

## Les flavonoïdes, des fourrages au lait

J.M. BESLE (1), J.L. LAMAISON (2), P. PRADEL (3), D. FRAISSE (2), D. VIALA (1), B. MARTIN (1)

(1) INRA, URH, Clermont Ferrand-Theix, 63122 St Genès Champanelle, France

(2) U.F.R. Pharmacie, pl. H. Dunant, 63000 Clermont Ferrand, France,

(3) Domaine de la Borie, INRA, 15190 Marcenat, France.

**RESUME** - Les fourrages sont riches en polyphénols. Parmi ceux-ci, les flavonoïdes, représentent une fraction qualitativement importante pour leurs actions bénéfiques sur la santé de l'homme. Ce texte décrit les résultats obtenus dans quelques expérimentations récentes où les flavonoïdes et d'autres composés phénoliques simples (FCP) ont été dosés dans des fourrages et des laits correspondants.

Dans l'expérience 1, six régimes différents ont été distribués à 6 lots de vaches laitières : concentré (65 %) et foin grossier, ensilage de maïs ou de ray-grass, foin de ray-grass, foin de prairie naturelle, ou prairie naturelle pâturée. Les teneurs en FCP, analysés par CLHP, variaient de 0,8 à 8 g kg<sup>-1</sup> MS, la prairie naturelle étant de loin la plus riche. Dans l'expérience 2, le fourrage distribué aux vaches était du trèfle violet fraîchement fauché contenant 9,2 g kg<sup>-1</sup> MS d'isoflavones.

Dans les laits, près d'une soixantaine de FCP ont été séparés par CLHP. Environ la moitié étaient communs à tous les régimes, dont 5 importants. Les autres composés, plus spécifiques d'un régime, peuvent permettre d'établir une empreinte chromatographique pour assurer la traçabilité de la ration. La teneur totale en FCP estimée a varié de 2,4 à 10,8 mg L<sup>-1</sup> de lait, la prairie naturelle produisant le plus de FCP. Dans le cas simple du trèfle, les isoflavones sont biotransformées dans le rumen et le foie et se retrouvent partiellement dans le lait sous une forme considérée comme très active contre certains cancers (sein et prostate) ainsi que de nombreux problèmes liés à l'andropause ou à la ménopause (dont l'ostéoporose). En plus d'une possible participation à la saveur, un effet nutritionnel des FCP du lait peut être envisagé dans le cas de molécules très spécifiques, mais son intérêt doit être confirmé.

## Flavonoids, from forages to milk

J.M. BESLE (1), J.L. LAMAISON (2), P. PRADEL (3), D. FRAISSE (2), D. VIALA (1), B. MARTIN (1)

(1) INRA, URH, Clermont Ferrand-Theix, 63122 St Genès Champanelle, France,

**SUMMARY** - Forages are rich in polyphenolic compounds. Among the latter, the flavonoids are qualitatively very important because of their beneficial effects on human health. This paper presents results obtained in recent experiments in which flavonoids and other simple phenolic compounds (FPC) were analysed in forages fed to cows and in the corresponding milks.

In experiment 1, six different diets were given to 6 groups of cows : rich in concentrates (65 %), maize silage, rye grass silage, rye grass hay, native mountain hay and native mountain pasture. The FPC content of these forages, determined by HPLC, varied from 0.8 to 8 g kg<sup>-1</sup> DM, with natural pasture being by far the richest. In experiment 2, freshly cut red clover was given to the cows as the main forrage. Its isoflavone content was about 9.2 g kg<sup>-1</sup> DM.

