

LES EXTRAITS FOLIAIRES DE LUZERNE (EFL)

Dossier scientifique

Eric Bertin, Professeur de Nutrition à l'UFR Médecine de l'Université de Reims

Présentation du produit

Procédé d'obtention des EFL :

La technique consiste en l'extraction des composants nutritifs les plus riches des feuilles : protéines, oligo-éléments et vitamines, après en avoir éliminé la partie fibreuse non digestible et une grande partie de la charge minérale contenue dans la plante entière.

Le fractionnement s'opère de la façon suivante (Gastineau 1981) : La luzerne est fauchée et hachée sur le champ et transportée à l'usine pour traitement immédiat, de façon à éviter la protéolyse enzymatique. Elle est broyée et pressée : on recueille un jus vert qui contient environ 30% de protéines. Ce jus est chauffé à 90°C par injection de vapeur pour précipiter les protéines. Le coagulum, recueilli par une centrifugation, est séché en lit fluidisé puis compacté en une semoule contenant in fine environ 55% de protéines. Le seul ajout au produit naturel est de la vitamine C qui est apportée en fin de process à titre d'anti-oxydant (à raison de 600mg de vitamine C par kg d'EFL).

La thermocoagulation permet d'extraire des feuilles, en moyenne 8% de la matière sèche et 20 à 25% de l'ensemble des protéines.

La France est actuellement le seul pays au monde fabriquant de l'extrait foliaire sous forme de concentré sec.

Variété de luzerne utilisée :

Médicago Sativa

Conditions de culture de la luzerne utilisée pour la production des EFL :

L'Agriculteur producteur de luzerne est un professionnel qui a fait le choix de cette culture pour ses qualités agronomiques :

- Tête d'assolement
- Plante améliorante

Il choisit des parcelles adaptées à sa réussite dans un assolement compatible avec ses exigences. Elle doivent être saines (Ph supérieur à 6,2 sans excès d'eau) et ne pas avoir été implantées en luzerne depuis 6 à 9 ans.

Certains précédents seront exclus ainsi que les méthodes d'implantation sans labour.

L'agriculteur adopte des méthodes d'implantation propre à la culture avec des époques de semis les plus propices pour assurer un départ rapide de végétation et évite ainsi les excès de produits phytosanitaires.

Il utilise des semences à double triage pour éliminer les graines d'adventices et de cuscute et sécuriser l'implantation.

Les étapes culturales se réalisent en partenariat avec les professionnels déshydrateurs qui apportent un conseil technique.

Le conseil technique peut intervenir à tous les stades de la culture et il sera à la base de l'agrément de la parcelle pour son engagement en déshydratation.

Au sein de la profession, le S.N.D.F. et son Comité de Recherche Agronomique avec le partenariat de la recherche INRA – ITCF – SRPV met en place régulièrement des travaux d'essais tant variétaux que de conduite culture.

Avec le Service «avertissement » à chaque étape culturale, une note est diffusée à l'ensemble de la profession en rappelant les précautions culturales et les interventions de protection nécessaires.

La conduite culture se fait selon des règles de bon usage avec pour objectif :

- L'obtention d'une culture propre sans adventices, une culture à haute teneur en protéines.
- L'obtention d'une culture saine ou toutes les interventions chimiques sont proscrites dans les 15 jours précédant la récolte (insecticide...)
- L'obtention d'une culture sécurisée avec l'interdiction de l'utilisation des boues d'épurations.

Cet ensemble de règles est consigné dans un guide élaboré par la profession et adopté par chaque producteur : « Guide des bonnes pratiques du planteur de luzerne ».

