	8,4	1,8	3,8	16,6	87,1	49,5

TABLEAU I5
Tiges de luzerne 25 avril (non dépectinisées)

D	L.C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H	
																A 5 %
1 h....	35,3	8,4	9,7	19,7	29,4	3,9	3,5		2,4	2,2	17,5	6,1	9,6	19,9	63,6	12,1
2 h....	29,7	6,9	11,6	17,5	29,1	5,0	3,3		3,3	0,9	16,6	5,9	9,2	19,9	84,7	16,6
3 h....	29,0	6,3	13,7	16,6	30,3	5,9	3,7		4,1	0,8	15,8	6,7	10,4	19,9	88,0	20,6
4 h....	27,1	6,9	14,7	17,0	31,7	6,2	4,1		4,4	0,5	16,5	6,7	10,8	20,9	82,4	21,2
6 h....	23,3	5,2	16,1	15,4	31,5	6,8	4,2		5,1	0,6	14,8	7,4	11,6	19,9	91,5	25,7
10 h....	23,2	6,3	16,9	16,1	33,0	5,8	4,3		6,7	0,2	15,9	6,1	10,4	22,6	96,3	29,8

TABLEAU 16
Tiges de luzerne 15 mai (non dépectinisées)

D	L. C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H
1 h....	38,5	8,5	9,2	25,2	34,4	4,9	2,4	1,9	1,5	23,7	6,4	8,8	25,6	76,1	7,5
2 h....	37,0	8,7	11,5	23,8	35,3	6,8	2,3	2,4	1,1	22,7	7,8	10,1	25,2	86,5	9,6
3 h....	36,8	8,4	12,6	23,4	36,0	7,8	2,1	2,8	1,6	22,1	9,4	11,5	24,9	82,7	11,2
4 h....	35,7	8,7	22,6	22,6	36,7	7,2	3,0	3,9	0,6	22,0	7,8	10,8	25,9	92,0	14,9
6 h....	33,1	8,5	14,6	23,4	38,0	7,7	2,7	4,2	0,1	22,9	7,8	10,5	27,1	99,3	15,5
10 h....	33,0	7,5	16,0	24,2	37,2	8,0	2,8	5,2	0,3	21,2	8,3	11,1	26,4	95,8	19,6

TABLEAU 17
Tiges de luzerne 3 juin (non dépectinisées)

D	L. C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H
1 h....	49,2	11,5	14,0	32,3	43,3	6,3	2,8	4,9	3,0	29,3	9,3	12,1	31,2	68,1	6,1
2 h....	44,6	10,5	13,9	29,5	43,4	7,9	3,4	2,6	2,0	27,5	9,9	13,3	30,1	79,7	8,6
3 h....	41,8	10,0	14,8	28,3	43,1	8,4	2,8	3,5	4,1	27,2	9,5	12,3	30,7	88,8	11,4
4 h....	40,8	9,7	16,5	26,9	43,4	9,7	3,2	3,6	1,1	25,8	10,8	14,0	29,5	90,0	12,3
6 h....	37,3	9,3	17,5	26,3	43,8	10,3	3,1	4,1	0,7	25,5	11,0	14,1	29,6	93,9	13,7
10 h....	34,5	8,0	20,0	22,5	42,5	9,1	2,6	8,3	0,3	22,2	9,4	12,0	30,5	97,1	27,1

TABLEAU 18
Tiges de luzerne 30 juin (non dépectinisées)

D	L. C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H
1 h....	54,6	16,3	10,6	34,8	42,4	6,1	2,3	2,2	3,5	28,3	9,6	11,9	30,5	63,8	7,1
2 h....	50,9	15,4	13,0	31,4	44,4	8,4	2,4	2,3	4,5	28,5	9,9	12,3	30,8	85,4	7,3
3 h....	47,5	13,5	14,0	31,6	45,6	8,5	2,5	3,1	4,4	30,1	9,9	12,4	33,2	85,4	9,3
4 h....	47,0	13,7	16,4	29,6	46,0	9,2	2,7	4,4	0,6	29,0	9,8	12,5	33,5	94,4	13,3
6 h....	44,3	14,7	17,5	28,7	46,2	9,3	2,5	5,8	0,2	28,5	9,5	12,0	34,2	97,5	16,8
10 h....	39,5	10,5	19,0	25,7	44,7	9,9	2,4	6,7	traces	25,7*	9,9*	12,3*	32,4*	99,5	20,8*

TABEAU 19
Tiges de luzerne 9 septembre (non dépeçtinisées).