In the milks, about 60 FPC compounds were detected by HPLC. About half were found in all of the milks whatever the diet, with five of them being predominant. The other compounds that were more specific to each diet may be used to establish a chromatographic fingerprint for the traceability of the diet. The estimated total content in FPC varied from 2.4 to 10.8 mg L<sup>-1</sup> milk, the natural pasture producing the major content in FPC. In the simple case of red clover, isoflavones were biotransformed in the rumen and the liver and were partially recovered in milk majorly as a compound known for its activity against certain cancers (breast, prostate) or diseases linked to andropause or menopause (such as osteoporosis). In addition, to a possible contribution towards the flavour, FPC might have a nutritional role in the case of specific molecules, but the extent and the interest of this effect warrant further investigation.

## INTRODUCTION

Les flavonoïdes et composés phénoliques (FCP) non pariétaux sont largement présents dans les fruits et les légumes (Hollman et Arts, 2000). Ils constituent un apport de micronutriments intéressants pour leurs effets bénéfiques sur la santé de l'Homme. Les isoflavones, en particulier (notamment du soja) ont un effet préventif sur les cancers du sein, de la prostate et l'ostéoporose. En revanche, ces composés ont été peu étudiés dans les fourrages et les aliments d'origine animale, notamment le lait. Mis à part des études dans des organes spécifiques pour leurs vertus pharmaceutiques (Harborne, 1999), rares sont les travaux plus globaux (Jeangros *et al.*, 2001). Récemment, nous avons analysé cette fraction dans des fourrages classiques et dans la prairie naturelle (Poulet *et al.*, 2002). Cette dernière s'est révélée de loin la plus riche; sur plus d'une centaine de composés séparés par CLHP, seuls 9 pics ont été identifiés. Parmi les flavonoïdes, les isoflavones sont une famille intéressante. On en trouve en grande quantité (jusqu'à 3 %

de la MS) dans certaines variétés de trèfle (Francis *et al.*, 1967). Dans la plante, ils sont sous forme de glycosides (une quarantaine de composés) mais ces derniers, après hydrolyse (dans le rumen ou au laboratoire) ne donnent que 4 aglycones dont 2 (la daidzéine et la formononétine) seraient les plus actifs. Le trèfle est alors un modèle simple pour étudier le devenir métabolique des flavonoïdes chez le ruminant.

Le lait contient de nombreux micronutriments qui ont été étudiés récemment : acides gras insaturés,  $\beta$ -carotène, vitamine E (Martin *et al.*, 2002) et terpènes (Viallon *et al.*, 2000). Ils ont un rôle nutritionnel et / ou servent de traceurs (liposolubles) pour certifier l'origine de l'aliment. Avec d'autres micronutriments, des FCP ont aussi été mis en évidence dans le lait mais, là encore, les connaissances sont limitées. Quelques composés ont été mis en évidence en faible quantité par Brewington *et al.* (1974) et par Lopez et Lindsay (1993) mais l'influence du régime n'a pas été étudiée. Par ailleurs, des xénobiotiques, potentiellement

toxiques, ont été caractérisés dans le lait (Baars *et al.*, 2004). D'autres études ont montré que les isoflavones du trèfle sont partiellement sécrétées dans le lait de vache sous forme d'équol (King *et al.*, 1998). Ce dernier serait extrêmement actif contre de nombreuses affections (cancer, ostéoporose) touchant les seniors (Setchell, 2002). De fait, les ruminants consomment de 20 à 100 fois plus de composés phénoliques (solubles et pariétaux) biodisponibles que l'homme. Après biotransformation par l'animal, la fraction sécrétée dans le lait peut refléter le régime ou même avoir un intérêt nutritionnel.

