

COMPARAISON DE DEUX MÉTHODES DE DOSAGE DE LA FRACTION LIGNEUSE SUR DES MATIÈRES PREMIÈRES FIBREUSES : IMPACT SUR LE RISQUE DE TROUBLES DIGESTIFS CHEZ LE LAPIN EN CROISSANCE

Rebours G. *, Vastel P., Bouchier M., Faussier G., Reys S.

Techna France Nutrition, B.P 10, 44220 Couëron, France

*Correspondant : gwenael_rebours@techna.fr

Résumé – Les fibres, notamment la fraction ligneuse, sont un facteur clé de la santé digestive du lapin en croissance. Plusieurs méthodes de dosage de la lignine existent. Les méthodes normalisées, utilisées en routine dans les laboratoires de contrôle, sont la mesure de l'ADL par la méthode de Van Soest (non corrigée pour les tannins), et la méthode directe de la Lignine Sulfurique. Cette étude compare ces deux méthodes afin de déterminer la plus pertinente pour améliorer la précision des apports en lignines et, mieux prédire les risques de troubles digestifs. Des écarts importants entre les 2 méthodes ont été observés sur les matières premières issues du raisin. L'analyse des composés phénoliques confirme que la méthode de Van Soest (sans correction au sulfite de sodium en cas de tannins) induit pour les matières premières à base de raisin, une surestimation de la fraction ligneuse (jusqu'à +8 points), expliquée par la formation de complexes avec les polyphénols (tannins). La meilleure additivité des valeurs unitaires des matières premières est obtenue par la méthode de la Lignine Sulfurique. Une méta-analyse à partir d'études antérieures (13 régimes) met en évidence une meilleure réponse du risque sanitaire des lapins (via l'Indice de Risque Sanitaire Digestif « IRSD ») à la fraction ligneuse évaluée par la méthode directe de la Lignine Sulfurique, dans le cas de régimes contenant des produits du raisin. En effet, l'ingéré ADL centré intra essai n'a pas d'effet significatif sur l'IRSD ($P=0,93$), alors que l'ingéré Lignine a un effet significatif ($p=0,011$). Ainsi, au sein d'un essai, on peut prédire que l'IRSD diminue de 13,3 points ($r^2=0,98$) par gramme de lignine ingéré. Il convient donc d'analyser les matières premières riches en tannins, avec la méthode de la Lignine Sulfurique (Norme NF EN ISO 13906, 2008), pour mieux prévoir l'IRSD.

Abstract – Comparison of two methods related to the ligneous fraction analysis, on fibrous raw materials: impact on the risk of digestive disorders in growing rabbits. Fibres, especially the ligneous fraction, are a key factor for ensuring rabbits' digestive health. Several methods are designed to analyse the lignin content. The standard methods used routinely in laboratories are the measurement of ADL by the Van Soest method (uncorrected for tannin) and the direct method of Sulfuric Lignin. This study aimed to compare these two methods to determine the most relevant to improve the precision of the fibre intake and to better predict the risks of digestive disorders. Significant differences between the two methods were observed on raw materials derived from grape. The analysis of phenolic compounds confirmed that the method of Van Soest (without correction with sodium sulfite in case of tannins) induced, for raw materials based on grapes, an overestimation of the ligneous fraction (up to 8 points), explained by the formation of complexes with polyphenols (tannins). The best additivity of the unit values of the raw materials was obtained by the lignin sulfuric method. A meta-analysis from previous studies (13 diets) revealed a better response on the health risk of rabbits (via Digestive Health Risk Index "IRSD") to the ligneous fraction evaluated by the direct method of Sulfuric Lignin, in the case of diets containing grape products. Indeed, ADL intake (intra-test centered) did not have a significant effect on the IRSD ($p=0.93$), whereas Lignin intake had a significant effect ($p=0.011$). Thus, within a trial, it can be predicted that the IRSD decreases by 13.3 points ($r^2 = 0.98$) per gram of lignin ingested. It is therefore necessary to analyze the raw materials rich in tannins with the Lignin Sulfuric method (NF EN ISO 13906, 2008) to better predict the IRSD.

