

Effet des tannins condensés sur la solubilité des protéines de légumineuses fourragères

B. Julier¹, M. Lila¹, C. Huyghe¹,
P. Morris², G. Allison², M. Robbins²

Les protéines issues des légumineuses fourragères sont souvent médiocrement valorisées par les ruminants. En effet, elles sont trop rapidement dégradées dans le rumen pour être efficacement absorbées dans l'intestin. Cependant, les tannins condensés, métabolites secondaires produits par certaines espèces comme les lotiers, réduisent la dégradation des protéines.

RÉSUMÉ

L'étude a consisté à tester l'effet d'une addition de tannins à des échantillons de luzerne ou de trèfle blanc. L'ajout, en différentes proportions, de fourrage de lotier à de la luzerne ou du trèfle blanc a permis de constituer des mélanges contenant de 0 à 5,2 % de tannins. Une diminution de la solubilité in vitro des protéines a été observée. L'ajout de tannins purifiés extraits de lotier et incorporé à des teneurs de 0 à 5% dans des échantillons de luzerne a aussi permis de réduire la solubilité des protéines. Ces résultats doivent être validés par des expériences utilisant des animaux pour proposer des techniques culturales ou des objectifs d'amélioration génétique des espèces.

MOTS CLÉS

Lotier, luzerne, protéine, tanin, trèfle blanc, valeur alimentaire.

KEY-WORDS

Bird's-foot trefoil, feeding value, lucerne, protein, tannin, white clover.

AUTEURS

1 : INRA, Unité de Génétique et d'Amélioration des Plantes Fourragères, F-86600 Lusignan ; julier@lusignan.inra.fr

2 : IGER, Plas Gogerddan, Aberystwyth SY23 3EB, UK (Grande Bretagne) ; mark.robbins@bbsrc.ac.uk

Les légumineuses fourragères, bien qu'ayant une teneur élevée en protéines, sont mal valorisées par les ruminants. Leurs protéines sont trop rapidement dégradées dans le rumen, ce qui peut entraîner de fortes pertes d'azote dans l'environnement, contribuant à des pollutions. De plus, cette dégradation rapide induit la formation d'agents moussants, responsables de la météorisation au pâturage. La meilleure valorisation des protéines de la ration est obtenue quand celles-ci parviennent en grande proportion dans l'intestin grêle, où elles sont dégradées en acides aminés et absorbées.

Les espèces du genre *Lotus* (*Lotus corniculatus*, ou lotier corniculé, *Lotus pedunculatus* ou lotier des marais) **ont des protéines moins dégradables** parce qu'elles **produisent des tannins condensés**, métabolites secondaires de la voie de biosynthèse des phénols. Les tannins condensés, localisés dans les vacuoles, et les protéines se lient en complexes qui sont insolubles dans le rumen. Dans l'intestin, le complexe se dissocie, et les protéines sont alors absorbées. Les principales légumineuses fourragères en France et en Europe, la luzerne (*Medicago sativa*) et le trèfle blanc (*Trifolium repens*) ne synthétisent pas de tannins dans leur fourrage. La dégradation des protéines de ces espèces est importante, et la variabilité génétique pour ce caractère est limitée ou nulle (JULIER *et al.*, 2003 ; JULIER *et al.*, même ouvrage ; TREMBLAY *et al.*, 2000).

L'objectif de l'étude était d'**analyser l'effet d'un ajout de tannins à du fourrage de luzerne ou de trèfle blanc sur la dégradation de leurs protéines.**

1. Matériels et méthodes

Une variété de luzerne, Europe, une variété de trèfle blanc, Grassland Huia, et une variété de *Lotus pedunculatus*, Maku (qu'on nommera par la suite "lotier 1"), ont été récoltées à Lusignan (France), au printemps 2001. Les fourrages ont été séchés en étuve à 60°C. Un cultivar de *L. corniculatus* ("lotier 2") a été cultivé en serre à Aberystwyth (Grande-Bretagne). Les feuilles ont été séparées des tiges et lyophilisées. Les échantillons ont été broyés à la grille de 1 mm. Les tannins condensés ont été extraits de feuilles d'un autre cultivar de *L. pedunculatus* cultivé à Aberystwyth.

Deux protocoles ont été utilisés :

- **Les échantillons séchés et broyés des lotiers** (plantes entières du lotier 1 et feuilles du lotier 2) **ont été mélangés aux échantillons de luzerne ou de trèfle blanc**, à raison de 0, 25, 50 et 100% de matière sèche ;

- **Des tannins condensés purifiés ont été ajoutés à de la luzerne** fraîche ou séchée, pour obtenir des échantillons avec 0, 1, 2, 3, et 5% de tannins dans la matière sèche.