Dans ce travail, nous avons complété l'étude des micronutriments du lait présentée par Martin *et al.* (2002) en analysant les FCP du lait de vaches recevant des rations classiques, de la prairie naturelle ou du trèfle violet, dont les composés ont un devenir métabolique mieux connu.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. SCHEMA EXPERIMENTAL :

Expérience 1 : sept lots équivalents de 8 vaches en milieu de lactation ont été constitués. Cinq lots ont été utilisés au cours d'une période hivernale pendant laquelle les vaches ont reçu 5 rations différentes : riche en concentrés (CC, orge et tourteau de soja), à base d'ensilage de maïs (EM), d'ensilage de *ray-grass* anglais (ERGA), de foin de *ray-grass* anglais (FRGA) et de foin de prairie naturelle de montagne (FPN). Dans la ration CC, le concentré contenait 95 % d'orge et 5 % de tourteau de soja, il représentait 68 % de la matière sèche ingérée par les animaux. Dans les autres rations le concentré contenait plus de soja (25 %) et était distribué à raison de 10 à 14 % de l'ingéré. Tous les lots recevaient en outre la même quantité de CMV. Les 2 autres lots de vaches ont été utilisés au cours de la période estivale, l'un a été mis à l'herbe sur une parcelle de prairie naturelle de montagne (PNV) sans aucun concentré (autre que le même CMV), le second lot a reçu une ration à base de FPN, identique à celle distribuée en période hivernale. Les quantités d'aliments distribués et refusées ont été mesurées pour toutes les vaches recevant des fourrages conservés. Un aliquote de la production hebdomadaire de lait a été conservé pour chaque vache à -15°C.

Expérience 2 : deux vaches laitières ont tout d'abord consommé un régime témoin à base d'ensilage de maïs puis ont reçu une ration constituée essentiellement de trèfle violet (TV) fraîchement coupé (variété Merviot, 83,2 % de la MS ingérée).

Pour les 2 essais, les FCP des échantillons moyens de fourrages et des compléments ont été analysés, après extraction hydroalcoolique, par CLHP (Poulet *et al.*, 2002). Les rations CC, EM, ERGA, FRGA, FPN et PNV contenaient respectivement 2,1, 0,8, 3,0, 4,1, 2,5 et 8,2 g kg<sup>-1</sup> MS de FCP. Le trèfle contenait 9,2 g kg<sup>-1</sup> MS d'aglycones d'isoflavones, dont 71 % de formononétine.

### 1.2 ANALYSES

Un aliquote du lait individuel produit par 5 vaches par régime a été analysé. Les FCP ont été extraits, purifiés et déconjugués par la méthode de King *et al.* (1998) avec pour principale modification une extraction des FCP à

l'acétonitrile au lieu de méthanol. Les FCP ont ensuite été analysés par CLHP dans les conditions décrites par Petitjean-Freytet *et al.* (1991) et détectés avec une barrette de diode. Une solution standard contenant 10 composés très différents (acides phénoliques, phénols, flavones, flavonols, isoflavones) a été utilisée en surcharge à un lait témoin pour calculer les coefficients de récupération des différents types de FCP après toutes les étapes d'extraction et purification. Après séparation, les composés ont été classés en différentes familles en fonction de leurs temps de rétention et des *maxima* et *minima* de leur spectre (Marckham, 1982) puis estimés à 265 nm par rapport à une molécule standard représentative de chaque type de spectre : acide syringique (pour les phénols et acides simples), acide férulique (type guaiacyle), lutéoline (flavone), quercétine (flavonols), génistéine (isoflavones).

## 2. RESULTATS

Pour la totalité des régimes, une soixantaine de pics présentant un spectre de composés phénoliques a été séparée. La moitié d'entre eux (28 pics) se retrouve dans tous les régimes (tableau 1). L'identification de ces composés, communs à tous les régimes étudiés, est actuellement en cours. Dans une première analyse des résultats de l'expérience 1 on distingue des pics dont les spectres correspondent en grande majorité à des phénols simples ou acides phénoliques (15 pics), et quelques pics dont les spectres correspondraient à 9 flavonols, 2 flavones et 2 isoflavones. Cinq de ces composés (dont une flavone et un flavonol) représentent à eux seuls environ 90 % de l'aire. D'autres composés paraissent spécifiques d'un régime ou d'un fourrage. Ainsi, le régime PNV donne la plus grande variété de composés, 7 pics apparaissent spécifiques, les régimes EM, FRGA et TV donnent 6 pics spécifiques tandis que les régimes FPN et CC en donnent le moins (respectivement 2 et 3 pics). Ces composés spécifiques sont toutefois en faible quantité, souvent à l'état de traces. Remarquons aussi que le pic 8 (une flavone) paraît caractéristique des foins et que le pic 49 (composé simple) n'apparaît que pour les 2 régimes contenant du *ray-grass*.