Introduction

Les fibres sont un constituant important des aliments pour lapins car, outre leur rôle de nutriments, elles ont un effet sur le niveau d'ingestion, la vitesse de transit des aliments et elles constituent le substrat majeur du microbiote caecal (Combes *et al.*, 2013). Leur rôle dans la gestion du risque sanitaire digestif a été démontré, sachant qu'il diffère selon les fractions

considérées : lignines, cellulose, hémicelluloses, pectines (Gidenne, 2015). Plusieurs études ont déjà montré l'impact positif d'une concentration en lignine de l'aliment sur la mortalité par troubles digestifs (Perez *et al.*, 1994 ; Colin *et al.*, 2007). Il est donc primordial de bien évaluer les composants des matières premières, notamment les lignines, afin d'améliorer la précision des apports nutritionnels et de

mieux prévenir les risques de diarrhée (Gidenne, 2015). Pour cela, plusieurs méthodes de dosage de la fraction ligneuse existent. Seules deux méthodes sont normalisées selon les normes AFNOR françaises et européennes, et utilisées en routine dans les laboratoires en vue d'une exploitation en nutrition animale : la méthode de la Lignine Sulfurique, et la méthode de Van Soest (procédure séquentielle). Pour cette dernière, un correctif est recommandé pour des échantillons riches en tannins ou polyphénols, consistant à ajouter du sulfite de sodium lors de l'extraction du résidu NDF (Giger, 1985; Hintz *et al.*, 1996).

Dans un premier temps, l'étude vise d'une part à comparer ces deux méthodes sur plusieurs matières premières et sur un mélange fibreux, le Lapilest®, utilisés en alimentation cunicole ; et d'autre part à valider l'additivité des valeurs lors de formulation alimentaire, pour juger la pertinence de chaque méthode. Dans un second temps, en relation avec les travaux de Terrill *et al.* (1994), sur l'interférence des tannins dans la méthode de Van Soest, des analyses des composés phénoliques ont été réalisées afin de justifier les différences constatées sur les matières premières analysées. Enfin, dans un troisième temps, une méta-analyse a été réalisée pour déterminer la meilleure réponse en relation avec l'état sanitaire du lapin en croissance, dans le cas d'une alimentation contenant des produits du raisin.

1. Matériel et méthodes

1.1. Analyses de la fraction ligneuse de matières premières

184 échantillons de 10 matières premières utilisées en alimentation cunicole, ont été analysés sur les critères ADL (Acid Detergent Lignin) Van Soest (AFNOR, NF V 18-122, 2013 prétraité à l' α -amylase et une protéase) et Lignine Sulfurique (NF EN ISO 13906, 2008) au laboratoire de Techna France Nutrition.

1.2. Analyses de la fraction ligneuse d'un mélange fibreux et étude d'additivité des méthodes d'analyses

37 échantillons provenant de 37 fabrications de Lapilest® (aliment fibreux spécialement conçu pour la nutrition cunicole, composé de cinq matières premières, dont des produits du raisin) ont été analysés sur les critères ADL et Lignine Sulfurique, au laboratoire de Techna France Nutrition.

Ces 2 critères ont également été analysés sur un échantillon de 5 matières premières constitutives d'un lot de Lapilest®, lui-même analysé, afin de comparer la somme pondérée des résultats sur matières premières aux valeurs analytiques du mélange.

1.3. Analyses des composés phénoliques de matières premières

Les composés phénoliques des matières premières constitutives du Lapilest® ont été quantifiés par

chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-DAD-MS), au laboratoire Polyphénols Biotech de Villenave d'Ornon (France) (Granica S., *et al.*, 2013).

1.4. Méta-analyse à partir d'essais zootechniques en engraissement

Une méta-analyse a été réalisée, à partir de 13 régimes (représentant 2184 lapins) issus de 4 essais distincts conduits sur des lapins d'engraissement, en station expérimentale. Les essais ont été sélectionnés sur les thématiques suivantes : niveaux ou sources de lignines (régimes intégrant des produits du raisin), afin de déterminer, dans ce cadre, la méthode de caractérisation de la lignine qui offre la meilleure prédiction intra essai de l'indice de risque sanitaire digestif (IRSD : cumul de la mortalité et morbidité digestives). Le modèle de covariance utilisé habituellement en méta-analyse (réponse de la répétition k pour un ingéré i au sein de l'essai j : $Y_{ijk} = \beta_0 + \beta_1 + \beta_1 \times \text{ing.ijk} + \beta_2 \times \text{inj.ijk} + \epsilon_{ijk}$) ne peut s'appliquer ici sur les données brutes du fait des plages de variations des variables explicatives "ingérés Lignine" et "ingérés ADL" ; en effet, les effets inter et intra essai sont confondus. C'est pourquoi ce modèle a été ajusté après avoir centré les variables explicatives "ingérés Lignine" et "ingérés ADL" intra essai (Sauvant *et al.* 2005) sous le logiciel R version 3.1.1®.