Composition nutritionnelle

L'EFL est riche en protéines de haute valeur biologique, acides gras essentiels (7 fois plus que le lait), fer, vitamine A et calcium :

	EFL	Lait entier en Poudre	spiruline
eau	8%	3%	3-7%
protides	55-58%	26%	55-65%
lipides	9-10%	26%	4-7%
AGPI (ω 3)	6.4% (4.8%)	0.9% (0.2%)	1.8% (1.0%)
glucides	10-12%	38%	15-25%
minéraux	13-14%	8%	7-9%
fibres	1-2%	-	4-7%

AGPI = Acides Gras Poly-Insaturés

Aa essentiels (mg/g de protéines)	EFL	Lait en poudre	Isolat de soja	spiruline	oeuf
Histidine	24	26	26	17	23
Isoleucine	55	52	49	58	48
Leucine	95	94	82	90	81
Lysine	65	68	63	48	66
Méthionine et cystéine	31	33	26	29	40
Phénylalanine et tyrosine	88	92	90	76	95
Thréonine	52	43	38	53	51
Tryptophane	25	13	13	15	17
valine	62	61	50	66	56

L'indice PDCAAS* des EFL est égal à 1 :

Aa essentiels (mg/g de protéines)	EFL	Digestibilité (Aa _ 90%)	Ref FAO	Indice PDCAAS
Histidine	24	21	19	1.10
Isoleucine	55	49	28	1.75
Leucine	95	85	66	1.29
Lysine	65	58.5	58	1.00
Méthionine et cystéine	31	28	25	1.12
Phénylalanine et tyrosine	88	79	63	1.26
Thréonine	52	47	34	1.37
Tryptophane	25	22	11	2.00
valine	62	56	35	1.59

**Indice proposé par la FAO et l’OMS pour préciser la qualité des protéines d’un aliment donné*

Teneurs en minéraux, vitamines et oligo-éléments :

La teneur en micronutriments est très significative, notamment en ce qui concerne le bêta-carotène (pro-vitamine A), le fer et le calcium.

	Valeur pour 10g d’EFL
Vitamines :	
A (β carotène)	750 µg ER
B1	0.03 mg
B2	0.05 mg
B3 (PP)	0.06 mg
B5	~ 0 mg
B6	0.84 mg
B8	2 µg
B9	7.5 µg
B12	0.14 µg
C**	6mg
D	~ 0 µg
E	9 mg
K	1 mg
Oligo-éléments :	
cuiivre	0.08 mg
iode	3 µg
fer	5 mg
zinc	0.2 mg
Minéraux :	
calcium	320 mg
magnésium	14 mg
phosphore	78 mg
potassium	78 mg
sodium	0.5 mg

* 1mg = 167 µg ER ** : apport de 60 mg de vit C / 100g d’EFL lors de la production

Valeur pour 10 g	spiruline	EFL	LEP
β carotène	11 mg	4.5 mg	0.017 mg
Vit E	1 mg	9 mg	0.07 mg
Vit B9	1 µg	7.5 µg	4 µg
calcium	100 mg	320 mg	95 mg
phosphore	80 mg	78 mg	75 mg
fer	9.5 mg	5 mg	0.05 mg

zinc	0.2 mg	0.2 mg	0.03 mg
------	--------	--------	---------

Teneur en composés anti-nutritionnels :

- *Phytates* : ils sont présents en quantités négligeables au sein des EFL (< 0,2g de phytates par kg). Les valeurs retrouvées sont en phase avec la notion de faible concentration de phytates dans les feuilles et tiges des plantes (Sauveur 1989)

- *Saponines* : Les concentrations de saponines dans le jus vert de luzerne (juste après la phase de pressage) et dans les EFL, sont respectivement de 2 à 3% et de 0,5 à 1,4%, ce qui est inférieur aux teneurs rapportées pour d'autres légumineuses (3 à 7%) (Fenwick 1983). Les saponines de la luzerne sont dépourvues de toxicité (Malinow 1982 J Med Primatol).

- *L-Canavanine* : La concentration de L-Canavanine dans les EFL est proche de celle du soja et bien inférieure à celle d'autres aliments courants (lentille, oignon).

