

Les fruits du gattilier et les feuilles de noyer contiennent des phytoprogestagènes permettant d'envisager l'utilisation de ces plantes comme alternative aux hormones de synthèse pour la synchronisation des cycles des cochettes

Ghylène GOUDET (1), Philippe CHEMINEAU (1), Philippe LIERE (2), Anne-Lyse LAINE (1), Marie-Laure GREIL (3), Marine DELMAS (3), Thibaut CHABRILLAT (4), Stéphane FERCHAUD (5)

(1) UMR PRC, INRAE, CNRS, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

(2) U1195 INSERM Université Paris Saclay, Kremlin Bicêtre, France

(3) UEA, INRAE, 33210 Toulence, France

(4) Phytosynthèse, 63200 Mozac, France

(5) UE GENESI, INRAE, 86480 Rouillé, France

ghylene.goudet@inrae.fr

Avec la collaboration de Chantal Porte, Patrick Manceau, Antoine Pianos et le soutien financier du Métaprogramme Métabio

Chasteberry fruits and walnut leaves contain phytoprogestins and could be considered as an alternative to synthetic progestogens for synchronising the oestrus of gilts

On pig farms, sows are often managed in batches because batches have practical and hygiene advantages, but doing so requires synchronising the oestrus of gilts. Synthetic progestogens are commonly used for this purpose, but they may raise concerns about the environment and human health, are prohibited on organic farms and have a financial cost. The objective of this study was to develop natural alternatives for synchronising oestrus. We identified and quantified phytoprogestins in two plants: chasteberry (*Vitex agnus castus*), a shrub from Mediterranean areas, and walnut (*Juglans regia*). High-performance liquid chromatography showed that chasteberry fruits contain the flavonoids kaempferol and apigenin, and that walnut leaves contain kaempferol. These flavonoids interact with the progesterone receptor and elicit progestin effects. Gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry showed that walnut leaves contain high concentrations of progesterone, 5alpha- and 20alpha-dihydroprogesterone, and that chasteberry fruits contain low concentrations of these progestogens. Both plants contain phytosterols (i.e., beta-sitosterol, campesterol, stigmasterol) that are precursors for steroid hormone biosynthesis and induce an increase in progesterone concentrations in plasma when administered to female rats. Thus, chasteberry fruits and walnut leaves contain compounds with progestin effects. Further studies are underway to assess whether these plants could be used as an alternative to synthetic progestogens for synchronising the oestrus of gilts.

INTRODUCTION

En élevage porcin, la conduite en bande présente de nombreux avantages, mais elle nécessite la synchronisation des cycles des femelles. L'usage d'hormones progestagènes de synthèse pour cette synchronisation soulève des questions environnementales et de santé publique, est interdit en élevage biologique et représente un coût financier non négligeable. Notre objectif est d'identifier des substituts naturels aux hormones progestagènes de synthèse.

Plusieurs études ont montré que le gattilier (*Vitex agnus-castus*), un arbuste originaire du bassin méditerranéen, a un

effet progestagène. L'ingestion de fruits de gattilier augmente les taux de progestérone urinaire et fécale et bloque les cycles sexuels chez les femelles chimpanzés et babouins (Emery-Thompson *et al.*, 2008). L'ingestion de gattilier augmente la durée de la phase lutéale chez la vache et la femme et la concentration plasmatique de progestérone chez la vache, la femme, la souris et la ratte (Farhoodi *et al.*, 2011 ; Ahangarpour *et al.*, 2016).

Des travaux antérieurs ont montré que les feuilles de noyer (*Juglans regia*), contiennent de la progestérone en quantités très importantes (8 à 30 mg/kg de feuilles fraîches) avec des différences de concentrations entre variétés et entre saisons (Pauli *et al.*, 2010 ; Chemineau, communication personnelle).

L'ingestion de feuilles de noyer augmente les taux de progestérone plasmatique chez la chèvre (Chemineau, communication personnelle).

L'objectif de cette étude était d'identifier et de quantifier les molécules à effet progestagène dans les fruits de gattilier et les feuilles de noyer.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Fourniture des plantes

Les feuilles de noyer ont été collectées à la main au mois d'octobre 2021 dans l'Unité Expérimentale Arboricole (UEA, INRAE, Toulence) sur des arbres têtards. Trois variétés de noyer riches en progestérone d'après nos analyses antérieures et couramment cultivées en France ont été choisies. Les feuilles ont été séchées sur place dans un séchoir pendant 24 heures puis transportées au laboratoire et réduites en poudre.

Les fruits de gattilier ont été cueillis en été 2021 et 2022 par des producteurs marocains puis achetés par la société Phytosynthèse. Deux origines ayant une forte teneur en huiles essentielles et en casticine (marqueurs de qualité) d'après nos analyses antérieures et disponibles en grande quantité ont été choisies. Les fruits ont été séchés et réduits en poudre, puis envoyés au laboratoire.

1.2. Analyse des molécules à effet progestagène

L'analyse des molécules à effet progestagène a été réalisée sur le mélange des deux origines de gattilier et sur le mélange des trois variétés de noyer.