2. Résultats et discussion

2.1. Comparaison des résultats d'analyses des deux méthodes sur un panel de matières premières

On constate en Tableau 1 que les écarts entre les deux méthodes d'analyses du résidu ligneux sont très variables selon les matières premières. Sur la plupart d'entre elles, l'écart entre les deux méthodes est nul ou faible (entre -0,7 et +0,7 point), à l'exception des produits du raisin pour lesquels la méthode d'ADL de Van Soest révèle des niveaux supérieurs à la méthode de la Lignine Sulfurique (entre +4,4 et +8,0 points).

Tableau 1 : Teneurs en fraction ligneuse de matières premières pour l'alimentation cunicole.

	ADL %		Lignine sulfurique %		ADL-Lignine sulfurique
	moy	e-t	moy	e-t	
Pulpe de betterave ($n=19$)	2,2	1,2	2,3	1,6	-0,1
Son de blé ($n=9$)	3,9	1,2	3,2	0,6	+0,7
Luzerne déshydratée ($n=21$)	7,2	0,9	6,6	0,9	+0,6
Tourteau de tournesol ($n=14$)	8,4	1,5	7,7	1,7	+0,7
Tourteau de colza ($n=9$)	9,4	1,0	9,0	0,7	+0,4
Coque de tournesol ($n=17$)	19,1	1,0	19,2	1,3	-0,1
Marc de pomme ($n=18$)	21,6	2,2	22,3	2,5	-0,7
Pulpe de raisin ($n=42$)	32,8	4,4	24,8	4,4	+8,0
Pépin de raisin ($n=23$)	43,5	3,1	38,0	5,1	+5,5
Tourteau de pépin de raisin ($n=12$)	52,5	2,9	48,1	3,8	+4,4

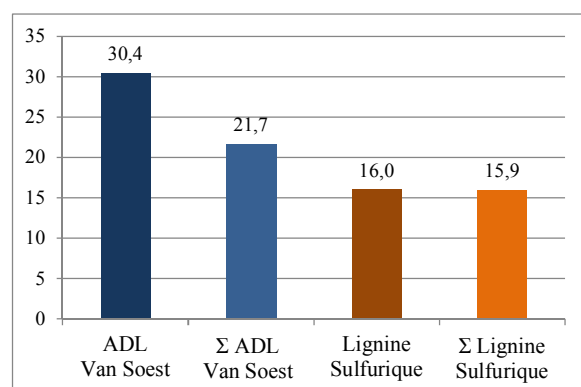
2.2. Analyses d'un mélange fibreux et étude d'additivité des méthodes d'analyses

En Tableau 2, les 37 analyses de Lapilest® révèlent des écarts importants entre les 2 méthodes (en moyenne +6,9 points via la méthode de Van Soest). Au niveau des matières premières qui composent le Lapilest®, on retrouve, comme en paragraphe précédent, des valeurs ADL supérieures à celles de Lignine Sulfurique, pour les produits issus du raisin (Pulpe et Pépins). D'autre part, d'après la Figure 1, on constate que la somme pondérée des valeurs de Lignine Sulfurique des matières premières est identique à la valeur de Lignine Sulfurique mesurée sur le lot correspondant de Lapilest® (respectivement 15,9% et 16,0%), ce qui n'est pas le cas via la méthode Van Soest (respectivement 21,7% et 30,4%). Cet écart provient des produits du raisin et suggère une surestimation de la méthode de Van Soest, alors que la méthode de la Lignine Sulfurique restitue les valeurs unitaires des matières premières. Ce constat d'additivité des résultats analytiques, respectée uniquement dans le cas de la méthode de la Lignine Sulfurique, donne plus de pertinence à cette approche pour caractériser la fraction fibreuse des matières premières et produits finis intégrant des produits du raisin.

