"Le Sélectionneur français" 1986 (37) 47 - 60

APPETIBILITE ET CARACTERISTIQUES ORGANOLEPTIQUES DE LA FETUQUE ELEVEE DERNIERES CONNAISSANCES

J. SCEHOVIC
Station Fédérale de Recherches Agronomiques de Changins
CH - 1260 NYON

Introduction

La mise en évidence à Lusignan du fait que la digestibilité mesurée sur moutons en cage et l'ingestibilité mesurée sur des chèvres laitières sont plus proches de l'appétibilité évaluée dans une cafétéria que l'ingestibilité des moutons en cage, nous a amenés il y a 2 ans à étudier de plus près ce facteur. Au cours de ces dernières années, il s'avérait que l'appétibilité est un facteur très important au niveau alimentaire et que la technique de son estimation in vivo - cafétéria - est un procédé parfaitement au point, relativement simple, et surtout parfaitement reproductible.

Connaisances actuelles

Le comportement social, reproductif et alimentaire des animaux est déterminé pour une large part par des stimuli chimiques. La stimulation captée par les animaux à l'aide de leurs chémorécepteurs est traduit par des réactions qui dépendent de l'espèce, de l'individu et de la concentration moléculaire du stimulus chimique.

Le comportement alimentaire des ruminants est fortement influencé par la composition chimique des aliments qui leur sont offerts. La discrimination alimentaire est bien connue au niveau des conséquences, mais relativement peu au niveau de ses causes.

Il existe une bibliographie abondante[1/] qui propose différentes théories sur la sélectivité alimentaire des herbivores et sur les facteurs qui la déterminent, tels que valeur nutritive, composition minérale, valeur azotée, teneur en glucides solubles et membranaires, etc.

L'importance et la complexité des travaux, effectués dans le domaine de l'appétibilité en relation avec diverses substances chimiques, sont indiscutables. Ce qu'on peut reprocher à la majorité des travaux concernant ce sujet, c'est leur approche au problème, c'est-à-dire l'utilisation de substances isolées, sélectionnées selon leur action (attractive ou répulsive)probable. Le choix des substances a souvent été affecté par les préférences humaines (goût et odeur agréables pour l'homme - agréable pour l'animal).

1/ SCEHOVIC et al, Agronomie, 1985. 5 (4), 347-354

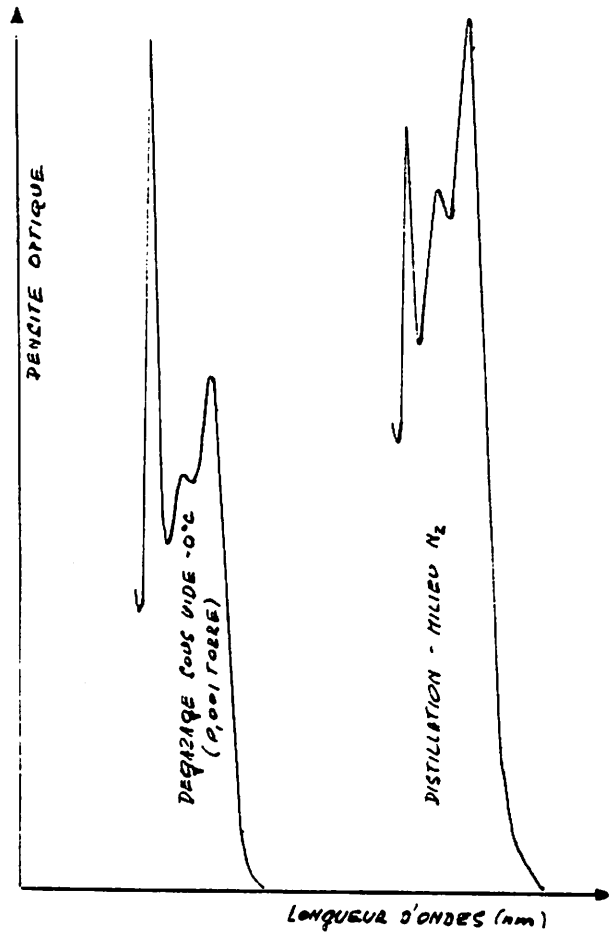

Fig. 1 Spectre UV - comparaison de deux procédés d'extraction des substances volatiles. (matière végétale : 100 g d'herbe d'une prairie naturelle).