Teneur en L-Canavanine ($\mu\text{g/g}$ de matière sèche) :

Jus vert de luzerne	EFL	Farine de soja	Farine de lentilles	Oignon
110	4,3	2,1	2800	10 000

Analyses effectuées au laboratoire de Biochimie du CHU de Reims

Ce point a fait l'objet d'une analyse spécifique du fait de la notion de réactivation d'un lupus érythémateux disséminé (LED) chez deux consommateurs de tablettes de luzerne commercialisées aux U.S.A. par la société SHAKLEE (consommation chronique respectivement de 8 et 15 tablettes par jour depuis plusieurs mois) (Roberts, 1983). Ces tablettes, constituées de graines et de germes de luzerne, étaient utilisées pour leurs propriétés hypocholestérolémiantes du fait de leur teneur élevée en saponines. La L-canavanine, qui est contenue essentiellement dans les graines et germes de la plupart des légumineuses, fut suspectée comme étant à l'origine de ces cas de lupus en raison des éléments suivants :

- la consommation de germes frais de luzerne induit l'apparition d'un LED chez le singe, après 5-7 mois d'une consommation de graines ou germes de luzerne représentant au moins 40% de la consommation alimentaire globale (Bardana 1982).
- Il a été constaté une régression du LED à l'arrêt de la consommation de graines ou de germes de luzerne, et une réapparition du LED après introduction de 1% de sulfate de L-canavanine dans l'alimentation des singes (Malinow 1982 Science).
- Il n'y a jamais eu d'apparition de LED chez les singes, après 1 année de consommation de graines de luzerne passées à l'autoclave pendant 2 heures avant consommation (entraînant ainsi la destruction de la L-canavanine) (Malinow 1984).

Les expérimentations *in vitro* ont permis de démontrer le rôle de la L-canavanine dans la survenue d'un LED (Alcocer-Varela 1985 ; Morimoto 1989) et aucune donnée à ce jour ne permet de suspecter le rôle pathogène d'un autre facteur. Il faut également souligner le fait que les seuls cas de pathologies auto-immunes

induites par des extraits de luzerne l'étaient avec des graines ou des germes frais, alors que les extraits proposés pour lutter contre la malnutrition proviennent exclusivement de feuilles de luzerne.

D'autre part, le coumestrol, phytoestrogène contenu dans la luzerne, est susceptible d'être un facteur atténuant l'intensité du LED chez la souris génétiquement prédisposée à cette maladie (Schoenroth 2004).

- *Phyto-estrogènes* : Les concentrations de Daidzeine et de Genisteine sont faibles et nettement inférieures à celles retrouvées dans de nombreuses autres plantes (soja, lentille, haricot blanc et rouge) (Livingston 1978, Mazur 1998). La concentration de Coumestrol se situe quand à elle entre 30 et 80 ppm selon les échantillons.

Le Coumestrol possède une activité estrogénique significative et est potentiellement à risque d'engendrer des effets utéro-trophiques et de perturbation de l'axe gonadotrope. Cependant, son activité au niveau utérin est respectivement au minimum 100 fois et 1000 fois inférieure à celle de l'Estradiol (Newsome 1980 ; Collins 1997) et du Diethylstilbestrol (Jefferson 2002).

Un effet significatif sur les organes sexuels et l'axe gonadotrope n'a été rapporté que pour des doses de Coumestrol $> 10\text{mg/kg/j}$ par voie orale (ingestion prolongée de nourriture ou d'eau de boisson comprenant du Coumestrol)(Whitten 1992 et 1995, Pocock 2002). Plusieurs études ayant eu recours au Coumestrol par voie parentérale ont révélé des effets significatifs, mais à des doses supérieures à celles susceptibles d'être apportées par les EFL, tout en sachant que l'activité d'une quantité de Coumestrol administrée sous la forme d'injections parentérales est 100 fois supérieure à celle de la même quantité consommée par voie orale (Braden 1967).

La quantité maximale de Coumestrol apportée par la consommation de 10g d'EFL étant de $800\mu\text{g/j}$, si l'on se réfère à une dose maximale admissible de sécurité de 1mg/kg/j , un enfant de 3kg consommant 10g/j d'EFL ou une femme enceinte de 40kg consommant 20g/j d'EFL (correspondant à un mésusage de l'EFL dans les 2 cas) seraient bien en deçà de cette dose admissible malgré le caractère extrême de ces situations.