Tableau 2 : Mesures comparées des niveaux d'ADL et Lignine Sulfurique sur le LAPILEST® et ses matières premières constitutives

	ADL	Lignine Sulfurique	Δ ADL-Lignine Sulfurique
LAPILEST® (n=37)	25,7	18,8	6,9
LAPILEST® (n=1)	30,4	16,0	14,4
Pulpe de betterave	1,3	1,0	0,3
Coque de tournesol	20,6	19,1	1,5
Marc de pomme	20,0	18,7	1,3
Pulpe de raisin	33,0	20,6	12,4
Pépin de raisin	44,3	33,8	10,5

Figure 1 : Pourcentage de Lignines dans le Lapilest® (mesure directe et somme des mesures effectuées sur les éléments constitutifs)



2.3. Analyse des composés phénoliques des matières premières

Dans cette étude, l'analyse des composés phénoliques réalisée sur une sélection de quelques matières

premières montre que les produits du raisin sont les plus riches en polyphénols (3380 µg/g d'extrait brut pour la pulpe de raisin et 5208 µg/g d'extrait brut pour le pépin de raisin) avec une proportion importante de flavonoïdes (respectivement 87,6% et 92,9%), sous-famille qui contient notamment les tannins (Tableau 3). Les coques de tournesol présentent un niveau intermédiaire en polyphénols (1042 µg/g d'extrait brut) mais qui n'appartiennent pas à la classe des flavonoïdes. Le marc de pomme contient également des polyphénols, en quantité moindre (602 µg/g d'extrait brut) alors que la pulpe de betterave en est dépourvue.

Tableau 3 : Quantification des composés phénoliques des matières premières (µg/g d'extrait brut)

	Acides phénoliques	Flavonoïdes	Total
Pulpe de betterave	0	0	0
Coque de tournesol	1042	0	1042
Marc de pomme	105	497	602
Pulpe de raisin	420	2960	3380
Pépin de raisin	370	4838	5208

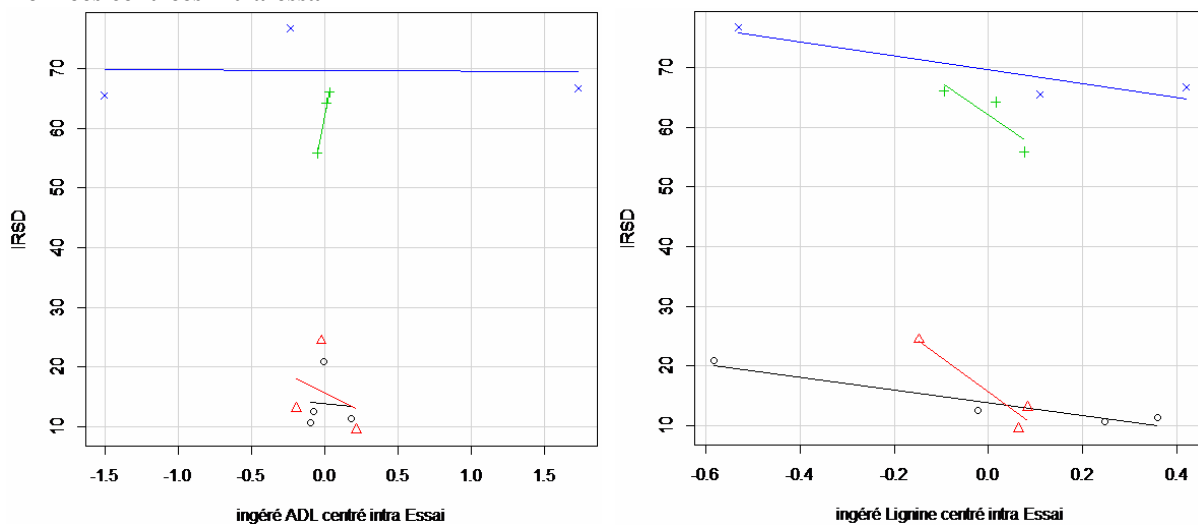
La pulpe de raisin et le pépin de raisin, qui présentent le plus d'écart entre la valeur ADL Van Soest et la valeur Lignine Sulfurique, contiennent le plus de flavonoïdes. Cela corrobore les travaux de Terrill *et al.* (1994), qui ont établi qu'en présence de tannins (composés phénoliques), l'étape d'attaque au détergent neutre de la méthode Van Soest engendre des complexes avec les protéines. Le résidu ADL obtenu par la méthode de Van Soest contiendrait donc des tannins polymérisés (Godin, 2011) qui surestimeraient le niveau de lignine mesuré. Hintz *et al.* (1996) ont montré l'intérêt d'utiliser du sulfite de sodium lors de l'extraction du résidu NDF pour hydrolyser au préalable ces protéines d'échantillons riches en tannins ou polyphénols. Toutefois cette méthode corrective n'est pas normalisée et donc peu utilisée dans les laboratoires de contrôle.

