



Thèse

Thèse .

Présentée par

Adjélé Eli WILSON

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Spécialité

Chimie Analytique

Recherche d'Isothiocyanates à intérêts fonctionnel et technologique chez les Brassicacées

Soutenue publiquement le 29 Août 2011 devant la commission d'examen

Dr Françoise BINDLER
Pr Philippe CAYOT
Pr Bruno LEBIZEC
Dr Saïd ENNAHAR
Pr François BERNIER
Dr Dalal AOUDE-WERNER

Directeur de thèse
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Examineur
Examineur
Examineur

Strasbourg
Dijon
Nantes
Strasbourg
Strasbourg
Strasbourg

**Institut Pluridisciplinaire
Hubert Curien**

Département des Sciences
Analytiques
Equipe de Chimie Analytique des
Molécules Bioactives

UMR 7178

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe de Chimie Analytique des Molécules Bioactives, UMR 7178, LC4, Département des Sciences Analytiques de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) sous la direction du Dr Françoise Bindler. Ce travail a donné lieu aux publications et aux communications suivantes :

Publications

- Eli Adjélé Wilson, Saïd Ennahar, Martine Bergaentzlé, Minjie Zhao, Eric Marchioni, Françoise Bindler. “Simultaneous determination of various isothiocyanates by RP-LC following Precolumn Derivatization with mercaptoethanol”, *Chromatographia* (2011) 73 (Suppl 1):S137–S142.
- Eli Adjélé Wilson, Saïd Ennahar, Minjie Zhao, Eric Marchioni, Françoise Bindler. Determination of various isothiocyanates by reversed phase HPLC with Heated column, en cours de rédaction.

Communications à des congrès par affiche :

- Eli Adjélé Wilson, Saïd Ennahar, Martine Bergaentzlé, Minjie Zhao, Eric Marchioni, Françoise Bindler. “Simultaneous determination of various isothiocyanates by HPLC following Precolumn Derivatization with mercaptoethanol”. 16th International Symposium on Separation Sciences – Recent advancements in Chromatography and Capillary Electromigration Techniques – Rome (Italy), 6-10 septembre 2010.
- Eli Adjélé Wilson, Saïd Ennahar, Minjie Zhao, Eric Marchioni, Françoise Bindler. “Determination of various isothiocyanates by reversed phase HPLC with Heated column”. 9ème congrès francophone de l’AfSep sur les sciences séparatives et les couplages – Toulouse (France), 23-25 mars 2011.

Remerciements

Gloire et Honneur soit rendu à celui sans qui je ne serais certainement pas en train d'écrire ces lignes, l'Eternel des Armées. "Mes faibles mots ne suffiraient pour te dire comment tu es merveilleux et combien je te suis reconnaissante; alors entends mon cœur".

Je tiens à remercier le Pr Eric Marchioni, pour m'avoir donné une chance en m'acceptant au sein de son équipe et de m'avoir permis de travailler sur cette thèse. J'y ai vécu une expérience enrichissante à la fois intellectuelle et personnelle.

Je voudrais exprimer ici ma plus sincère gratitude au Dr Françoise Bindler, mon directeur de thèse et au Dr Saïd Ennahar. Je vous remercie de m'avoir aidé et encouragé dans l'organisation et la réalisation de mes travaux tout au long de ces années. Françoise, ton soutien n'a pas seulement été d'ordre scientifique, mais aussi humain, par ton enthousiasme, ta générosité, et ta sympathie que ce soit dans le cadre du laboratoire, ou au niveau personnel. Merci à Saïd pour ta disponibilité, ta rigueur, et pour l'apprentissage accéléré en microbiologie.

Je remercie sincèrement les Pr Philippe Cayot et Pr Bruno Le Bizec qui m'ont fait l'honneur d'accepter de me consacrer du temps et de porter leur jugement expert sur ce travail. Mes remerciements vont à l'endroit du Pr François Bernier et du Dr Dalal Aoude-Werner qui ont accepté de siéger dans ce jury.

Merci à toutes les personnes qui ont su se mobiliser autour de mes recherches, et m'apporter non seulement leur expertise technique, mais aussi leur temps et leurs conseils avisés, contribuant ainsi à la qualité de mon travail. Je pense notamment aux équipes du laboratoire de Biochimie et nutrition et du laboratoire de microbiologie d'AERIAL: Véronique pour m'avoir mis à disposition tous ces échantillons de choux; Julie qui m'a précédé dans cette grande aventure et qui a toujours été là pour me donner un coup de pouce, Adrienne qui m'a été d'une grande aide au cours de ces derniers mois. Je remercie le Dr Francis Raul (Institut de Recherche sur les Cancers de l'Appareil Digestif, Strasbourg) et toute son équipe du laboratoire de Prévention Nutritionnelle du Cancer de l'Hôpital Civil de Strasbourg, pour la réalisation des tests anticancéreux.

Je remercie également les membres de l'équipe de Chimie Analytique des Molécules Bioactives, pour leur regard, leurs commentaires scientifiques qu'ils ont portés à mes travaux pendant ces trois années et m'avoir permis de travailler dans une ambiance chaleureuse: Minji pour ses conseils si précieux, Christophe pour sa gentillesse et sa disponibilité, Martine pour sa joie de vivre et toutes les connaissances en statistique que tu m'as apporté. Merci Myriam pour tout ce travail que tu fais pour nous rendre la vie au laboratoire plus facile.

Une mention spéciale à mes co-thésards avec qui j'ai partagé des moments inoubliables et des fous rires parfois à n'en plus finir. Je remercie en particulier : Michel, pour ta gentillesse, ta générosité, ta joie de vivre et tes petits goûters, merci de m'avoir fait découvrir les bons plats brésiliens ; Omar, merci pour tes conseils scientifiques et ta sympathie, on se verra très bientôt au Sénégal, Erwan merci pour tes petites expressions françaises que j'ai toujours du mal à retenir☺, merci pour ton soutien moral surtout ces derniers mois ; et Céline, merci de m'avoir motivé à faire cette thèse et d'être ma copine magique. Je remercie également ceux qui sont plus fraîchement arrivés enrichir notre équipe: Etienne (Mc Gyver), merci pour les dépannages informatiques, Li, Remmelt, courage et bonne continuation à vous. Merci aux stagiaires, Citra, Mattieu, et surtout Tamime qui m'a été d'une grande aide. Merci à tous pour votre bonne humeur, sans vous la vie au laboratoire n'aurait pas été la même.

A mes âmes sœurs, Flora, Sika, Toua, merci pour votre soutien indéfectible. Pas la peine de disserter, vous savez ce que je ressens pour vous, vous êtes des amies, des vrais. Faisons que notre amitié résiste au temps qui passe et aux kilomètres qui nous séparent... Merci à toute la famille Tutuaku, Marina, Lindzy, Anne, Carole, Sarah, Léopoldine, Patricia, Dadou, Moïse, Esse et toutes les personnes du groupe de danse Ablackadabra avec qui j'espère pouvoir continuer à partager des moments très agréables, merci.

Mes dernières pensées et non les moindres reviendront à ma mère et mon père qui m'ont soutenu pendant toutes ces années et sans qui je n'aurais pas pu aller au bout de mes projets. Je vous dois mon goût pour le travail, j'ai vraiment de la chance d'avoir des parents aussi merveilleux. A mes frères et ma sœur, Clarck, Joseph et Fafa, vous constituez le socle solide qui m'a permis d'arriver là où je suis. Je n'ai pas de mots pour vous dire à quel point je vous remercie.

A vous tous merci !!

Liste des abréviations

APCI	: Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique
BDT	: 1,2-benzenedithiol
BD2T	: 1,3-benzenedithiol-2-thione
BHI	: Brain Heart Infusion
CPG	: Chromatographie en Phase Gazeuse
CLHP	: Chromatographie Liquide Haute Performance
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
ELL	: Extraction Liquide/Liquide
EI	: Impacte Electronique
ESI	: Ionisation par Electrospray
GSL	: Glucosinolate
HILIC	: Chromatographie à Interaction Hydrophile
ITC	: Isothiocyanate
AITC	: Allyl-ITC
MITC	: Methyl-ITC
ProITC	: Propyl-ITC
BITC	: Benzyl-ITC
HITC	: Heptyl-ITC
PITC	: Phényl-ITC
PEITC	: Phénylethyl-ITC
3mproITC	: 3-(Methylthio)propyl-
3mPITC	: 3-(Methylthio)phenyl-ITC
SFN	: Sulforaphane
LOD	: Limite de détection
LOQ	: Limite de quantification
MS	: Spectrométrie de masse
NIST	: National Institute of Standards and Technology
PLE	: Extraction par Liquide Pressurisé
SPE	: Extraction sur phase solide

Tables des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : CONTEXTE DE L'ETUDE.....	5
1. LA FAMILLE DES BRASSICACEES	6
1.1 CRUCIFERES ET ALIMENTATION	6
1.1.1 Classification botanique et répartition géographique.....	6
1.1.2 Consommation.....	7
1.2 LES CHOUX ET PRODUITS DERIVES	8
1.2.1 Les choux à choucroute	10
1.2.2 Du chou à la choucroute	10
1.2.2.1 Historique.....	10
1.2.2.2 Procédé de fabrication.....	11
1.2.2.2.1 Etapes préliminaires	11
1.2.2.2.2 La fermentation.....	12
1.2.3 Nutrition et santé.....	14
2. LES ISOTHIOCYANATES.....	16
2.1 FORMATION DES ISOTHIOCYANATES	16
2.1.1 Les glucosinolates.....	16
2.1.2 Hydrolyse enzymatique des glucosinolates	18
2.1.3 Structure des isothiocyanates.....	21
2.2 REACTIVITES CHIMIQUES	23
2.3 STABILITE PHYSICO-CHIMIQUE DES ISOTHIOCYANATES ET DE LEURS PRECURSEURS.....	24
2.4 ABSORPTION, DISTRIBUTION, METABOLISME ET EXCRETION.....	24
2.5 PROPRIETE BIOLOGIQUES DES ISOTHIOCYANATES.....	26
2.5.1 Prévention de cancer.....	26
2.5.1.1 Mécanisme de la cancérogénèse	26
2.5.1.2 Activité anticancéreuse des isothiocyanates.....	26
2.5.2 Autres effets bénéfiques.....	27
2.5.2.1 Propriétés antibactériennes.....	27
2.5.2.2 Propriétés antifongiques.....	28
2.5.2.3 Propriétés insecticides.....	28
3. METHODES D'ANALYSE DES ISOTHIOCYANATES	30
3.1 EXTRACTION ET PURIFICATION	30
3.1.1 Extraction en phase liquide.....	30
3.1.2 Extraction sur phase solide	30
3.2 ANALYSES CHROMATOGRAPHIQUES	31
3.2.1 Chromatographie liquide haute performance.....	31

3.2.1.1	Isothiocyanates totaux.....	31
3.2.1.2	Isothiocyanates individuels.....	31
3.2.2	Chromatographie en phase gazeuse.....	32
CHAPITRE 2 : ELABORATION DE METHODES D'ANALYSE DES ISOTHIOCYANATES.....		35
INTRODUCTION.....		36
PARTIE A : MISE AU POINT DE METHODES D'ANALYSE D'ESPECES MOLECULAIRES.....		39
1.	MATERIELS ET METHODES.....	40
1.1	REACTIFS ET SOLVANTS.....	40
1.1.1	Réactifs.....	40
1.1.2	Solvants.....	40
1.1.3	Solutions stocks.....	40
1.2	CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.....	41
1.2.1	Séparations chromatographiques.....	41
1.2.2	Analyse quantitative.....	41
1.3	CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE.....	42
1.3.1	Mise en évidence de la précipitation d'ITCs en présence de phase mobile fortement aqueuse.....	42
1.3.1.1	Séparation chromatographique et collecte de fractions.....	42
1.3.1.2	Protocole de dosage par cyclocondensation.....	43
1.3.2	Test de différentes colonnes chromatographiques.....	44
1.3.3	CLHP en phase inverse avec dérivation pré-colonne au Mercaptoethanol.....	46
1.3.3.1	Conditions de dérivation.....	46
1.3.3.2	Séparation chromatographique.....	46
1.3.3.3	Analyse quantitative.....	47
1.3.4	CLHP en phase inverse avec chauffage de colonne.....	47
1.3.4.1	Séparation chromatographique.....	48
1.3.4.2	Analyse quantitative.....	48
2.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	49
2.1	ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.....	49
2.1.1	Profils chromatographiques des étalons.....	49
2.1.2	Analyse quantitative.....	50
2.2	ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE.....	51
2.2.1	Mise en évidence de la précipitation d'ITCs en présence de phase mobile fortement aqueuse.....	51
2.2.2	Test de différentes colonnes chromatographiques.....	53
2.2.3	CLHP en phase inverse avec dérivation pré-colonne au mercaptoethanol.....	54
2.2.4	CLHP en phase inverse avec chauffage de colonne.....	58
PARTIE B : MISE AU POINT DE METHODES D'EXTRACTION.....		61
1.	MATERIELS ET METHODES.....	62
1.1	REACTIFS ET SOLUTIONS STOCKS.....	62

1.1.1	Réactifs	62
1.1.2	Solvants et solutions stocks	62
1.2	PREPARATION DE L'ECHANTILLON	62
1.3	EXTRACTION ET ANALYSE DES ISOTHIOCYANATES	63
1.3.1	Extraction liquide/liquide	63
1.3.1.1	Protocole d'extraction	63
1.3.1.2	Analyses	64
1.3.2	Extraction sur phase solide	65
1.3.2.1	Etapes préliminaires: choix des cartouches d'extraction	65
1.3.2.2	Application au chou	67
1.3.2.3	Analyse quantitative	67
1.3.3	Extraction par solvant pressurisé	68
1.3.3.1	Protocole d'extraction	68
1.3.3.2	Analyse quantitative	69
2.	RESULTATS ET DISCUSSION	70
2.1	EXTRACTION LIQUIDE/LIQUIDE	70
2.1.1	Courbes d'épuisement	70
2.1.2	Application au chou	71
2.1.2.1	Analyse qualitative	71
2.1.2.2	Analyse quantitative	73
2.2	EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE	74
2.2.1	Choix de la cartouche d'extraction	74
2.2.2	Application au chou	78
2.3	EXTRACTION PAR SOLVANT PRESSURISE	81
	CONCLUSION	83
	PUBLICATION 1	85
	CHAPITRE 3 : COMPOSITION EN ISOTHIOCYANATES DE BRASSICACEES	93
	INTRODUCTION	94
1.	MATERIELS ET METHODES	96
1.1	ANALYSES CHROMATOGRAPHIQUES	96
1.1.1	Réactifs	96
1.1.2	Solvants	96
1.1.3	Matrices alimentaires	96
1.1.4	Préparation des échantillons	98
1.1.5	Dosage des Isothiocyanates totaux	98
1.1.5.1	Protocole de dosage	98
1.1.5.2	Chromatographie liquide haute performance	98
1.1.6	Détermination des isothiocyanates	99
1.1.6.1	Extraction liquide/liquide	99

1.1.6.2	Chromatographie liquide haute performance	100
1.1.6.3	Chromatographie en phase gazeuse	100
1.2	ÉTUDE D'ACTIVITES BIOLOGIQUES DES ISOTHIOCYANATES	101
1.2.1	Inhibition de croissance de cellules bactériennes.....	101
1.2.2	Inhibition de croissance de cellules cancéreuses	102
2.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	104
2.1	COMPOSITION EN ISOTHIOCYANATES DES MATRICES ALIMENTAIRES	104
2.1.1	Dosage des isothiocyanates totaux.....	104
2.1.1.1	Conditions de dosage	104
2.1.1.2	Teneurs en isothiocyanates totaux des matrices alimentaires.....	105
2.1.2	Détermination des composés majeurs.....	108
2.1.2.1	Analyse qualitative.....	108
2.1.2.2	Analyse quantitative.....	110
2.1.3	Comparaison du dosage d'ITCs totaux et de la détermination des ITCs individuels	112
2.2	ÉTUDE D'ACTIVITES BIOLOGIQUES DES ISOTHIOCYANATES	114
2.2.1	Inhibition de la croissance de cellules bactériennes.....	114
2.2.2	Inhibition de la croissance de cellules cancéreuses.....	125
	CONCLUSION.....	127
	CONCLUSION GENERALE.....	129
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	134

Liste des Figures

Figure 1. Répartition géographique de différents genres de Brassicacées (2).....	6
Figure 2 : Chou Bacalan de Rennes (12)	9
Figure 3 : Chou cœur de bœuf (13).....	9
Figure 4 : Chou de Milan de Pontoise (14)	9
Figure 5 : Chou quintal d'Alsace (15).....	9
Figure 6 : Processus de fabrication de la choucroute (18).....	12
Figure 7 : Structure générale des glucosinolates	16
Figure 8 : Structure de la myrosinase. En vert l'atome de zinc et en rouge et jaune l'acide glutamique dans chacun des 2 sites catalytiques (49).....	19
Figure 9 : Des GSLs aux ITCs, les différentes conditions favorisant la formation de certains produits de dégradation par rapport à d'autres (38).....	20
Figure 10 : Réarrangement de type Lossen.....	21
Figure 11 : Réaction des ITCs avec le 1,2-benzenedithiol (A) et le mercaptoethanol (B)	23
Figure 12 : Schéma récapitulatif de l'adsorption, du métabolisme et de l'excrétion des GSLs et des ITCs après ingestion de crucifères	24
Figure 13 : Métabolisme des isothiocyanates dans l'organisme humain (73).....	25
Figure 14 : Profils chromatographiques de 8 étalons obtenus sur 2 colonnes différentes. (A) CP-Sil 24CB-MS avec une détection par FID, (B) VF-5MS avec une détection par spectrométrie de masse.....	50
Figure 15 : Profil chromatographique des 8 ITCs étalons (1000 µg/mL) après analyse par CLHP en phase inverse. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne Hypersil C18 avec une phase mobile à base d'eau et d'acétonitrile et un débit de 0,8 mL/min. Les ITCs sont détectés à 245 nm.	52
Figure 16 : Chromatogrammes d'un mélange de 5 ITCs (50 µg/mL chacun) obtenus après séparation sur une colonne de silice (Nucleosil 100 silica) avec comme phase mobile de l'hexane (A), de l'isooctane (B), de l'heptane (C) et du cyclohexane (D); la lettre S assignée correspond au pic de solvant.	54
Figure 17 : Profil chromatographique obtenu pour une solution contenant 8 ITCs à une concentration de 50 µg/mL pour chacun et suivant la méthode décrite au paragraphe 1.3.3 (dérivation au mercaptoethanol). Les ITC-mce sont détectés à 271 nm.....	55
Figure 18 : Spectres de masse des ITCs dérivés obtenus après analyse par CLHP/SM avec une source APCI en mode positif pour le PITC et en mode négatif pour le SFN, le MITC, l'AITC, le proITC, le BITC, le PEITC et le HITC.....	57

Figure 19 : Profil chromatographique obtenu avec une solution de 8 ITCs (50 µg/mL chacun) et après analyse par CLHP en phase inverse sur Xbridge C18 chauffée à 60°C. La séparation est réalisée avec un gradient à base d'eau et d'acétonitrile et une détection à 245 nm.	58
Figure 20 : Protocoles d'extraction liquide/liquide des isothiocyanates à partir de chou blanc	64
Figure 21 : Extracteur par Solvant pressurisé, ASE 350	68
Figure 22 : Rendements d'extraction de 8 ITCs (SFN, MITC, AITC, proITC, BITC, PITC, HITC, PEITC) après chaque extraction successive au dichlorométhane.	70
Figure 23 : Chromatogrammes d'extrait de chou blanc au dichlorométhane analysé par CLHP en phase inverse avec : (A) la méthode de dérivation pré-colonne au mercaptoethanol. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne Nucleosil C18 avec un gradient de phase mobile à base d'acétonitrile et d'eau. Les ITCs dérivés sont détectés à 271 nm ; (B) la méthode de chauffage de colonne. Les ITCs sont analysés sur une colonne C18 Xbridge. La colonne est chauffée à 60°C. La phase mobile est à base d'eau et d'acétonitrile. Les ITCs sont détectés à 245 nm.....	72
Figure 24 : Chromatogrammes d'ITCs extraits du chou blanc analysés par CPG sur 2 colonnes (A) CP-Sil 24CB-MS avec une détection par FID, (B) VF-5MS avec une détection par spectrométrie de Masse.....	72
Figure 25 : Formation de précipité au cours de l'ELL du chou blanc.....	73
Figure 26 : Représentation graphique des rendements d'extraction d'ITCs sur les 6 cartouches SPE les plus efficaces après application du protocole A. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± écart-type. Pour chaque cartouche, les rendements d'extractions des ITCs donnés avec des lettres différentes (de a à l) sont significativement différents (P<0,05). Par contre, les rendements donnés avec un (*) ne sont pas significativement différents (P>0,05).	77
Figure 27 : Représentation graphique des rendements d'extraction d'ITCs de chaque fraction d'élution sur la cartouche Oasis HLB avec le protocole A (A) et le protocole B (B).	78
Figure 28 : Profil chromatographique d'un extrait de chou blanc analysé par CPG-FID après SPE sur une cartouche Oasis HLB.	79
Figure 29 : Taux de recouvrement des ITCs dans le milieu réactionnel centrifugé et dans chaque eau de lavage du culot. S : sans lavage du culot, L1 à L5 : 1 ^{er} au 5 ^{ème} lavage, EC : Extraction au dichlorométhane du culot.....	80
Figure 30 : Racine de Raifort.....	97
Figure 31 : Formule semi-développée d'un dithiocarbamate. R ₁ et R ₂ peuvent être des chaînes alkyles ou des groupements aryles. R' peut être un groupement alkyle.....	105
Figure 32 : Teneurs en ITCs totaux du chou fermenté (µmol/100 g de MF) des échantillons prélevés entre 1 et 13 semaines de fermentation	108
Figure 33 : Profils chromatographiques de 11 ITCs (A) et d'extrait de chou blanc (B) analysés par CLHP en phase inverse sur Xbridge C18 chauffée à 60°C. La séparation chromatographique est réalisée avec un gradient à base d'acétonitrile et d'eau et une détection à 245 nm.....	109

Figure 34 : Profils chromatographiques d'extrait de raifort (A) et de chou-fleur (B) analysés par CLHP en phase inverse sur Xbridge C18 chauffée à 60°C. La séparation chromatographique est réalisée avec un gradient à base d'acétonitrile et d'eau et une détection à 245 nm.	110
Figure 35 : Profils chromatographiques d'extraits de chou ramkila avec (B) et sans cyclocondensation (A) analysés par CLHP en phase inverse avec la méthode de chauffage de colonne. La séparation chromatographique est réalisée avec un gradient à base d'acétonitrile et d'eau. La détection est effectuée à 245 nm.....	112
Figure 36 : Chromatogramme d'extrait de chou blanc (A) accompagné des chromatogrammes de masse sur le courant ionique des ions m/z 113, 163 et 206 caractéristiques des 3 composés proposés.....	113
Figure 37 : Graphiques représentatifs de l'effet antibactérien d'un ITC, ici le PEITC sur la souche <i>Salmonella enteritidis</i> . Les flèches horizontales (A) et verticales (B) indiquent respectivement, les retards de croissance (Lag) ainsi que les populations finales (maxPoP) des témoins et des échantillons avec différentes concentrations de PEITC. BHI : témoin sans éthanol, BHI (5% éthanol) : témoin avec 5% d'éthanol.....	115
Figure 38 : Graphiques représentatifs de l'inhibition complète de croissance bactérienne (A) avec l'exemple de la bactérie <i>S. xylosus</i> vis-à-vis de l'AITC et de la résistance d'une souche bactérienne (B) avec l'exemple de la bactérie <i>E. faecalis</i> vis-à-vis du MITC.....	118
Figure 39 : Répartition des indices d'efficacité antibactérienne en fonction des différentes souches bactériennes et des différents ITCs. 1 : <i>S. enteritidis</i> , 2 : <i>B. subtilis</i> , 3 : <i>E. faecalis</i> , 4 : <i>L. plantarum</i> , 5 : <i>S. xylosus</i> , 6 : <i>E. coli</i> , 7 : <i>S. aureus</i> , 8 : <i>S. marcescens</i> , 9 : <i>S. typhimurium</i> , 10 : <i>L. monocytogenes 1/2a</i> , 11 : <i>P. aeruginosa</i> , 12 : <i>E. faecium</i> , 13 : <i>B. cereus</i> , 14 : <i>K. pneumonia</i>	120
Figure 40 : Graphique représentatif de l'effet antibactérien d'extrait de raifort et de chou blanc de la variété Mégaton sur la souche <i>S. typhimurium</i> . BHI (5% Ethanol) : témoin avec 5% d'éthanol.....	123
Figure 41 : Effet du SFN (A) et de l'ibérine (B) sur la croissance de cellules SW620	126