Données toxicologiques

Dès 1960, les chercheurs anglais Waterlow et Pirie ont suggéré d'utiliser des extraits foliaires de végétaux à feuille verte pour lutter contre la malnutrition dans les pays en voie de développement (Pirie 1959 et 1966 ; Waterlow 1962). Cette solution a été confortée par d'autres études utilisant divers concentrés de feuilles obtenus artisanalement (Doraiswamy 1969, Lala 1970, Olatunbosun 1972, Devadas RP 1978 et 1984, Shah 1981).

La luzerne est une légumineuse réputée non toxique qui est utilisée couramment à l'état brut ou transformé pour l'alimentation animale.

L'EFL ne contient aucune trace d'aflatoxines, de pesticides ou de métaux lourds, et ses caractéristiques microbiologiques sont conformes aux normes alimentaires européennes.

TOXINES

	Nancy 1998			UCCAB 1998	Eurofins 2002	
	PX 1996	236CX	231 CX		1440930	1440931
Aflatoxine B1	< seuil	< seuil	< seuil	-	< seuil	< seuil
Aflatoxine B2	< seuil	< seuil	< seuil	-	< seuil	< seuil
Aflatoxine G1	< seuil	< seuil	< seuil	-	< seuil	< seuil
Aflatoxine G2	< seuil	< seuil	< seuil		< seuil	< seuil
Vomitoxine	-	-	-	< seuil	< seuil	< seuil
Zéaralénone	-	-	-	< seuil	< seuil	< seuil
Ochratoxine A	-	-	-	-	< seuil	< seuil
Fumonisine B1	-	-	-	-	< seuil	< seuil
Fumonisine B2	-	-	-	-	< seuil	< seuil

Un haut niveau de consommation d'EFL chez l'animal (rat et porc) 10 à 30 fois supérieure à celle préconisée chez l'Homme (doses recommandées : 5 à 10g/ chez l'enfant et 15g/j chez l'adulte) n'a pas mis en évidence d'effets délétères après plusieurs mois d'utilisation (Carr 1974, Bourdon 1980, et étude du Pr Tomé en cours de publication).

Si l'on se réfère à la FDA, la luzerne est une plante inoffensive pour l'Homme (cf photocopie du texte officiel ci-dessous) :

TITLE 21--FOOD AND DRUGS	
CHAPTER I--FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (CONTINUED)	
PART 182--SUBSTANCES GENERALLY RECOGNIZED AS SAFE--Table of Contents	
Subpart A--General Provisions	
Sec. 182.10 Spices and other natural seasonings and flavorings.	
Spices and other natural seasonings and flavorings that are generally recognized as safe for their intended use, within the meaning of section 409 of the Act, are as follows:	

Common name	Botanical name of plant source

Alfalfa herb and seed.....	Medicago sativa L.

<i>Résultats constatés sur le « terrain » et au cours des études scientifiques</i>
--

Les données d'observation sur le terrain sont les suivantes, et sont en faveur d'une amélioration franche de l'état nutritionnel et des conséquences de la dénutrition, par les EFL :

- accélération de la croissance staturo-pondérale chez l'enfant et l'adolescent
- diminution des retards de croissance intra-utérin (augmentation du poids de naissance) et amélioration de la lactation
- correction de l'anémie par carence martiale
- diminution des infections respiratoires et des diarrhées chroniques
- amélioration significative de l'état de santé des sujets HIV
- prévention efficace du NOMA

L'acceptation des EFL par les différentes populations est excellente, en association à l'alimentation traditionnelle.

320 tonnes ont déjà été consommées dans 20 pays du monde, et aucun effet délétère des EFL n'a été signalé par les différentes ONG l'ayant utilisé.