Avec le régime trèfle, on observe les mêmes pics communs (figure 1) que dans l'expérience 1 mais ils ne représentent que 20 % de l'aire totale, ainsi que des composés (6 pics) spécifiques à la ration, presque tous identifiés. Il s'agit d'un mélange (au total 2841 µg L<sup>-1</sup>) contenant une petite fraction des composés originaux (daïdzéine, formononétine, biochanine A) ainsi que des produits issus de la fermentation ruminale (Sakakibara *et al.*, 2003), essentiellement de l'équol (737 µg L<sup>-1</sup>) et deux composés non identifiés, dont l'un, appelé "équol like", a un spectre très proche de celui de l'équol. Le total "daïdzéine + formononétine + équol" correspond à 0,2 p1000 des composés initiaux ingérés. Ce calcul n'a pu être fait pour les autres composés des autres régimes, dans la mesure où ils n'ont pas été identifiés.

Au total, la fraction phénolique est la plus élevée pour le régime PNV (10,8 mg L<sup>-1</sup>) et la plus faible pour les régimes CC et TV (environ 4 et 2,8 mg L<sup>-1</sup>) avec des valeurs intermédiaires pour les autres régimes (tableau 1).

**Tableau 1** : valeurs estimées ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) et écarts types (*italique*) des teneurs en FCP des laits suivant les régimes

Ration <sup>(1)</sup>	Composés communs <sup>(2)</sup>							Comp. spécifiques		Total	
	A	4	7	8	22	23	27	B	C <sup>(3)</sup>		Equol
CC	<b>77</b>	<b>202</b>	<b>211</b>		<b>73</b>	<b>322</b>	<b>2750</b>	<b>277</b>	<b>53</b>		<b>3964</b>
	<i>66</i>	<i>111</i>	<i>171</i>		<i>77</i>	<i>169</i>	<i>2404</i>	<i>376</i>	<i>77</i>		<i>2387</i>
EM	<b>222</b>	<b>951</b>	<b>590</b>		<b>174</b>	<b>638</b>	<b>6030</b>	<b>131</b>	<b>486</b>		<b>9222</b>
	<i>145</i>	<i>609</i>	<i>298</i>		<i>328</i>	<i>262</i>	<i>1557</i>	<i>157</i>	<i>367</i>		<i>2454</i>
ERGA	<b>217</b>	<b>380</b>	<b>300</b>		<b>870</b>	<b>1110</b>	<b>5482</b>	<b>244</b>	<b>20</b>		<b>8621</b>
	<i>35</i>	<i>112</i>	<i>143</i>		<i>709</i>	<i>435</i>	<i>3482</i>	<i>189</i>	<i>23</i>		<i>4634</i>
FRGA	<b>249</b>	<b>1465</b>		<b>28</b>	<b>38</b>	<b>808</b>	<b>5085</b>	<b>169</b>	<b>82</b>		<b>7923</b>
	<i>216</i>	<i>1184</i>		<i>29</i>	<i>62</i>	<i>343</i>	<i>1754</i>	<i>165</i>	<i>77</i>		<i>2994</i>
FPN	<b>219</b>	<b>817</b>	<b>91</b>	<b>17</b>	<b>68</b>	<b>537</b>	<b>3162</b>	<b>247</b>	<b>tr</b>		<b>5157</b>
	<i>177</i>	<i>980</i>	<i>113</i>	<i>19</i>	<i>90</i>	<i>514</i>	<i>694</i>	<i>382</i>			<i>2039</i>
PNV	<b>73</b>	<b>1377</b>	<b>84</b>			<b>2908</b>	<b>5852</b>	<b>208</b>	<b>298</b>		<b>10799</b>
	<i>60</i>	<i>542</i>	<i>110</i>			<i>888</i>	<i>1539</i>	<i>106</i>	<i>153</i>		<i>2436</i>
TV	<b>75</b>	<b>285</b>	<b>34</b>			<b>45</b>	<b>193</b>	<b>35</b>	<b>1437</b>	<b>737</b>	<b>2841</b>
	<i>64</i>	<i>91</i>	<i>26</i>			<i>3</i>	<i>69</i>	<i>40</i>	<i>373</i>	<i>93</i>	<i>655</i>