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux légumes crucifères consommés.....	7
Tableau 2 : Tableau des différentes classes des GSLs en fonction de la nature du radical R (36,40)	17
Tableau 3 : Structures générales de quelques ITCs.....	22
Tableau 4 : Techniques d'analyses les plus couramment utilisées pour l'analyse des ITCs	33
Tableau 5 : Gradient de composition de la phase mobile pour la séparation des ITCs	43
Tableau 6 : Gradient de composition de la phase mobile pour l'élution du BD2T	44
Tableau 7 : Tableau récapitulatif des colonnes testées en CLHP	45
Tableau 8 : Gradient de concentration pour la séparation des ITCs-mce	46
Tableau 9 : Gradient de composition de la phase mobile pour la séparation des ITCs	48
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des facteurs de réponse des ITCs par rapport au HITC et des concentrations obtenues pour les solutions témoins.....	51
Tableau 11 : Pourcentages de perte en ITCs obtenus pour 2 solutions témoins d'ITCs de concentrations différentes.	52
Tableau 12 : Tableau récapitulatif des masses molaires, des coefficients de corrélation obtenus pour les droites d'étalonnage, des limites de détection et de quantification des ITCs dérivés.	56
Tableau 13 : Pourcentages de perte en ITCs obtenus pour 2 solutions témoins d'ITCs de concentrations différentes avec une colonne chauffée à 60°C	59
Tableau 14 : Tableau récapitulatif des coefficients de corrélation obtenus pour les droites d'étalonnage, des limites de détection de quantification des ITCs testés	59
Tableau 15 : Tableau récapitulatif des cartouches d'extraction testées.....	66
Tableau 16 : Taux de recouvrement moyens des ITCs dans le chou blanc en fonction du protocole d'ELL utilisé	73
Tableau 17 : Tableau récapitulatif des rendements d'extraction des ITCs obtenus avec les 12 cartouches d'extraction et avec le protocole A	75
Tableau 18 : Taux de recouvrement moyen des ITCs dans le chou blanc avec SPE.....	80
Tableau 19 : Rendements d'extraction des ITCs par PLE	81
Tableau 20 : Tableau récapitulatif des échantillons de chou et choucroute analysés	97
Tableau 21 : Gradient de composition de la phase mobile pour l'élution du BD2T	99
Tableau 22 : Gradient de composition de la phase mobile pour la séparation des ITCs	100

Tableau 23 : Tableau récapitulatif des souches bactériennes utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des ITCs	101
Tableau 24 : Teneur en ITCs totaux des matrices alimentaires mises à disposition.....	106
Tableau 25 : Teneurs des ITCs identifiés dans les différentes variétés de chou.....	110
Tableau 26 : Teneurs des ITCs identifiés dans les extraits de chou-fleur et de raifort.....	111
Tableau 27 : Concentrations finales des 10 ITCs dans le milieu de croissance des souches bactériennes	114
Tableau 28 : Activité antibactérienne de 10 ITCs sur 14 souches de bactéries.....	117
Tableau 29 : Tableau récapitulatif des concentrations minimales inhibitrices des 10 ITCs.....	121
Tableau 30 : Tableau récapitulatif des indices d'efficacité antibactérienne d'extraits de chou et de raifort	124

Introduction générale

Depuis quelques décennies, les recherches concernant l'impact du régime alimentaire sur la santé de l'homme se sont multipliées. Si ces études concernent les facteurs nutritionnels engendrant l'apparition et le développement de maladies chroniques (hypertension, diabète, obésité, cancer.....), elles s'intéressent également et de plus en plus aux nutriments pouvant, au contraire, avoir un rôle de prévention pour ces mêmes maladies. C'est ainsi que les experts de l'OMS et de la FAO, dans leurs études conjointes (1), ont fait état des progrès rapides accomplis ces dernières années dans plusieurs domaines scientifiques pertinents, en particulier dans la quantité de données épidémiologiques recueillies, qui ont aidé à clarifier le rôle du régime alimentaire dans la lutte contre un certain nombre de maladies chroniques. Parmi les diverses sources alimentaires, il est une catégorie à laquelle les nutritionnistes et autres acteurs de la santé s'intéressent tout particulièrement, c'est celle des fruits et légumes (à titre d'exemple, en France les recommandations émanant du Programme National Nutrition Santé « manger au moins cinq fruits et légumes par jour » sont connues de tous). En effet, les fruits et légumes contribuent à la santé grâce à la variété de phytonutriments (antioxydants, polyphénols, flavonoïdes...), de minéraux (potassium.....), de vitamines (vitamines E, A, B, C...), de fibres...qu'ils contiennent et leur apport quotidien, en quantité suffisante, est recommandé pour réduire le risque de cardiopathie coronarienne, d'accidents cérébrovasculaires, de tension artérielle élevée, de diabète et de cancers. En ce qui concerne ces dernières maladies certains experts pensent par exemple que dans les pays en développement, 60% des cancers de la cavité buccale, du pharynx ou de l'œsophage résultent de carences en micronutriments liées à une alimentation insuffisante dans laquelle il n'entre guère de légumes ou de fruits. Il semble également qu'une forte consommation de fruits et de légumes diminue le risque de développer des cancers de l'estomac et du côlon.

Parmi les végétaux contenant des phytonutriments, les représentants de la famille des Brassicacées (crucifères) ont été particulièrement étudiés. Des expérimentations animales et humaines ont montré qu'il existait une corrélation inverse entre la consommation des crucifères telles que le brocoli, le chou, le chou-fleur et le risque de développer des maladies cardio-vasculaires ou des cancers. Ces vertus de chimio-protection sont souvent attribuées à des composés appelés isothiocyanates (ITCs) présents dans ces plantes. Ces substances sont dotées de plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques expliquant leurs bienfaits sur la santé de l'homme. En effet, des travaux de recherche ont démontré que les ITCs inhibaient la prolifération des cellules cancéreuses par induction de l'apoptose. De cette façon, ils empêchent la formation de tumeurs mammaires, du côlon, de l'œsophage, du rectum, ou encore de la vessie. Ces observations ont conduit un certain nombre de nutritionnistes et d'industriels à envisager l'utilisation des ITCs dans des compléments alimentaires ou en supplémentation d'aliments.

Outre l'intérêt des ITCs dans la prévention des maladies chroniques, il a été démontré que certains de ces composés possédaient des propriétés antimicrobiennes pouvant être exploitées dans le domaine de l'industrie agroalimentaire en tant que conservateurs d'origine naturelle. Des études ont

également démontré que les ITCs avaient des effets protecteurs contre les insectes. Cependant, les données concernant les propriétés biologiques des ITCs, ainsi que les mécanismes moléculaires auxquels ils participent restent encore souvent inexpliqués.

Dans ce contexte, et dans le cadre de l'UMT 06.3 (Unité Mixte Technologique) « Méthodes Analytiques et Nutrimateurs », l'Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bioactives et Aériales (un institut technique agro-industriel) ont collaboré afin de mettre au point des méthodes analytiques fiables et validées pour la recherche d'ITCs dans les Brassicacées produites dans la Région Alsace. Un intérêt particulier est accordé au chou blanc et à son produit dérivé, la choucroute. Ces aliments ont été choisis d'une part, en raison des bienfaits qu'ils sont supposés apporter sur le plan de la santé et d'autre part en raison de leur place importante sur les plans gastronomique et économique dans la Région Alsace. La choucroute est un aliment dont le profil en ITCs, encore mal connu, est très probablement fortement dépendant du processus de fermentation. En effet, la choucroute est obtenue par fermentation lactique de lanières de chou, en présence de sel. Durant quatre à cinq semaines, le chou est soumis aux effets des microorganismes produisant des changements biochimiques favorables au développement des saveurs et des arômes, mais dont les effets sur les ITCs n'ont à ce jour pas été étudiés.

Les protocoles de dosage de phytonutriments dans des matrices alimentaires nécessitent plusieurs étapes successives notamment d'extraction et d'analyse qualitative impliquant souvent plusieurs techniques de caractérisation structurale des composés recherchés. Les méthodes disponibles doivent être continuellement améliorées et systématiquement adaptées à la nature des substances d'intérêt recherchées et à celle de la matrice étudiée. Le travail mené dans le cadre de cette thèse porte sur le développement de méthodes d'analyses performantes permettant d'extraire, d'isoler et de déterminer la nature des différents ITCs du chou et de la choucroute. De telles déterminations sont par ailleurs indispensables afin de mieux caractériser l'activité biologique des ITCs alimentaires.

Ce travail est présenté en trois grandes parties. Après la description du contexte de l'étude, la deuxième partie consiste en la mise au point d'une méthode chromatographique d'analyse d'espèces moléculaires couvrant une large gamme de polarité de substances et de méthodes d'extraction et de purification des ITCs à partir de chou. Enfin une dernière partie est consacrée, d'une part à la détermination (identification et quantification) d'espèces moléculaires présentes dans des légumes produits en Alsace (raifort, chou-fleur, et différentes variétés de choux), ainsi que dans la choucroute et d'autre part à la réalisation de tests d'activité antibactérienne et d'activité anticancéreuse dans le but de sélectionner les espèces moléculaires les plus efficaces qui pourraient faire l'objet d'une valorisation industrielle.

Chapitre 1 : Contexte de l'étude

1. La famille des Brassicacées

1.1 Crucifères et alimentation

1.1.1 Classification botanique et répartition géographique

Les Brassicacées, anciennement nommées crucifères, sont une importante famille de plantes dicotylédones et essentiellement herbacées. Dès le XVI^e siècle, la similitude entre ces plantes avait frappé les botanistes, qui regroupaient déjà tous ces végétaux dans un même ensemble naturel (2,3). Le nombre et la disposition des sépales (4) et des pétales (4) sont tellement constants et remarquables que l'on a donné le nom de crucifères – ou porte-croix – à la famille. Celle-ci présente une grande homogénéité dans le type de fleur et le modèle de fruit. Ce dernier comporte deux loges séparées par une cloison médiane qui porte les graines: c'est une silique. La famille des Brassicacées comprend 4000 espèces avec plus de 350 genres dont 78 en France (3,4). Ce sont des plantes représentées dans le monde entier, mais principalement dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord (**Figure 1**).

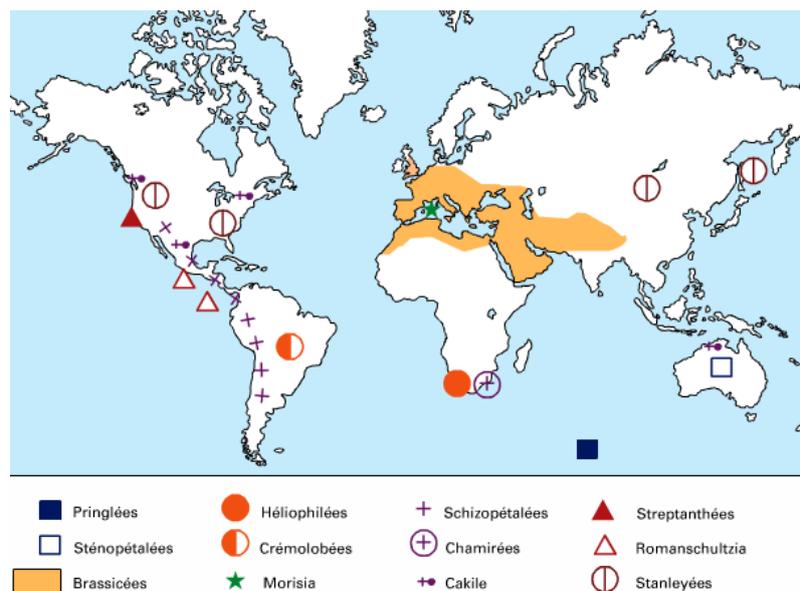


Figure 1. Répartition géographique de différents genres de Brassicacées (2)

Toutes ces plantes sont facilement cultivables quelque soit les différentes conditions climatiques. Selon la variété, les températures de culture sont comprises entre 4°C et 30°C. En raison de leur capacité d'adaptation au froid, les cultures de Brassicacées sont produites dans des régions tempérées pendant les saisons froides ou à altitudes élevées dans les régions tropicales et subtropicales (5).

Ainsi, les crucifères peuplent la majorité des biotopes terrestres possibles: sables et rochers maritimes, bords de ruisseaux, talus calcaires, pelouses humides ou sèches, bords de chemins, cailloutis et prairies de montagne etc... Ces plantes peuvent être cultivées dans les jardins et les champs comme plantes ornementales (monnaie-du-pape) ou alimentaires (chou, brocoli etc...).

1.1.2 Consommation

Les Brassicacées peuvent être consommées sous forme de racines (radis, navets, rutabaga), sous forme de feuilles et de fleurs (chou, chou-fleur, chou de bruxelles, brocoli, cresson de fontaine, roquette, etc), de produits de transformation comme les condiments (moutarde, raifort) ou l'huile (graine de colza). Cependant, malgré la grande diversité de ces plantes, très peu sont destinées à la consommation. Parmi ces dernières, les légumes du genre *Brassica* sont les plus représentés et essentiellement l'espèce *Brassica oleracea* (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Principaux légumes crucifères consommés

Genre	Espèces et variétés	Nom commun
<i>Brassica</i>	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Chou-fleur
	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Chou Blanc
	<i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	Chou de bruxelles
	<i>B. oleracea</i> var. <i>gongyloides</i>	Chou rave
	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	Brocoli
	<i>B. oleracea</i> var. <i>rubra</i>	Chou rouge
	<i>B. oleracea</i> var. <i>sabauda</i>	Chou de milan
	<i>B. oleracea</i> var. <i>sabellica</i>	Chou frisé
<i>Brassica</i>	<i>B. rapa</i> var. <i>chinensis</i>	Chou chinois
	<i>B. rapa</i> var. <i>oleifera</i>	Navette
	<i>B. rapa</i> var. <i>rapa</i>	Navet
<i>Brassica</i>	<i>B. napus</i> var. <i>oleifera</i>	Graine de colza
	<i>B. alba</i>	Graine de moutarde blanche
	<i>B. nigra</i>	Graine de moutarde noire
<i>Raphanus</i>	<i>R. sativus</i>	Radis
<i>Armoracia</i>	<i>A. rusticana</i>	Raifort
<i>Nasturtium</i>	<i>N. officinalis</i>	Cresson de fontaine
<i>Eruca</i>	<i>E. vesicaria</i>	Roquette
<i>Wasabia</i>	<i>W. japonica</i>	Wasabi

Le nom latin *Brassica* serait dérivé d'un mot celte, *bresic*, qui veut dire « chou », alors que *oleracea* veut dire potager. Le terme « chou », vient du latin *caulis*. Les types de choux que l'on consomme habituellement en Occident viennent tous d'un ancêtre sauvage unique, *B. oleracea* var. *oleracea*, dont certains font remonter la domestication à 2000 ans dans les pays de l'est du bassin méditerranéen ou en Anatolie, au sud de la mer Noire. D'autres pensent qu'il y aurait eu un ancêtre beaucoup plus ancien qui était déjà cultivé il y a 8000 ans sur les côtes du nord de l'Europe. Cet ancêtre sauvage, aujourd'hui disparu, aurait été introduit dans les pays du bassin méditerranéen, en

Europe de l'Est, et même au Proche-Orient et en Orient. Au fil des siècles, *B. oleracea* a donné naissance à des sous-espèces présentant des caractéristiques diverses selon qu'on ait voulu développer les fleurs (brocoli, chou-fleur), les feuilles formant la pomme (chou de Milan ou chou de Savoie, chou blanc, chou rouge, choux de Bruxelles), ou la tige (chou-rave). Chacune de ces variétés créées a donné lieu à l'apparition de spécialités culinaires locales.

Ces légumes peuvent être consommés crus ou cuits et se retrouvent très fréquemment dans l'alimentation des européens. La production de plantes de la famille des Brassicacées en Europe est estimée à environ 70 millions de tonnes/an avec une consommation moyenne par personne d'environ 3-5 kg par an (6). Les habitants des pays du nord tels que la Norvège, la Grande Bretagne et l'Allemagne en consomment (≈ 30 g par jour) plus que ceux du sud comme la Grèce et l'Espagne (≈ 13 g par jour) (7,8). En ce qui concerne la France, elle se trouve en position intermédiaire avec 23,5 g de crucifères consommés par jour. Les français consomment différents genres de crucifères tels que le radis (20% sur l'ensemble des crucifères consommés), le navet (12%), le brocoli (15%), mais ce sont les choux qui sont les plus appréciés (25%). Plusieurs espèces sont produites sur le territoire et certaines régions se sont spécialisées dans la culture de légumes particuliers. Par exemple, les choux-fleurs et les choux de Bruxelles sont principalement produits en Bretagne (80,6% de la production nationale) et au Nord-Pas-de-Calais (85,6%), respectivement (9). Quant à l'Alsace, c'est la région où la culture de chou à choucroute est la plus répandue (69,8%) (9,10). Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement à ce type de chou.

1.2 Les choux et produits dérivés

Il existe différentes catégories de choux, classées en fonction de la forme de la pomme, la partie centrale comestible du chou (11). On retrouve des choux ayant des pommes coniques (**Figure 2**), rondes (**Figure 3**), rondes arrondies et aplaties (**Figure 4**) ou aplaties (**Figure 5**). La pomme est séparée par des entre-nœuds courts, donnant à la plante un port bas. De ce fait, le rendement utile de la plante (partie commercialisable et consommable) est très élevé (60 à 70%). Seules les racines, une partie de la tige et quelques feuilles externes (moins pommées et souillées) ne sont pas consommées. Les choux sont pour l'essentiel commercialisés à l'état frais et entier, pour être consommés crus ou après cuisson. Une partie de la production (20 à 25%) est destinée à des transformations industrielles, la plus courante est la production de choucroute.



Figure 2 : Chou Bacalan de Rennes (12)



Figure 4 : Chou de Milan de Pontoise (14)



Figure 3 : Chou cœur de bœuf (13)



Figure 5 : Chou quintal d'Alsace (15)

1.2.1 Les choux à choucroute

La choucroute est produite avec des choux pommés aplatis. Plusieurs variétés peuvent être utilisées telles que (16) :

Le **chou de Brunswick** qui possède des feuilles et une pomme d'un beau vert foncé. La pomme est très vigoureuse et aplatie sur le dessus. La pomme paraît comme posée à même le sol tant le pied est court. Ce chou donne un bon rendement et est adapté aux grandes cultures. Cette variété se récolte vers la fin de l'été.

Le **chou de Schweinfürt**, plus volumineux et plus hâtif (précoce) que le précédent, est très productif et la pomme est bien large. La couleur est plutôt vert pâle à blond, on peut observer des nervures blanches ou plus fréquemment d'une teinte rouge-violacée ou brunâtre. Il s'agit d'un chou à développement rapide, mais dont la pomme est lâche et d'un poids faible.

Le **chou quintal d'Alsace** ou de Strasbourg, c'est une variété ancienne très rustique à très grosse pomme (diamètre d'environ 50 cm). Son poids peut dépasser les 8 kg. Il s'agit d'un chou plus tardif que le précédent, mais très productif et adapté aux grandes cultures.

D'autres variétés peuvent être utilisées telles que le **chou Amager** (variété rustique et ancienne) qui se récolte en automne, le chou **Vaugirard d'hiver** (variété tardive à pomme légèrement rouge) qui se récolte en hiver et résiste bien au froid, et enfin le **chou Kilderkraut** qui se récolte l'hiver avec une pomme légèrement plus petite que les variétés citées précédemment.

Les 3 premières variétés présentées sont principalement utilisées en Alsace pour la fabrication de la choucroute. Semées au mois d'avril et mises en place début juin, les 3 variétés se succéderont à la récolte avec 15 jours d'intervalle. Plus exactement, fin août pour le chou de Schweinfürt, septembre pour la variété Brunswick et octobre-novembre pour le quintal d'Alsace.

1.2.2 Du chou à la choucroute

1.2.2.1 Historique

Le mot « choucroute » dérive de l'allemand « sauerkraüt » qui signifie « chou acide ». L'histoire a voulu que ce soit l'Alsace qui donne son nom à la choucroute. En effet, une dérive a aboutit au mot « Sürkrüt » qui signifie littéralement herbe aigre (« sür » pour aigre et « Krüt » pour herbe) (16).

Il semblerait que la choucroute ait des origines chinoises et qu'elle fût la nourriture de base des constructeurs de la « Muraille de Chine ». En effet, la légende raconte qu'au III^{ème} siècle av. J.C., les Chinois ont découvert le chou fermenté d'une manière fortuite. Lors d'un hiver glacial, les ouvriers ont dû se mettre à l'abri dans la plaine et laissèrent le chantier et la nourriture sous la neige. A leur retour, ils dégustèrent les choux au goût aigre car, à l'abri de l'air sous la neige, ils avaient fermenté. Par la suite, ce seraient les grands voyageurs, comme Marco Polo, qui nous auraient apporté la choucroute.

Quant aux allemands, ils l'ont découverte à l'occasion des invasions Mongoles et Tartares. Et au XVI^{ème} siècle, ils ont mis au point le procédé de fermentation en présence de sel, ce qui a permis d'étendre cet aliment aux contrées voisines comme l'Alsace. C'est cette dernière qui en fit sa réputation et son épanouissement puisque la choucroute devint un plat régional traditionnel. Ce qui a fait de l'Alsace, la 1^{ère} région française productrice de chou à choucroute. Approximativement à la fin du siècle dernier, du fait du développement des transports entre autre, la choucroute s'est répandue en France et est passée de « Paysanne » à « Bourgeoise » par son opulence, sa gastronomie mais également par sa présence sur les tables de fête.

1.2.2.2 Procédé de fabrication.

1.2.2.2.1 Etapes préliminaires

La choucroute est obtenue principalement par fermentation lactique de lanières de choux en présence de sel (**Figure 6**) (17,18). Le processus débute par la récolte des choux et une série d'opérations précède la fermentation :

L'**approvisionnement** en chou : trémie, tapis roulant ou élévateur.

L'**étrognage** : les choux arrivent sur un tapis à alvéoles présentant le trognon sur la face supérieure, et les étrogneuses (vrille en rotation) s'abaissent et extraient la partie fibreuse et cellulosique.

L'**effeuillage** : les choux tombent sur des jeux de rouleaux effeuilleurs qui enlèvent les feuilles n'adhérant pas à la pomme.

Le **parage** : c'est l'étape de contrôles (matière sèche, teneur en sucre, concentration en nitrates,...) et de finitions.

La **coupe** : les choux entraînés par des lobes de retenue tournants, sont émincés en fines et longues lanières d'une épaisseur moyenne de 0,75 mm par des couteaux inox multilames.

Le **salage** : cette étape correspond à la répartition homogène du sel avec une concentration allant de 1,5% à 2,5% en poids. Certains choucroutiers utilisent le sel marin. Le sel a pour but de provoquer un déséquilibre osmotique conduisant à la perte d'eau et d'éléments nutritifs des feuilles qui sont nécessaires aux microorganismes de la fermentation.

L'**encuvage** : les lanières sont aiguillées vers une cuve de stockage et de fermentation jusqu'à la remplir complètement. Le tassement accélère l'exsudation du suc du parenchyme végétal et l'élimination de l'air occlus, permettant ainsi d'obtenir plus rapidement l'anaérobiose nécessaire à la fermentation. La cuve est couverte avec une bâche à eau surmontée d'un bloc de béton de 20 cm d'épaisseur. La bâche empêche la pénétration de l'oxygène atmosphérique qui pourrait nuire à la prolifération de la flore anaérobie lactique et le bloc de béton permet d'appliquer une pression qui favorise la fermentation. Les cuves ont des capacités variables (7 à 100 tonnes) et sont faites habituellement aujourd'hui en fibre de verre (matériel pouvant facilement être aseptisé).

