

Les légumineuses, gage de produits de qualité différenciée

E. Froidmont, F. Daems, V. Decruyenaere, F. Dehareng, D. Franckson, A. Lefevre, V. Ninane, JM Romnee

Centre wallon de Recherches agronomiques

Il est bien connu qu'un animal nourri à l'herbe produit du lait ou de la viande offrant une qualité nutritionnelle spécifique. Ceci provient notamment de la richesse de l'herbe en certains acides gras polyinsaturés, en caroténoïdes ou encore en vitamines. La diversité floristique des prairies a un effet indéniable sur la qualité des productions animales, tout comme le stade de développement des espèces pâturées, étant donné qu'un bon nombre de ces constituants sont associés aux feuilles (**Williams et al., 1998 ; Collomb et al., 2002 ; Martin et al., 2002 ; Graulet et al., 2008**). Par contre, le mode de conservation (ensilage, foin...) limite partiellement cet atout de l'herbe du fait que des constituants, tels que les caroténoïdes, sont sensibles à l'oxydation (**Chauveau-Duriot et al., 2005**).

Les polyphénols constituent un autre groupe de composés présents dans les végétaux et susceptibles d'influencer la qualité des productions animales. Parmi ceux-ci, les isoflavones sont des molécules présentes spécifiquement dans les légumineuses. Deux d'entre elles, la daidzéine et la formononétine, sont particulièrement intéressantes. Elles sont en effet métabolisées par des bactéries spécifiques du tube digestif de l'animal qui les transforment en un dérivé microbien: l'équol. Plusieurs études suggèrent que ce métabolite, absent du règne végétal, aurait un réel intérêt pour la santé humaine, en prévenant notamment les risques de développer certains types de cancers hormono-dépendants, des maladies cardiovasculaires et en réduisant les troubles liés à la ménopause (**Setchell et al., 2002**). Développer des modes de production permettant d'enrichir les productions animales en équol serait d'autant plus intéressant que seulement 25% de la population occidentale aurait la chance de disposer de cette microflore capable de le synthétiser, contre 80% dans les pays asiatiques (**Jackson et al., 2011**).

Plusieurs études menées au CRA-W par le biais des projets PhytoHealth (Fonds Moerman) et GrassMilk (SPW, DGO3) ont pour objectif d'étudier les possibilités d'enrichissement du lait en équol. Un premier essai montre que faire pâturer les vaches sur des parcelles riches en trèfle violet (TV) enrichit le lait en équol alors qu'il n'en contient quasiment pas lorsque ces mêmes vaches pâturent des parcelles composées de graminées. Cet essai montre une variabilité animale considérable dans la réponse obtenue, qui pourrait s'expliquer par la spécificité de la flore microbienne digestive et des différences dans le métabolisme digestif de ces molécules (**Adler et al., 2014**). Parmi les autres constituants d'intérêt du lait, le profil en acides gras n'était pas influencé par le type de couvert pâturé. Ceci peut s'expliquer par le fait que d'autres facteurs que la composition floristique, et en particulier le stade de végétation (**Dewurst et al., 2001**), influencent les teneurs ou le profil en acides gras de l'herbe.

Développer une filière de qualité différenciée basée sur des composés tels que l'équol implique d'être en mesure de le produire tout au long de l'année, c'est-à-dire aussi en période hivernale. Dès lors, il est important de savoir si les isoflavones précurseurs de l'herbe se maintiennent dans les fourrages conservés. Un essai d'ensilage de TV mené en micro-silos (**Daems et al., 2016**) a montré

que, malgré des paramètres de conservation tout à fait corrects, la teneur en isoflavones de l'ensilage diminuait de l'ordre de 65% dès les 15 premiers jours d'ensilage comparativement aux teneurs mesurées dans l'herbe fraîche. Le fait de préfaner le TV protégeait quelque peu les isoflavones. Dès lors, un enrichissement en équol est-il réellement envisageable en période hivernale ?