Deux flavonoïdes, l'apigénine et le kaempferol, ont été quantifiés par HPLC (high performance liquid chromatography) à l'ITEIPMAI (institut technique interprofessionnel des plantes à parfum, médicinales, aromatiques et industrielles). L'apigénine et le kaempferol sont capables de se fixer sur les récepteurs de la progestérone, de les activer et d'avoir un effet progestagène (Dean *et al.*, 2017).

L'ensemble des stéroïdes, en particulier la progestérone, ses précurseurs et ses métabolites, ont été analysés par GC-MS/MS (gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry) à l'INSERM (U1195).

Le cholestérol et trois phytostérols, le campestérol, le β -sitostérol et le stigmastérol, ont été analysés par GC-MS/MS à l'INSERM (U1195). Ces phytostérols ont une structure similaire au cholestérol et peuvent servir de précurseurs pour la synthèse d'hormones stéroïdiennes (Tarkowska, 2019).

L'administration de phytostérols à des rattes ovariectomisées

provoque une augmentation des concentrations plasmatiques de progestérone (Swar *et al.*, 2017).

2. RESULTATS

L'analyse des flavonoïdes par HPLC a montré que les fruits du gattilier contiennent du kaempferol et de l'apigénine et que les feuilles de noyer contiennent de grandes quantités de kaempferol (tableau 1).

L'analyse des stéroïdes par GC-MS/MS a montré que les fruits du gattilier contiennent peu de stéroïdes, alors que les feuilles de noyer sont très riches en prégnénolone, progestérone, 5α - et 20α -dihydroprogestérone (tableau 1).

L'analyse des phytostérols par GC-MS/MS a montré que les fruits du gattilier et les feuilles de noyer contiennent du cholestérol, du campestérol, du β -sitostérol et du stigmastérol (tableau 1).

Tableau 1 – Composition des fruits du gattilier et des feuilles de noyer (en $\mu\text{g/g}$ ou ng/g de matière sèche)

	Fruits de gattilier ¹	Feuilles de noyer ¹
Flavonoïdes		
Kaempferol ($\mu\text{g/g}$)	34,5	2800
Apigénine ($\mu\text{g/g}$)	88,4	< SD ²
Stéroïdes		
Prégnénolone (ng/g)	6,4	1859
Progestérone (ng/g)	2,9	24533
5α -dihydroprogestérone (ng/g)	2,6	13971
20α -dihydroprogestérone (ng/g)	0,2	1703
3α -dihydroprogestérone (ng/g)	207,7	< SD ²
Phytostérols		
Cholestérol ($\mu\text{g/g}$)	5,4	2,1
Campestérol ($\mu\text{g/g}$)	31,3	8,4
β -sitostérol ($\mu\text{g/g}$)	499,7	895,9
Stigmastérol ($\mu\text{g/g}$)	79,2	5,5

¹ fruits de gattilier : mélange de 2 origines, feuilles de noyer : mélange de 3 variétés ; ² < SD : inférieur au seuil de détection

CONCLUSION

Les fruits du gattilier et les feuilles de noyer contiennent donc des substances ayant un effet progestagène. Une étude est en cours afin de vérifier si ces plantes pourraient être utilisées comme substituts naturels aux hormones progestagènes de synthèse et si la distribution de ces plantes dans la ration alimentaire permettrait une synchronisation des œstrus des cochettes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahangarpour A., Najimi S.A., Farbood Y., 2016. Effects of vitex agnus-castus fruit on sex hormones and antioxidant indices in a D-galactose-induced aging female mouse model. *J. Chin. Med. Assoc.*, 79, 589-596.
- Dean M., Murphy B.T., Burdette J.E., 2017. Phytosteroids beyond estrogens: Regulators of reproductive and endocrine function in natural products. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 442, 98-105.
- Emery-Thompson M., Wilson M.L., Gobbo G., Muller M.N., Pusey A.E., 2008. Hyperprogesteronemia in response to Vitex fischeri consumption in wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*). *Am. J. Primatol.*, 70, 1064-1071.
- Farhoodi M., Khorshid M., Eyvani D., 2011. Vitex agnus-castus effects on inter estrus interval in dairy cows. *Proc. XVth International Congress of the International Society for Animal Hygiene, Vienna, Austria, 3-7 July 2011, Volume 3: 1305-1308 ref.10e.*
- Pauli G.F., Friesen J.B., Gödecke T., Farnsworth N.R., Glodny B., 2010. Occurrence of progesterone and related animal steroids in two higher plants. *J. Nat. Prod.*, 73, 338-345.
- Swar G., Shailajan S., Menon S., 2017. Activity based evaluation of a traditional Ayurvedic medicinal plant: Saraca asoca (Roxb.) de Wilde flowers as estrogenic agents using ovariectomized rat model. *J. Ethnopharmacol.*, 195, 324-333.
- Tarkowska D., 2019. Plants are capable of synthesizing animal steroid hormones. *Molecules* 24, 2585.