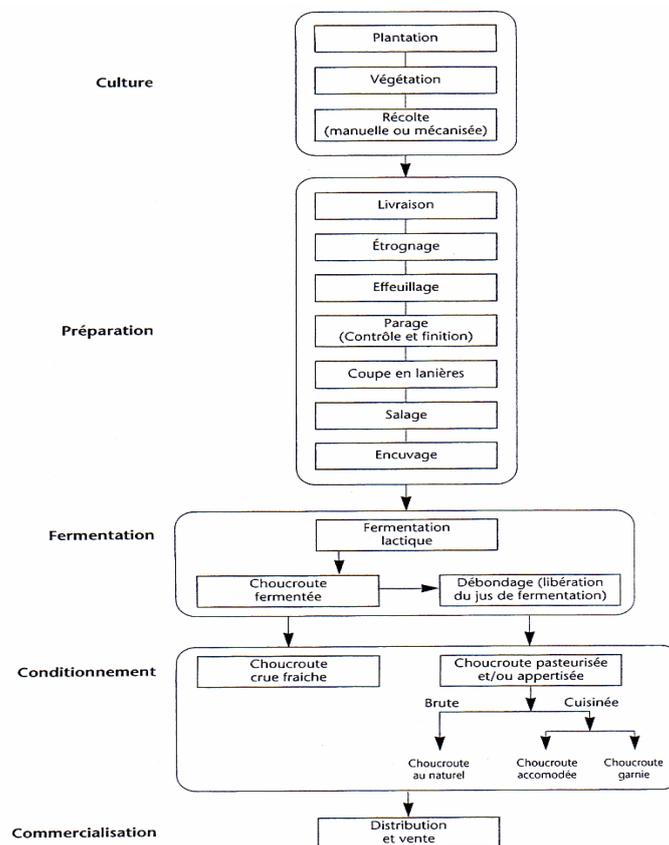


Figure 6 : Processus de fabrication de la choucroute (18)

1.2.2.2.2 La fermentation

C'est en 1930, que Pederson identifie les microorganismes responsables de la fermentation de la choucroute. On retrouve 3 espèces principales qui sont successivement présentes dans le milieu

durant le processus de fermentation : *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, et *Lactobacillus brevis* (19,20). Cette flore est naturellement présente à la surface des feuilles internes du chou à une concentration de l'ordre de 4 000 bactéries/g.

La fermentation débute à 18°C avec une succession d'étapes dès la coupe et le remplissage des cuves (19). La flore aérobie (les coliformes et *Pseudomonas*) utilise l'ensemble de l'oxygène présent dans la cuve. Au bout de 2 jours, cette flore disparaît et simultanément, *Leuconostoc mesenteroides*, bactérie hétérofermentaire convertit les différents sucres contenus dans les cellules végétales (glucose, fructose, saccharose) en différents métabolites (acide lactique, acide acétique, mannitol, dextrane, éthanol, et gaz carbonique). Le CO₂ chasse l'O₂ résiduel, et on observe simultanément une diminution du pH. La flore aérobie ne peut plus se développer. C'est à partir d'une acidité totale de 1% que *Leuconostoc mesenteroides* est remplacé par *Lactobacillus plantarum*. Cette flore homofermentaire élimine le goût amer de la choucroute et transforme le dextrane et le mannitol. Cette étape aboutit à une acidité de 1,5 à 1,9%. Et pour terminer cette succession d'action de microorganismes, *Lactobacillus brevis*, bactérie hétérofermentaire qui résiste à l'acidité transforme les sucres restants et amène le pH à une valeur de 3,60 soit 2,5 % d'acidité.

Durant la fermentation, on effectue une opération dénommée « débondage » qui consiste à enlever le jus de fermentation. L'opération est pratiquée tous les 3-4 jours jusqu'à ce que la saumure soit claire et limpide. Ce procédé dure 3 semaines environ et la saumure est remplacée par une nouvelle solution saline. Au bout de 1 mois de fermentation, la choucroute est « consommable », néanmoins il est préférable, pour profiter de toutes ses qualités organoleptiques, de prolonger celle-ci jusqu'à 2 mois. Le rendement (rapport entre la masse de choucroute recueillie et la masse de choux épluchés utilisée) est de l'ordre de 1/3 du poids des choux épluchés (16). Plusieurs paramètres peuvent influencer la qualité de la choucroute :

- L'**anaérobiose** est indispensable pour le développement des bactéries lactiques, les autres bactéries sont inhibées. Elle permet d'éviter l'altération du chou par oxydation et d'éviter la synthèse de produits secondaires indésirables qui altèrent le goût et l'odeur du chou. C'est pourquoi, on veille à ce que le chou soit toujours recouvert par son jus.
- La **température** de fermentation de 18°C permet l'obtention d'une bonne qualité organoleptique et une fermentation rapide et rend aussi la commercialisation possible en 3 semaines.
- La **concentration en sel** permet d'extraire, par l'intermédiaire de l'eau, les substances nutritives des tissus du chou qui servent de substrat aux bactéries lactiques. Le sel associé à l'acidité, inhibe le développement de la flore aérobie et atténue l'action des enzymes pectinolytiques des cellules végétales. Sa concentration optimale se situe entre 1,5 et 2,5%

- du poids du chou. Lorsque la concentration en sel est élevée, la choucroute est plus croquante.
- Le **pH** a une importance via la succession des flores qu'il induit, mais il doit être contrôlé puisque *Leuconostoc mesenteroides* y est extrêmement sensible. Son temps de division (temps nécessaire à une bactérie pour multiplier son nombre par deux) peut passer de 40 à 145 min lorsque le pH varie de 6,2 à 4,5. C'est pourquoi il est retrouvé dans la 1^{ère} phase de la fermentation.

1.2.3 Nutrition et santé

La valeur nutritionnelle est le deuxième critère indispensable de la qualité d'un aliment recherché par le consommateur après le goût et avant le critère sanitaire. La consommation de fruits et de légumes tels que les crucifères présente un réel avantage pour la santé. Leurs caractéristiques nutritionnelles diffèrent selon leur génome, l'environnement (espacement entre les plantes, utilisation de fertilisants, durée d'ensoleillement, température de l'air etc...) et le type de sol de culture (21). En ce qui concerne le chou et la choucroute, il s'avère que ces aliments peuvent être les compagnons idéaux d'une alimentation saine et équilibrée. En effet, ces aliments sont très peu énergétiques (≤ 25 kcal/100 g), contiennent très peu de matières grasses (0,20%) et sont très riches en vitamine C aux vertus tonifiantes (20 à 52 mg/100g) (22,23). Ils fournissent également des vitamines (E, B, K), de la provitamine A et des fibres.

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que la consommation d'une grande variété de légumes et de fruits diminuait le risque de développer des maladies cardiovasculaires, certains cancers et d'autres maladies chroniques (24,25). Dans le cas des Brassicacées, une consommation régulière peut contribuer à prévenir des cancers comme ceux du poumon, des ovaires et des reins (26-28). Par ailleurs, il a été prouvé qu'une consommation fréquente des légumes de cette famille (au moins quotidiennement) était associée à une plus faible concentration sanguine d'homocystéine, un acide aminé constituant un facteur de risque de maladie cardiovasculaire lorsque sa concentration est trop élevée (29,30). Enfin, des scientifiques travaillant sur la fonction cognitive (par exemple, divers aspects de la mémoire) chez les femmes âgées ont démontré que celles qui consommaient plus souvent des crucifères, présentaient un déclin cognitif plus faible par rapport à celles qui en consommaient moins souvent (31). Quant aux choux plus précisément, plusieurs expérimentations menées tant sur l'animal que chez l'homme, ont confirmé l'action bénéfique de leur consommation régulière (au moins une portion par semaine) dans la prévention du cancer du côlon, de l'estomac, du poumon, de l'œsophage, du rectum ou de la vessie (32-34). La richesse des Brassicacées en fibres alimentaires, micronutriments et autres phytonutriments (exemple, les polyphénols) pourraient

contribuer à la capacité de ces aliments à réduire les risques de développer des cancers (35). Cependant, les principales cibles des chercheurs pour tenter d'expliquer cette action chimio-protectrice, sont les isothiocyanates (ITCs).

2. Les Isothiocyanates

2.1 Formation des isothiocyanates

2.1.1 Les glucosinolates

Les ITCs sont des produits de dégradation des glucosinolates (GSLs) dont regorgent les légumes de la famille des crucifères. Les GSLs sont issus du métabolisme secondaire des plantes (21). Ces composés sont présents dans 16 familles de plantes de l'ordre des Capparales dont font partie les crucifères (36,37). Ce sont des dérivés d'acides aminés qui comportent une unité β -D-glucopyranoside hydrophile, une fonction thiohydroximate-O-sulfatée, anionique et une partie aglycone R hydrophobe variable (**Figure 7**). La présence du groupement sulfaté confère aux GSLs la propriété d'être fortement acides. Ces molécules sont généralement présentes sous forme de sels de potassium (38).

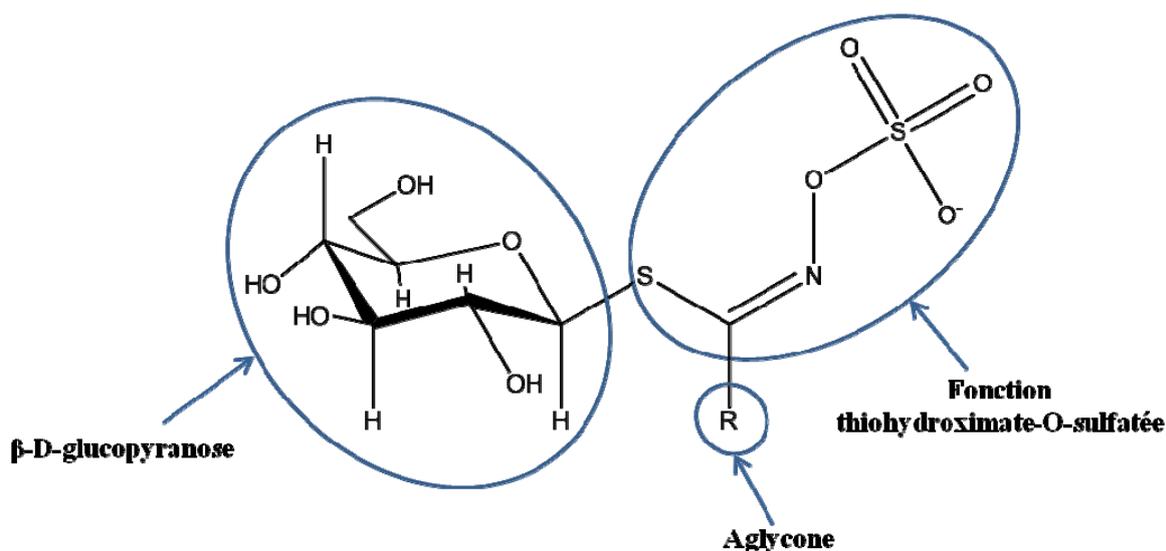


Figure 7 : Structure générale des glucosinolates

Les GSLs ont une grande similitude de structure et diffèrent seulement par la nature de leurs chaînes latérales R qui résultent de modifications structurales (oxydation, élimination, ou hydroxylation) aboutissant à des groupements aliphatiques, aromatiques ou hétérocycliques (indoles) (**Tableau 2**). Le résultat est une grande variabilité structurale des GSLs, puisque plus de 120 composés naturels ont été recensés dans cette famille (39).

Tableau 2 : Tableau des différentes classes des GSLs en fonction de la nature du radical R (36,40)

Nom commun	Nature du substituant R	Plantes sources
GSLs aliphatiques		
Sinigrin	2-Propenyl ou Allyl	chou blanc, moutarde, raifort
Gluconapin	3-Butenyl	chou rouge, brocoli, navet
Gluco brassicanapin	4-Pentenyl	chou de milan, brocoli, feuilles de navet
Progoitrin	2(R)-2-Hydroxy-3-butenyl	chou blanc, chou de bruxelles, navet
Gluconapoleiferin	2-Hydroxy-4-pentenyl	brocoli, navet, chou chinois
Glucoibervirin	3-Methylthiopropyl	chou frisé, chou-fleur, navet vert
Glucoerucin	4-Methylthiobutyl	chou blanc, brocoli, navet
Dehydroerucin	4-Methylthio-3-butenyl	radis
Glucoiberin	3-Methylsulphinylpropyl	chou-fleur, chou rouge, brocoli
Glucoraphanin	4-Methylsulphinylbutyl	chou Blanc, brocoli, roquette
Glucoraphenin	4-Methylsulphinyl-3-butenyl	radis
Glucoalyssin	5-Methylsulphinylpentenyl	pak-choi
GLSs aromatiques		
Glucotropaeolin	Benzyl	cresson
Gluconasturtiin	2-Phenylethyl	chou de milan, brocoli, navet
Gucosinalbin	4-hydroxybenzyl	moutarde
GSLs indoles		
Gluco brassicin	3-Indolylmethyl	chou blanc, brocoli, navet
4-Hydroxygluco brassicin	4-Hydroxy-3-indolylmethyl	chou blanc, chou rave, navet vert
4-Methoxygluco brassicin	4-Methoxy-3-indolylmethyl	chou de milan, chou rave, navet
Neoglucobrassicin	1-Methoxy-3-indolylmethyl	chou rouge, chou-fleur, navet

Les GSLs identifiés dans les végétaux de la famille des Brassicacées sont présents au sein d'une même espèce, en nombres et en quantités qui peuvent être très différents (41-44). C'est le cas en particulier de multiples variétés de l'espèce de chou *B. oleracea* pour lesquelles, non seulement les teneurs en GSL sont très variables mais la nature de ces GSLs est également très différente. La proportion en GSLs est également fonction de la maturité de la plante. Par exemple, les jeunes pousses de brocoli contiennent de 70 à 100 mmol de GSLs par gramme de matière fraîche (soit 10% du poids sec), comparativement à la plante mature qui n'en contient que 1 à 4 mmol par gramme de matière fraîche, soit 20 à 50 fois moins (45,46). Dans une même plante, il a été retrouvé jusqu'à 15 GSLs différents, mais le plus souvent seulement 3 ou 4 GSLs sont prédominants (38). Ces molécules sont produites dans toutes les parties de la plante mais à des proportions différentes, puisque selon les espèces, ils sont préférentiellement concentrés dans les racines, les feuilles, la tige ou les graines (42). Dans la nature, les GSLs sont des précurseurs d'arômes responsables de la forte odeur et du goût de certains légumes (chou, chou-fleur, raifort) et de l'inappétence des aliments (47). Par exemple, la sinigrine est un composé amer, mais l'ITC correspondant est piquant. La progoitrine est sans amertume, mais après dégradation, elle donne un produit (goitrine) extrêmement amer. Les GSLs jouent également un rôle majeur dans la défense des plantes contre les maladies fongiques et les infestations de ravageurs (48).

D'autres facteurs tels que l'origine génétique, culturale et environnementale, la période de récolte, la transformation et le stockage peuvent influencer la composition en GSLs des crucifères. Par exemple dans le colza, les quantités des principaux GSLs présents sont contrôlées par des groupes de gènes différents indépendamment régulés. Il est donc possible de réduire sélectivement la production de GSLs indésirables et d'améliorer ceux qui sont appréciés pour la saveur et l'effet positif sur la santé.

2.1.2 Hydrolyse enzymatique des glucosinolates

La formation des ITCs à partir des GSLs est catalysée par la myrosinase. C'est une enzyme de type thioglucosidase (EC 3.2.3.1) d'environ 125 à 150 kDa et de structure dimérique avec en son centre un atome de zinc et 2 sites catalytiques avec un acide glutamique (positions 187 et 409) (**Figure 8**) (49).

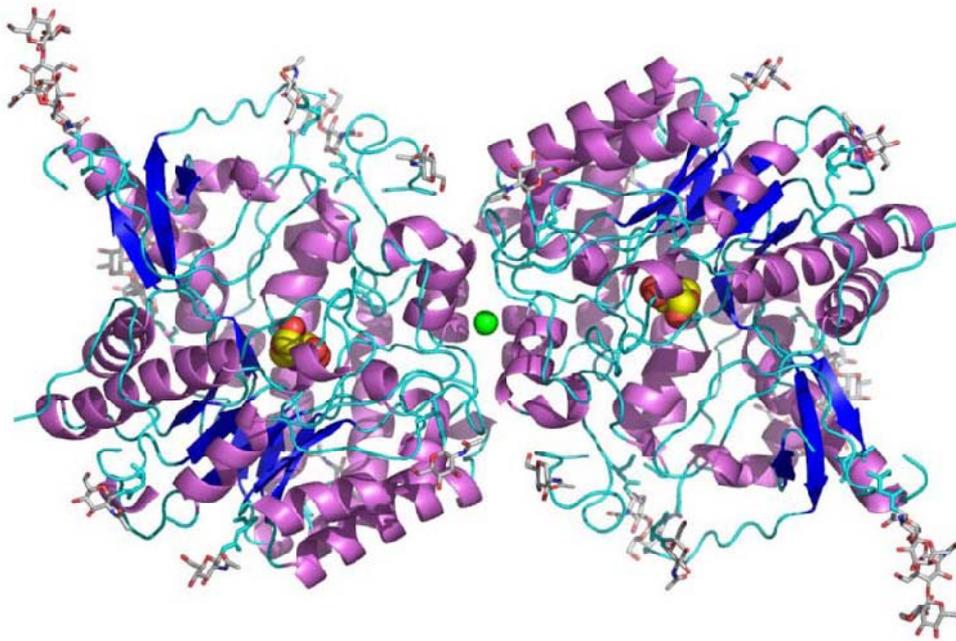


Figure 8 : Structure de la myrosinase. En vert l'atome de zinc et en rouge et jaune l'acide glutamique dans chacun des 2 sites catalytiques (49)

Pour agir la myrosinase nécessite un effet allostérique avec l'acide ascorbique. En se liant à elle, ce cofacteur modifie la conformation de l'enzyme dans la région de son site actif (50). En présence d'acide ascorbique, la température optimale d'activité est alors abaissée de 55°C à 35°C. Il a été constaté que l'activité peut être multipliée par un facteur 100 si la concentration de ce cofacteur est voisine de 1 mM, néanmoins des concentrations supérieures à 5 mM peuvent inhiber l'activité (51). Une étude concernant les facteurs d'activation et d'inactivation de la myrosinase indique que la pression a un effet antagoniste sur l'inactivation thermique de la myrosinase (52). D'autres facteurs sont nécessaires à un fonctionnement optimal de cette enzyme comme la température (de 30 à 70°C selon les auteurs), le pH (en moyenne de 8) (53). Selon les espèces ou les variétés de plantes, les conditions optimales d'activité de la myrosinase peuvent changer (54). Ces différences peuvent s'expliquer par l'existence de différentes formes de myrosinase appelées isozymes qui peuvent avoir des activités plus ou moins importantes selon la plante et l'organe d'origine (55). La cuisson a aussi un effet sur l'activité enzymatique. L'enzyme peut en effet perdre son activité au bout de 2 min au four à micro-onde et après 30 min de cuisson à 70°C. Il a été démontré que la myrosinase n'est pas uniquement d'origine végétale, les bactéries du tube digestif en produisent également (56), ce qui pourrait compenser partiellement la perte d'activité de la myrosinase des aliments cuits.

Dans la plante, la myrosinase est située dans des cellules appelées idioblastes dont le type dépend de leur localisation. Dans les parties vertes, elles appartiennent au tissu parenchymateux; dans les racines, au cortex et dans les graines, elles sont présentes dans l'embryon (57). À l'intérieur de la cellule, la myrosinase est uniformément présente dans le cytoplasme avec quelques agglomérations sur des membranes, alors que les GSLs sont confinés dans les vacuoles (58). Ces observations expliquent la stabilité des GSLs dans les tissus intacts et leur autolyse observée lors de la rupture de l'intégrité cellulaire provoquée lorsque la plante est coupée, broyée ou mâchée. Dans ces cas, la myrosinase hydrolyse la liaison thioglucosidique des GSLs pour donner le D-glucose et un thiohydroxamate-O-sulfonate (**Figure 9**). Ce composé instable libère spontanément le sulfate et se transforme ensuite en fonction de la nature de la chaîne latérale du GSL et des conditions du milieu, en divers composés (41). La formation des produits de dégradations des GSLs va dépendre de différents facteurs tels que le pH, la présence ou non d'ions métalliques (Fe^{2+}) ou de protéines épithiospécifiques (ESP).

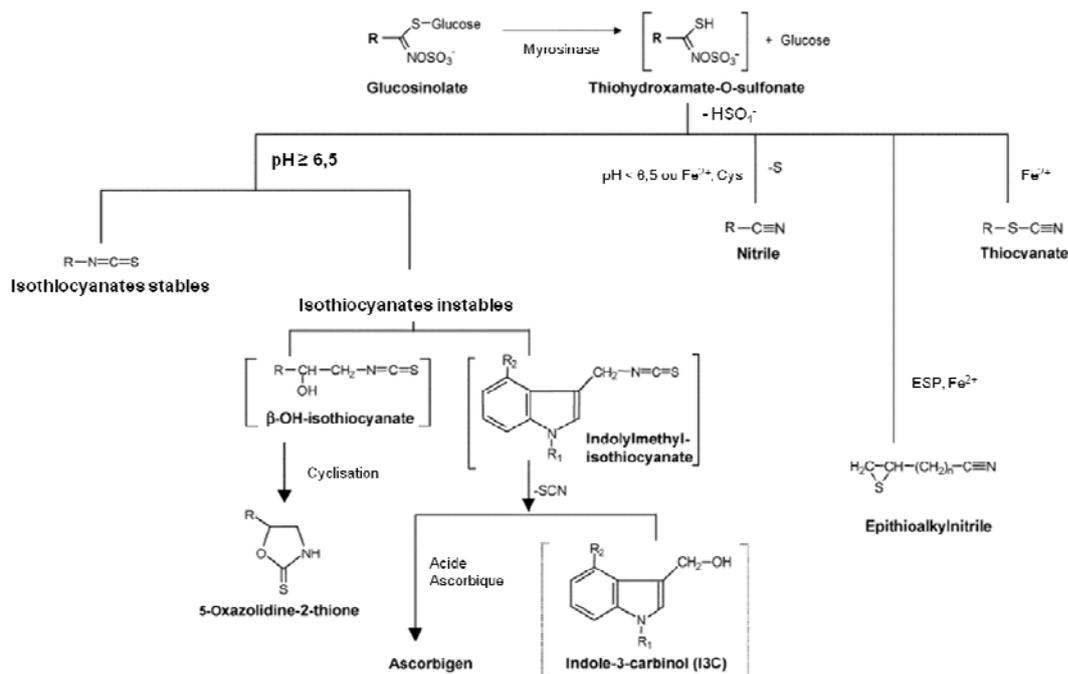


Figure 9 : Des GSLs aux ITCs, les différentes conditions favorisant la formation de certains produits de dégradation par rapport à d'autres (38)

Parmi les produits de dégradation des GSLs, les ITCs, principaux composés connus, sont formés dans un environnement à pH neutre et notamment lors de la mastication dans la bouche où le pH (6,2 à 7,2) est optimal à leur production. Certaines conditions sont à l'inverse défavorables à cette production, comme par exemple un pH faible, la présence d'ions ferreux ou d'ESP, qui provoquent la

dégradation des GSLs en nitriles, en épithioalkynitriles et en thiocyanates. Par ailleurs, lorsque la chaîne latérale R du GSL contient une fonction hydroxyle en position 2 ou 3, l'ITC résultant est instable et se cyclise spontanément pour donner un hétérocycle à 5 ou 6 chaînons : un oxazolidine-2-thione ou une tétrahydro-1,3-oxazine-2-thione.