D	L. C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	G 5 %/Σ H
1 h.....	48,3	13,7	10,1	30,2	40,2	5,9	2,4	1,8	2,9	27,2	8,8	11,2	29,0	67,5	6,2
2 h.....	44,7	13,5	13,6	27,8	41,4	7,7	2,7	3,2	4,7	26,1	9,4	12,1	29,3	82,1	10,8
3 h.....	43,8	12,5	14,7	27,7	42,4	9,0	2,5	3,3	4,6	26,1	10,6	13,0	29,4	85,2	11,1
4 h.....	42,3	13,3	16,1	27,5	43,6	9,9	2,7	3,4	1,2	26,4	11,1	13,8	29,8	89,3	11,5
6 h.....	40,6	11,8	16,3	26,4	42,7	9,1	2,2	5,0	1,2	25,3	10,3	12,5	30,3	88,4	16,7
10 h.....	36,8	10,5 ₂	17,9	23,6	41,5	9,2	2,4	6,3	0,3	23,2	9,5	11,9	29,5	96,7	21,2

TABEAU 20
Feuilles de ray grass anglais — 19 avril.

D	L. C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H
1 h.....	26,7	4,2	10,8	16,8	27,6	6,5	2,1	2,2	1,3	15,5	7,8	9,9	17,7	83,9	12,3
2 h.....	24,1	4,4	11,7	15,9	27,6	6,5	2,1	3,1	1,1	14,8	7,6	9,7	17,9	86,1	17,3
3 h.....	22,6	4,6	12,4	15,3	27,7	6,7	2,2	3,4	0,9	14,4	7,6	9,9	17,8	88,1	19,2
4 h.....	21,5	3,8	12,5	15,1	27,6	7,0	2,1	3,5	0,8	14,3	7,8	9,9	17,7	89,6	19,6
6 h.....	21,5	3,7	13,3	14,7	28,0	7,3	2,0	4,0	0,5	14,2	7,8	9,8	18,2	91,0	21,7
10 h.....	20,4	3,6	13,2	14,5	27,7	6,8	2,1	4,3	0,4	14,1	7,3	9,3	18,4	94,4	23,3

TABEAU 21
Feuilles de ray grass anglais — 4 mai.

D	L. C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H
1 h.....	26,7	3,5	12,1	18,5	30,6	7,2	2,3	2,7	1,4	17,1	8,6	10,9	19,7	83,8	13,6
2 h.....	23,2	3,6	13,7	17,1	30,8	8,4	1,8	3,5	4,0	16,1	9,4	11,2	19,6	89,6	17,8
3 h.....	22,5	3,7	14,1	16,7	30,8	8,7	2,0	3,4	0,9	15,8	9,6	11,5	19,2	90,9	17,5
4 h.....	21,8	3,9	14,5	16,4	31,0	8,6	2,0	3,9	0,6	15,9	9,2	11,2	19,8	93,7	19,9
6 h.....	21,3	3,3	14,8	15,8	30,6	8,2	2,4	4,2	0,6	15,2	8,8	11,2	19,4	93,5	21,8
10 h.....	20,2	3,2	14,8	15,1	29,9	7,1	2,2	5,5	0,5	14,6	7,6	9,8	20,1	93,9	27,3

TABLEAU 22
Feuilles de ray grass anglais — 17 mai.