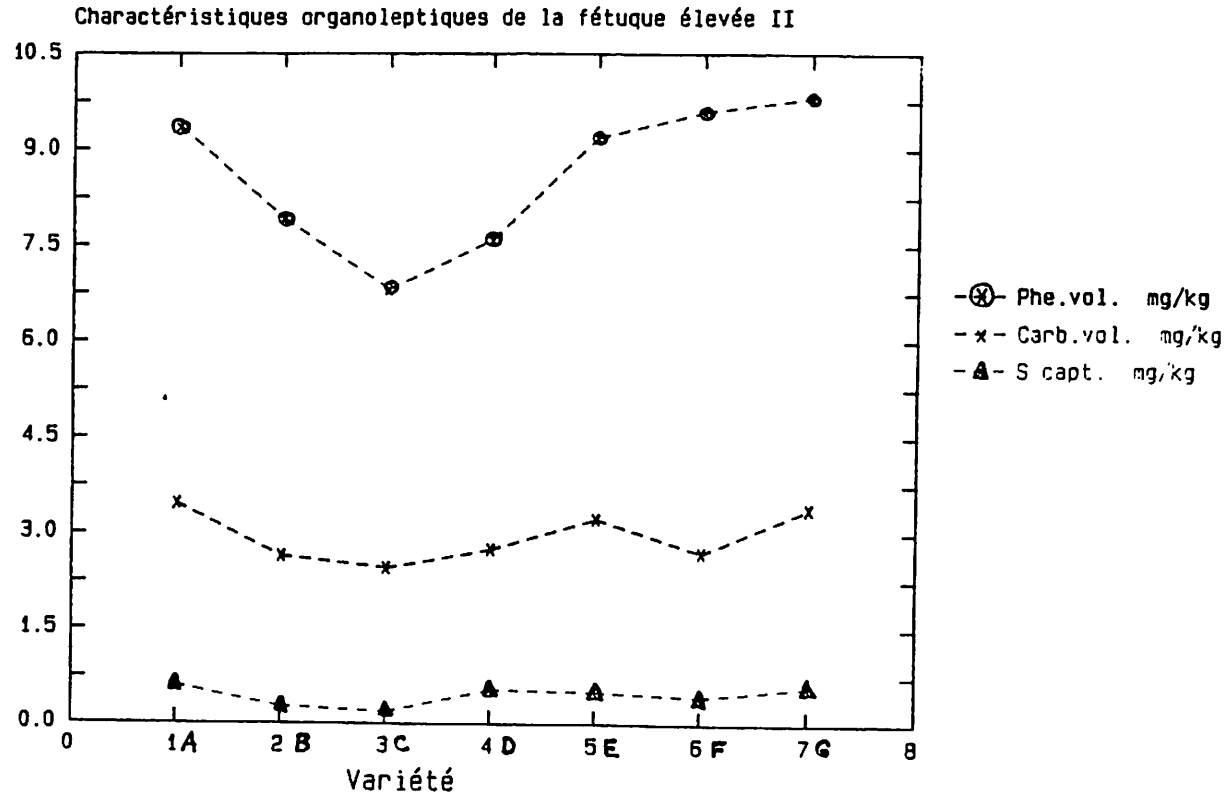

Fig. 2 Phénols volatils, substances à carbonyle volatile et composés soufrés volatiles. Comparaison des variétés (variétés correspondantes A à G, voir tableau 1.).

Mise en évidence du phénomène

Les caractéristiques organoleptiques des fourrages ont leur importance maximale lorsque les animaux ont le choix. Une telle situation, lorsqu'elle est expérimentale, s'appelle une **"cafétéria"**.

En utilisant cette technique, l'importance de l'odorat dans la différence d'appétibilité entre raygrass d'Italie et fétuque élevée a été mise en évidence à Lusignan.

Comparaison,dans une cafétéria avec 10 moutons, de l'appétibilité de quatre fourrages en 10 répétitions.

- raygrass d'Italie ADRET
- fétuque élevée CLARINE
- Adret aspergé avec du jus de CLARINE
- Clarine aspergée avec du jus de ADRET.

Ces résultats semblent montrer que le jus de fétuque serait répulsif, tandis que le jus de raygrass ne serait pas particulièrement attractif.

Les observations des animaux expérimentaux, leur comportement envers différents fourrages en relation avec le traitement par le jus, et sa modification dans le temps, semblent confirmer notre hypothèse de l'existence, chez la fétuque, de substances répulsives qui seraient volatiles, ou labiles par oxydation, action enzymatique ou autres réactions biochimiques. A ce propos, il faut noter que les substances défensives, dissuasives ou répulsives (action selon agresseur) ne se trouvent pas forcément sous la même forme dans l'organisme végétal intact et l'organisme qui a subi une agression physique (parasites, insectes, animaux, récoltes, etc.). Le passage d'une forme "précurseur" à la forme active est instantané (après l'agression) à l'aide d'une activité enzymatique.

Il est évident qu'une substance volatile, ou qu'un groupe de substances volatiles, mêmes présentes en abondance, ne déterminent pas le vrai arôme de la matière végétale. Celui-ci est le résultat d'un mélange extrêmement complexe de ces substances. Son action attractive ou répulsive est déterminée par la concentration des substances volatiles, leur proportion, leur volatilité et leur pouvoir odorant.

A la suite de toutes ces observations et réflexions, il était donc intéressant de rechercher si les deux espèces comparées dans une cafétéria à Lusignan différaient par leur teneur en substances susceptibles d'être responsables des différences en appétibilité.

Matière végétale (fig. 2)

Les graminées étudiées* préalablement testées en cafétéria à Lusignan ont été semées en 4 répétitions à Changins.

La matière végétale destinée à être analysée a été récoltée en 6 coupes et conditionnée par plusieurs procédés (extraction du jus, congélation de matière verte et séchage à 55°C) selon les analyses envisagées.

La phase échantillonnage et conservation est extrêmement importante du point de vue de la standardisation, puisqu'il s'agit de la matière vivante extrêmement active.

Substances étudiées

La majorité des substances responsables du goût, de l'odeur et de la couleur des plantes appartiennent à la catégorie des produits naturels qu'on appelle les métabolites secondaires.

Il existe dans la littérature une multitude de définitions, plus ou moins "tendancieuses" (selon la spécialisation de l'auteur - chimiste, biochimiste, physiologiste, etc.), qui essayent d'encadrer l'importance, l'activité et les fonctions de cette catégorie très hétéroclite.

Par la synthèse de plusieurs idées, théories, hypothèses, etc., on peut dire que les métabolites secondaires sont les substances organiques physiologiquement non essentielles, dont le rôle principal est écologique. C'est-à-dire leur action se situe non seulement au niveau des interactions entre des plantes et leur biotope, mais aussi elles fonctionnent comme agents protecteurs contre les stress physiques environnementaux.