2.1.3 Structure des isothiocyanates

Le passage du GSL à l'ITC nécessite un réarrangement de type Lossen (**Figure 10**). Le soufre par effet électrodonneur conduit à l'élimination du groupement sulfate. Cette phase est suivie par la formation d'une double liaison entre l'azote et le carbone. L'azote devient alors électropositif et entraîne la rupture de la liaison entre le radical et le carbone, ce qui aboutira finalement à la formation de la liaison du radical avec l'azote.

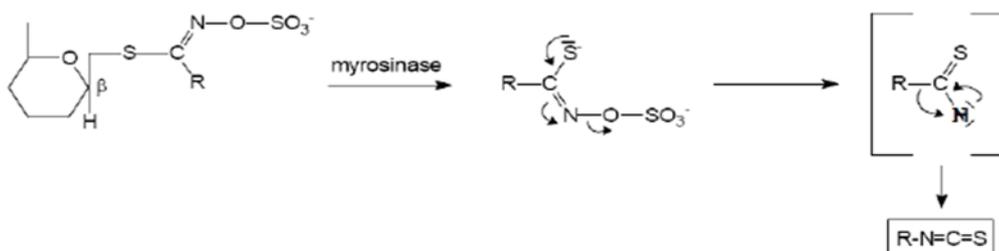
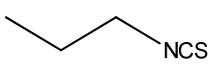
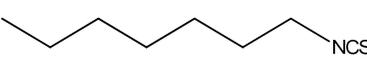
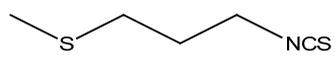
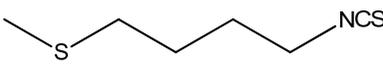
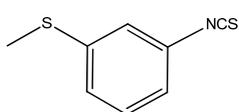
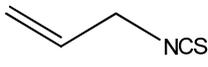
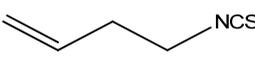
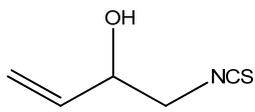
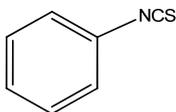
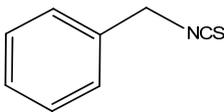
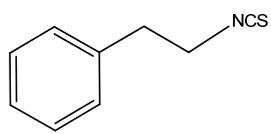
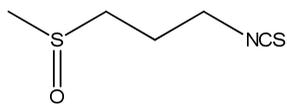
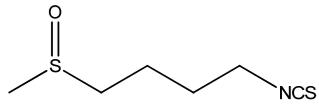


Figure 10 : Réarrangement de type Lossen

La structure générale des ITCs est $R-N=C=S$ où le radical R correspond au GSL qui a été dégradé. Le **tableau 3** présente quelques exemples de structures d'ITCs.

Tableau 3 : Structures générales de quelques ITCs

Chaîne latérale R	Structure chimique	MM (g/mol)	Log P (25°C)
Méthyl		73	0,94
Propyl		101	2,01
Heptyl		157	4,13
3-Méthylthiopropyl		147	2,35
3-Méthylthiobutyl		161	2,67
3-Méthylthiophényl		181	3,66
Allyl		99	1,76
3-Butenyl		113	2,69
2-Hydroxy-3-butenyl		129	1,88
Phényl		135	3,24
Benzyl		149	3,01
Phényléthyl		163	3,47
Ibérine		163	0,18
Sulforaphane		177	0,23

2.2 Réactivités chimiques

Les ITCs sont électrophiles et réagissent avec les groupements nucléophiles (thiols, NH_2 et OH , etc...) (59). C'est pourquoi certains ITCs sont utilisés pour la détection d'acides aminés (primaires et secondaires), de protéines ou de peptides (60); par exemple le phényl-ITC est employé dans la méthode d'Edman pour le séquençage des protéines et des peptides. L'ITC va réagir avec la fonction amine N-terminale pour donner un complexe qui, après action d'un acide dans des conditions douces libère une phenylthiohydantoïne (PTH), les autres acides aminés de la chaîne peptidique restant intacts. Le PTH peut être ensuite analysé par chromatographie ou par électrophorèse. D'autres ITCs (fluorescéine-ITC, p-phenylbenzoyl-ITC, 4-N,N'-diméthylaminoazobenzène-4'-ITC) sont utilisés pour la détection d'acides aminés ou d'amines.

Sur la base du caractère électrophile de l'atome de carbone du groupement $\text{N}=\text{C}=\text{S}$, des méthodes d'analyse ont été développées pour doser les ITCs après transformation par des réactifs nucléophiles. Par exemple, le 1,2-benzenedithiol va réagir avec les ITCs en un composé unique, le 1,3-benzenedithiol-2-thione (**Figure 11A**). La quantification du produit de cyclocondensation permet de déterminer la quantité totale d'ITCs présents dans un échantillon. La méthode a été utilisée pour évaluer le contenu en ITCs totaux des crucifères ou pour quantifier leurs métabolites dans l'urine après ingestion de crucifères (61-63). D'autres réactifs comme le 2-mercaptoéthanol (**Figure 11B**) ou l'ammoniac ont été utilisés pour la dérivation des ITCs en vue d'une analyse par CLHP avec dérivation pré colonne (64,65).

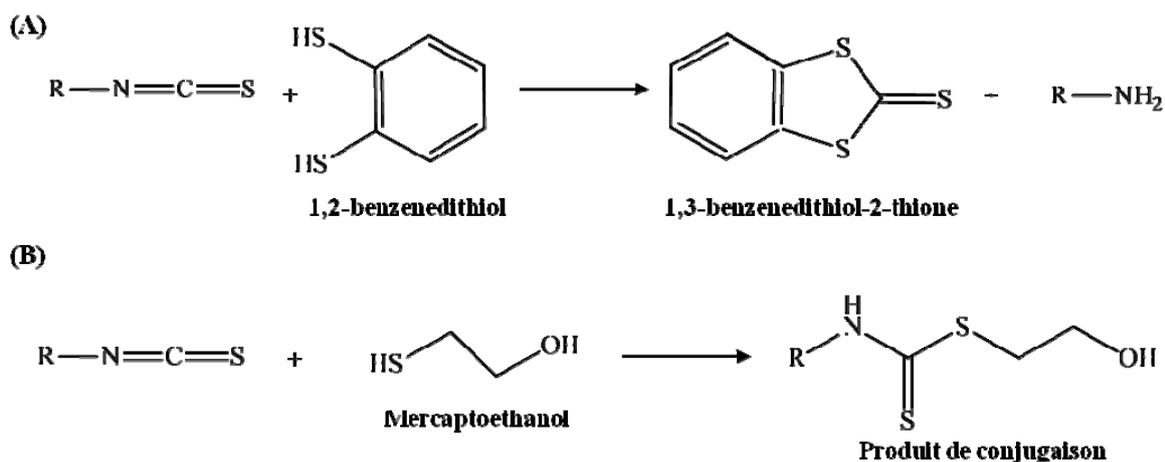


Figure 11 : Réaction des ITCs avec le 1,2-benzenedithiol (A) et le mercaptoéthanol (B)

2.3 Stabilité physico-chimique des isothiocyanates et de leurs précurseurs

Selon l'environnement dans lequel se trouvent les ITCs, ils sont plus ou moins stables. Des études ont montré que ces composés peuvent se dégrader à haute température ou lorsqu'ils se trouvent dans un milieu aqueux (66-68). Par exemple, il a été reporté que le sulforaphane se dégradait en différents produits volatils suite à l'application d'une température élevée (210°C) dans un injecteur lors d'une analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (69). Parfois, certains composés comme l'Allyl-ITC sont instables dans une solution aqueuse de méthanol (70).

Contrairement aux ITCs, les GSLs sont chimiquement et thermiquement stables jusqu'à ce qu'ils se trouvent dans un environnement favorisant leur hydrolyse. La présence de la fonction thiohydroxamate-O-sulfaté rend le GSL soluble et stable dans l'eau (38).

2.4 Absorption, distribution, métabolisme et excrétion

Quelque soit le mode de consommation (cru ou cuit) et le mode de cuisson (cuisson à l'eau bouillante, blanchiment, aux micro-ondes ou à la vapeur), les GSLs, les ITCs ou les deux se retrouvent après ingestion dans l'estomac. Après la phase gastro-intestinale, ils sont transportés dans l'organisme par le sang (38). Les différentes étapes de transport et de métabolisation des GSLs et des ITCs sont représentés à la **figure 12**.

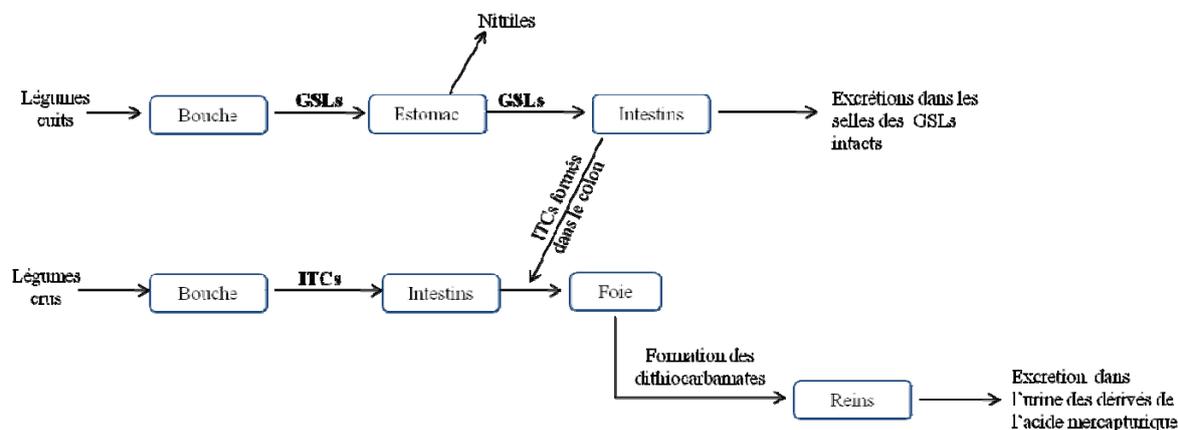


Figure 12 : Schéma récapitulatif de l'adsorption, du métabolisme et de l'excrétion des GSLs et des ITCs après ingestion de crucifères

- Les glucosinolates

Sous l'effet de la cuisson, la myrosinase peut être désactivée et seuls les GSLs sont ingérés. En raison du faible pH de l'estomac (1,0 à 3,0), une hydrolyse acide des GSLs peut avoir lieu conduisant à la formation de nitriles (36). Alors que dans l'intestin grêle (pH de 4,8 à 8,2), aucune réaction de dégradation des GSLs n'a été observée. Arrivés dans le gros intestin, une partie des GSLs (10 à 15%) est convertie en ITCs par la microflore du côlon (pH de 7,8 à 8,0). Par la suite, les GSLs non transformés, ni convertis en ITCs, sont excrétés sous forme inchangée dans les selles (71,72).

- Les isothiocyanates

Les ITCs formés après coupure ou mastication des légumes sont absorbés dans tout le tractus intestinal. Leur métabolisme se fait par la glutathion-S-transférase (GST), aboutissant à différents dithiocarbamates (**Figure 13**). Les ITCs sont conjugués au glutathion (GSH) dans le foie. Cet organe présente l'activité GST la plus élevée dans l'organisme. La réaction de conjugaison est réversible, ce qui prolonge la durée de séjour des ITCs dans le corps. Arrivés dans le rein, les dithiocarbamates sont convertis en dérivés de l'acide mercapturique après N-acétylation. Les étapes nécessaires à cette conversion sont le clivage de la glutamine catalysée par la glutamyltranspeptidase (GTP), le clivage de la glycine catalysée par la cystéinylglycinase (CGase), et enfin la N-acétylation catalysée par la N-acétyltransférase (NAT). Finalement, les dérivés de l'acide mercapturique sont excrétés dans les urines et peuvent servir de marqueur de l'absorption d'ITCs (63).

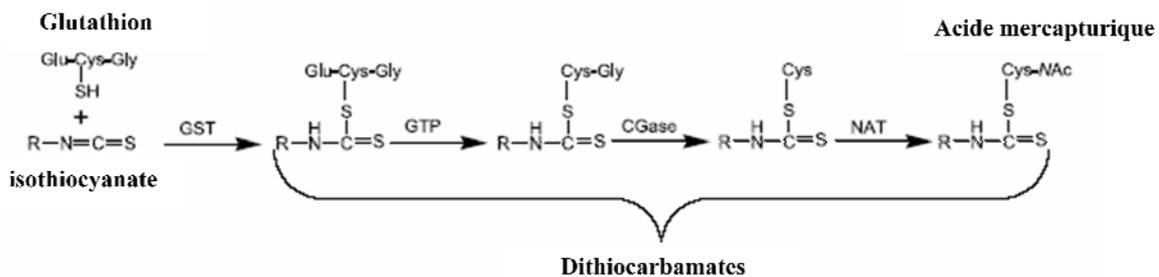


Figure 13 : Métabolisme des isothiocyanates dans l'organisme humain (73)

2.5 Propriété biologiques des isothiocyanates

2.5.1 Prévention de cancer

Le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Bien que les traitements curatifs se développent, les échecs et les récurrences sont encore nombreux. La prévention constitue donc un axe de recherche important.

2.5.1.1 Mécanisme de la cancérogénèse

La cancérogénèse est caractérisée par un processus complexe qui implique une série de 3 étapes distinctes. La première dite phase d'**initiation** est une étape d'acquisition de caractères néoplasiques suite à des lésions stables et irréversibles de l'ADN induites par une substance cancérogène. L'apparition des cellules initiées est nécessaire mais pas suffisante pour conduire au développement tumoral. La deuxième étape appelée phase de **promotion** correspond au passage des cellules initiées d'un état quiescent à un état prolifératif, entraînant alors la transformation des cellules cancéreuses en clones cancéreux. Cette phase aboutit à la formation d'une tumeur pré-maligne. Et enfin, la dernière phase correspond à la **progression**. C'est un processus irréversible au cours duquel les cellules initiées précancéreuses acquièrent des propriétés prolifératives accrues, invasives et des potentiels métastatiques conduisant à l'apparition clinique de la tumeur maligne.

2.5.1.2 Activité anticancéreuse des isothiocyanates

Pour éviter le développement des cellules cancéreuses, l'organisme dispose de différents mécanismes de régulation scindés en plusieurs actions distinctes telles que la prévention de l'activation métabolique des composés cancérogènes, l'induction de l'apoptose, l'antiprolifération, l'arrêt du cycle cellulaire, ou l'inhibition des mécanismes d'angiogénèse. Les ITCs peuvent intervenir au cours de ces mécanismes et contribuer ainsi à la prévention des cancers (74,75).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les ITCs permettent de moduler le métabolisme des cellules cancéreuses par inhibition des enzymes de phase I (Cytochrome P450), responsables de la bio-activation de composés cancérogènes et par induction de la synthèse d'enzymes détoxifiantes (Glutathion S Transférase (GST), l'UDP Glucuronyl Transférase (UDPGT) et la NADPH quinone réductase (QR)) par lesquelles les composés cancérogènes sont détoxifiés et donc facilement éliminés de l'organisme. Par exemple, le phényléthyl-ITC très abondant dans le cresson s'est révélé efficace dans la prophylaxie du cancer des poumons en bloquant l'activation métabolique des nitrosamines par inhibition du cytochrome P450 pulmonaire (39). Dans une autre étude, cet ITC a été introduit dans la nourriture de rats recevant une dose (0,5 mg/kg) journalière de N-Nitrosométhylbenzylamine (NMBA). Après 3 semaines, l'analyse de l'œsophage a révélé que l'ITC protégeait de l'effet cancérogène du NMBA par un mécanisme de modulation des gènes induits (76). Par ailleurs, une

étude de 2007 a démontré que ce même ITC pouvait intervenir dans la prévention du cancer par inhibition de l'angiogénèse sur des cellules HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) (77).

Dans de nombreuses publications, les chercheurs ont attribué l'action anti-cancérogène des crucifères, au sulforaphane. Cet ITC présente une double action d'inhibition des enzymes de la phase I et d'induction des enzymes de la phase II. Il a également été démontré que le sulforaphane peut agir par induction de l'apoptose et par inhibition de l'angiogénèse du cycle cellulaire et de la migration cellulaire (métastase) (5,75,78). Par exemple, une action du sulforaphane sur les cancers du poumon, a été mise en évidence par induction de l'apoptose, par liaison aux protéines (propriétés électrophiles). La variété des sites d'action du sulforaphane font qu'on le retrouve aussi dans la prévention du cancer de la prostate, de l'ostéosarcome, du cerveau, du pancréas, de la peau et du côlon du fait de ses propriétés cytotostatiques, cytotoxiques et pro-apoptiques sur ces cellules cancéreuses (42).

D'autres ITCs peuvent être bénéfiques dans la prévention des cancers tels que l'ibérine qui a présenté une activité anticancéreuse par apoptose des glioblastomes humains et une activité antiproliférative, le 7-méthyl-indole-éthyl-ITC, qui par un mécanisme similaire à une action contre la prolifération cellulaire, active les caspases impliquées dans l'apoptose (39,56,79,80), et l'AITC, qui a présenté des effets d'inhibition de la prolifération de diverses cellules cancéreuses avec des valeurs de CI50 de l'ordre du μM (81). Et enfin, une étude de 2007 a démontré que les ITCs inhibent les cancers de la sphère crânienne (langue, oropharynx,...) et cervicale via les divers mécanismes évoqués précédemment (82).

2.5.2 Autres effets bénéfiques

De nombreuses études montrent que les ITCs, en plus de leurs effets dans la prévention du cancer ont également des effets protecteurs contre les bactéries, les champignons et les insectes. Ces propriétés peuvent trouver des applications concrètes dans les domaines technologiques et de la santé (5).

2.5.2.1 Propriétés antibactériennes

Plusieurs travaux ont démontré que les ITCs présentaient une activité contre des bactéries pathogènes. Une étude réalisée par Fahey *et al.*, sur 48 souches de *Helicobacter pylori*, un germe à l'origine du cancer gastrique, a montré que le sulforaphane avait une action bactériostatique et bactéricide sur cette bactérie (83). L'allyl-ITC possède également une activité antibactérienne vis à vis des bactéries telles que *H. pylori*, mais aussi *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* etc...(81). Un autre ITC, le phényléthyl-ITC extrait de la moutarde blanche a également présenté une activité d'inhibition de croissance d'*Escherichia coli* et de *Clostridium difficile* (84).

Les propriétés antibactériennes des ITCs ont aussi fait l'objet d'études dans le domaine de l'industrie alimentaire, dans le but de les utiliser comme conservateurs d'origine naturelle. Dans ce cadre, Lin *et al.* (85), ont étudié les effets de l'allyl-ITC et du méthyl-ITC après vaporisation sur des fruits et légumes «inoculés» avec différentes espèces bactériennes (*Salmonella enterica* sérotype Montevideo, *E. coli* sérotype 0157:H7 et *Listeria monocytogenes* Scott A). Les deux ITCs se sont montrés bactéricides.

Les mécanismes d'action des ITCs concernant leurs propriétés antibactériennes ne sont pas entièrement connus et font actuellement l'objet de nombreuses expérimentations. Quelques exemples de modes d'action ont été proposés pour l'allyl-ITC. Une étude de 2000 a démontré que son action ressemblerait à celle de la polymyxine B, connue pour se lier à la membrane cellulaire et accroître ainsi sa perméabilité (86). L'allyl-ITC est également capable d'inhiber les enzymes jouant un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire, telles que la thiorédoxine réductase et l'acétate kinase isolée d'*E. coli* (87).

2.5.2.2 Propriétés antifongiques

Les ITCs présentent des effets vis-à-vis de levures et de moisissures (88-92). Il a été démontré que l'allyl-ITC a une activité fongicide sur *Aspergillus flavus*, *Endomyces fibuliger*, *Penicillium commune*, *Penicillium corylophilum*, etc...(81). Le benzyl-ITC agit en tant que fongicide sur *Alternaria brassicicola* et *Alternaria brassicae*. Cette activité antifongique peut se produire à chaque étape du développement du champignon (croissance, germination des spores,...) (92). En ce qui concerne les moisissures, elles sont aussi sensibles aux ITCs que les levures (93).

2.5.2.3 Propriétés insecticides

Les substances soufrées telles que les GSLs et les ITCs peuvent jouer un rôle essentiel dans la défense de la plante contre les insectes (94). Des GSLs isolés des graines de crambe (*Crambe abyssinica*) possèdent une toxicité sur les larves de moustiques (*Aedes aegypti*) et de mouches domestiques (*Musca domestica*) lorsqu'ils sont incorporés à leur alimentation. (95). Selon les insectes, les extraits bruts ou dilués sont mis en contact avec les larves ou sont incorporés dans des aliments adéquats (100 mg/traitement) en respectant les cycles des insectes. Les résultats obtenus montrent une forte mortalité des larves de moustique et de mouche 24 h après traitement. L'efficacité sur les coléoptères n'intervient qu'à partir de 10 jours. Le ver des racines de maïs est également sensible à ce traitement. Des ITCs utilisés en vaporisation, en particulier l'allyl-ITC, sont aussi efficaces sur *M. domestica* et *Rhyzopertha dominica* que des insecticides de synthèse tels que la chloropicrine et le dichlorovos (96).

Pour mieux connaître l'activité biologique des ITCs, il est indispensable de déterminer la nature des différents ITCs existants, de les isoler. La caractérisation de ces composés permettra de mieux comprendre leurs propriétés biologiques d'où la nécessité de disposer de méthodes analytiques fiables.

3. Méthodes d'analyse des Isothiocyanates

Les protocoles d'analyse des ITCs comportent plusieurs étapes importantes telles que l'extraction des ITCs formés après hydrolyse des GSLs et l'analyse chromatographique pour leur identification et leur quantification. Toutefois, les stratégies d'analyses adoptées sont diverses et dépendent de la nature des analytes cibles, de la nature de l'échantillon et du niveau de concentration recherché.

3.1 Extraction et purification

3.1.1 Extraction en phase liquide

Parmi les nombreuses méthodes d'extraction en phase liquide recensées, la plus utilisée est l'extraction liquide/liquide (ELL). Les ITCs formés après hydrolyse des GSLs sont extraits par un solvant organique apolaire comme le dichlorométhane dans lequel les ITCs sont très solubles (64,97-99). Cette méthode peut être mise en œuvre pour l'extraction d'ITCs ayant des propriétés physico-chimiques différentes. L'ELL est parfois employée pour l'obtention d'un extrait brut qui sera ensuite utilisé pour une purification sur phase solide (100). D'autres méthodes d'extraction par Soxhlet ou par hydrodistillation ont été développées pour la recherche d'ITCs dans les graines de moutarde, de chou-fleur, de chou romanesco ou dans le raifort (70,101,102). Ces techniques consomment peu de solvant mais elles ont comme inconvénients d'être longues et de se faire à chaud, ce qui peut être dommageable pour des substances sensibles à la chaleur (66).

3.1.2 Extraction sur phase solide

Des techniques d'extraction et de microextraction sur phase solide (SPE et SPME respectivement) ont été développées pour la recherche d'ITCs. Un extrait brut est déposé sur une cartouche contenant un support solide sur lequel ont été greffées des fonctions capables d'interagir avec les analytes cibles. Différents supports peuvent être utilisés mais le plus courant pour l'extraction et la purification des ITCs, est la silice vierge (97,98,100,103). Il existe deux modes d'utilisation de la SPE. Le premier consiste à extraire le composé d'intérêt par rétention sur l'adsorbant et à éliminer par rinçage les autres constituants de la matrice initiale. Le composé est ensuite récupéré avec un faible volume de solvant pour obtenir une solution fortement enrichie. L'autre mode consiste à faire passer l'échantillon sur l'adsorbant qui retient les composés non désirés tandis que l'analyte cible passe librement. Dans ce cas, le composé est purifié mais pas concentré. Cette technique a été utilisée pour l'extraction des ITCs par Vermeulen *et al.*, avec une phase solide à base de carbone graphite (64).