C'est ce qu'un troisième essai a évalué en comparant sur vaches laitières deux régimes contenant chacun 80% d'ensilage d'herbe et ne différant que par la nature de cet ensilage (ensilage de trèfle blanc, TV, dactyle vs ensilage de graminées). Pour des performances zootechniques similaires, cet essai a montré un enrichissement très important en équol du lait produit à partir de l'ensilage contenant les légumineuses. Si la présence d'isoflavones est bien déterminante sur l'apparition d'équol dans le lait, l'analyse des données des essais au pâturage et hivernal n'a pas permis d'établir une relation précise entre les quantités d'isoflavones ingérées et les teneurs en équol des laits. Il semble que des facteurs alimentaires et métaboliques soient susceptibles d'influencer grandement le rendement de transformation des isoflavones en équol, qui reste un processus complexe (**Njastad et al. 2014**). En ce qui concerne la composition en acides gras du lait, cet essai a confirmé l'intérêt de l'ensilage riche en légumineuses sur la proportion d'acides gras polyinsaturés. Le TV contiendrait en effet des polyphénols oxydase capables de limiter la lipolyse des acides gras de l'herbe lors de l'ensilage ; le trèfle blanc contiendrait des saponines pouvant jouer le même rôle (**Van Ranst et al., 2009, 2011**). Enfin, les légumineuses étant plus digestibles que les graminées, elles occasionnent une vidange plus rapide des particules alimentaires du rumen (**Dewurst et al., 2003**). Elles limitent de ce fait la biohydrogénation des acides gras et contribuent ainsi à protéger les acides gras polyinsaturés d'origine alimentaire.

Parmi les légumineuses, le TV semble être particulièrement intéressant pour accroître la teneur en équol du lait (**Mustonen et al. 2009**). Mais le soja est également une légumineuse, riche en daidzéine et en génistéine (**Wang et Murphy, 1994**), et largement utilisée comme source de protéines dans nos élevages. Une ration riche en tourteau de soja permet-elle d'atteindre le même résultat ? C'est la question à laquelle nous avons tenté de répondre dans un essai mis en place au début 2016 en comparant deux rations équivalentes sur le plan nutritionnel mais apportant des isoflavones par le biais de TV ou de tourteau de soja. Les premiers résultats montrent que le TV accroît de manière bien plus importante les taux d'équol dans le sang et le lait que le tourteau de soja. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'ensilage de TV (7 kg MS/vache/jour) peut s'incorporer dans une plus grande proportion dans l'alimentation des ruminants que le tourteau de soja (2,7 kg MS/vache/jour). Des analyses sont en cours afin de déterminer les teneurs exactes en isoflavones des aliments ingérés. Il n'est cependant pas impossible que le processus d'extraction de l'huile réduise les teneurs en isoflavones du tourteau de soja comparativement à la graine initiale, même si les isoflavones ne sont pas solubles dans l'hexane qui est le solvant le plus utilisé pour la trituration (**Eldridge et Kwolek, 1983**). Le TV serait alors un aliment de premier choix pour optimiser la teneur en équol du lait, avec un délai de réponse très rapide. La teneur en équol des laits pasteurisés, stérilisés et écrémés ainsi que des produits laitiers (fromage, yoghourt, kefir, crème, petit lait) confectionnés à partir des laits de cet essai constituait un autre objectif. Les premiers résultats montrent que les traitements à la chaleur des laits ont peu d'influence sur les teneurs en équol, et suggèrent que cette molécule persiste dans le fromage et le lait écrémé comme suggéré par **King et al. (1998)**, **Uzzan et al. (2007)** et **Křížová et al. (2011)**.

Une autre question soulevée sur le sujet était de savoir si le lait que nous consommons au quotidien, présent dans les rayons des distributeurs, contient de l'équol. Une cinquantaine de laits issus de grandes surfaces et de quelques fermes ont dès lors été collectés et analysés en février 2013 (**Daems et al., 2015**). Cette étude a montré que l'équol était présent à raison de 20 à 40 ng/mL dans les laits issus de l'agriculture conventionnelle. Les laits provenant de l'agriculture biologique étaient plus riches en équol (en moyenne 100 ng/mL). Comme le mentionne **Mustonen et al. (2009) et Adler et al. (2015)**, l'utilisation plus importante de fourrages riches en trèfle dans ce type d'agriculture est la principale raison de cette différence. Notons que des laits beaucoup plus riches en équol que ceux récoltés dans cette étude ont été obtenus dans d'autres pays, à d'autres périodes [411 ng/mL pour **Hoikkala et al., 2007** et 191 ng/mL pour **Antignac et al. (2004)**]. De telles teneurs sont encourageantes étant donné que seuls le lait & produits laitiers ainsi que les œufs peuvent constituer une source significative d'équol en alimentation humaine, les produits carnés (viandes de porc, bœuf, volaille) et le poisson n'en contenant pas (**Kuhnle et al., 2008**).

Une dernière question était de savoir si une consommation normale de lait pouvait apporter des doses d'équol intéressantes pour la santé. Il est évident que la réponse à cette question dépend des aspects santé considérés et de leur sévérité. Les études ayant apporté un supplément d'équol à des humains sont très rares et n'ont souvent testé qu'une ou deux doses importantes. Pour **Ishiwata et al. (2009)**, l'apport de 10 mg d'équol trois fois par jour supprime de nombreux effets néfastes liés à la ménopause. Selon **Usui et al. (2013)**, un supplément de 10 mg/j réduit les problèmes de surpoids et d'obésité. Un tel supplément correspond toutefois à une ingestion de 50 litres de lait contenant 200 ng/mL d'équol !