Les métabolites secondaires sont impliqués comme agents défensifs dans trois catégories d'interactions plante-plante ; plante-pathogène ; et plante-herbivore. C'est cette dernière qui détermine l'appétibilité des plantes fourragères. L'activité antiherbivore est réalisée essentiellement par trois voies :

1) Action dissuasive ou répulsive (goût et odeur)
2) Action antibiotique - inhibiteurs de la digestion
3) Action toxique.

Plusieurs substances peuvent cumuler les trois activités. Selon l'importance de leur concentration dans l'organisme végétal, on les classe dans deux groupes :

Métabolites secondaires considérés comme "qualitatifs" par leurs faibles concentrations : alkaloïdes, saponines, glycosides cyanogènes, terpenoïdes, composés soufrés et azotés, seleno-acides aminés et non protéinique et beaucoup d'autres.

Et ceux considérés comme "quantitatifs", présents en plus grandes concentrations, tels que la lignine, la silice, les tanins, etc.

Techniques d'extractions

L'étude de l'arôme d'un aliment est très délicate. Les composés présents dans la phase vapeur au-dessus des aliments constituent le plus souvent des mélanges très complexes de par leur nombre et leur variété. Ces molécules appartiennent à différentes classes chimiques : amines, esters, alcools, phénols, dérivés carbonyles, composés soufrés, etc.

La première phase importante et délicate dans la recherche sur les substances volatiles est la phase de l'extraction. Deux catégories de techniques sont utilisées :

A) Les techniques de l'espace de tête. Ce sont les techniques douces dont l'avantage principal est de conserver la qualité de l'arôme, mais elles sont insuffisantes pour permettre de pousser l'analyse jusqu'au stade de l'identification, voire de la simple détection si l'on n'est pas équipé d'un appareillage extrêmement sensible et sophistiqué. Les substances volatiles sont concentrées à l'aide de différents adsorbants qui sont souvent les résines organiques poreuses.

B) Les techniques plus brutales mais généralement utilisées visant à extraire la totalité des composés volatils mais entraînant inévitablement une distorsion de l'arôme. Il s'agit principalement de l'entrainement à la vapeur d'eau, distillation simple, sous pression réduite ou sous vide, de la cryoconcentration et de l'extraction par solvant. Le désavantage de ces procédés est le risque de pertes de substances les plus volatiles et la dégradation des composés thermolabiles.

Avant d'adopter une technique d'extraction définitive, nous avons procédé à quelques tests préliminaires comparatifs. Ainsi on a étudié le spectre en UV de distillats obtenus à partir d'un échantillon congelé de la prairie naturelle par différents procédés :

1) Distillation simple
2) Distillation sous azote
3) Distillation sous pression réduite à 42°C
4) Dégazage sous vide très poussé (0,001 Torre) à la température inférieure à 0°C.

L'expérience a été complétée par comparaison analytique de la concentration en quelques groupes de composés volatils intéressants ; comparaison entre le distillat et le produit de dégazage. On voit clairement que les substances étudiées, intéressantes du point de vue "appétibilité" sont présentes dans tous les extraits mais en concentrations différentes selon le procédé (fig. No 1).

A la suite de ces expériences nous avons définitivement adopté la technique de distillation dans le milieu azoté, condensation dans le réfrigérant, collection du distillat dans l'éthanol à -50°C et captage à la sortie du collecteur des composés soufrés (substances parmi les plus volatiles) par absorption à l'aide d'hydroxyde de cadmium.

Il faut noter à cette occasion que dans notre optique qui vise une application ultérieure du procédé de façon routinière (quantité des échantillons importante), la rapidité et la simplicité du procédé sont aussi importantes que la reproductibilité, la fiabilité et la précision. La condition absolue pour ce genre de travail est la **Standardisation** stricte du procédé.

Les substances non volatiles, hydrosolubles susceptibles d'influencer le goût (acides organiques, glucides solubles et leurs dérivés, phénols solubles, etc.) sont dosées dans le résidu de distillation.

TABLEAU 1.

	Espèce	Variété
A	Fétuque élevée	Clarine
B	Festulolium	Hazel
C	Amphidiploïde	Exm
D	Festulolium	Kenhy
E	Fétuque élevée	Lubrette
F	Festulolium	179/8
G	Festulolium	540

TABLEAU 3.

Composés phénoliques dans la matière végétales

		A	B	C	D	E	F	G
Phénols solubles (MS)	g/kg	12,01	13,37	12,68	13,73	12,44	12,29	11,96
Acides phénol. (MS)	g/kg	17,06	15,37	15,15	16,30	16,68	14,56	16,89
Phénols hydrosolubles (matière verte)	g/kg	19,5	13,8	14,3	20,2	17,4	13,6	19,7

TABLEAU 2.

	Propriétés biologiques
Anthocyanines	Pigments rouge + bleu
Chalcones	Pigments jaune
Aurones	Pigments jaune
Flavones	Pigments blanc-crémeux Répulsifs alimentaires
Flavonols	Pigments blanc-crémeux Répulsifs alimentaires
Flavonones	Substances amères
Dihydrochalcones	Substances amères
Proanthocyanidines	Substances astringentes + Aptitude au tannage
Catéchines	Substances astringentes + Aptitude au tannage
Flavane-3,4-diols	Substances astringentes + Aptitude au tannage
Isoflavones + Comp. voisins	Oestrogènes + Fongicide

Les substances lipophiles non volatiles (terpénoïdes, principes amers, pigments, cires, etc.) sont extraites à l'aide de solvants spécifiques (dichlorométhane, éther éthylique, éther de pétrole, acétone, etc.).