En ce qui concerne la SPME, il s'agit d'une miniaturisation de la SPE utilisant une fibre en silice revêtue d'un film polymère (par exemple, polydiméthylsiloxane ou PDMS, 100 μ m) sur laquelle vont être piégés les analytes. Il existe différents types de fibres (polaire, apolaire ou bipolaire) qui sont choisies en fonction de la polarité des composés à extraire. Cette technique a été appliquée pour l'analyse d'ITCs volatils extraits des feuilles de chou ou pour détecter des traces d'ITCs dans les sols de culture (104,105). Après extraction, les composés fixés sur la cartouche, sont désorbés par volatilisation dans l'injecteur en chromatographie en phase gazeuse. C'est une méthode rapide, sans solvant et qui ne nécessite qu'un petit volume d'échantillon. Cependant, elle n'est applicable qu'aux composés volatils.

3.2 Analyses chromatographiques

D'après la littérature scientifique, les techniques les plus couramment utilisées pour l'analyse des ITCs sont la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou la chromatographie liquide haute performance (CLHP).

3.2.1 Chromatographie liquide haute performance

3.2.1.1 Isothiocyanates totaux

Cette méthode décrite par Zhang *et al* consiste à réduire tous les ITCs en un composé unique (1,3-benzenedithiol-2-thione) par réaction avec le 1,2-benzenedithiol. Le principe du dosage a été décrit au paragraphe 2.1.3. Le produit de cyclocondensation est analysé de manière simple et rapide par CLHP en phase inverse sur une colonne C18 avec une détection UV à 365 nm. Les avantages de l'utilisation du 1,2-benzenedithiol comme réactif dithiol sont qu'il réagit aisément, quantitativement (réaction équimolaire) avec tous les ITCs et indépendamment de la structure du substituant R de l'ITC (106). De plus, le produit de cyclocondensation est stable dans les conditions de réaction exigées. Cependant, il n'existe pas d'étalon de 1,3-benzenedithiol-2-thione commercialisable. Pour appliquer cette méthode, il est nécessaire de synthétiser au préalable un produit pur qui servira d'étalon.

3.2.1.2 Isothiocyanates individuels

La plupart des études menées en vue de la détermination des espèces moléculaires d'ITCs utilisent la CLHP couplée à des détecteurs UV ou à des spectromètres de masse (MS) (Tableau 4). La chromatographie est effectuée en mode partage soit en phase normale soit en phase inverse. Les méthodes utilisant la CLHP en phase normale ont été développées sur des phases stationnaires composées de silices non modifiées ou greffées avec des groupements diols, cyano ou amino (107,108). Toutefois, la CLHP en phase inverse sur colonne C18 est généralement la méthode la plus

utilisée. L'élution se fait en fonction de la polarité des molécules qui dépend de la nature du radical R. Des méthodes ont été mises au point pour le dosage de composés particuliers tels que l'allyl-ITC dans la moutarde, le butyl-ITC et le phényl-ITC dans les graines de colza et le 6-(methylsulfinyl)hexyl-ITC dans le wasabi (99,103,109-111). Cependant, sur l'ensemble des méthodes recensées, la plupart se sont bornées au dosage du sulforaphane dans les espèces du genre *Brassica* et principalement le brocoli (99,100,103,112,113). Depuis plusieurs années maintenant, le sulforaphane a fait l'objet de nombreux travaux à cause de ses différentes propriétés biologiques intéressantes pour la santé humaine. Dans cette même logique, une méthode de chromatographie à contre courant a été développée en 2008 par Liang *et al*, pour purifier et produire du sulforaphane en quantité (114). Elle est basée sur une technique de séparation avec une phase stationnaire liquide (organique) et une phase mobile liquide (aqueuse) et consiste à faire circuler en sens inverse la solution à extraire et le solvant extractif. La double circulation produit un brassage intense qui permet un contact prolongé entre les 2 phases. La séparation des solutés se fait par ordre de coefficient de partage croissant.

D'autres méthodes d'analyses ont été utilisées comme la transformation des ITCs par des réactifs comme le mercaptoethanol ou l'ammoniac (voir paragraphe 2.1.3). La dérivation des ITCs avec l'ammoniac donne des dérivés thiourés facilement détectables par CLHP-MS/MS (115). Cependant, ces méthodes ne permettent pas de travailler directement sur les ITCs après la séparation chromatographique.

3.2.2 Chromatographie en phase gazeuse

La CPG a souvent été utilisée pour l'analyse d'ITCs extraits de plantes (104), de graines de plantes (101) ou pour détecter la présence d'ITCs libérés dans les sols de culture (105) (**Tableau 4**). Pour des composés à fort caractère volatil et de petite taille, l'utilisation de la CPG est très aisée. La séparation chromatographique est généralement effectuée sur une colonne capillaire avec des phases stationnaires apolaires ou de polarité intermédiaire (50 à 100% diméthyle polysiloxane). Lorsqu'elle est couplée à un spectromètre de masse, cette technique sert de méthode complémentaire pour identifier et confirmer la nature des ITCs présents dans les échantillons. Cependant, la CPG présente à l'évidence des limites puisqu'elle est difficilement applicable aux grosses molécules et aux composés peu volatils. De plus, il a été démontré qu'à haute température, certains composés peuvent se décomposer, ce qui peut conduire à des pertes d'information au niveau structural (66).

Tableau 4 : Techniques d'analyses les plus couramment utilisées pour l'analyse des ITCs

Echantillons	ITCs analysés	Séparation	Détection	Références
NS*	Butyl-ITC, phényléthyl-ITC	CLHP en phase normale	UV	(107)
Wasabi	6-(Methylsulfinyl)hexyl-ITC	CLHP en phase normale	UV	(108)
Brocoli	Sulforaphane	CLHP en phase inverse / CPG	MS (ESI) / MS (EI)	(103)
Brocoli, chou	Sulforaphane	CLHP en phase inverse	UV	(99)
Moutarde	Allyl-ITC	CLHP en phase inverse	UV	(109)
Brocoli, chou-fleur, chou romanesco, chou	Sulforaphane	CHLP en phase inverse	UV	(100)
Graines de colza	Allyl-ITC, butyl-ITC, phényléthyl-ITC	CLHP en phase inverse / CPG	UV / MS (EI)	(110)
Brocoli	Sulforaphane	CLHP en phase inverse / CPG	UV / MS (EI)	(112)
NS*	6-(Methylsulfinyl)hexyl-ITC	CLHP en phase inverse	MS (APCI)	(111)
Câpres, raifort, moutarde	Methyl-ITC, benzyl-ITC, allyl-ITC, sulforaphane, phényléthyl-ITC,	CLHP en phase inverse avec dérivaison au mercaptoethanol	UV	(64)
Plasma sanguine	Allyl-ITC, butenyl-ITC, ibérine, sulforaphane	CLHP en phase inverse après dérivaison avec de l'ammoniac	MS/MS (ESI)	(65)

*NS: Non spécifié

Chapitre 2 : Elaboration de méthodes d'analyse des Isothiocyanates

Introduction

Le protocole de dosage de phytonutriments dans des matrices alimentaires (comme le chou) nécessite le plus souvent plusieurs étapes successives notamment l'extraction des composés recherchés et l'analyse (chromatographique) pour une identification et une quantification précise. Dans ce cas, il faut disposer de méthodes fiables qui doivent être optimisées selon la nature des substances d'intérêt. L'optimisation du protocole de dosage débute par la mise au point de l'analyse chromatographique puis par celle de la méthode d'extraction.

Parmi les méthodes chromatographiques recensées, les plus couramment utilisées sont la CPG avec détection de masse ou par ionisation de flamme (FID) (104,116,117), et la CLHP en phase normale ou en phase inverse (107), avec détection de masse ou par spectrophotométrie UV (65,113). La CLHP en phase inverse sur colonne C18 avec une phase mobile plutôt polaire est généralement la méthode la plus utilisée pour l'analyse d'espèces moléculaires spécifiques. Ainsi, des méthodes ont été décrites pour le dosage de composés particuliers tels que le sulforaphane dans le brocoli ou le chou, l'allyl-ITC dans la moutarde, le propyl-ITC et le phenyl-ITC dans les graines de colza (99,103,109,110). Cependant, ces méthodes ne permettent pas de doser en une seule fois différents ITCs puisque ceux-ci ne présentent pas les mêmes caractéristiques notamment en termes de polarité et de volatilité. Dans ce cas, au moins deux protocoles différents doivent être utilisés conjointement pour analyser ces composés. Par exemple, les ITCs volatils et non volatils sont analysés par CPG et par CLHP, respectivement. Pour les composés polaires ou non polaires, la CLHP en phase normale et la CLHP en phase inverse sont utilisées respectivement. De plus, la solubilité des ITCs dans l'eau peut varier de 8 g/L pour un composé soluble tel que le sulforaphane à 0,035 g/L pour un ITC hydrophobe tel que l'heptyl-ITC (118). Dans ce cas, l'utilisation d'une CLHP en phase inverse peut entraîner une précipitation des ITCs insolubles dans la phase mobile aqueuse. Dans ces conditions, la quantification précise des ITCs ne peut être possible.

L'objectif de ce chapitre a donc été dans une première partie d'élaborer une méthode permettant une analyse simultanée de tous les ITCs quelque soit leur solubilité dans l'eau, leur polarité ou leur volatilité. Bien que la CPG ne soit applicable qu'aux composés volatils et de petite taille, l'utilisation d'une phase stationnaire et d'un gradient de température adéquats peuvent permettre la séparation de plusieurs composés ayant des structures chimiques variées. En ce qui concerne la CLHP, nous avons déterminé dans un premier temps, l'influence de la présence d'eau dans la phase mobile sur la quantification des ITCs. Pour cela, il a fallu comparer les quantités de substances retrouvées après analyse à celles injectées. Le dosage a été réalisé en utilisant une réaction de cyclocondensation où les ITCs réagissent quantitativement (mole à mole) avec le 1,2-benzenedithiol (BDT) formant un produit cyclique stable et soluble dans l'eau, le 1,3-benzodithiole-2-thione (BD2T) (63,119,120). Dans un deuxième temps, nous avons cherché à mettre au point des

méthodes de séparation en limitant l'utilisation de l'eau dans la phase mobile. Des modes de séparation en phase liquide telles que la CLHP en phase normale ou la chromatographie à interaction hydrophile (HILIC), ont été testées afin de travailler dans des conditions de polarité intermédiaire avec des phases mobiles fortement organiques. Deux autres alternatives ont également été envisagées pour une analyse par CLHP en phase inverse. La première est une dérivation pré-colonne au mercaptoéthanol par conjugaison au groupement $N=C=S$ afin d'augmenter la polarité des ITCs et permettre ainsi leur séparation chromatographique en présence de phase mobile très polaire. La deuxième méthode est une CLHP en phase inverse avec chauffage de colonne à 60°C , développée pour réduire la formation de précipités des ITCs ayant une faible solubilité dans l'eau.

Une fois la méthode d'analyse d'espèces moléculaires mise au point, nous nous sommes intéressés dans une deuxième partie, à l'extraction et à la purification des ITCs à partir d'une matrice alimentaire, le chou blanc. Notre objectif était de mettre au point une méthode permettant d'extraire tous les ITCs formés après hydrolyse des GSLs. Un protocole d'ELL développé par Liang *et al.*, (99) et modifié par nos soins, a été appliqué. Nous avons choisi cette méthode car elle est simple et peut être mise en œuvre pour l'extraction d'ITCs ayant des structures chimiques différentes. En plus de l'ELL, d'autres techniques ont été testées telles que la SPE et l'extraction par liquide pressurisé (PLE). Les méthodes utilisant la SPE et recensées dans la littérature, sont généralement appliquées à l'analyse du sulforaphane et utilisent des cartouches d'extraction à base de silice (97,98,100,103). Notre but étant d'analyser un panel de composés ayant des propriétés physico-chimiques différentes, il était important de trouver une phase solide permettant la rétention de l'ensemble des ITCs présents dans les échantillons puis permettre leur élution avec très peu de solvant. Enfin, en ce qui concerne la PLE, elle a déjà été utilisée pour l'analyse de GSLs présents dans des plantes de la famille des crucifères (121). L'extraction réalisée à haute température avec un solvant sous pression permet d'augmenter la solubilité des analytes dans le solvant et d'accélérer la cinétique de désorption des analytes cibles de la matrice. Pour chacune de ces méthodes testées, des rendements d'extraction et des taux de recouvrement ont été déterminés afin de choisir la méthode la plus adaptée à l'extraction des ITCs dans des matrices complexes.

Partie A : Mise au point de méthodes d'analyse d'espèces moléculaires

1. Matériels et méthodes

1.1 Réactifs et solvants

1.1.1 Réactifs

Les ITCs ont une large gamme de polarité, ce qui a conduit à l'utilisation de 8 étalons qui couvrent cette gamme. Le D,L-SFN de pureté 97% a été acheté chez Enzo Life Sciences (Villeurbanne, France); l'allyl-ITC (AITC) de pureté 95%, le benzyl-ITC (BITC) de pureté 98%, le methyl-ITC (MITC) de pureté 97%, le phenyl-ITC (PITC) de pureté 99%, le phenylethyl-ITC (PEITC) de pureté 99%, ainsi que le propyl-ITC (proITC) de pureté 98% proviennent de chez Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). L'heptylITC (HITC) de pureté 97%, le 1,2 benzenedithiol (BDT) de pureté 96% sont fournis par Acros organics (Geel, Belgium) et par Sigma-Aldrich respectivement. Le 1,3-benzodithiole-2-thione (BD2T) a été préparé et caractérisé au laboratoire suivant une méthode publiée (63). Enfin, le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) est fourni par SDS (Vaidereuil, France), l'acétate et le formiate d'ammonium, le dihydrogénophosphate de sodium monohydraté (98%) et l'hydrogénophosphate de sodium (99%) proviennent de chez Merck (Darmstadt, Germany).

1.1.2 Solvants

L'eau ultrapure est produite au laboratoire par un système de purification Synergy® UV (Millipore, Molsheim, France), à partir de l'eau permutée disponible à la faculté de pharmacie d'Illkirch (Université de Strasbourg). Les solvants organiques utilisés sont de qualité HPLC, sauf précision. L'acétonitrile, le méthanol, le chloroforme et l'isopropanol ont été fournis par Sigma-Aldrich, la triéthylamine (99%) et le 2-mercaptoethanol par Acros organics, l'hexane, l'heptane, le dichlorométhane, l'isooctane, et l'éthanol par VWR (Briare, France) et enfin le cyclohexane par Fischer Scientific (Illkirch, France). L'acide formique (98-100%) et l'acide acétique (99,8%) fournis par Riedel de Haën (Sigma-Aldrich, Seelze, Allemagne), et le dichlorométhane (pour l'extraction) provenant de chez Merck, sont de qualité analytique.

1.1.3 Solutions stocks

Des solutions mères de chaque ITC à 2 mg/mL dans de l'éthanol, sont préparées à partir des étalons dans des microtubes. Des solutions filles (A et B) sont obtenues par dilution des solutions mères dans différents solvants en fonction de l'analyse chromatographique effectuée. Ces solutions filles contenaient respectivement, 6 ITCs (MITC, AITC, proITC, BITC, PEITC à 50 µg/mL chacun et

PITC à 25 µg/mL) pour la solution A et 8 ITCs (SFN, MITC, AITC, proITC, PITC, BITC, PEITC et HITC à 50 µg/mL chacun) pour la solution B. Toutes les solutions sont conservées au maximum 2 semaines à 5°C.

1.2 Chromatographie en phase gazeuse

1.2.1 Séparations chromatographiques

L'analyse a été réalisée sur un appareil de marque Varian de type 3400CX équipé d'un injecteur automatique 8200CX et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La séparation a été effectuée sur une colonne CP-Sil 24 CB [(50% phényl 50% diméthylpolysiloxane) 30 m × 0,25 mm, 0,15 µm, Varian]. Le gaz vecteur utilisé était de l'hélium (pureté de 99,9995%, Air liquide, France) avec un débit de 1 mL/min. Des échantillons de 1 µL sont injectés en split de rapport 1:10. La température initiale de la colonne était de 35°C pendant 2 min. La colonne a ensuite été chauffée pour atteindre une température de 96°C à raison de 20°C/min (maintenue pendant 5min) puis celle de 170°C à raison de 8°C/min (maintenue pendant 5 min) et enfin celle de 330°C à raison de 25°C/min (maintenue pendant 5 min). Les températures de l'injecteur et du détecteur FID étaient fixées à 180°C et 330°C respectivement. Pour la flamme du FID, de l'air et de l'hydrogène sont utilisés avec respectivement un débit de 300 et 30 mL/min.

Les ITCs sont également analysés par CPG/MS en utilisant une colonne VF-5ms [(5% phényl 95% diméthylpolysiloxane) 30 m × 0,25 mm, 0,10 µm]. Les conditions opératoires (injection et programme de température) sont identiques à celles décrites ci-dessus. Seul le détecteur était différent. Il s'agissait ici d'un spectromètre de masse (Saturne 2000, Varian) équipé d'une source d'ionisation de type impact électronique (EI, énergie d'ionisation 70eV) et fonctionnant sur une échelle de masse de m/z 40-600. La base de données permettant l'identification des ITCs a été la NIST Mass Spectral Data Base, version 2000.

1.2.2 Analyse quantitative

La quantification des ITCs a été réalisée par étalonnage interne. Le HITC est choisi comme étalon interne car il ne se trouve pas dans les matrices alimentaires. Il est distinguable des analytes cibles et surtout il présente des propriétés physiques et chimiques proches des composés d'intérêt.

Dans un premier temps, le facteur de réponse (FR) de chaque ITC par rapport à l'étalon interne (HITC) est déterminé en utilisant des solutions d'ITCs de références (solution A) préparées dans du dichlorométhane et du méthanol. La formule de calcul est la suivante :

$$\text{Equation 1 : } [\text{FR}] = (\text{Q}'_{\text{HITC}} / \text{Q}'_{\text{ITC}}) \times (\text{A}'_{\text{ITC}} / \text{A}'_{\text{HITC}})$$

Dans laquelle Q'_{HITC} et Q'_{ITC} sont respectivement les quantités (μg), dans la solution injectée, d'HITC et de l'ITC d'intérêt ; A'_{ITC} et A'_{HITC} sont les aires des pics de l'ITC et du HITC respectivement.

La quantification d'ITCs (Q_{ITC}) dans des solutions à analyser, a été réalisée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Equation 2 : } [\text{Q}_{\text{ITC}}] = (\text{Q}'_{\text{HITC}} / \text{FR}) \times (\text{A}_{\text{ITC}} / \text{A}_{\text{HITC}})$$

Dans laquelle Q'_{HITC} est la quantité d'HITC (μg) dans la solution injectée, FR correspond au facteur de réponse précédemment déterminé; A_{ITC} et A_{HITC} sont les aires des pics de l'ITC et du HITC respectivement. Dans chaque solution analysée, la quantité d'HITC ajoutée est la même que celle ajoutée dans les solutions de référence.

Les expériences ont été réalisées plusieurs fois et les résultats sont présentés sous la forme (Moyenne \pm écart-type)

1.3 Chromatographie liquide haute performance

1.3.1 Mise en évidence de la précipitation d'ITCs en présence de phase mobile fortement aqueuse

1.3.1.1 Séparation chromatographique et collecte de fractions

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un système chromatographique constitué d'une pompe binaire Prostar 210, d'un injecteur automatique Prostar 410 et d'un détecteur à barrette de diodes UV/vis Prostar 330 (Varian, les Ulis, France). Les solvants utilisés pour la phase mobile sont ceux préconisés par Liang et *al* (99). La méthode a été mise au point pour l'analyse simultanée de plusieurs composés ayant des structures chimiques différentes.

Pour cette analyse, des solutions d'ITCs dans l'acétonitrile avec différentes concentrations, l'une à 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et l'autre à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ont été utilisées. Cent microlitres de solution sont injectés et analysés sur une colonne chromatographique C18, Hypersil 4,6 \times 250 mm, 5 μm (Interchim, Montluçon, France) à l'aide d'un gradient linéaire à base d'acétonitrile et d'eau (**Tableau 5**). Le débit de la phase mobile est fixé à 0,8 mL/min.

Tableau 5 : Gradient de composition de la phase mobile pour la séparation des ITCs

Temps (min)	% Acétonitrile	% Eau
0	20	80
8	40	60
20	50	50
35	60	40
43	100	0
49	100	0
50	20	80
60	20	80

La détection est réalisée à une longueur d'onde de 245 nm. Contrairement, à ce que l'on trouve le plus souvent dans la littérature scientifique (122), nous avons opté pour une détection à 245 nm et non à 210 nm comme l'ont fait Matthäus *et al.* (110). En effet, même si l'absorbance est moins importante à 245 nm, elle reste plus spécifique. Chaque ITC est collecté individuellement en sortie de détecteur dans des tubes à hémolyse en verre.

1.3.1.2 Protocole de dosage par cyclocondensation

Pour pouvoir quantifier les pertes en ITCs, nous avons utilisé un protocole d'analyse nécessitant la cyclocondensation des ITCs avec un réactif dithiol (BDT) et conduisant à la formation d'un produit cyclique dithiol-thione (BD2T) soluble dans l'eau et stable (63).

Cette technique a été utilisée pour analyser les ITCs présents dans les différentes fractions collectées. Dans chaque tube, sont ajoutés 1000 μ L de tampon phosphate (100 mM) pH 8,5 et 500 μ L d'une solution de BDT 20 mM dissous dans de l'acétonitrile. L'ensemble est agité au vortex puis incubé une heure à 65°C. Après incubation et refroidissement, le milieu réactionnel (MR) est filtré sur un filtre seringue 0,45 μ m en PTFE (Macherey Nagel, Hoerd, France) puis injecté (10 μ L). Le produit de cyclocondensation est identifié et quantifié par CLHP en phase inverse. La séparation chromatographique se fait sur la même colonne que précédemment à l'aide d'une phase mobile constituée de méthanol et d'eau acidifiée (1% acide formique v/v). Le débit utilisé est de 1 mL/min. Le gradient d'élution est répertorié dans le **tableau 6**. Le BD2T est détecté à une longueur d'onde de 365 nm. En parallèle, 100 μ L de chaque solution d'ITCs (à 80 ou à 1000 μ g/mL) sont soumis à la réaction de cyclocondensation et analysé par CLHP de la même manière que les produits de cyclocondensation issus des fractions collectées.

Tableau 6 : Gradient de composition de la phase mobile pour l'élution du BD2T

Temps (min)	% Eau acidifiée	% Méthanol
0	20	80
5	20	80
6	0	100
11	0	100
12	20	80
22	20	80

Pour la quantification du produit de cyclocondensation, une courbe d'étalonnage de BD2T est établie avec une gamme de concentration variant de 0,03 à 0,81 mmol/L. Chaque point de calibration est réalisé 3 fois.

Les quantités d'ITC injectées et d'ITC collectées sont exprimées en μmol d'équivalent de BD2T. Le pourcentage de perte en ITCs est calculé avec la formule suivante (équation 3).

$$\text{Equation 3 : \% Pertes} = [1 - (X'/X)] \times 100$$

Dans cette équation, X' et X représente la quantité d'ITC collectée et injectée respectivement. Trois répétitions sont effectuées pour chaque analyse et les résultats sont exprimés sous la forme (Moyenne \pm écart-type).

1.3.2 Test de différentes colonnes chromatographiques

Différentes techniques de séparation chromatographique en phase liquide ont été testées mettant en œuvre des colonnes chromatographiques de type silice avec ou sans greffage (amine, cyano, diol, phenyl), et des phases stationnaires particulières de type silica Hilic, carbone graphite poreuse (Hypercarb) ou pentafluorophenyl (PFP). Les colonnes testées ainsi que les phases mobiles associées sont regroupées dans le **tableau 7**.

Des analyses par CLHP en phase normale ont été réalisées avec des solvants apolaires à différents pouvoirs éluants, utilisés comme phase mobile. La chromatographie en mode HILIC est effectuée avec plusieurs phases mobiles à base de solvants polaires, de mélange d'eau et de solvants apolaires ou de mélange d'acétonitrile et de tampon aqueux acide. Les tampons sont préparés à partir d'une solution aqueuse de formiate d'ammonium 10 mM ou d'acétate d'ammonium 10 mM ajustée à pH 3,2 ou pH 5,3 avec de l'acide formique et de l'acide acétique respectivement. Les colonnes Hypercarb et PFP ont également été testées en utilisant des phases mobiles fortement organiques.