(1) Voir abréviations dans le texte ; (2) tr : traces ; A : pics 1-3 + 6 + 14-19 + 25 ; B : pics 28-32 + 36 + 39 + 43 + 44 + 45 + 47 ;

(3) composés spécifiques suivant les rations : **CC** : pics 5 (flavone), 13 (flavonol) et 26 (flavonol) ; ration **EM** : pics 11 (PS = phénol simple), 20 (PS), 21 (flavonol), 38 (PS), 49 (PS) et 56 (PS) ; ration **ERGA** : pics 9 (PS) ; 34 (flavonol) et 52 (PS) ; ration **FRGA** : pics 10 (PS), 48 (PS), 51 (PS), 52 (PS), 54 (AP) et 58 (flavone) ; ration **FPN** : pics 24 (PS) et 42 (PS) ; ration **PNV** : pics 12 (PS), 33 (flavone), 35 (flavonol), 46 (flavone), 48 (PS), 50 (PS) et 55 (PS) ; ration **TV** : daidzéine + génistéine + formononétine + biochanine A + équol like + inconnu

### 3. DISCUSSION

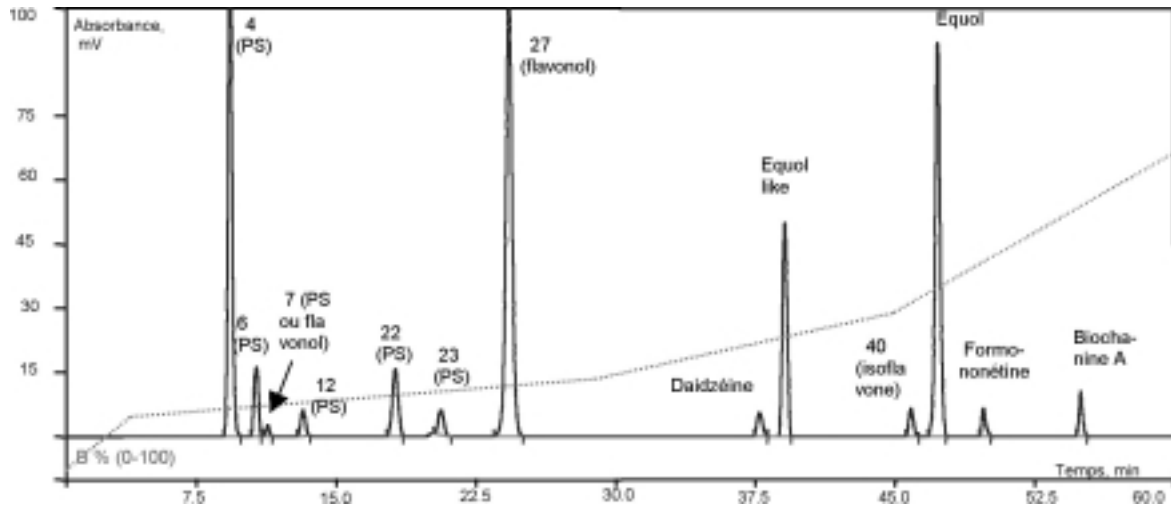
#### 3.1. IDENTIFICATION

Nos résultats se rapprochent de ceux de Brewington *et al.* (1974) et Lopez et Lindsay (1993) qui ont isolé respectivement 15 et 16 composés aromatiques dans le lait de vaches, avec respectivement 6 et 5 composés importants. Certains composés, communs aux deux études, sont essentiellement des phénols simples (phénol, crésol, éthylphénol, propylphénol), des diphénols (dérivés du catéchol) et des composés en C6-C2 (acide phénylacétique ou acétovanillone). Ces composés proviendraient essentiellement de phénomènes de détoxification ou de la dégradation des phénols pariétaux. Si l'on considère en effet, avec l'essai trèfle que seulement 0,2 p 1000 des isoflavones ingérées parviennent sous forme transformée dans le lait, il est peu probable que les flavonoïdes des autres rations participent de façon importante au pool de composés majeurs car il y en a au total 10 fois moins que dans le trèfle, répartis en de nombreux pics (Poulet *et al.* 2002). Les phénols pariétaux (lignines, acides hydroxycinnamiques) biodisponibles seraient en revanche 20 fois plus abondants dans les fourrages que les flavonoïdes analysés dans l'essai 1. Ils apporteraient l'essentiel des composés aromatiques du lait. Cela expliquerait aussi que la variation des teneurs dans