Détections et procédés analytiques

Etant donné qu'à l'heure actuelle ce domaine est pratiquement inexploré, les premières années de notre recherche sur les caractéristiques organoleptiques en relation avec l'appétibilité des graminées, nous avons effectué un très grand nombre de déterminations différentes. Après avoir étudié les relations entre la concentration en différentes substances et l'appétibilité déterminée avec les animaux à Lusignan, la cohérence et la répétabilité de l'évolution de ces substances tout au long de la période de végétation, notre effort se concentra sur quelques groupes chimiques, probablement les plus importants dans le domaine de l'appétibilité.

Les composés phénoliques

Les tissus végétaux contiennent un très grand nombre de substances à fonction phénolique dont les plus importantes sont les anthocyanes, pigments rouges et bleus de fleurs et fruits, les flavones et leurs dérivés, pigments jaunes, les acides phénoliques (inhibiteur de la digestion) et les phénols présents sous forme de polymères, tels que les tannins et les lignines.
Mis à part ces trois derniers dont l'action antinutritionnelle est bien connue, ce sont les flavonoïdes qui sont les plus intéressants au niveau de l'appétibilité (couleur, goût) (Tableau 2).

D'une façon générale les phénols ne sont pas volatils, mais les éthers et esthers phénoliques, moins polaires, sont volatils. Leur odeur peut varier (appréciation humaine) entre très agréable (β-phényléthyl alcool dans l'eau de rose, fruits, etc.) à très piquant et répulsif (P-hydroxylbenzyl alcool dans moutarde).

Dans nos observations, nous avons enregistré des relations très étroites entre les phénols et le classement selon l'appétibilité in vivo de la fétuque élevée.
Dans la matière séchée (phénols solubles) : relation positive puisqu'il s'agit des pigments phénoliques extraits dans les conditions spécifiques de l'analyse (méthanol - milieu acide - extraits pigments) (Tabl. 3).
Acides phénoliques : relation étroite négative (Tabl. 3).
Phénols hydrosolubles (résidus de distillation) : influencent négativement le goût des aliments (amer, astringent). Leur relation avec l'appétibilité est nettement négative (Tabl. 3).
Phénols volatils : relation négative (Fig. No 2).

Les aldéhydes et les cétones (substances à carbonyle volatile)
sont des substances organiques fortement volatiles. Malgré leur faible concentration dans la matière végétale, elles participent de façon importante à la