Les essais sont réalisés avec des solutions B d'ITCs préparées à chaque fois dans le solvant d'élution. Le volume d'injection est de 10 μL et le débit est fixé entre 0,3 et 1 mL/min en fonction de la taille de la colonne. Les ITCs sont détectés à 245 nm.

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des colonnes testées en CLHP

Technique de séparation	Colonne testée	Fournisseur	Débit (mL/min)	Phase mobile
CLHP en phase normale	Nucleosil 100 silica (5 µm) 250 × 4,6 mm	Macherey Nagel (Hoerd, France)	1,00	
	Nucleosil 100 diol (5 µm) 250 × 4,6 mm	Macherey Nagel (Hoerd, France)	1,00	
	Spherisorb amino (5µm) 250 × 4,6 mm	Waters (Guyancourt, France)	0,50	Hexane Heptane
	Eclipse XDB-phenyl (5µm) 250 × 4,6 mm	Interchim (Montluçon, France)	0,32	Cyclohexane Isooctane Dichlorométhane
	Hypersil Cyano BDS (5 µm) 250 × 4,6 mm	Macherey Nagel (Hoerd, France)	1,00	
	Hypercarb carbone graphite poreux (3 µm) 150 × 3 mm	Thermo Fischer (Courtaboeuf, France)	1,00	
	Pursuit PFP (5 µm) 150 × 4,6 mm	Varian (Les Ulis, France)	0,30	
HILIC	Atlantis silica Hilic (3,5 µm) 150 × 3 mm	Waters (Guyancourt, France)	1,00	- Mélange binaire acétonitrile/méthanol ou isopropanol ou eau * - Mélange ternaire acétonitrile/eau/méthanol ou Isopropanol* - Mélange binaire acétonitrile/formiate d'ammonium (10 mM) à pH 3,2 ou acétate d'ammonium (10 mM) à pH 5,3*
CLHP en phase inverse	Pursuit PFP (5 µm) 150 × 4,6 mm	Varian (Les Ulis, France)	0,30	- Mélange binaire acétonitrile ou méthanol/eau*
	Hypercarb carbone graphite poreux (3 µm) 150 × 3 mm	Thermo Fischer (Courtaboeuf, France)	0,32	- Acétonitrile, méthanol ou éthanol - Mélange binaire acétonitrile ou méthanol/eau*

*L'apport en eau n'excède pas 10%.

1.3.3 CLHP en phase inverse avec dérivation pré-colonne au Mercaptoethanol

L'analyse par CLHP en phase inverse avec une dérivation pré-colonne au mercaptoethanol des ITCs, est adaptée de la méthode décrite par Vermeulen et al (64).

1.3.3.1 Conditions de dérivation

Les conditions d'analyse ont été mises au point avec un mélange de 8 ITCs étalons (SFN, MITC, ProITC, AITC, PITC, BITC, PEITC et HITC). Le milieu réactionnel de dérivation est constitué de 1000 μ L de solution B d'ITCs dans du dichlorométhane, et de 500 μ L de réactif (mercaptoethanol 200 mM, triéthylamine 20 mM dans du dichlorométhane). Le réactif est ajouté en excès pour s'assurer de la transformation totale des ITCs. Le mélange est incubé 1h à 30°C sous agitation constante. Après incubation, le dichlorométhane est évaporé à sec sous flux d'azote. Le culot est repris dans 1000 μ L de solution (acétonitrile/eau, 1:1, v/v) puis filtré sur un filtre seringue 0,45 μ m en PTFE dans un flacon d'injection.

1.3.3.2 Séparation chromatographique

Les ITCs dérivés obtenus (ITCs-mce) sont injectés (10 μ L) et séparés sur une colonne chromatographique C18 Nucleosil 4,6 \times 150 mm, 5 μ m (Macherey Nagel, Hoerd, France) avec une pré-colonne C18 de dimension 4,6 \times 10 mm, 5 μ m. La phase mobile est un gradient à base d'acétonitrile et d'eau (**Tableau 8**). Le débit de la phase mobile est fixé à 0,8 mL/min.

Tableau 8 : Gradient de concentration pour la séparation des ITCs-mce

Temps (min)	% Acétonitrile	% Eau
0	10	90
10	10	90
40	100	0
45	100	0
47	10	90
60	10	90

Deux modes de détection des ITC-mce sont utilisés :

- Soit la détection spectrophotométrique à 271 nm,
- Soit la détection par spectrométrie de masse

Comme il n'existe pas dans le commerce d'étalons d'ITCs dérivés au mercaptoethanol, une analyse par CLHP/MS a été réalisée pour confirmer l'identification des ITCs-mce. Le système chromatographique utilisé est le même que précédemment à l'exception du détecteur qui est un spectromètre de masse triple quadripôle 1200L équipé d'une source d'ionisation APCI (Varian, Les Ulis, France). Le gaz de nébulisation, dont la pression est fixée à 45,8 psi est de l'azote de haute pureté, fourni par un générateur (Domnik Hunter, Villefranche-sur Saône, France). Il est également utilisé comme gaz desséchant (18 psi) et sa température est fixée à 250°C. L'acquisition est faite en mode positif et négatif dans une gamme de masse située entre les m/z de 50 et 300. Les conditions chromatographiques sont les mêmes que précédemment à l'exception de l'eau utilisée pour la phase mobile qui ici a été acidifiée (0,1%). Un split est mis en place en sortie de colonne pour limiter à 0,2 mL/min le débit de phase mobile entrant dans le spectromètre de masse. Les ions moléculaires détectés sont sous la forme $[M+H]^+$ ou $[M-H]$.

1.3.3.3 Analyse quantitative

Pour la quantification des ITCs après dérivaison, des courbes de calibration sont établies à partir de solutions étalons dans du dichlorométhane de concentration en ITCs allant de 1 à 50 µg/mL. Chaque solution étalon est soumise à la réaction de dérivaison au mercaptoethanol et chaque point de calibration est réalisé 3 fois. Les équations de courbes de régression obtenues sont utilisées pour déterminer la concentration en ITCs dans les échantillons (µg/mL). Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) des ITCs dérivés ont également été déterminées.

1.3.4 CLHP en phase inverse avec chauffage de colonne

Certains ITCs étant faiblement solubles dans l'eau, le chauffage de la colonne devrait permettre de réduire, voire d'éviter la formation de précipité dans une phase mobile aqueuse puisqu'en général la solubilité en phase aqueuse d'un composé augmente avec la température. La colonne choisie pour cette analyse est une Xbridge C18 4,6 × 150 mm, 3,5 µm (Waters, Guyancourt, France) conçue pour offrir une flexibilité maximale lors du développement de méthodes robustes quelles que soient les conditions de pH, de phase mobile et de température, pour présenter des performances régulières et une longévité accrue, même dans des conditions extrêmes. Cette méthode a également été mise au point avec le mélange de 8 ITCs cités précédemment.

1.3.4.1 Séparation chromatographique

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un système chromatographique constitué d'une pompe binaire Prostar 210, d'un injecteur automatique Prostar 410 et d'un détecteur à barrette de diodes UV/vis Prostar 330 comme décrit ci-dessus. La colonne, la pré-colonne correspondante (4,6 × 20 mm, 3,5 µm) ainsi que le tube reliant la vanne d'injection et la colonne (30 cm) sont chauffés à 60°C. La seringue et la boucle d'injection sont rincées avec du méthanol entre chaque injection. L'analyse chromatographique est effectuée avec un gradient linéaire à base d'acétonitrile et d'eau (**Tableau 9**). Le débit de la phase mobile est fixé à 0,8 mL/min. Le volume injecté est de 10 µL. Les ITCs sont détectés à 245 nm. Pour cette méthode, les pertes en ITCs au cours de l'analyse sont également déterminées comme décrit ci-dessus.

Tableau 9 : Gradient de composition de la phase mobile pour la séparation des ITCs

Temps (min)	% Acétonitrile	%Eau
0	20	80
8	40	60
16	46	54
21	46	54
33	100	0
39	100	0
40	20	80
50	20	80

1.3.4.2 Analyse quantitative

Le dosage des ITCs a été effectué par étalonnage externe. Pour chaque composé, des solutions étalons dans l'acétonitrile, ont été réalisées en triple avec six concentrations différentes entre 2 et 100 µg/mL et analysées dans les conditions chromatographiques mises au point. Les équations de la relation linéaire qui lie la surface des pics chromatographiques avec la concentration de la solution injectée ont ainsi été calculées et utilisées pour déterminer la concentration en ITCs dans les échantillons (µg/mL). Les solutions étalons ont été diluées pour déterminer les LOD et LOQ de chaque ITC testé.

2. Résultats et discussion

2.1 Analyse par chromatographie en phase gazeuse

2.1.1 Profils chromatographiques des étalons

Deux colonnes chromatographiques ainsi que deux systèmes de détection ont été utilisés. La première colonne est une CP-Sil 24 CB composée de 50% phényl 50% diméthylpolysiloxane et la deuxième est une VF-5ms de composition 5% phényl 95% diméthylpolysiloxane employées pour l'analyse par CPG/FID et CPG/MS respectivement. La **figure 14** présente les chromatogrammes obtenus avec ces 2 colonnes, pour un mélange de 8 ITCs. L'analyse montre que:

- La colonne CP-Sil 24 CB ne permet pas d'analyser le SFN qui est probablement trop retenu sur ce type de colonne, étant donné sa forte polarité,
- Le MITC, substance très volatile, est retenu sur la colonne CP-Sil 24 CB et non sur la colonne VF-5MS (trop peu polaire).
- L'AITC et le proITC, composés de structures chimiques similaires présentent des pics très proches.

Cette analyse a montré qu'avec 2 colonnes de polarité différentes, il était possible d'analyser plusieurs composés ayant des structures chimiques différentes.

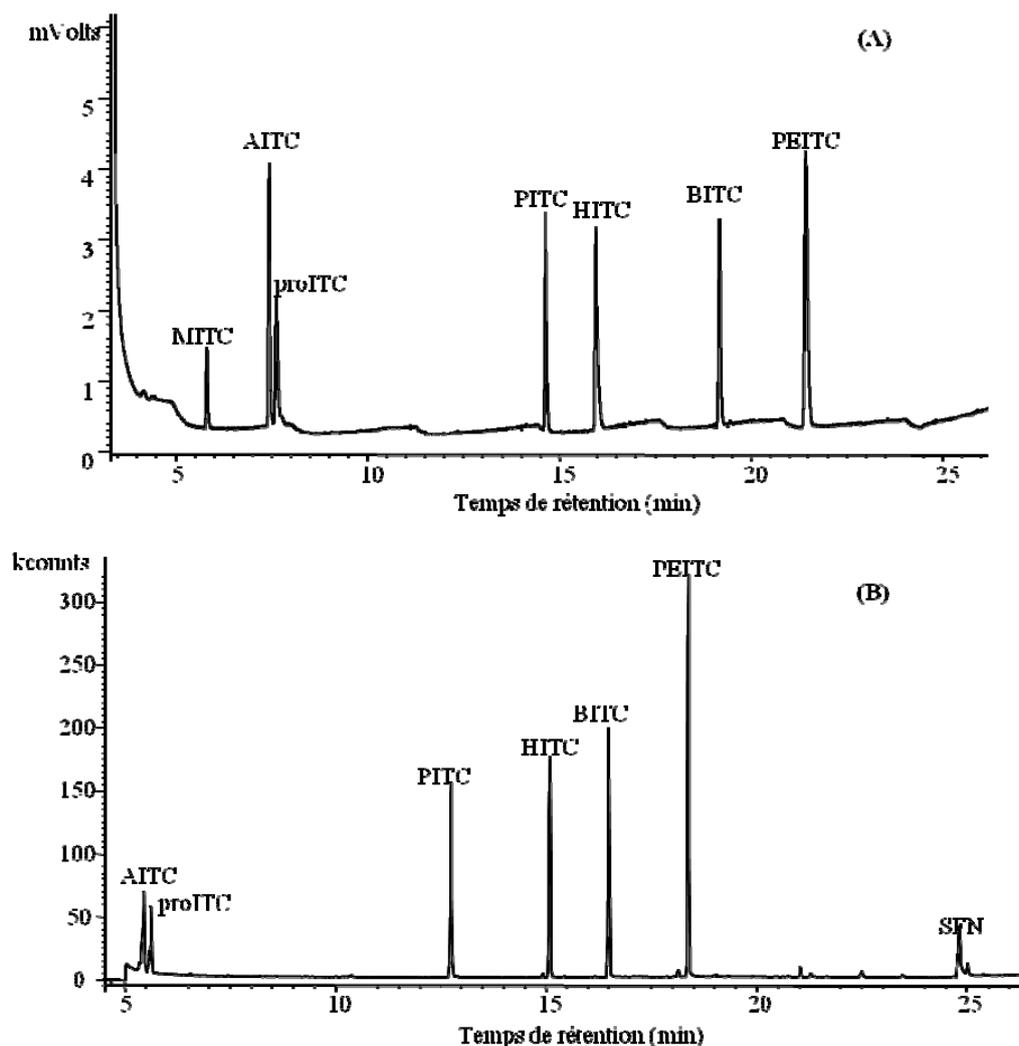


Figure 14 : Profils chromatographiques de 8 étalons obtenus sur 2 colonnes différentes. (A) CP-Sil 24CB-MS avec une détection par FID, (B) VF-5MS avec une détection par spectrométrie de masse

2.1.2 Analyse quantitative

L'analyse quantitative par étalonnage interne des ITCs est réalisée uniquement avec la CPG/FID. Seuls 7 ITCs ont été utilisés puisque le pic de SFN n'est pas visible sur le chromatogramme.

Sachant que selon le type de solvant utilisé et les conditions d'injection, les réponses obtenues pour une même substance peuvent varier (123,124), nous avons déterminé les facteurs de réponse de chaque ITC par rapport au HITC dans 2 solvants différents. Les valeurs obtenues sont récapitulées dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des facteurs de réponse des ITCs par rapport au HITC et des concentrations obtenues pour les solutions témoins

ITC	Facteurs de réponse*		Concentrations des solutions témoins ($\mu\text{g/mL}$)*		
			Théoriques	Expérimentales	
MITC	$0,41 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,02$	50	$50,04 \pm 1,85$	$49,29 \pm 0,34$
AITC	$0,74 \pm 0,05$	$0,60 \pm 0,04$	50	$49,62 \pm 0,57$	$51,03 \pm 0,79$
proITC	$0,99 \pm 0,16$	$0,61 \pm 0,08$	50	$49,92 \pm 0,15$	$51,88 \pm 0,07$
PITC	$1,07 \pm 0,02$	$0,87 \pm 0,13$	25	$24,98 \pm 0,34$	$24,76 \pm 0,4$
BITC	$1,11 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,07$	50	$50,67 \pm 1,77$	$49,35 \pm 0,21$
PEITC	$1,14 \pm 0,02$	$1,09 \pm 0,06$	50	$47,49 \pm 2,36$	$48,01 \pm 0,26$
Solvant de dilution	Dichlorométhane	Méthanol		Dichlorométhane	Méthanol

*Moyenne \pm écart type (n=5)

Ces données montrent que les FRs déterminés, diffèrent selon le type d'ITCs et selon le solvant de dilution. Ils varient de $0,41 \pm 0,05$ à $1,14 \pm 0,02$ lorsque les ITCs se trouvent dans le dichlorométhane et varient de $0,30 \pm 0,02$ à $1,09 \pm 0,06$ lorsque les ITCs sont dans le méthanol. Ces FRs ont été utilisés pour vérifier les concentrations en ITCs dans les solutions témoins utilisées au cours des analyses impliquant la CPG/FID (**Tableau 10**). Les concentrations expérimentales sont relativement proches des concentrations théoriques. Ces résultats montrent bien que les valeurs de FR obtenus peuvent être prises en compte lors de la quantification d'ITCs dans les analyses suivantes.

2.2 Analyse par chromatographie liquide haute performance

2.2.1 Mise en évidence de la précipitation d'ITCs en présence de phase mobile fortement aqueuse

Le profil chromatographique obtenu avec une solution de 8 ITCs (**Figure 15**) et selon le protocole décrit précédemment, montre une bonne séparation de tous les constituants analysés. Cependant, après plusieurs analyses successives, des problèmes techniques sont apparus tels que le colmatage de la boucle d'injection (présence de particules solides blanches) et de la colonne, conduisant à une augmentation de la pression dans la colonne. Après l'étape de chargement de l'échantillon, les ITCs sont entraînés vers la colonne avec une phase mobile contenant 80% d'eau. Au contact de l'eau, les ITCs faiblement solubles, précipitent probablement dans le système. Pour confirmer notre hypothèse, il a fallu déterminer en appliquant la méthode décrite en 1.3.1.2, les pertes en ITCs par comparaison des quantités d'ITCs injectées et retrouvées en sortie de colonne (**Tableau 11**).

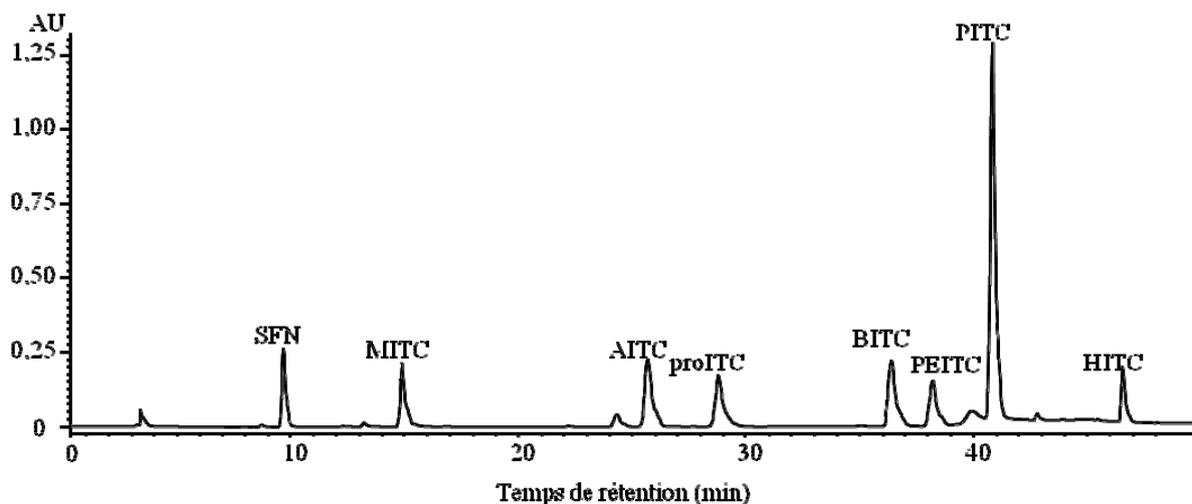


Figure 15 : Profil chromatographique des 8 ITCs étalons (1000 $\mu\text{g/mL}$) après analyse par CLHP en phase inverse. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne Hypersil C18 avec une phase mobile à base d'eau et d'acétonitrile et un débit de 0,8 mL/min. Les ITCs sont détectés à 245 nm.

Tableau 11 : Pourcentages de perte en ITCs obtenus pour 2 solutions témoins d'ITCs de concentrations différentes.

ITC	Pourcentage de pertes *	
	80 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$
SFN	5,4 \pm 3,3	5,8 \pm 3,1
MITC	8,7 \pm 0,6	28,9 \pm 6,6
AITC	7,2 \pm 2,1	19,2 \pm 1,1
proITC	9,8 \pm 1,9	16,6 \pm 2,3
BITC	11,0 \pm 1,3	31,9 \pm 4,4
PEITC	7,1 \pm 3,9	14,0 \pm 0,6
PITC	9,9 \pm 4,4	23,9 \pm 7,7
HITC	11,5 \pm 7,9	26,2 \pm 6,6

*Moyenne \pm écart type (n=3)

Les résultats obtenus montrent que les quantités d'ITCs collectées en sortie de colonne sont inférieures à celles qui ont été injectées. Les pourcentages de perte calculés, varient en fonction de la concentration en ITCs et de leur polarité. En effet, avec une solution à 1000 $\mu\text{g/mL}$, les pertes sont proportionnellement plus élevées qu'avec une solution à 80 $\mu\text{g/mL}$. Le SFN qui est le composé le plus polaire et le plus hydrophile (8 g/L de solubilité dans l'eau (118)) présente de très faibles pertes par rapport aux autres composés. Avec une solution à 1000 $\mu\text{g/mL}$, les composés ayant une faible solubilité dans l'eau comme le BITC, le PITC et le HITC ont des pourcentages de pertes supérieurs à 20%. Cependant, le MITC qui est un composé polaire (3,9 g/L de solubilité dans l'eau (118)) présente

également des pertes importantes. Cette substance est très volatile et les fortes pertes observées sont sans doute dues à cette forte volatilité.

Bien que la méthode utilisée permette une bonne séparation des ITCs ayant des propriétés physico-chimiques différentes, elle ne permet cependant pas leur analyse quantitative en raison de leur précipitation en présence d'eau contenue dans la phase mobile. L'idéal serait de pouvoir faire une séparation chromatographique en travaillant avec des phases mobiles ayant des teneurs élevées en solvants organiques uniquement ($\geq 90\%$).

2.2.2 Test de différentes colonnes chromatographiques

Les différents essais effectués dans les conditions qui figurent au **tableau 7**, montrent que l'utilisation de phases stationnaires normales ne permet pas d'obtenir de séparation satisfaisante d'un mélange de 5 ITCs de structures chimiques différentes. Le composé le moins polaire (PITC) n'est pas retenu sur ce type de phase stationnaire. La **figure 16** présente les résultats obtenus avec une colonne de silice et différentes phases mobiles. Les pics de l'AITC et du proITC, composés de structures chimiques proches, ne sont jamais totalement séparés. Seul l'élution avec l'hexane permet une séparation de ces 2 substances. Cependant le facteur de résolution n'est que de 0,83.

L'utilisation de phases stationnaires constituées de silice greffée avec des groupements diol, amino, ou cyano donne des profils chromatographiques identiques à ceux obtenus avec la colonne de silice. Ces résultats concordent avec les travaux obtenus par Lübke *et al* qui ont montré que l'interaction entre les ITCs et une phase stationnaire polaire est très difficile, ce qui ne permet pas une bonne rétention et une bonne séparation de ces composés (107).

Enfin l'utilisation de colonne de type phényl, Hilic, Hypercarb et PFP n'a pas donné de meilleurs résultats car les pics d'ITCs co-éluient. Les fortes proportions de solvants organiques utilisées ne permettent pas une rétention efficace des ITCs.