le lait ne suit pas celle dans les aliments. Ainsi, pour la ration EM, la teneur relativement élevée en FCP du lait proviendrait plus de la forte teneur en acides hydroxycinnamiques biodisponibles de l'ensilage (environ 25 g kg<sup>-1</sup> MS) que de sa teneur en flavonoïdes (0,8 g kg<sup>-1</sup> MS). L'essai trèfle, ainsi que d'autres études montrent toutefois que des phénols non pariétaux, spécifiques de l'alimentation (notamment la dioxine caractérisée par Baars *et al.*, 2004) passent dans le lait. Ces composés seraient responsables des nombreux pics spécifiques à une ration observés dans ce travail.

#### 3.2. TRAÇABILITE

Les composés spécifiques observés pour chaque ration, ainsi que les teneurs relatives en composés communs, définissent une empreinte chromatographique de la ration qui peut permettre de caractériser la ration. Les FCP seraient actuellement les seuls traceurs hydrosolubles à l'étude. Ils pourraient être très spécifiques, notamment dans le cas de la prairie naturelle car l'altitude, l'exposition, le climat et la saison définissent un mélange de plantes dont la composition particulière en FCP, peut donner une empreinte caractéristique. Dans cette stratégie il n'est pas nécessaire d'identifier les composés mais il est important de bénéficier de méthodes d'analyse sensibles.



**Figure 1** : séparation par CLHP des FCP du lait avec la ration trèfle violet (mesure à  $\lambda$  max). Pics n° 6, 7, 12, 22, 23, 29 : communs à tous les régimes ; PS = phénol simple ou acide phénolique. . . . gradient de l'éluent (B = acétonitrile 70%).

### 3.3. INTERET NUTRITIONNEL

Avec la ration trèfle, la teneur en équol du lait est deux fois plus élevée que le maximum mesuré par King *et al.* (1998). Cela est vraisemblablement plus dû à la méthode d'extraction utilisée qu'au régime ou au schéma expérimental des auteurs. Les flavonoïdes sont en effet chélatés dans la matrice protéique du lait et très difficiles à extraire. Il est certain que l'équol a un intérêt nutritionnel important. Selon Setchell (2002), ce serait, chez les Asiatiques, la molécule la plus active après fermentation des isoflavones du soja dans l'intestin. Elle serait surtout intéressante pour préserver la santé des seniors (cancers du sein ou de la prostate, troubles de la ménopause ou de l'andropause, ostéoporose...). La dose optimale ainsi que l'effet bénéfique de ces molécules dans le lait sont à confirmer mais il paraît possible d'optimiser la sécrétion de micronutriments d'intérêt dans le lait.