Tous les échantillons ont été analysés *in vitro* pour estimer la solubilité des protéines en incubant 1 g de fourrage sec dans 50 ml de tampon, centrifugation, filtration et détermination de la teneur en azote du tampon (VERITE et DEMARQUILLY, 1978). La solubilité des pro-

TABLEAU 1 : Composition biochimique des échantillons de légumineuses fourragères (% MS).

TABLE 1 : Biochemical composition of the forage legume samples (% DM).

	Teneur en protéines	Teneur en tannins condensés
Luzerne	18,6	-
Trèfle blanc	18,8	-
Lotier 1	21,7	3,16
Lotier 2	24,2	5,22

FIGURE 1 : Solubilité des protéines de mélanges de fourrages : a) mélange de luzerne et de trèfle blanc avec deux échantillons de lotier, à des teneurs entre 0 et 100% (en abscisse, la proportion de tannins dans le mélange ; RMSE de la solubilité des protéines de chaque mélange varie entre 1,5 et 2,7), b) mélange de luzerne et de tannins condensés purifiés (RMSE = 1,8).

FIGURE 1 : Protein solubility of forage mixtures : a) mixture of lucerne and white clover with two bird's-foot trefoil samples, at rates of 0 to 100% (the x-axis indicates the proportion of tannins in the mixture ; RMSE for protein solubility of each mixture varied between 1.5 and 2.7), b) mixture of lucerne and purified condensed tannins (RMSE = 1,8).

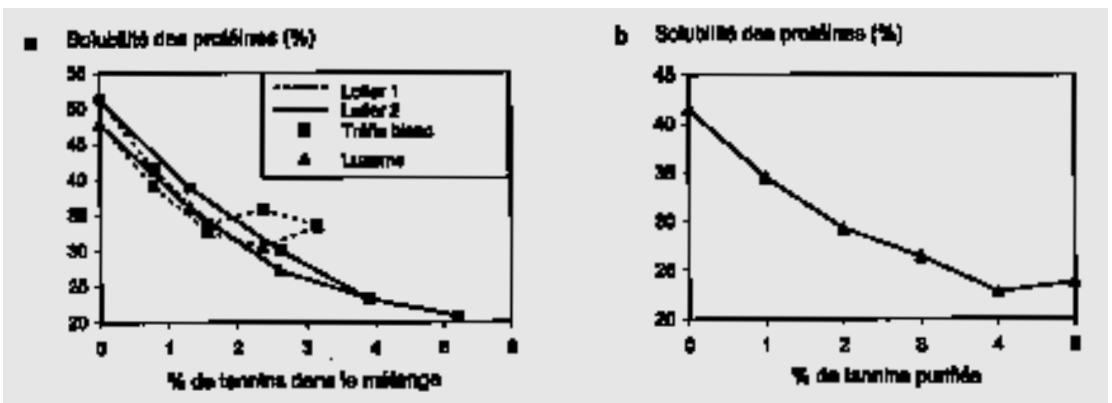
téines a été mesurée par le rapport entre la quantité d'azote dans le tampon et la quantité d'azote dans l'échantillon initial.

2. Résultats et discussion

La composition des échantillons de lotier, luzerne et trèfle blanc est indiquée dans le tableau 1. La luzerne et le trèfle ont des teneurs en protéines similaires. Les deux échantillons de lotier diffèrent sensiblement : le lotier de Aberystwyth est plus riche en protéines et en tannins condensés que le lotier de Lusignan.

L'addition de fourrage de lotier à la luzerne ou au trèfle blanc a induit une diminution de la solubilité des protéines (figure 1a). Avec le lotier de Lusignan, la solubilité des protéines décroît d'environ 20 unités quand la proportion de lotier passe de 0 à 50%, puis reste stable avec une plus grande proportion de lotier. Avec le lotier d'Aberystwyth, la solubilité des protéines décroît de 30 unités quand la proportion de lotier passe de 0 à 50%, sans marquer de stabilisation.

Dans les deux cas, la solubilité des protéines décroît **de façon curvilinéaire avec la teneur en tannin** du mélange. Une décroissance linéaire aurait indiqué un simple effet de dilution des deux types de fourrages, l'un riche en tannin, l'autre sans tannin. La relation curvilinéaire suggère que les tannins du lotier ont contribué à diminuer la dégradation des protéines de la luzerne ou du trèfle. Ces composés étant solubles, ils ont pu être mis en suspension dans le tampon lors de la mesure de la dégradabilité des protéines *in vitro*, et venir interagir avec les protéines des deux espèces, solubles pour la plupart.