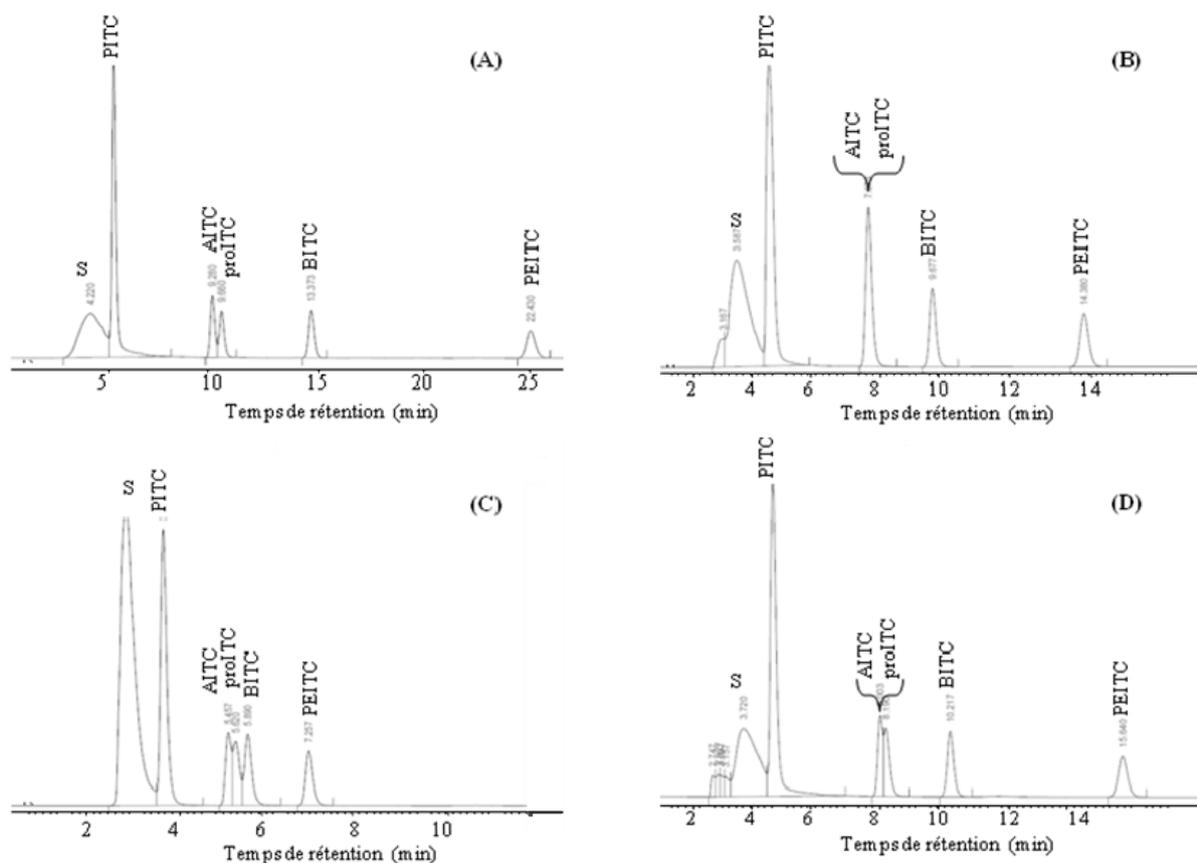


Figure 16 : Chromatogrammes d'un mélange de 5 ITCs (50 µg/mL chacun) obtenus après séparation sur une colonne de silice (Nucleosil 100 silica) avec comme phase mobile de l'hexane (A), de l'isooctane (B), de l'heptane (C) et du cyclohexane (D); la lettre S assignée correspond au pic de solvant.

2.2.3 CLHP en phase inverse avec dérivation pré-colonne au mercaptoethanol

Les produits de dérivation (ITC-mce) plus polaires et plus solubles dans l'eau peuvent être analysés par CLHP en phase inverse avec une phase mobile aqueuse. Le gradient de phase mobile mis au point, a permis une bonne séparation des 8 ITC-mce (**Figure 17**). La résolution entre les pics de composés les plus proches (BITC-mce et PEITC-mce) est supérieure à 1,5. Ces substances (ITC-mce) sont éluées dans le même ordre que leurs précurseurs (**Figure 15**), à l'exception du SFN-mce et du MITC-mce qui sont inversés. De plus, en se plaçant à une longueur d'onde de 271 nm, on améliore très nettement, l'intensité du signal, donc la sensibilité de la détection.

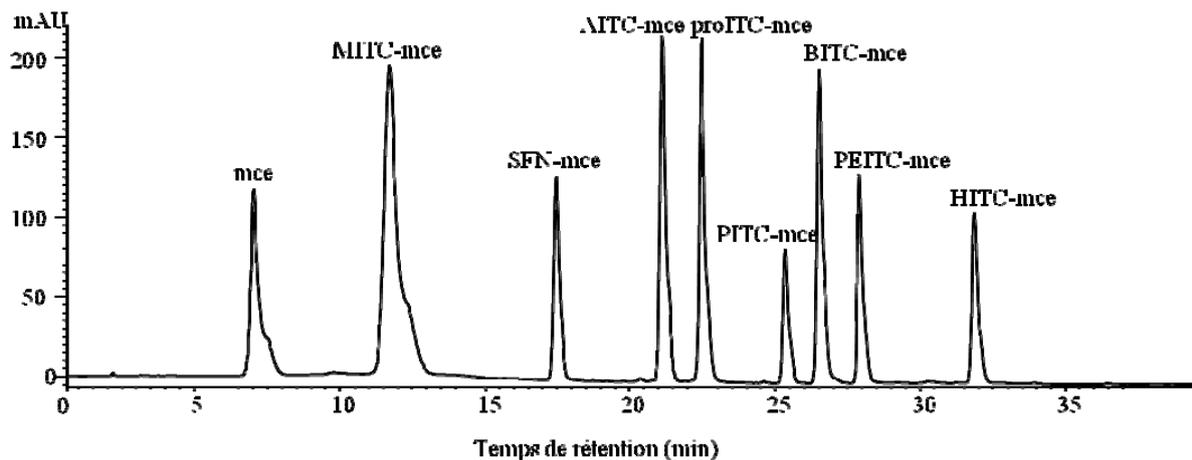


Figure 17 : Profil chromatographique obtenu pour une solution contenant 8 ITCs à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$ pour chacun et suivant la méthode décrite au paragraphe 1.3.3 (dérivation au mercaptoethanol). Les ITC-mce sont détectés à 271 nm.

Il est important de vérifier la nature des ITCs dérivés. Cependant, il n'existe pas dans le commerce d'étalons d'ITC-mce. Une analyse par spectrométrie de masse était donc nécessaire. Des essais ont été effectués en vue de la caractérisation des ITCs-mce par CLHP/MS équipée d'une source ESI. Les spectres de masse obtenus ne permettaient pas de déterminer la masse moléculaire des ITCs dérivés. Il est fort probable que les liaisons chimiques de ces composés se cassent à haute température entraînant leur dégradation dans la source d'ionisation.

Si l'analyse par CLHP/MS avec une source ESI n'a pas donné de bons résultats, ceux obtenus en CLHP/MS avec une source APCI en mode négatif et en mode positif, sont plus satisfaisants. L'utilisation de l'APCI comme source d'ionisation (méthode douce) cause peu de fragmentations. Les spectres obtenus fournissent des informations exactes sur la masse des molécules (**Figure 18**). Dans notre cas, la masse moléculaire des ITC-mce correspond à la somme de la masse de l'ITC et de celle du mercaptoethanol. Pour le SFN, la masse du dérivé serait de 255. L'analyse en mode négatif a donné un ion moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$ avec un m/z de 253,9. Ce qui permet d'affirmer que le SFN a bien été transformé. A l'exception du PITC dérivé, l'analyse en mode négatif a permis de détecter plusieurs m/z correspondant aux ions moléculaires $[\text{M}-\text{H}]^-$ des dérivés. Le PITC-mce n'a pu être détecté qu'en mode positif. Ce qui a donné un ion moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ avec un m/z de 214 correspondant à la masse du PITC dérivé attendue. L'analyse par spectrométrie de masse a permis de confirmer la nature des ITCs dérivés.

En ce qui concerne l'analyse quantitative, la linéarité des réponses pour les divers étalons après dérivatisation ainsi que leurs LOD et leurs LOQ ont été évaluées (**Tableau 12**). Huit courbes de calibration ont été construites en liant les aires de pics d'ITCs dérivés à la concentration en ITCs. Les coefficients de corrélation obtenus (R^2) sont supérieurs à 0,99 et démontrent qu'il y a bien une

linéarité entre les aires de pics et les concentrations en ITCs. Les faibles valeurs de LOD et LOQ obtenues montrent que cette méthode est relativement sensible.

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des masses molaires, des coefficients de corrélation obtenus pour les droites d'étalonnage, des limites de détection et de quantification des ITCs dérivés.

ITC dérivé	Masse molaire (g/mol)	R²	LOD (ng)	LOQ (ng)
MITC-mce	151	0,9996	2,8	9,4
SFN-mce	255	0,9995	2,9	9,7
AITC-mce	177	0,9999	2,1	7,1
proITC-mce	179	1	4,4	14,7
PITC-mce	213	0,9948	7,8	26,0
BITC-mce	227	0,9994	1,5	5,1
PEITC-mce	241	0,9994	14,2	47,7
HITC-mce	235	0,9998	6,5	21,7

L'ensemble de ces résultats démontrent que les ITCs testés réagissent aisément et quantitativement avec le mercaptoethanol. Cette méthode d'analyse avec dérivation pré-colonne au mercaptoethanol peut donc servir à identifier et quantifier les ITCs présents dans des légumes crucifères.

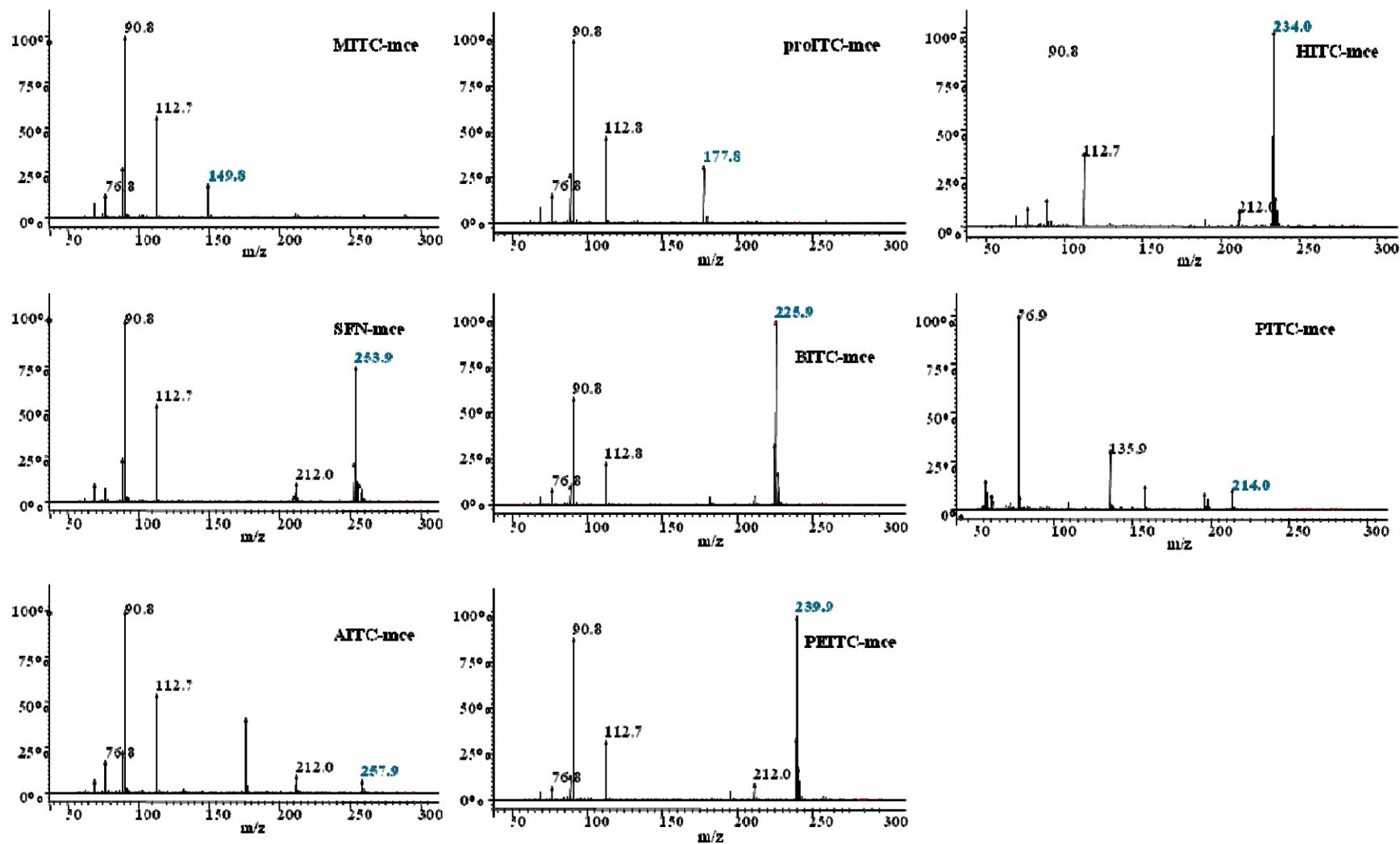


Figure 18 : Spectres de masse des ITCs dérivés obtenus après analyse par CLHP/SM avec une source APCI en mode positif pour le PITC et en mode négatif pour le SFN, le MITC, l'AITC, le proITC, le BITC, le PEITC et le HITC.

2.2.4 CLHP en phase inverse avec chauffage de colonne

L'autre alternative pour éviter la formation de précipités dans le système HPLC, a été de chauffer la colonne de séparation à 60°C. Le chromatogramme obtenu après analyse des 8 ITCs présente des pics de composé fins et bien résolus (**Figure 19**).

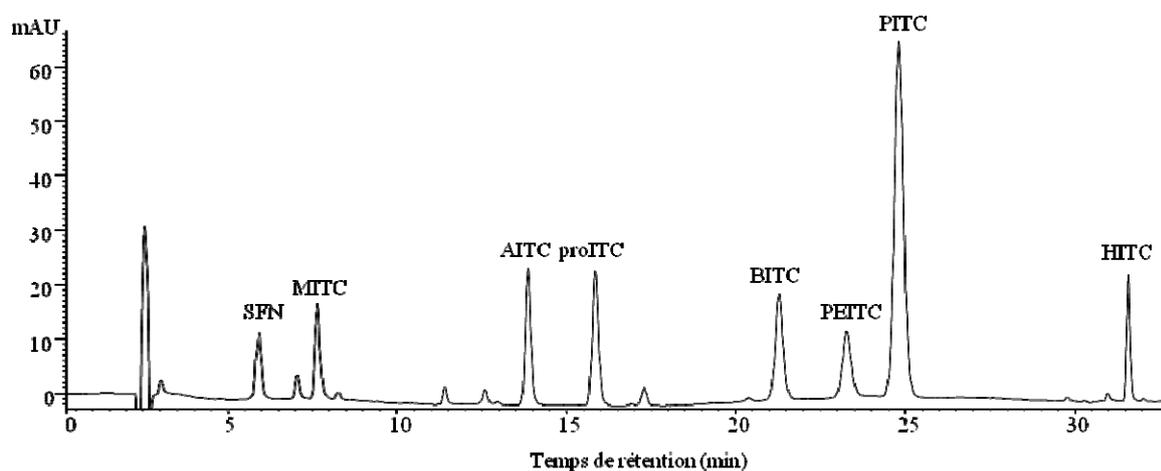


Figure 19 : Profil chromatographique obtenu avec une solution de 8 ITCs (50 µg/mL chacun) et après analyse par CLHP en phase inverse sur Xbridge C18 chauffée à 60°C. La séparation est réalisée avec un gradient à base d'eau et d'acétonitrile et une détection à 245 nm.

Comme précédemment, les pertes en ITCs au cours de l'analyse ont été déterminées. Les résultats obtenus montrent qu'à l'exception du MITC, les pertes sont inférieures à 10% et ceci quelque soit la concentration en ITC de la solution analysée (80 ou 1000 µg/mL) (**Tableau 13**). Il est donc possible de travailler avec une large gamme de concentrations en ITCs. Seules les pertes en MITC sont aussi élevées que précédemment, ce qui est toujours lié à une volatilisation de ce composé. Enfin, après plusieurs injections, les problèmes liés à la précipitation des ITCs (hausse de la pression ou présence de particules solides blanches dans la boucle d'injection) n'ont pas été observés.

Tableau 13 : Pourcentages de perte en ITCs obtenus pour 2 solutions témoins d'ITCs de concentrations différentes avec une colonne chauffée à 60°C

ITCs testés	Pourcentage de perte*	
	80 µg/mL	1000 µg/mL
SFN	1,5 ± 2,8	3,2 ± 2,8
MITC	17,9 ± 2,6	32,5 ± 3,7
AITC	3,2 ± 3,5	2,1 ± 3,1
proITC	3,8 ± 7,4	6,0 ± 3,2
BITC	6,4 ± 0,03	9,8 ± 2,2
PEITC	1,9 ± 3,8	3,6 ± 6,7
PITC	1,5 ± 6,7	8,3 ± 1,9
HITC	6,5 ± 5,8	6,3 ± 4,7

*Moyenne ± écart type (n=3)

Pour l'analyse quantitative, la linéarité, les limites de détection et de quantification pour chaque ITC, ont été déterminées (**Tableau 14**). Le coefficient de corrélation a été évalué à partir de la droite de régression qui lie la surface des pics chromatographiques à la concentration des solutions injectées. Les R^2 obtenus (supérieurs à 0,99) démontrent qu'il y a une bonne linéarité entre les aires de pics et les concentrations en ITCs. A l'exception du PEITC, les valeurs de LOD et LOQ suggèrent que la méthode est sensible et que de faibles quantités d'ITCs peuvent être déterminées. En ce qui concerne le PEITC, à de faibles concentrations, le pic est très large, ce qui explique que sa LOD et sa LOQ soient supérieures à celles des autres ITCs

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des coefficients de corrélation obtenus pour les droites d'étalonnage, des limites de détection de quantification des ITCs testés

ITCs testés	R^2	LOD (ng)	LOQ (ng)
SFN	0,9995	8,8	29,2
MITC	0,9996	5,8	19,4
AITC	0,9996	8,9	29,5
proITC	0,9994	9,2	30,8
BITC	0,9999	6,1	20,4
PEITC	0,9997	43,6	145,5
PITC	0,9998	3,8	12,8
HITC	0,9998	5,2	17,4

L'analyse par CLHP permet de doser à la fois les ITCs volatils et non volatils, les petites et grosses molécules. Les méthodes de CLHP en phase inverse élaborées dans cette partie, présentent des avantages et des inconvénients. L'analyse avec dérivation pré-colonne, est plus sensible et sélective car seuls les composés ayant un groupement $N=C=S$ dans leur structure réagiront avec le mercaptoethanol et seront détectés à 271 nm. On obtiendra ainsi un chromatogramme de meilleure qualité avec très peu de pics parasites. Quand à l'analyse avec chauffage de colonne, elle présente l'avantage de gain de temps contrairement à la méthode précédente puisqu'elle ne nécessite pas d'étape supplémentaire de transformation des ITCs ; elle permet l'utilisation de phase mobile aqueuse tout en restant quantitative (il n'y a pas de précipitation des ITCs les moins solubles dans l'eau). Toutes ces méthodes pourront être appliquées à l'identification et à la quantification d'ITCs extraits du chou, et d'autres légumes de la famille des crucifères.

Partie B : Mise au point de méthodes d'extraction

L'objectif de cette partie a été d'élaborer une méthode d'extraction des ITCs à partir d'une matrice alimentaire, le chou blanc, technique qui pourra par la suite être appliquée à d'autres légumes de la famille des Brassicacées. L'identification et la quantification des ITCs extraits ont été réalisées avec les méthodes chromatographiques mises au point dans la partie A.

1. Matériels et méthodes

1.1 Réactifs et solutions stocks

1.1.1 Réactifs

Le D,L-SFN de pureté 97% a été acheté chez Enzo Life Sciences (Villeurbanne, France); l'AITC de pureté 95%, le BITC de pureté 98%, le MITC de pureté 97%, le PITC de pureté 99%, le PEITC de pureté 99%, ainsi que le proITC de pureté 98% proviennent de chez Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). Le HITC de pureté 97% et le Na₂SO₄ anhydre sont fournis respectivement, par Acros organics (Geel, Belgium) et par SDS (Vaidereuil, France).

1.1.2 Solvants et solutions stocks

Tous les solvants utilisés pour la chromatographie liquide sont de qualité HPLC. Les solvants utilisés pour l'étape d'extraction et de purification (méthanol, dichlorométhane) sont de qualité analytique. L'eau ultrapure est produite au laboratoire par un système de purification Synergy® UV (Millipore, Molsheim, France). L'acétonitrile et le méthanol, ont été fournis par Sigma-Aldrich ; l'éthanol par VWR (Briare, France). Le dichlorométhane (pour l'extraction) provenait de chez Merck.

Deux solutions d'ITCs (A et B), sont préparées dans de l'éthanol dans des microtubes à partir des ITCs étalons. La solution A et la solution B contenaient respectivement 8 ITCs (SFN, MITC, AITC, proITC, PITC, BITC, PEITC et HITC à 2 mg/mL chacun) et 6 ITCs (MITC, AITC, proITC, BITC, PEITC à 2 mg/mL chacun et PITC à 1 mg/mL). Ces solutions peuvent être conservées 2 semaines à 5°C.

1.2 Préparation de l'échantillon

La matrice alimentaire (chou blanc provenant d'un producteur local) est broyée à l'aide d'un broyeur cryogénique (6870 Freezer/Mill, Spex CertiPrep, Stanmore, Grande Bretagne). Ce procédé permet de broyer l'échantillon de façon efficace tout en préservant les qualités du produit.

L'échantillon est donc placé dans une cellule, elle-même placée dans une cuve remplie d'azote liquide. Dans ces conditions, le broyage est fin et la myrosinase reste inactive jusqu'à l'étape de transformation des GSLs. La méthode de broyage utilisée comporte 2 cycles organisés comme suit : 2 min de refroidissement dans l'azote liquide, 2 min de broyage à raison de 24 impacts/s puis encore 1 min de refroidissement. Avant utilisation, le chou cryobroyé est conservé à -20°C .

Pour pouvoir analyser les ITCs, une étape de libération de ceux-ci à partir des GSLs est nécessaire. Pour cela, 10 g de chou cryobroyé sont mis en contact avec 10 mL d'eau milliQ dans un tube polypropylène à fond conique de 50 mL (Falcon BD, Le Pont de Claix, France). L'ensemble est placé 1h à température ambiante sous agitation constante pour s'assurer de la conversion des GSLs en ITCs.

1.3 Extraction et analyse des isothiocyanates

Les méthodes développées dans cette partie, ont d'abord été testées sur des étalons puis sur la matrice alimentaire dopée avec un mélange standard d'ITCs.

1.3.1 Extraction liquide/liquide

1.3.1.1 Protocole d'extraction

Le protocole d'ELL est une adaptation de celui développé par Liang *et al* pour l'analyse de sulforaphane et modifié par nos soins. En raison de la complexité de la matrice alimentaire, deux protocoles ont été testés afin de choisir le plus efficace pour l'extraction de l'ensemble des ITCs contenus dans les échantillons. La **figure 20** présente un schéma récapitulatif des variantes des 2 protocoles.

Protocole 1 : Les ITCs formés après hydrolyse sont extraits avec 5 mL de dichlorométhane. Le mélange est agité au vortex puis centrifugé (2571 g pendant 5 min à 20°C) afin de séparer la phase aqueuse de la phase organique. Cette dernière est récupérée dans un erlenmeyer de 50 mL. La phase aqueuse restante est re-extraite 3 fois avec 5 mL de dichlorométhane. La fraction organique est séchée avec environ 250 mg de Na_2SO_4 puis transvasée dans une ampoule de 25 mL après filtration sur papier (Whatman, GmbH, Dassel Allemagne). Le dichlorométhane est évaporé sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (30°C , 600 mpa).

Protocole 2 : Après hydrolyse des GSLs, 1 mL d'éthanol ainsi que 10 mL de dichlorométhane sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est agité 15 min avec un agitateur rotatif type RM Multi-1 (StarLab, Bagneux, France) afin d'augmenter la surface de contact entre la phase aqueuse et la phase organique et de favoriser la diffusion des ITCs au sein de chaque phase. Ensuite, la

séparation des 2 phases est réalisée par centrifugation (2571 g pendant 5 min à 20°C). La phase organique est récupérée dans un erlenmeyer puis la phase aqueuse restante est re-extraite 3 fois avec 10 mL de dichlorométhane. La fraction organique est séchée avec du Na₂SO₄ puis filtrée avant évaporation du dichlorométhane.