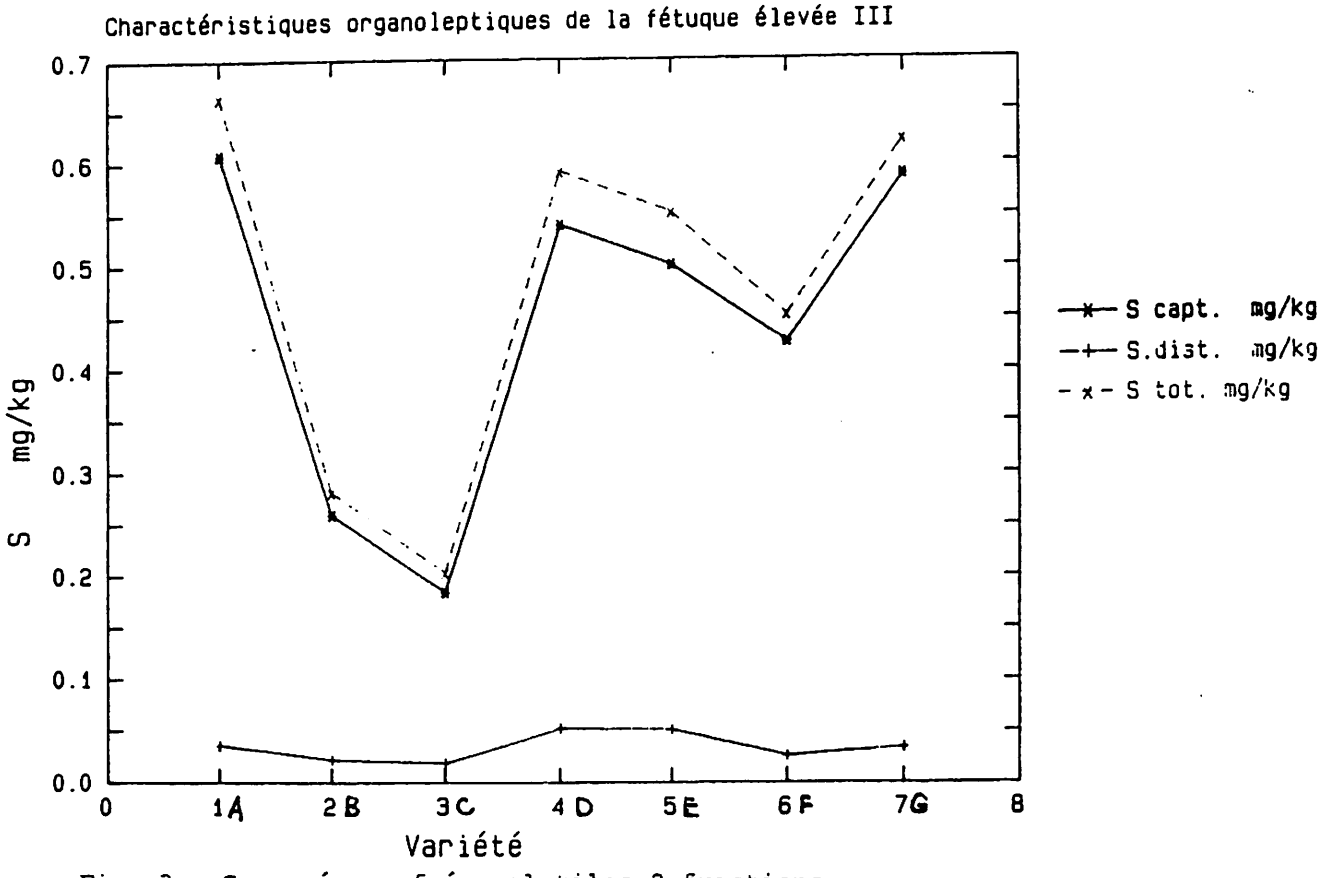

Fig. 3 Composés soufrés volatiles 2 fractions
(S capt. = fortement volatil ; S dist. = faiblement volatil).
Comparaison des variétés.

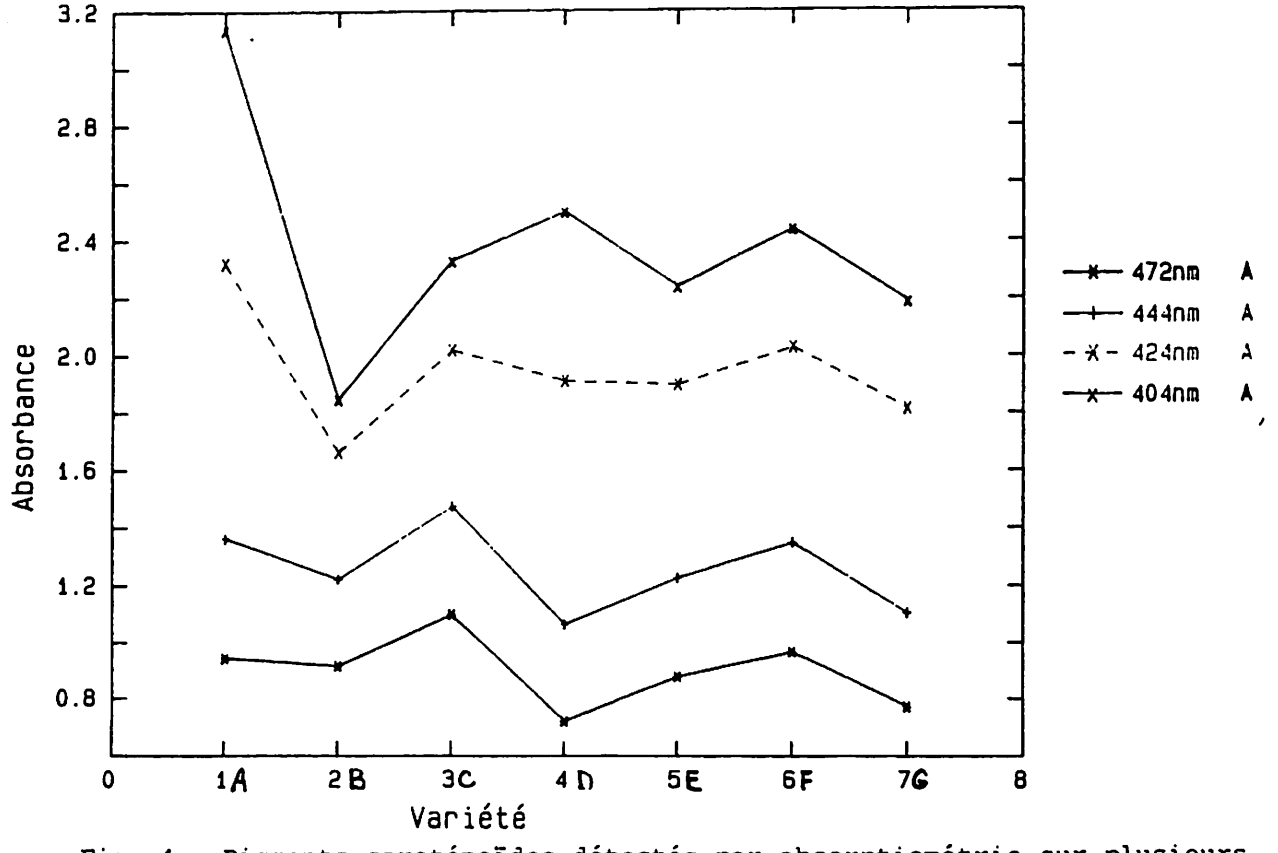

Fig. 4 Pigments caroténoïdes détectés par absorptiométrie sur plusieurs longueurs d'ondes (nm). Comparaison des variétés.

formation de l'arôme. Parfois elles sont considérées comme principales responsables du caractère de l'arôme, ce qui ne correspond souvent pas à la réalité. Un des représentants les plus connus de ce groupe de produits naturels est le 2-hexanal, plus connu sous l'appellation "aldéhyde de feuilles". Il est largement responsable de l'odeur bien distincte de feuilles broyées.
Selon plusieurs auteurs, ce groupe de substances est caractérisé comme attractif pour les insectes pollinisateurs, mais souvent répulsif, selon la présence des formes individuelles (butylaldéhyde, formaldéhyde, acétaldéhyde). Les mauvaises herbes sont souvent très riches en aldéhydes (Heracleum). En outre, on leur attribue l'activité antibiotique et celle de stimulateur de germination.
Chez la fétuque élevée, leur action sur l'appétibilité serait plutôt négative (fig. No 2). A ce propos on peut ajouter une observation : chez le pâturin, espèce très bien consommée par les animaux, contenant env. 50 % de moins de substances à carbonyle volatile que chez la fétuque élevée, la maladie fongique, telle que la rouille, augmente la concentration de ces substances de 62 %.