Quatre études contrôlées ont été réalisées récemment :

- la première étude réalisée au Pérou en partenariat avec l'université de Lima, a étudié l'effet de la prise quotidienne de 10g d'EFL pendant 1 an sur 30 enfants âgés de 3 à 5 ans comparativement à celui constaté chez 30 enfants recevant du lait écrémé en poudre (quantité permettant d'apporter la même quantité de protéines que l'EFL). Un suivi médical, et biologique (hémoglobininémie, protidémie, albuminémie, créatininémie et transaminases) a été réalisé pendant 1 an. Les résultats montrent que les EFL sont bien acceptés (91% de consommation). La croissance staturo-pondérale est similaire entre les 2 groupes. Les EFL entraînent une normalisation plus rapide des marqueurs de dénutrition (protidémie et albuminémie) que le lait, et il n'y a plus aucun enfant anémié dans le groupe EFL à 3 mois et 1 an (anémie présente à l'inclusion chez 33% des enfants), alors que le lait n'a pas d'effet significatif sur les

taux d'hémoglobine. Aucun impact négatif des EFL au niveau digestif, rénal et hépatique n'a été constaté pendant toute la durée de l'étude.

- la seconde étude s'est déroulée dans les mêmes conditions méthodologiques, mais a porté sur une population plus importante de la même région (70 enfants par groupe), n'a duré que 6 mois et le groupe contrôle a reçu du lait entier en poudre au lieu de lait écrémé en poudre. Cette étude montre une efficacité des EFL strictement superposable à celle du lait entier en poudre sur la croissance, les niveaux d'albumine et de protidémie. Aucun effet délétère n'a été constaté.
- la troisième étude s'est déroulée en République Démocratique du Congo et a été menée pendant 3 mois avec pour objectif la comparaison de l'impact de 10g d'EFL/j versus celui de 15g de lait écrémé en poudre (30 enfants de 3 à 5 ans par groupe) sur la croissance et l'albuminémie. L'acceptation de l'EFL a été similaire à celle du lait et les effets des 2 compléments nutritionnels sur les paramètres analysés étaient tout à fait similaires.
- La quatrième étude réalisée en partenariat avec l'université du Rajasthan en Inde, a analysé l'effet sur l'hémoglobinémie d'une consommation quotidienne de 10g d'EFL par 60 adolescentes présentant une anémie par carence en fer comparativement à celui de tablettes de 60 mg de fer recommandées par le gouvernement (60 adolescentes). La tolérance et l'acceptation des EFL a été excellente (significativement moins d'arrêt de consommation dans le groupe EFL), et l'évolution des taux d'hémoglobinémie à 3 mois n'était pas significativement différente entre les 2 groupes.

Les rapports détaillés de ces différentes études peuvent être fournis sur simple demande.

Références bibliographiques :

- Alcocer-Varela J, Iglesias A, Llorente L, Alarcon-Segovia D. Effects of L-canavanine on T cells may explain the induction of systemic lupus erythematosus by alfalfa. *Arthr Rheum* 1985, 28 : 52-57.
- Bardana EJ, Malinow MR, Houghton DC, McNulty WP, Wuepper KD, Parker F, Pirofsky B. Diet-induced systemic lupus erythematosus (SLE) in primates. *Am J Kidney Dis* 1982, 1 : 345-352.
- Bourdon D, Perez JM, Henry Y, Calmes R. Valeur énergétique et azotée d'un concentré de protéines de luzerne, le « PX1 », et utilisation par le porc en croissance-finition. *Journées Rech Porcine en France* 1980, 227-244.
- Braden AWH, Hart NK, Lamberton JA. Oestrogenic activity and metabolism of certain isoflavones in sheep. *Aus J Agric Res* 1967, 18 : 355-348.
- Carr JR, Pearson G. Nutritive value of Lucerne leaf-protein concentrate and lupin seed-meal as protein supplements to barley diets for growing pigs. *Proc N Z Soc Anim Prod* 1974, 34 : 95 – 100.
- Collins BM, Mc Lachlan JA, Arnold SF. The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids* 1997, 62 : 365-372.
- Devadas RP and Murthy NK. Biological utilisation of beta-carotene from Amaranth and leaf protein in preschool children. *World Rev Nutr Diet* 1978, 31 : 159-161.
- Devadas RP, Vijayalakshmi P, Vijaya S. Studies on nutritional trial with preschool children with low cost leaf protein supplements in 'current trends in life sciences' vol XI – 1984 – progress in leaf protein research (Ed N Singh), 1984 : 311-315.
- Doraiswamy TR, Singh N, Daniel VA. Effects of supplementing ragi (*Eleusine coracana*) diets with lysine or leaf protein on the growth and nitrogen metabolism of children. *Br J Nutr* 1969, 23 : 737-743.
- Fenwick DE, Oakenfull D. Saponin content of food plants and some prepared foods. *J Sci Food Agric* 1983, 34 : 186-191.
- Gastineau I et de Mathan O. La préparation industrielle de la protéine verte de luzerne. In : Gauthier-Villars, ed. Costes C. Protéines foliaires et alimentation. Paris : 1981, 159-182.
- Jefferson WN, Padilla-Banks E, Clark G, Newbold RR. Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. *J Chromatogr. B* 2002, 777 : 179-189.
- Lala VR, Reddy V. Absorption of beta-carotene from green leafy vegetables in undernourished children. *Am J Clin Nutr* 1970, 23 : 110-113.