Une autre réflexion est de partir du principe que la population asiatique a beaucoup moins de problèmes de santé d'ordre cardiovasculaire, obésité, ostéoporose ou de cancers hormono dépendants que la population occidentale et d'attribuer cet effet à leur capacité à transformer les isoflavones en équol. Or, selon **Jackson et al. (2011) et Fujimoto et al. (2008)**, la concentration plasmatique en équol de la population asiatique varie en moyenne entre 14 et 24 ng/mL, soit 35.000 à 60.000 ng au niveau corporel. Sur cette base, nous pouvons calculer qu'un verre de 300 mL lait dosant 200 ng/mL d'équol pourrait assurer une telle dose journalière. Cette approche est simpliste et dépend de plusieurs hypothèses (temps de métabolisation de l'équol, effet santé de l'équol...). Elle laisse néanmoins penser qu'un verre de lait enrichi en équol pourrait déjà s'avérer intéressant d'un point de vue préventif. Des études cliniques à large échelle devront permettre de prendre position dans le futur (**Magee et al., 2011**).

En conclusion, en plus de leurs nombreux avantages sur les plans agronomique (fixation symbiotique d'azote, services agro-systémiques...) et zootechnique (équilibre protéique des rations, autonomie alimentaire...), les légumineuses fourragères sont une source de métabolites secondaires susceptibles d'influencer la qualité des productions animales. La diversité de ces molécules représente un monde nouveau à explorer. Le développement d'une nouvelle filière sur de telles bases nutritionnelles nécessitera d'une part d'associer le monde médical à la réflexion agronomique, et d'autre part de valider des techniques analytiques, tels que la spectrométrie infra rouge, pour certifier de manière simple et rapide ces atouts nutritionnels.

Références bibliographiques

ADLER S.A., PURUP S., HANSEN-MOLLER J., THUEN E., GUSTAVSON A.M., STEINSHAMN H. (2014). Phyto-oestrogens and their metabolites in milk produced on two pastures with different botanical compositions. *Livestock Science* 163, 62-68.

ADLER S.A., PURUP S., HANSEN-MOLLER J., THUEN E., STEINSHAMN H. (2015). Phytoestrogens and their metabolites in bulk-tank milk: effects of farm management and season. *PLoS ONE* 10(5): e0127187. doi:10.1371/journal.pone.0127187

ANTIGNAC J.-P., CARIOU R., LE BIZEC B., ANDRÉ F. (2004). New data regarding phytoestrogens content in bovine milk. *Food Chemistry*, 87, 275–281.

CHAUVEAU-DURIOT B., THOMAS D., PORTELLI J., DOREAU M. (2005). Effet du mode de conservation sur la teneur en caroténoïdes des fourrages. *Renc. Rech. Rum.* 15, 117.

COLLOMB M., BÜTIKOFER U., SIEBER R., JEANGROS B., BOSSET J.O. (2002). Correlation between fatty acids in cow's milk fat produced in the Lowlands, Mountains and Highlands of Switzerland and botanical composition of the fodder. *Int. Dairy J.* 12, 661-666.

DAEMS F., DECRUYENAERE V., AGNEESSENS R., LOGNAY G., ROMNÉE JM, FROIDMONT E. (2016). Evolution of isoflavone contents in red clover (*Trifolium pretense* L.) silage with laboratory-scale silages using vacuum-packing system. *Anim. Feed Sci. Tech.* (accepted)

DAEMS F., JASSELETTE C., ROMNÉE JM, LOGNAY G., FROIDMONT E. (2015). Validation of an UPLC-MS/MS method to quantify equol in commercial cow's milk. *Dairy Science and Technology* 95 (3):303-319.

DEWURST R.J., EVANS R.T., SCOLLAN N.D., MOORBY J.M., MERRY R.J., WILKINS R.J. (2003). Comparaison of grass and legume silages for milk production. É. In vivo and in sacco evaluations of rumen function. *J. Dairy Sci.* 86: 2612-2621.

DEWURST R.J., SCOLLAN N.D., YOUELL S.J., TWEED J.K.S., HUMPHREYS M.O. (2001). Influence of species, cutting date and cutting interval on the fatty acid composition of grasses. *Grass and Forage Science*, 56 (1) 68-74.

ELDRIDGE A.C., KWOLEK W.F. (1983). Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *J. Agric. Food. Chem.* 31, 394-395.

FUJIMOTO K, TANAKA M, HIRAO Y, NAGATA Y, MORI M, MIYANAGA N, AKAZA H, KIM WJ. (2008). Age-stratified serum levels of isoflavones and proportion of equol producers in Japanese and Korean healthy men. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 11(3):252-257.