Les composés soufrés sont les métabolites secondaires d'une très large diversité au niveau de leurs caractéristiques chimiques et fonctionnelles. Il reste encore beaucoup d'inconnus et de questions concernant ce groupe. Malgré cela, en l'absence des évidences métaboliques, il semblerait qu'ils sont biologiquement dérivés, dans les plantes, des acides aminés soufrés.
Leur caractéristique principale est leur forte volatilité et leur odeur très offensive. Ils peuvent être détectés par l'odorat à des concentrations extrêmement faibles - 1 partie pour 50 milliards. Certaines formes chimiques de composés soufrés manifestent une action fortement bactéricide et antibiotique (sulfoxydes, alicine, etc.) et par ces actions, ils inhibent l'activité enzymatique in vitro.
La plupart de ces substances sont considérées dans la matière végétale comme artefact, puisqu'elles passent dans leur forme active à partir des précurseurs, tels que sulfoxide des acides aminés, à l'aide des enzymes dont l'action est déclenchée instantanément après une agression physique (broutage, récolte, etc.).
On les trouve dans la matière végétale sous forme de différents types de structure (thiols, sulfides, di- et polysulfides, sulfoxides, etc.).
L'oignon et l'ail sont les meilleurs exemples de la participation des composés soufrés à la formation de l'arôme des plantes.

Dans notre étude sur la fétuque élevée on observe une relation nettement négative avec l'appétibilité (fig. No 3). Les différences entre la CLARINE et HAZEL vont jusqu'à 200 - 250 % en plus pour la CLARINE.
De nombreuses mauvaises herbes sont riches en composés soufrés.

Les terpénoïdes

Les terpénoïdes représentent un des groupes les plus larges et biologiquement les plus importants parmi les produits naturels. Les terpénoïdes exhibent une diversité structurale et fonctionnelle remarquable malgré leur origine commune qui est une unité C_5 isopentenoïde. Ils se trouvent dans la nature sous forme libre, souvent ils sont accumulés dans les tissus spécifiques ou glandes spéciales ; plusieurs sont conjugués aux acides organiques, glucides, chlorophylles,