- Malinow MR, Mc Nulty WP, Houghton DC, Kessler S, Stenzel P, Goodnight SH, Bardana EJ, Palotay JL, Mc Laughlin P, Livingston AL. Lack of toxicity of alfalfa saponins in cynomolgus macaques. *J Med Primatol* 1982, 11 : 106-118.
- Malinow MR, Bardana EJ, Pirofsky B, Craig S, McLaughlin P. Systemic lupus erythematosus-like syndrome in monkeys fed alfalfa sprouts: role of a nonprotein amino acid. *Science* 1982, 216 : 415-417.
- Malinow MR, McLaughlin P, Bardana EJ, Craig S. Elimination of toxicity from diets containing alfalfa seeds. *Food Chem Toxicol.* 1984, 22 : 583-587. Livingston AL. Forage plant estrogens. *J Toxicol Environ Health* 1978, 4 : 301-324.
- Mazur W. Phytoestrogen content in foods. *Baill Clin Endocrinol Metab* 1998, 12 : 729-742.
- Morimoto I, Shiozawa S, Tanaka Y, Fujita T. L-canavanine acts on suppressor-inducer T cells to regulate antibody synthesis: lymphocytes of systemic lupus erythematosus patients are specifically unresponsive to L-canavanine. *Clin Immunol Immunopathol* 1990, 55 : 97-108.
- Newsome FE, Kitts WD. Action of phytoestrogens coumestrol and genistein on cytosolic and nuclear oestradiol-17B receptors in immature rat uterus. *Anim Reprod Sci* 1980, 3 : 233-245.
- Olatunbosun DA, Adadevoh BK, Oke OL. Leaf protein : a new protein source for the management of protein calorie malnutrition in Nigeria. *Nigerian Med J* 1972, 2 : 195-199.
- Pirie NW. Leaf protein as human food. *Lancet* 1959, 2 : 961-962.
- Pirie NW. Leaf protein as a human food. *Science* 1966, 152 : 1701-1705.
- Pocock VJ, Sales GD, Milligan SR. Comparison of the oestrogenic effects of infant milk formulae, oestradiol and the phytoestrogen coumestrol delivered continuously in the drinking water to ovariectomised mice. *Food Chem Toxicol* 2002, 40 : 643-651.
- Roberts JL, Hayashi JA. Exacerbation of SLE associated with alfalfa ingestion. *N Engl J Med* 1983, 308 :1361.
- Sauveur B. Phosphore phytique et phytases dans l'alimentation des volailles. *INRA Prod Anim* 1989, 2 : 343-351.
- Shah FH, Salam Sheikh A, Rasool FH. A comparison of leaf protein concentrate fortified dishes and milk as supplements for children with nutritionally inadequate diets. *Hum Nutr* 1981, 30 : 245-258.
- Waterlow JC. The absorption and retention of nitrogen from leaf protein by infants recovering from malnutrition. *Br J Nutr* 1962, 16 : 531-540.
- Whitten PL, Russell E, Naftolin F. Effects of a normal, human-concentration, phytoestrogen diet on rat uterine growth. *Steroids* 1992, 57 : 98-106.
- Whitten PL, Lewis C, Russell E, Naftolin F. Phytoestrogen influences on the development of behavior and gonadotropin function. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995, 208 : 82-86.