GRAULET B., CHAUVEAU-DURIOT B., MARTIN B., PRADEL P., GAREL J.P., FARUGGIA A. (2008). Comparaison des teneurs en micronutriments liposolubles du lait de vaches au cours de la période de pâturage sur deux systèmes prairiaux contrastés. *Renc. Rech. Rum.* 15, 120.

HOIKKALA A., MUSTONEN E., SAASTAMOINEN I., JOKELA T., SALONIEMI H., WÄHÄLÄ K. (2007). High levels of equol in organic skimmed Finnish cow milk. *Mol. Nutr. Food Res.* 51 (7), 782-786.

ISHIWATA N, MELBY M.K., MIZUNO S, WATANABE S. (2009). New equol supplement for relieving menopausal symptoms: randomized, placebo-controlled trial of Japanese women. *Menopause* 16(1):141-148. KING RA, MANO MM, HEAD RJ (1998). Assessment of isoflavonoid concentrations in Australian bovine milk samples. *J Dairy Res* 65(3): 479–489. KŘÍŽOVÁ L, VESELÝ A, TŘINÁCTÝ J, SCHULZOVÁ

V, HURAJOVÁ A, HAJŠLOVÁ J, KVASNIČKOVÁ E, HAVLÍKOVÁ Š (2011). Changes in isoflavones concentrations in cheese during processing and ripening. *Acta Univ Agric et Silvicae Mendel Brun* 59: 153–162.

JACKSON R.L., GREIWE J.S., SCHWEN R.J. (2011). Emerging evidence of the health benefits of S-equol, an estrogen receptor β agonist. *Nutrition Reviews* 69(8): 432–448

KUHNLE G.G., DELL'AQUILA C., ASPINALL S.M., RUNSWICK S.A., MULLIGAN A.A., BINGHAM S.A. (2008). Phytoestrogen content of foods of animal origin: dairy products, eggs, meat, fish, and seafood. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10099-10104.

MARTIN B., FERLAY A., PRADEL P., ROCK E., GROlier P., DUPONT D., GRUFFAT D., BESLE JM, BALLOT N., CHILLIARD Y., COULON JB (2002). Variabilité de la teneur des laits en constituants d'intérêt nutritionnel selon la nature des fourrages consommés par les vaches laitières. *Renc. Rech. Rum.* 9, 347-350.

MAGEE P.J. (2011). Is equol beneficial to health ? Symposium on 'Nutrition: getting the balance right in 2010' UK, Coleraine, 16-18 June 2010. *Proc. Nutr. Soc.* 70, 10-18.

MUSTONEN E.A., TUORI M., SAASTAMOINEN I., TAPONEN J., WAHALA K., SALONIEMI H., VANHATALO A. (2009). Equol in milk of dairy cows is derived from forage legumes such as red clover. *Br. J. Nutr.* 102, 1552-1556.

NJASTAD K.M., ADLER S.A., HANSEN-MOLLER J., THUEN E., GUSTAVSSON A.M., STEINSHAMN H. (2014). Gastrointestinal metabolism of phytoestrogens in lactating dairy cows fed silages with different botanical composition. *J. Dairy Sci.* 97: 7735-7750.

SETCHELL K.D.R., BROWN N.M., LYDEKING-OLSEN E. (2002). The clinical importance of the metabolite equol – a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J. Nutr.* 132: 3577-3584.

VAN RANST G., LEE M.R.F., FIEVEZ V. (2011) Red clover polyphenol oxidase and lipid metabolism. *Animal* 5:4, 512-521.

USUI T., TOCHIYA M., SASAKI Y., MURANAKA K., YAMAKAGE H., HIMENO A., SHIMATSU A., INAGUMA A., UENO T., UCHIYAMA S., SATOH-ASAHARA N. (2013). Effects of natural S-equol supplements on overweight or obesity and metabolic syndrome in the Japanese, based on sex and equol status. *Clin. Endocr.* 78(3)365-372.

UZZAN M, NECHREBEKI J, LABUZA TP (2007) Thermal and storage stability of nutraceuticals in a milk beverage dietary supplement. *J Food Sci* 72(3): E109–E114.

VAN RANST G., FIEVEZ V., VANDEWALLE M., DE RIEK J., VAN BOCKSTAELE E. (2009). Influence of herbage species, cultivar and cutting date on fatty acid composition of herbage and lipid metabolism during ensiling. *Grass and Forage Science*, 64, 196-207.

WANG H., MURPHY P.A. (1994). Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year and location. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1674-1677.

WILLIAMS A.W., BOILEAU T.W.M., ERDMAN J.W. (1998). Factors influencing the uptake and absorption of carotenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 218, 106.