D	L. C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H
1 h....	28,7	4,5	14,5	20,5	35,0	9,4	2,3	2,9	4,9	18,5	11,3	13,6	21,4	82,9	13,4
2 h....	26,6	4,7	16,0	19,1	35,1	10,5	2,0	3,5	1,1	18,1	11,6	13,6	21,6	90,7	16,1
3 h....	26,2	4,5	16,5	19,0	35,5	10,3	2,4	3,8	0,6	18,4	10,9	13,3	22,2	94,4	17,3
4 h....	25,3	3,9	17,0	18,5	35,5	11,3	2,1	3,7	0,3	18,1	11,6	13,7	21,9	97,1	17,1
6 h....	23,8	4,2	17,2	17,2	34,4	10,2	2,2	4,8	0,2	17,0	10,4	12,6	21,8	98,0	22,0
10 h....	21,9	3,8	17,2	16,3	33,5	8,5	2,3	6,4	0,4	16,0	8,9	11,2	22,4	96,5	28,7

TABLEAU 23
Feuilles de ray grass anglais — 13 juin.

D	L. C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H
1 h....	37,7	8,0	17,5	26,6	44,1	12,9	2,8	4,8	3,6	23,0	16,5	19,3	24,8	78,3	7,4
2 h....	35,6	6,6	19,5	25,6	45,1	13,0	3,6	2,9	1,9	23,7	14,9	18,5	26,6	87,4	40,8
3 h....	33,8	7,0	20,5	24,6	45,1	13,8	3,8	2,9	1,4	23,2	15,2	19,0	26,2	91,0	11,2
4 h....	33,0	7,2	20,7	24,2	44,9	13,7	3,6	3,4	1,0	23,2	14,7	18,3	26,6	93,4	12,9
6 h....	31,4	7,1	20,7	23,1	43,8	14,2	2,6	3,9	0,8	22,3	15,0	17,6	26,2	94,8	14,9
10 h....	30,3	7,3	20,4	22,4	42,8	13,1	2,6	4,8	0,4	22,0	13,5	16,0	26,8	97,2	18,0

TABLEAU 24
Tiges de ray grass anglais — 17 mai.

D	L. C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H
1 h....	31,3	6,5	17,2	22,9	40,1	12,8	2,1	2,4	3,1	19,8	15,9	18,0	22,2	80,6	10,7
2 h....	29,1	5,8	18,8	21,3	40,1	13,5	2,0	3,1	2,1	19,2	15,6	17,8	22,3	86,6	44,0
3 h....	28,4	5,9	18,9	21,1	40,0	13,8	2,0	3,1	1,1	19,7	15,2	17,2	22,8	91,0	13,6
4 h....	27,1	5,7	19,4	20,3	39,7	13,9	1,9	3,6	0,7	19,6	14,6	16,5	23,2	95,1	15,4
6 h....	26,8	5,6	20,2	20,5	40,7	14,4	4,9	3,9	0,4	20,1	14,8	16,7	24,0	97,2	16,0
10 h....	25,9	5,6	19,5	20,1	39,6	13,3	2,0	4,2	0,3	19,8	13,6	15,6	24,0	97,4	17,4

TABIEAU 25
Tiges de ray grass anglais — 13 juin.

D	L.C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H
1 h....	38,6	10,1	19,0	26,4	45,4	14,6	2,4	2,0	3,6	22,8	18,2	20,6	24,8	80,4	7,9
2 h....	36,0	9,3	20,6	25,1	45,7	15,6	2,4	2,5	2,5	22,6	18,1	20,5	25,1	86,4	10,1
3 h....	34,5	9,2	21,5	24,4	45,6	15,6	2,5	3,4	4,7	22,4	17,3	19,8	25,8	90,3	13,3
4 h....	34,1	9,0	21,8	23,8	45,6	15,8	2,6	3,3	1,1	22,7	16,9	19,5	26,0	93,8	12,8
6 h....	32,9	8,7	21,8	23,2	45,0	16,1	2,4	3,3	0,9	22,3	17,0	19,4	25,6	94,5	12,9
10 h....	31,9	8,4	21,4	23,2	44,6	16,1	2,0	3,3	0,5	22,7	16,6	18,6	26,0	96,9	12,7

TABIEAU 26
Limbes de fétuque des prés — 20 avril.