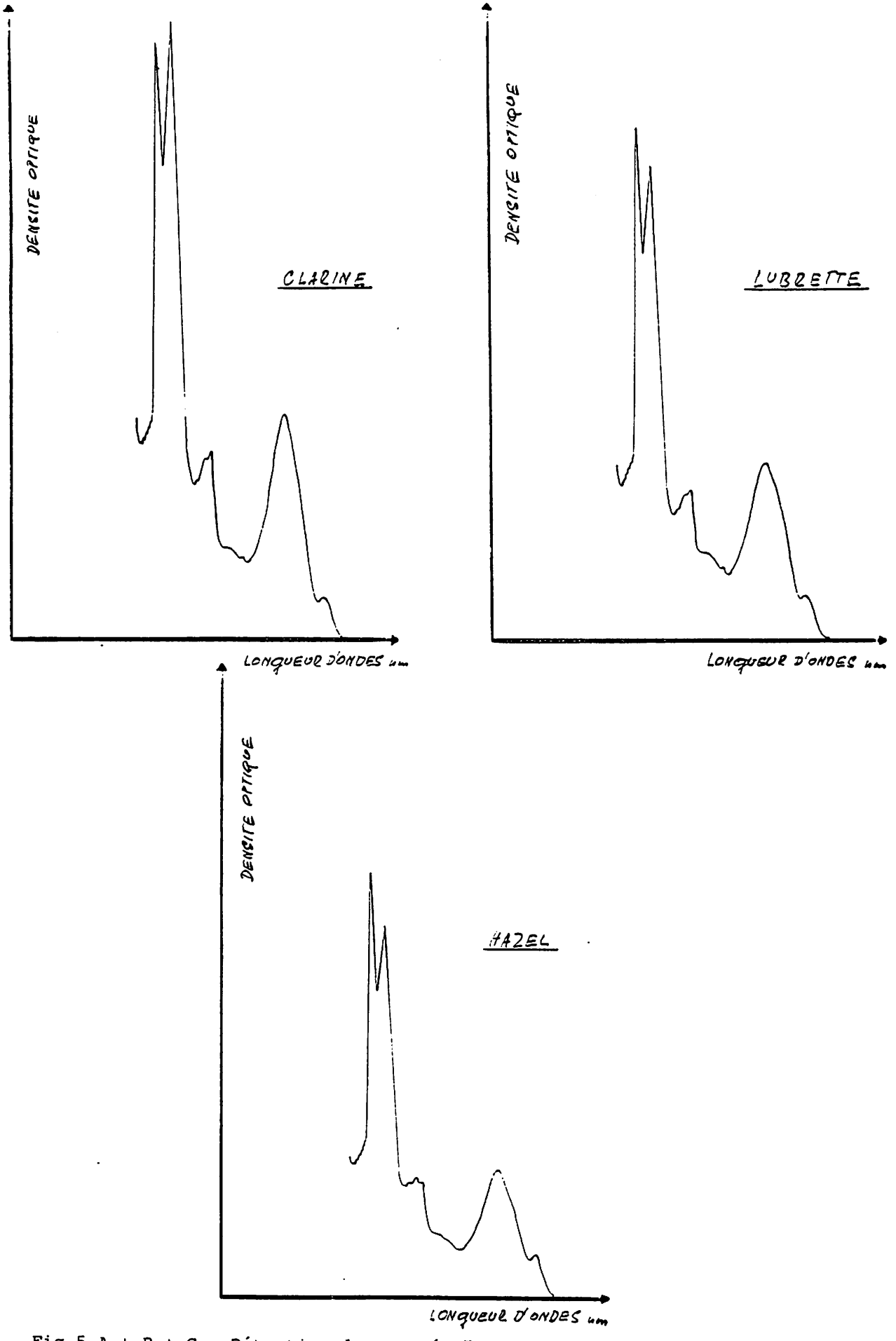

Fig 5 A + B + C. Détection des terpénoïdes non volatils par absorptiométrie dans un extrait (CH_2Cl_2) purifié. Comparaison de 2 fétuques élevées et un hybride.

protéines et autres métabolites primaires. Leur action caractéristique est attractive pour les insectes pollinisateurs et leur rôle extrêmement actif dans plusieurs fonctions défensives ou dissuasives.

Actions importantes pour les relations plante-animal ou plante-pathogène.

Beaucoup de monoterpènes et sesquiterpènes sont volatils et participent à la formation de l'arôme (les huiles essentielles) des plantes, et ils sont attractifs pour les pollinisateurs. En même temps, ils servent de défense naturelle par leur action répulsive olfactive, et répulsive par leur toxicité pour les herbivores. On attribue aux terpènes volatils une forte activité bactériostatique et bactéricide (Aromathérapie) ce qui a pour résultat l'inhibition de l'activité bactérienne dans le rumen et réduction de l'ingestibilité.

Les sesquiterpènes sont très intéressants de par leur action défensive et dissuasive. Cette action se situe au niveau de la toxicité directe, de l'action allergène, du goût fortement amer (sesquiterpènes lactones considérés comme principales substances amères). Leur action cytostatique (activité antitumorale) et fongicide est non négligeable. Parmi les phytoalexines antifongiques, on trouve beaucoup de sesquiterpènes. En outre, on a pu isoler plusieurs sesquiterpènes spécifiques après l'attaque des pathogènes fongiques (helmintosporal - sesquiterpène isolé d'un bouillon de culture contaminé par le champignon Helmintosporum sativum).

Les autres structures terpénoïdes, telles que diterpènes (toxicité) ou triterpènes (substances amères-cucurbitacines) jouent aussi un rôle important dans le système défensif contre les herbivores (larves, animaux).

Les tétraterpénoïdes dont principaux représentants sont les caroténoïdes (pigments) et leurs dérivés oxygénés, les xantophylles, sont très abondants dans la nature (production annuelle : 100 Mio de tons). Leur rôle principal est la protection des chlorophylles contre sa photodestruction par la lumière à longueur d'ondes courtes. Leur fonction écologique ne peut pas être négligée. Attractifs pour certains insectes, dissuasifs pour d'autres, leur présence plus ou moins abondante dans les graminées peut contribuer à la formation de "l'aspect vert" des plantes. (fig. No 4).

Détection

A cause de la très grande diversité des structures chimiques dans ce groupe de métabolites secondaires, il n'existe aucun procédé analytique capable de déterminer la concentration des terpènes dans la matière végétale à l'aide d'une réaction spécifique. Pour aborder le problème, nous avons alors décidé d'utiliser, dans un premier temps, la technique de détection par absorptiométrie dans l'ultrat-violet (dans le visible pour certains constituants). Il s'agit d'une technique très sensible (limites de détection comprises entre 10 et 20 nanogrammes) mais un peu moins sélective que la méthode plus sophistiquée, telle que la détection électrochimique. (fig. n°2 et n° 5 A, B, C)