2.4. Méta-analyse à partir d'essais zootechniques en engraissement

L'ajustement du modèle de covariance sur les données centrées intra-essai (figure 2) nous permet de montrer que l'interaction entre les effets essai et l'ingéré Lignine est non significative ($p=0,102$) : la pente estimée est donc généralisable à l'ensemble des essais. Cette pente est significativement non nulle ($p=0,011$) : au sein d'un essai, on prédit que l'IRSD diminue de 13,3 points par gramme de lignine ingéré. En revanche, l'ingéré ADL centré intra essai n'a pas d'effet significatif sur l'IRSD ($p=0,93$).

Cette méta-analyse montre, dans le cas de régimes contenant des produits du raisin, une meilleure relation entre l'ingéré de Lignine Sulfurique et l'IRSD, comparé à l'ingéré d'ADL.

Figure 2 : IRSD en fonction de l'ingéré ADL (à gauche) ou de l'ingéré Lignine Sulfurique (à droite) - Données centrées intra-essai



Conclusions

Cette étude confirme les différences importantes entre les deux méthodes d'analyses des lignines (ADL de Van Soest non corrigée au sulfite de sodium et Lignine Sulfurique), pour des matières premières riches en polyphénols de type tannins. Cela induit, pour les aliments contenant des produits du raisin, une mauvaise prédiction de la fraction ligneuse par cette méthode. La caractérisation de la fraction ligneuse de matières premières riches en tannins, avec une méthode normalisée, devrait suivre la technique de la Lignine Sulfurique, pour mieux prédire le niveau de risque digestif chez le lapin en croissance.

Références

- AFNOR, 2008. Aliments des animaux. Détermination des teneurs en fibres au détergent acide (ADF) et en Lignine Sulfurique (ADL). NF EN ISO 13906
- AFNOR, 2013. Aliments des animaux. Détermination séquentielle des constituants pariétaux. Méthode par traitement aux détergents neutre et acide et à l'acide sulfurique. NFV 18-122
- Colin M., Binet E., Prigent A.Y., 2007. Influence de l'incorporation d'un concentré fibreux riche en lignine sur la mortalité, la croissance et le rendement à l'abattage du lapin, 12^{èmes} J. Rech. Cunicole, Le Mans, 113-116
- Combes S., Fortun-Lamothe L., Cauquil L., Gidenne T., 2013. Engineering the rabbit digestive ecosystem to improve digestive health and efficacy. *Animal* 7, 1429-1439

- Gidenne T., 2015. Dietary fibres in the nutrition of the growing rabbit and recommendations to preserve digestive health: a review. *Animal* 9, 227-242
- Giger S., 1985. Revue sur les méthodes de dosage de la lignine utilisées en alimentation animale. *Ann. Zootech.*, 34, 85-118.
- Giger S., Pochet S., 1987. Méthodes d'estimation des constituants pariétaux dans les aliments destinés aux ruminants. *Bull. Tech. C.R.Z.V. Theix, INRA*, 70, 49-60.
- Godin B., 2011. Revue bibliographique sur les méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux des biomasses lignocellulosiques. *Biotech. Agr. Soc. Environ.* 15, 165-182.
- Granica S., Krupa K., Klebowska A., Kiss A., 2013. Development and validation of HPLC-DAD-CAD-MS3 method for qualitative and quantitative standardization of polyphenols in *Agrimoniae eupatoriae herba*. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 86, 112-122.
- Hintz R.W., Mertens D.R., Albrecht K.A., 1996. Effects of sodium sulfite on recovery and composition of detergent fiber and lignin. *J.A.O.A.C Int.* 79, 16-22
- Koné A.R., Guérin H., Richard D., 1987. Contribution à la mise au point d'une méthode d'étude de la valeur nutritive des fourrages ligneux, Shinaire régional sur les fourrages et l'alimentation des Ruminants
- Perez JM., Gidenne T., Lebas F., Caudron I., Arveux P., et al., 1994. Apports de lignines et alimentation du lapin en croissance. II. Conséquences sur les performances et la mortalité. *Annales de zootechnie*, 43, 323-332
- Sauvant D., Schmidely P., Daudin J.J., 2005. Les méta-analyses des données expérimentales : applications en nutrition animale, *INRA Prod. Anim.* 18, 63-73
- Terrill T.H., Windham W.R., Evans J.J., Hovelannd C.S., 1994. Effect of drying Method and condensed Tannin on Detergent Fiber Analysis of *Sericea lespedeza*, *J. Sci. Food Agric* 1994, 66, 337-343.