Ce résultat demande à être confirmé et son mécanisme doit être mieux expliqué. Il pourrait être utilisé pour mieux ajuster la qualité des protéines à la valeur énergétique de la ration. En effet, **il serait possible soit de cultiver des associations luzerne-lotier ou trèfle blanc-lotier** avec, selon les cas, une graminée fourragère, permettant un ajout direct de tannin au fourrage produit. Une autre solution serait de **mélanger après la récolte les deux types de fourrages**.

L'addition de tannins purifiés à de la luzerne a induit une réduction de la solubilité de 41,5 à 23,8% (figure 1b). La courbe de diminution de la solubilité des protéines est très similaire à celle obtenue avec le mélange luzerne-lotier. Ce résultat est particulièrement intéressant car il montre que **les tannins exogènes parviennent à agir sur la dégradation des protéines** comme le font les tannins endogènes. Le mécanisme exact de cette action demande une étude plus précise, mais on peut imaginer une valorisation de ce résultat. En effet, l'extraction de tannins condensés pourrait se faire à partir d'espèces très riches en tannins, comme certaines légumineuses tropicales (MORRIS et ROBBINS, 1997). **Ces tannins pourraient être fournis dans la ration**, pour améliorer la valorisation des protéines.

Conclusion

La valorisation des protéines de la ration, qu'elles proviennent de légumineuses ou d'autres espèces (graminées fourragères par exemple), est souvent médiocre. Son amélioration passe certainement par des voies techniques et génétiques. Les tannins condensés sont des métabolites qui peuvent aider à réduire la dégradation des protéines des légumineuses fourragères. Au niveau technique, le mélange d'espèces à fort potentiel de rendement, comme la luzerne et le trèfle blanc, avec du lotier ou des tannins purifiés pourrait être étudié sur des aspects pratiques et économiques. **Au niveau génétique, la production de luzerne ou de trèfle blanc transgéniques capables de produire des tannins condensés dans les feuilles et les tiges serait une alternative**. Les connaissances accumulées sur la voie de biosynthèse des tannins condensés et le fait que la luzerne et le trèfle blanc possèdent cette voie de biosynthèse, puisqu'ils produisent des enveloppes de graines contenant des tannins, laissent penser que cette voie est techniquement possible. Ainsi GRUBER *et al.* (2003) ont obtenu des luzernes transgéniques produisant des tannins condensés. **La teneur optimale de tannin dans le fourrage d'une légumineuse doit être déterminée**, pour à la fois limiter la dégradation des protéines sans diminuer fortement la digestibilité de la matière sèche.

Travail présenté aux Journées d'information de l'A.F.P.F.
"Fourrages, protéines et environnement :
de nouveaux équilibres à construire",
les 27 et 28 mars 2003.

Remerciements

Cette étude a été financée par le programme européen CAGED (FAIR CT98-4068).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- GRUBER M., YU M. WANG Y., FRUTOS P., RAY H., WESTCOTT N., McALLISTER T., COULMAN B. (2003) : "Lc-transgenic alfalfa forage has leucocyanidin reductase activity and accumulates proanthocyanidin (condensed tannin)", *Molecular Breeding of Forage and Turf, Third International Symposium*, 18-22 Mai 2003, Dallas, EU, p 82.
- JULIER B., GUINES F., EMILE J.C., HUYGHE C. (2003) : "Variation in protein degradability in dried forage legumes", *Anim. Res.*, à paraître.
- MORRIS P., ROBBINS M.P. (1997) : "Manipulating condensed tannins in forage legumes", *Biotechnology and the improvement of forage legumes*, McKersie B.D. et Brown D.C.W. (Eds), CAB International, pp 147-173.
- TREMBLAY G.F., MICHAUD R., BÉLANGER G., McRAE K.B., PETIT H.V. (2000) : "In vitro ruminal undegradable protein of alfalfa cultivars", *Can. J. Plant Sci.*, 80, 315-325.
- VÉRITÉ R., DEMARQUILLY C. (1978) : "Qualité des matières azotées des aliments pour ruminants", *La vache laitière*, INRA-CNRA, INRA Versailles, pp. 143-147.

SUMMARY

Effects of condensed tannins on the protein solubility of forage legumes

Proteins from forage legumes are often poorly utilized by ruminants. Indeed, they are too rapidly degraded in the rumen to be efficiently absorbed in the intestine. However, the condensed tannins, secondary metabolites produced by some species such as bird's-foot trefoil, reduce protein degradation. This study consisted in the assessment of the addition of tannins to forage samples of lucerne or white clover. The addition, in different proportions, of bird's-foot trefoil forage to lucerne or to white clover resulted in mixtures containing from 0 to 5.2% tannins. A decrease in *in vitro* protein solubility was observed. The addition of purified tannins extracted from bird's-foot trefoil and incorporated at rates of 0 to 5% to lucerne samples also induced a reduction in protein solubility. These results need validation with trials using animals, before management techniques or breeding objectives can be proposed for these species.