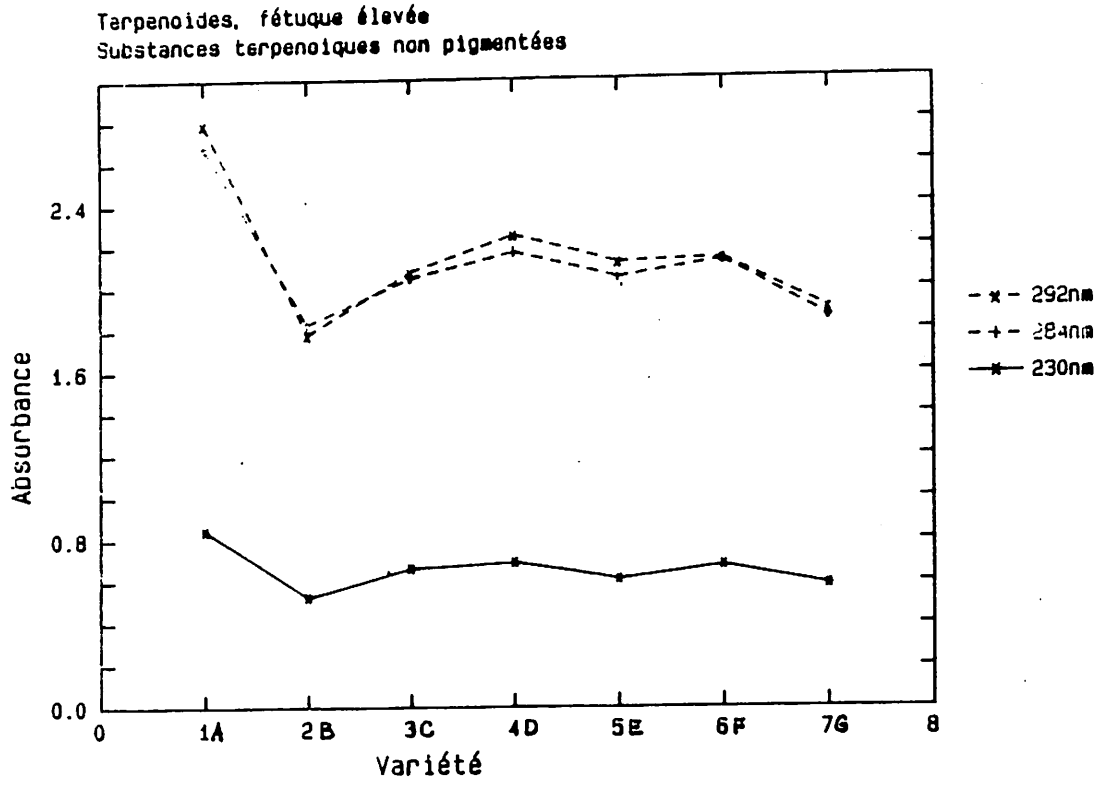

Fig. 6 Terpénoïdes détectés en UV. Comparaison des variétés.

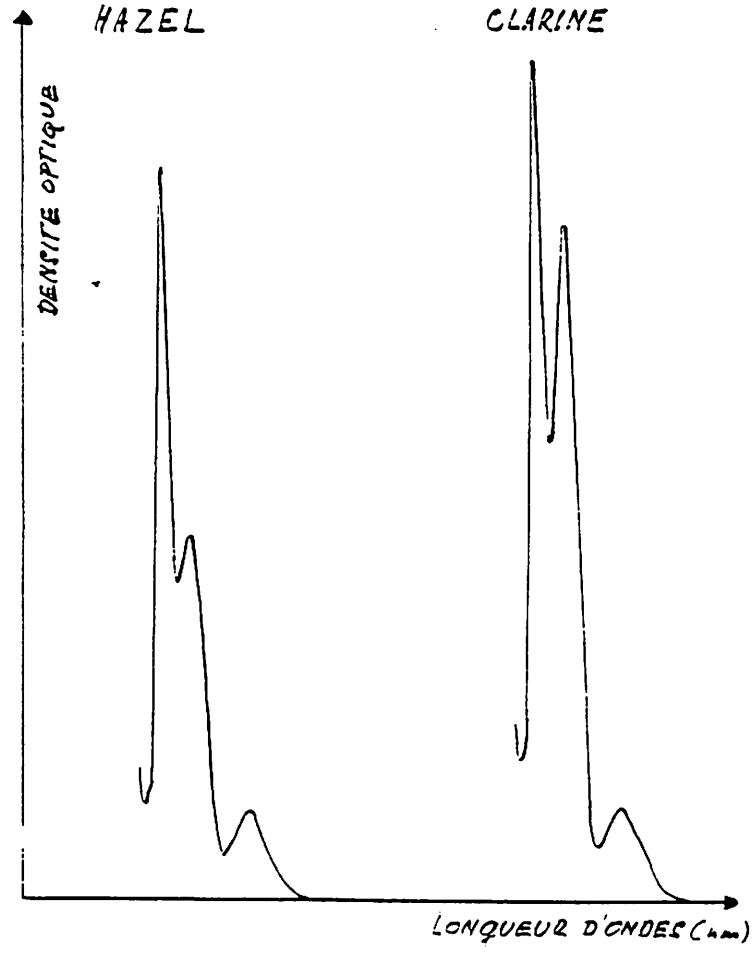

Fig. 7 Détection des mono- et sesquiterpènes volatiles par absorptiométrie en UV. Comparaison d'une fétuque élevée et un hybride.

En utilisant le caractère non polaire de la majorité des terpénoïdes, nous avons pu les séparer des autres constituants végétaux polaires à l'aide du solvant. L'extrait brut contenant les autres pigments non terpénoïdes et autres substances liposolubles, après avoir été "mesuré" et exprimé sous terme "aspect vert"

(corrélation négative avec la teneur en pigments terpénoïdes-jaunes), a été purifié pour obtenir l'extrait contenant uniquement les substances terpénoïdes. Etant donné que la majorité des substances terpénoïdes isolées et détectées par ce procédé est susceptible d'avoir une action négative (goût - terpénoïdes non pigments (fig. No 6), odeur - terpénoïdes volatils dans le distillat (fig. No 7), il est intéressant de voir que leur concentration, exprimée en densité optique et calculée sur 20 % de MS (comme toutes les autres substances) semble être en bonne corrélation négative avec l'appétibilité déterminée in vivo. Les spectres en UV et en visible ont été interprétées à l'aide d'une trentaine de substances de références naturelles ou synthétisées.

Pour conclure, on peut dire que d'une façon générale les métabolites secondaires, produits par l'organisme végétal pour sa propre défense, sont en relation négative avec l'appétibilité des plantes fourragères. Les résultats des analyses et l'image spectrale confirment les observations faites sur les animaux que les hybrides de la fétuque ne sont pas très attractifs mais plus que la fétuque elle-même, ou plutôt que la fétuque stimule moins l'appétence chez les animaux que les autres graminées.

Journées A.S.F. Section "Plantes Fourragères"
des 26 et 27 Novembre 1985