D	L.C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H
1 h....	28,0	5,5	13,5	16,4	29,9	7,1	3,1	3,4	1,1	15,3	8,2	11,3	18,7	86,7	18,1
2 h....	25,2	4,7	14,2	15,4	29,6	7,5	2,7	4,0	0,7	14,6	8,2	10,9	18,7	91,2	21,6
3 h....	25,1	5,2	14,1	15,3	29,4	7,4	2,9	3,8	0,7	14,4	8,1	11,0	18,2	91,1	21,0
4 h....	24,1	5,5	14,0	14,7	28,7	7,3	2,8	4,0	0,5	14,2	7,8	10,6	18,2	93,5	22,0
6 h....	22,7	4,9	14,7	13,7	28,4	7,5	2,7	4,5	0,2	13,4	7,7	10,4	18,0	97,2	25,3
10 h....	21,1	4,7	13,9	12,3	26,2	5,7	2,5	5,7	0,1	12,2	5,8	8,3	17,9	97,9	31,8

TABIEAU 27
Limbes de dactyle — 20 avril.

D	L.C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 %/Σ X	H 5 %/Σ H
1 h....	30,8	6,7	12,7	17,5	30,2	7,7	2,3	2,7	1,2	16,0	8,9	11,5	18,7	86,5	14,4
2 h....	29,6	6,4	13,7	16,6	30,3	7,2	2,2	4,3	0,8	15,8	8,0	10,2	20,1	90,0	21,4
3 h....	26,7	6,5	14,5	15,4	29,9	7,6	2,5	4,4	0,5	14,9	8,2	10,8	19,4	92,6	22,6
4 h....	24,5	6,6	14,6	14,8	29,4	7,6	2,5	4,4	0,5	14,9	8,2	10,8	19,4	92,6	22,6
6 h....	21,9	6,0	14,7	13,1	27,8	5,8	2,4	6,6	0,3	12,7	6,1	8,5	19,3	95,0	34,1
10 h....	20,4	7,0	14,2	11,9	26,1	5,8	2,3	6,1	0,2	11,7	6,0	8,3	17,8	96,7	34,2

TABLEAU 28

Tiges de féruque des prés — 8 juin.

D	L.C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 % / Σ X	H 5 % / P
1 h....	43,7	9,5	18,7	30,3	49,0	12,9	2,7	3,1	3,5	26,9	16,3	49,3	29,9	78,9	10,2
2 h....	40,7	8,9	18,9	28,2	47,1	13,2	2,2	3,5	2,4	25,9	15,6	47,8	29,4	84,7	11,9
3 h....	39,9	8,7	19,5	26,6	46,1	13,6	2,5	3,5	1,6	25,0	15,2	47,7	28,5	89,7	12,2
4 h....	39,0	8,7	19,6	25,8	45,4	13,7	2,2	3,7	1,4	25,0	15,1	47,3	28,7	91,0	14,9
6 h....	37,1	8,6	19,4	23,5	42,9	11,8	1,6	6,0	0,7	22,8	12,5	44,1	28,7	94,3	20,8
10 h....	35,9	8,8	18,0	22,7	40,7	10,4	1,7	5,9	0,4	22,3	10,8	42,5	28,2	95,8	21,0

TABLEAU 29

Tiges de dactyle — 8 juin.

D	L.C.	L	H	C	H + C	X 5 %	A 5 %	H 5 %	X 72 %	H 72 %	Σ X	Σ P	Σ H	X 5 % / Σ X	H 5 % / Σ H
1 h....	44,4	10,0	19,0	29,0	48,0	13,8	2,2	2,9	3,2	25,8	17,0	20,3	28,7	81,2	10,1
2 h....	41,9	9,7	18,5	28,1	46,6	12,9	2,2	3,4	2,3	25,8	15,1	47,3	29,2	85,4	11,6
3 h....	40,7	8,5	20,0	27,0	47,0	13,8	2,6	3,6	1,7	25,3	15,5	48,1	28,9	89,0	12,4
4 h....	39,3	7,8	19,8	26,7	46,4	13,5	2,3	4,0	1,3	25,4	14,8	47,1	29,3	91,2	13,6
6 h....	38,1	9,5	18,2	25,2	43,4	12,2	1,7	4,4	0,8	24,4	13,0	44,7	28,8	93,8	15,2
10 h....	37,9	9,3	16,5	24,8	41,3	10,9	1,8	3,8	0,4	24,3	11,3	43,1	28,1	96,4	13,5