Avec les autres rations, la teneur estimée en FCP est, elle aussi, plus importante que dans l'étude de Lopez et Lindsay (1993). Bien que cette teneur ne soit pas négligeable, son effet nutritionnel sera toujours moindre que dans des sources végétales. Certaines substances peuvent toutefois avoir un effet nutritionnel spécifique à très petite dose ou participer à la saveur. Et ainsi expliquer, en partie, des différences observées par un jury de dégustation du lait selon les régimes. Dans ce cas, l'identification des FCP du lait est nécessaire.

### CONCLUSION

De nombreux composés phénoliques existent dans le lait, certains ayant un spectre qui s'apparente à celui des flavonoïdes. Des molécules sont communes à tous les régimes et paraissent plutôt dériver de la paroi végétale ou du catabolisme de l'animal. D'autres paraissent plus spécifiques d'un régime. Une empreinte chromatographique peut alors être envisagée pour la traçabilité avec des marqueurs hydrosolubles. Enfin, des composés très actifs

comme l'équol peuvent se trouver en quantité suffisante pour avoir un effet biologique potentiel. L'intérêt nutritionnel de telles molécules est toutefois à confirmer.

*Ces travaux ont été réalisés avec un soutien financier du ministère de la Recherche (programme Aliments-Qualité-Sécurité).*

- Baars A.J., Bakker M.I., Baumann R.A., Boon P.E., Freijer J.I., Hoogenboon L.A.P., Hoogerbrugge R., Van Klaveren J. D., Liem A. K. D., Traag W. A., De Vries J., 2004.** Toxicology Letters, 151, 51-61.
- Brewington C.R., Parks O.W., Schwartz D.P., 1974.** J. Agric. Food Chem., 22, 293-294.
- Francis C.M., Millington A.J., Bailey E.T., 1967.** Austr. J. Agric. Res., 18, 47-54.
- Harborne J.B., 1999.** in HARBORNE J.B. (Ed), The handbook of natural flavonoids. Wiley & Sons, New York
- Hollman P.C.H., Arts I.C.W., 2000.** J. Sci. Food Agric., 80, 1081-1093.
- Jeanros B., Scehovic J., Schubiger F., Lehmann J., Daccord R., Arrigo Y., 2001.** Revue Suisse Agric., 33, 147-151.
- King R.A., Mano M.M., Head R.J., 1998.** J. Dairy Res., 65, 479-489.
- Lopez V., Lindsay R.C., 1974.** J. Agric. Food Chem., 41, 446-454.
- Markham K.R., 1982.** in MARKHAM K.R. (Ed), Techniques of flavonoid identification, Academic Press, New York. 1-51.
- Martin B., Ferlay A., Pradel Ph., Rock E., Grolier P., Dupont D., Gruffat D., Besle J.M., Chilliard T., Coulon J.B., 2002.** 9<sup>e</sup> Rencontres Rech. Ruminants, Paris, 4-5 déc 2002, pp 347-350.
- Petitjean-Freytet, C., Carnat, A., Lamaison, J.L., 1991.** J. Pharm. Belg., 46, 241-246.
- Poulet J.L., Fraisse D., Viala D., Carnat A., Pradel P., Martin B., Lamaison J.L., Besle J.M., 2002.** 19<sup>e</sup> Congrès EGF, La Rochelle, 27-30 mai 2002, pp. 590-591.
- Sakakibara H., Viala D., Doreau M., Besle J.M., 2003.** 1<sup>st</sup> International Conference on Polyphenols and Health, 18-21 November 2003, Vichy, France, pp 296.
- Viallon C., Martin B., Verdier-Metz I., Pradel P., Garel J.P., Coulon J.B., Berdagué J.L., 2000.** Lait, 80, 635-641.