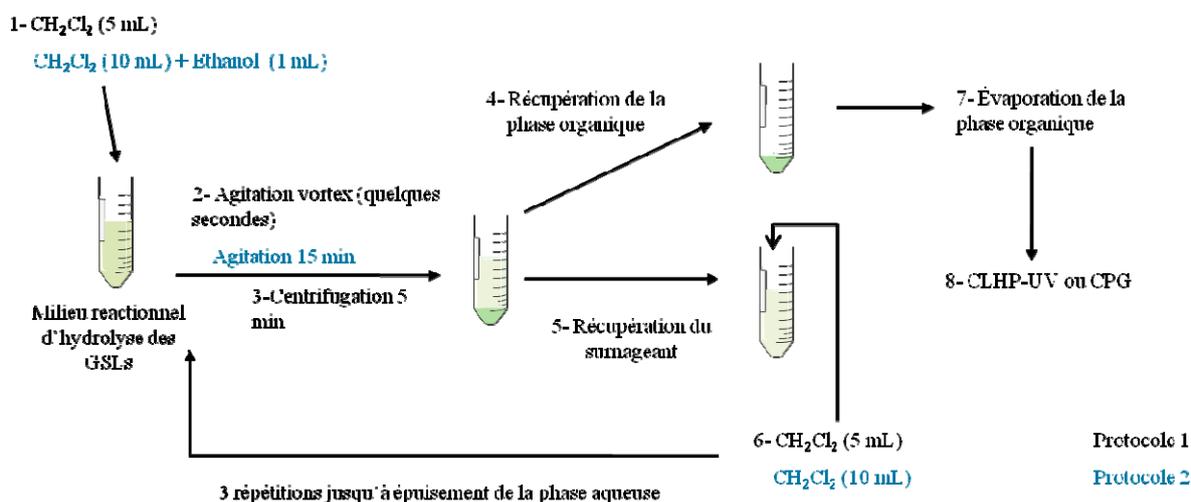


Figure 20 : Protocoles d'extraction liquide/liquide des isothiocyanates à partir de chou blanc

Selon l'analyse chromatographique effectuée, le dichlorométhane est évaporé avec ou sans transfert de phase.

1.3.1.2 Analyses

Les systèmes chromatographiques utilisés sont les mêmes que ceux décrits dans la partie A. Pour une analyse CLHP avec la méthode de dérivation pré-colonne au mercaptoéthanol, le dichlorométhane est évaporé jusqu'à 2 mL. L'extrait est soumis à la réaction de dérivation puis les ITCs dérivés sont analysés avec une détection UV et par spectrométrie de masse. Pour une analyse CLHP avec la méthode de chauffage de colonne, 1 mL d'acétonitrile est ajouté à la phase organique puis le dichlorométhane est évaporé complètement pour un transfert de phase des ITCs vers l'acétonitrile. Les ITCs extraits sont ensuite analysés comme décrit précédemment. Pour une analyse par CPG, le solvant est évaporé jusqu'à 1 mL, l'extrait est filtré puis analysé comme décrit dans la partie A.

L'identification des ITCs présents dans la matrice alimentaire a été effectuée par comparaison des temps de rétention, des spectres UV et de masse avec ceux des étalons.

La quantification des ITCs dans les extraits, a été réalisée avec la méthode de chauffage de colonne et en effectuant une calibration externe. Pour chaque composé testé, une gamme d'étalonnage dans l'acétonitrile, a été préparée avec des concentrations comprises entre 2 et 100 µg/mL. Les

équations de courbe de régression obtenues sont utilisées pour déterminer la concentration en ITCs dans les différents extraits. Les rendements d'extraction ainsi que les taux de recouvrement (exprimés sous la forme pourcentage moyen \pm écart-type), ont été déterminés avec des échantillons dopés, par ajout de 25 μ L de solution A.

1.3.2 Extraction sur phase solide

Pour cette étude, nous nous sommes inspirés de publications scientifiques décrivant des méthodes de sélection de cartouche d'extraction sur phase solide pour la purification de substances d'intérêt (125,126).

1.3.2.1 Etapes préliminaires: choix des cartouches d'extraction

Dans un premier temps, notre objectif était de choisir la phase solide la mieux adaptée à l'extraction de plusieurs ITCs ayant des structures chimiques différentes. Le choix de la colonne est défini par le volume de l'échantillon, la concentration en analytes et les types d'échanges recherchés. C'est ainsi que 12 cartouches d'extraction composées de différentes phases solides (**Tableau 15**), ont été sélectionnées et testées avec des protocoles identiques.

Tableau 15 : Tableau récapitulatif des cartouches d'extraction testées

Nom commercial	Composition de la phase solide	Fournisseur
Oasis HLB (200 mg)	Poly DVB-co-N-vinylpyrrolidone	Waters (Guyancourt, France)
Strata X (200 mg)	PS-DVB ^b	Phenomenex (Le Pecq, France)
Strata C18-E (200 mg)	Si-C18	Phenomenex (Le Pecq, France)
Strata C18-U (200 mg)	Si-C18	Phenomenex (Le Pecq, France)
Atoll XC (200mg)	PS-DVB	Interchim (Montluçon, France)
Bond Elut Plexa (200 mg)	PS-DVB fonctionnalisé avec des groupements hydroxyles et amides	Varian (Les Ulis, France)
SampliQ OPT (150 mg)	DVB fonctionnalisé avec des amides	Agilent (Les Ulis, France)
SampliQ DVB (150mg)	DVB ^a	Agilent (Les Ulis, France)
Chromabond PA (200mg)	Polyamide	Macherey Nagel (Hoerdt, France)
Chromabond Easy (200 mg)	PS-DVB	Macherey Nagel (Hoerdt, France)
Supelclean Envi-carb (250 mg)	Carbone graphite poreux	Supelco (Bellefonte, USA)
HyperSep Retain-PEP (200 mg)	PS-DVB fonctionnalisé avec de l'urée	Thermo Fischer (Courtaboeuf, France)

^aDVB : Divinylbenzène

^bPS-DVB : polystyrène-divinylbenzène

Deux protocoles d'extraction ont été utilisés.

Protocole A : Après conditionnement de la cartouche avec 5 mL de méthanol et 5 mL d'eau ultra-pure, 10 mL d'eau additionnée de 25 µL de solution B d'ITCs sont déposés. La cartouche est lavée 2 fois avec 5 mL d'un mélange eau/méthanol (95/5 v:v). Enfin, l'élution des ITCs retenus sur la cartouche est effectuée 3 fois avec 2 mL de méthanol puis 2 fois avec 2 mL de dichlorométhane. Les 5 fractions d'élution sont collectées individuellement dans des flacons de 10 mL et nommées de E1 à E5. Après ajout d'une solution éthanolique d'HitC à 2mg/mL (25 µL), les fractions sont analysées par CPG/FID.

Protocole B : Après conditionnement de la cartouche avec 5 mL de méthanol et 5 mL d'eau ultra-pure, 10 mL d'eau additionnée de 25 µL de solution B d'ITCs sont déposés. La cartouche est lavée avec 5 mL d'un mélange eau/méthanol (95/5 v:v). La cartouche est séchée pendant une minute sous vide pour éliminer le maximum de solvant de lavage. Enfin, l'élution des ITCs retenus sur la cartouche est effectuée 3 fois avec 2 mL de dichlorométhane. Les 3 fractions d'élution sont collectées

individuellement dans des flacons de 10 mL. Après ajout d'une solution éthanolique d'HITC à 2 mg/mL (25 µL), les fractions sont analysées par CPG-FID.

1.3.2.2 Application au chou

Afin d'appliquer la méthode d'extraction au chou, nous avons réduit la prise d'essai à 5 g de matrice additionnée de 5 mL d'eau. Des cartouches de 1 g ont été utilisées pour éviter le colmatage de la cartouche lors du dépôt d'échantillon alimentaire.

Le conditionnement de la cartouche a été réalisé avec 10 mL de méthanol puis 10 mL d'eau. Le milieu réactionnel d'hydrolyse des GSLs en ITCs placé dans un tube en verre de 20 mL est centrifugé (2571 g pendant 5 min à 20°C). Le surnageant est déposé sur la cartouche d'extraction puis 5 mL d'eau additionnée de 1 mL d'éthanol sont ajoutés au culot contenant des débris de chou. Le mélange est agité au vortex puis centrifugé. Le surnageant est également déposé sur la cartouche. Le culot est ainsi lavé 4 fois de suite. Après le rinçage de la cartouche avec 5 mL d'un mélange eau/méthanol (95/5 v:v), la phase solide est séchée pendant une minute sous vide. L'élution des ITCs retenus sur la cartouche est effectuée 3 fois avec 2 mL de dichlorométhane. Les 3 fractions d'élution sont collectées individuellement dans des flacons de 10 mL. Après ajout d'une solution éthanolique d'HITC à 2 mg/mL (25 µL), les fractions sont analysées par CPG/FID (voir partie A).

1.3.2.3 Analyse quantitative

L'analyse quantitative des ITCs a été effectuée par étalonnage interne et le HITC est choisi comme étalon interne. La quantification d'ITCs (Q_{ITC}) dans les solutions à analyser, a été réalisée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Equation 1 : } [Q_{ITC}] = (Q'_{HITC} / FR) \times (A_{ITC} / A_{HITC})$$

Dans cette équation, Q'_{HITC} représente la quantité (µg) d'HITC ajoutée dans la solution injectée; FR correspond au facteur de réponse de l'ITC d'intérêt par rapport au HITC ; A_{ITC} et A_{HITC} représentent les aires des pics de l'ITC et du HITC respectivement. Les rendements d'extraction ainsi que les taux de recouvrement (échantillons dopés par ajout de 25 µL de solution B) sont exprimés sous la forme de pourcentage moyen ± écart-type. Chaque analyse est répétée au moins 3 fois.

Les données sont soumises à une analyse de variance à un facteur contrôlé (One-Way ANOVA) en utilisant le test de la plus petite différence significative pour la comparaison des moyennes. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Statgraphics plus version 5.1.

1.3.3 Extraction par solvant pressurisé

1.3.3.1 Protocole d'extraction

L'extraction a été réalisée avec un système ASE 350 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) (**Figure 21**). Dans le cas des légumes frais, les ITCs formés après hydrolyse des GSLs étant dans un milieu aqueux, il a fallu trouver un dispersant qui permette un bon contact entre les composés d'intérêt et le solvant d'extraction sans toutefois les retenir. Nous avons donc choisi la terre de diatomée (Merck, Darmstadt, Allemagne) car elle absorbe bien l'eau et permet de réduire le volume de solvant utilisé pendant l'extraction (127) ; le dichlorométhane a été choisi comme liquide d'extraction en raison de l'affinité des ITCs pour ce solvant.



Figure 21 : Extracteur par Solvant pressurisé, ASE 350

- Essais sur des étalons

Dans une cellule d'extraction de 33 mL, sont ajoutés successivement un filtre (30 mm de diamètre) à base de fibre de cellulose (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), 1 cm de sable de fontainebleau (VWR, Geldenaaksebaan, Belgique), 10 g de terre de diatomée, 10 mL d'eau dopée avec 25 µL de solution A d'ITCs dans de l'éthanol et enfin 1 cm de sable de fontainebleau. La cellule est chauffée à 45°C. Une pression de 100 bar est appliquée à la cellule d'extraction pour maintenir le solvant chauffé à l'état liquide durant l'extraction. La purge est réalisée avec de l'azote (Air liquide, France). Le temps de contact du solvant dans la cellule d'extraction a été fixé à 10 min puis la fraction organique

en sortie de cellule est recueillie dans un flacon en verre de 60 mL. Chaque cellule est extraite 2 fois. Un gramme de Na_2SO_4 est ajouté dans le flacon pour sécher la phase organique. Après filtration et récupération de la phase organique dans une ampoule d'évaporation, 1 mL d'ACN est ajouté puis le dichlorométhane est évaporé sous pression réduite (30°C , 600 mpa) à l'évaporateur rotatif. Les ITCs extraits sont ensuite analysés avec la méthode CLHP avec chauffage de colonne. L'expérience a été répétée 3 fois.

- Application au chou

Après l'étape d'hydrolyse des GSLs en ITCs, le milieu réactionnel constitué de 10 g de chou et de 10 mL d'eau, est introduit dans une cellule d'extraction (33mL) dans laquelle sont introduits au préalable du sable de fontainebleau (1 cm) et 10 g de terre de diatomée. Avant de fermer la cellule, une 2^{ème} couche de sable de fontainebleau (1 cm) est ajoutée. La méthode d'extraction et l'analyse chromatographique des extraits sont les mêmes que précédemment. Pour déterminer l'efficacité de la méthode d'extraction, des taux de recouvrement ont été évalués par ajout de 25 μL de solution éthanolique A d'ITCs dans l'échantillon de chou avant extraction.

1.3.3.2 Analyse quantitative

Les concentrations en ITC dans l'extrait sont calculées à partir des équations des droites d'étalonnage établies pour chaque ITC étudié. Une gamme d'étalonnage dans l'acétonitrile, a été préparée avec des solutions d'ITCs standards de concentration variant de 2 à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les rendements d'extraction ainsi que les taux de recouvrement sont exprimés sous la forme (pourcentage moyen \pm écart-type). Les expériences ont été répétées plusieurs fois ($n \geq 6$).

2. Résultats et discussion

L'objectif de ce chapitre était de comparer les 3 méthodes d'extraction et de choisir la plus efficace pour extraire qualitativement et quantitativement les ITCs présents dans les échantillons alimentaires.

2.1 Extraction liquide/liquide

2.1.1 Courbes d'épuisement

La méthode d'extraction liquide/liquide au dichlorométhane a été mise au point sur un ensemble d'ITCs ayant des structures chimiques variées. Nous avons cherché dans un premier temps à évaluer le nombre d'extractions nécessaires à l'épuisement des échantillons en ITCs. Pour cela, des rendements ont été calculés après chaque extraction et des courbes d'épuisement ont été tracées (Figure 22).

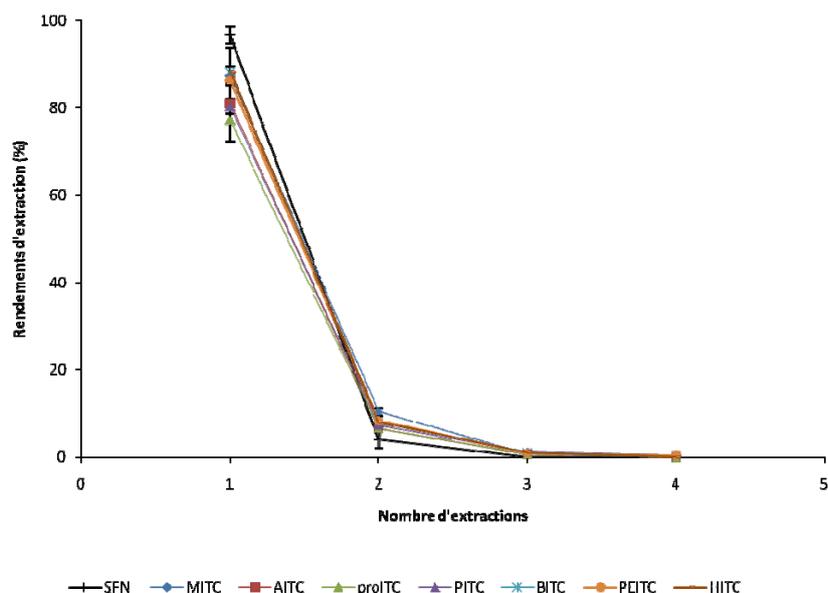


Figure 22 : Rendements d'extraction de 8 ITCs (SFN, MITC, AITC, proITC, BITC, PITC, HITC, PEITC) après chaque extraction successive au dichlorométhane.

En analysant les résultats obtenus, il apparaît que 4 extractions successives au dichlorométhane sont suffisantes pour récupérer plus de 95% d'ITCs. D'autres solvants d'extraction ont été testés tels que le chloroforme, l'acétate d'éthyle, et un mélange dichlorométhane/chloroforme (50/50) afin d'extraire quasi totalement les substances d'intérêt avec un volume réduit de solvant. Cependant, les résultats n'étaient pas meilleurs, les rendements d'extraction obtenus étaient compris entre 34% à 88% voire même nuls pour les ITCs aliphatiques. Ces faibles rendements d'extraction

s'expliquent par des pertes d'ITCs par volatilisation. Il faut savoir que le chloroforme et l'acétate d'éthyle ont des températures d'ébullition respectivement de 61°C et 77°C, alors que celle du dichlorométhane est de 40°C. Au cours de l'étape de concentration des extraits, pour évaporer le chloroforme et l'acétate d'éthyle à l'évaporateur rotatif à 30°C, il est nécessaire de réduire la pression en dessous de 200 mpa, ce qui a entraîné des pertes des ITCs volatils. Ces résultats sont en accord avec ceux de Matthäus *et al* (110) qui ont démontré que les conditions d'évaporation (pression et température) peuvent avoir une influence sur les rendements d'extraction des ITCs. Pour l'extraction liquide/liquide des ITCs, le dichlorométhane est le solvant le plus efficace comme l'ont montré Wu *et al* (102).

2.1.2 Application au chou

2.1.2.1 Analyse qualitative

Les extraits obtenus à partir de chou ont été analysés par CLHP (méthode de dérivation pré-colonne au mercaptoethanol et méthode de chauffage de colonne). Ces analyses ont montré la présence d'AITC et de SFN (**Figure 23**). Pour les analyses par CLHP, les temps de rétention, les spectres UV et de masses des ITCs identifiés sont comparables à ceux des pics de références. Les extraits ont également été analysés par CPG-FID et CPG-MS (**Figure 24**) et l'utilisation de la base de données NIST Library qui compare les spectres de masse de composés inconnus aux spectres de masse de composés de référence, a confirmé la présence de ces composés. Par ailleurs ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres auteurs (99,128).

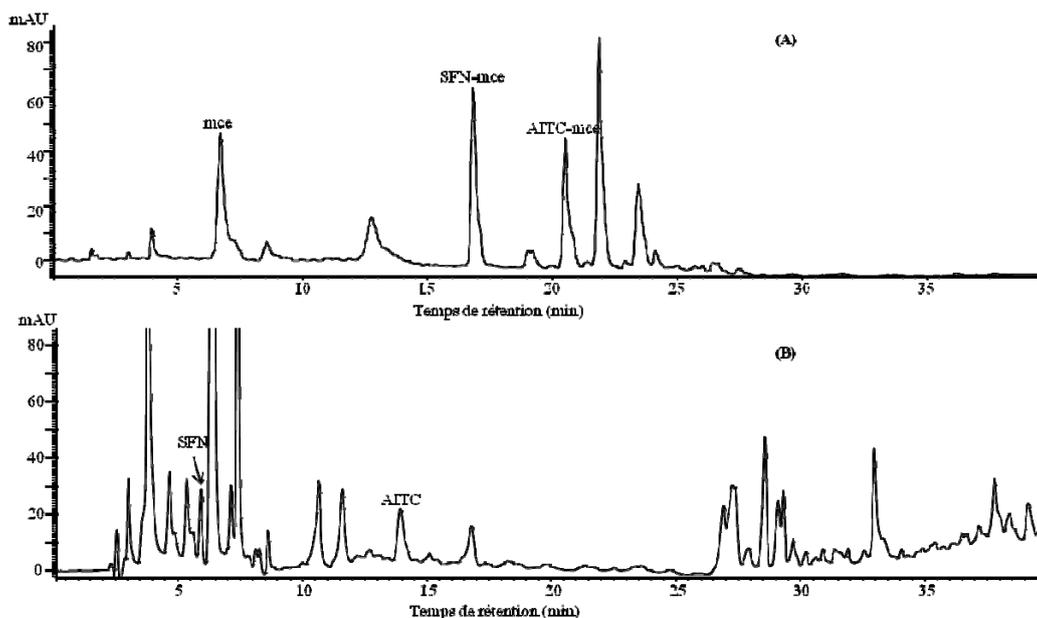


Figure 23 : Chromatogrammes d'extrait de chou blanc au dichlorométhane analysé par CLHP en phase inverse avec : (A) la méthode de dérivation pré-colonne au mercaptoethanol. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne Nucleosil C18 avec un gradient de phase mobile à base d'acétonitrile et d'eau. Les ITCs dérivés sont détectés à 271 nm ; (B) la méthode de chauffage de colonne. Les ITCs sont analysés sur une colonne C18 Xbridge. La colonne est chauffée à 60°C. La phase mobile est à base d'eau et d'acétonitrile. Les ITCs sont détectés à 245 nm.

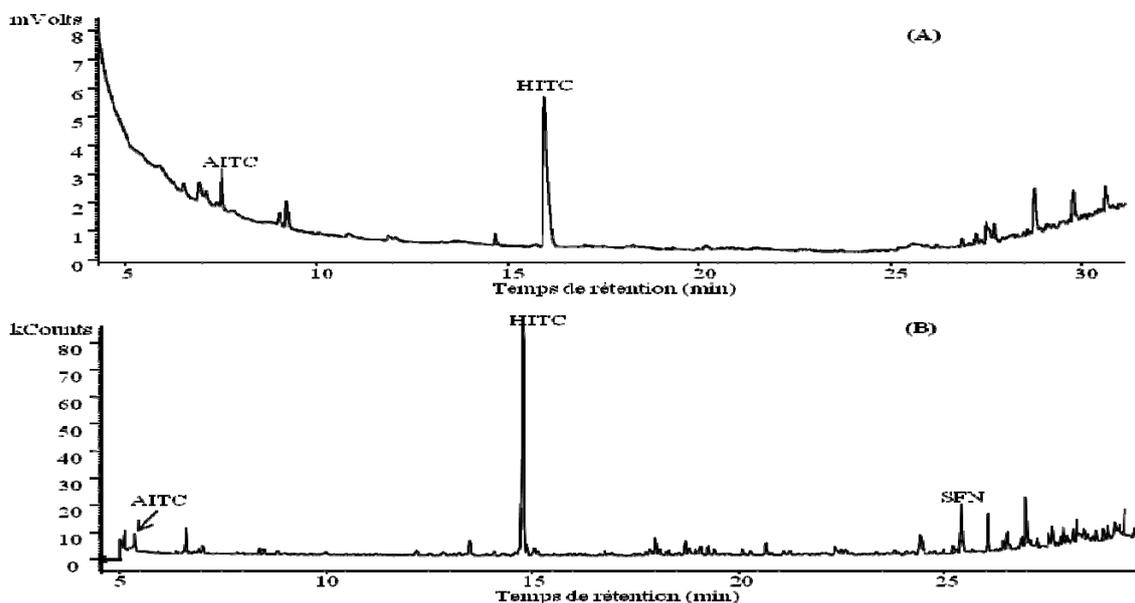


Figure 24 : Chromatogrammes d'ITCs extraits du chou blanc analysés par CPG sur 2 colonnes (A) CP-Sil 24CB-MS avec une détection par FID, (B) VF-5MS avec une détection par spectrométrie de Masse.

2.1.2.2 Analyse quantitative

Deux protocoles d'extraction ont été testés sur un échantillon alimentaire dopé avec un mélange standard d'ITCs pour calculer les taux de recouvrement de chaque ITC et ainsi évaluer l'efficacité de la méthode d'extraction (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Taux de recouvrement moyens des ITCs dans le chou blanc en fonction du protocole d'ELL utilisé

ITC	Taux de recouvrement (%)*	
	Protocole 1	Protocole 2
SFN	62,3 ± 2,7	102,1 ± 0,9
MITC	56,7 ± 5,0	106,8 ± 3,5
AITC	42,5 ± 1,2	102,3 ± 5,2
proITC	34,9 ± 0,5	93,6 ± 4,6
BITC	36,7 ± 0,5	130,9 ± 5,3
PEITC	15,7 ± 8,6	95,5 ± 2,5
PITC	18,2 ± 8,8	117,9 ± 0,8
HITC	20,3 ± 4,2	100,6 ± 0,9

*Moyenne ± écart type (n=3)

Avec le protocole 1 inspiré de Liang *et al*, les taux obtenus sont faibles ($\leq 62,3\%$) voire inférieurs à 30% pour certains ITCs. Ce sont principalement les ITCs les moins solubles dans l'eau qui présentent les taux de recouvrement les plus bas. Il est fort probable que ces ITCs précipitent dans la phase aqueuse. De plus, nous avons remarqué qu'un précipité se forme systématiquement à l'interface des 2 phases (**Figure 25**) et piège le dichlorométhane, ce qui est gênant pour l'extraction d'où les faibles taux de recouvrement obtenus pour l'ensemble des ITCs. Ces résultats ne sont pas satisfaisants et démontrent que ce protocole d'ELL ne permet pas d'extraire les ITCs.

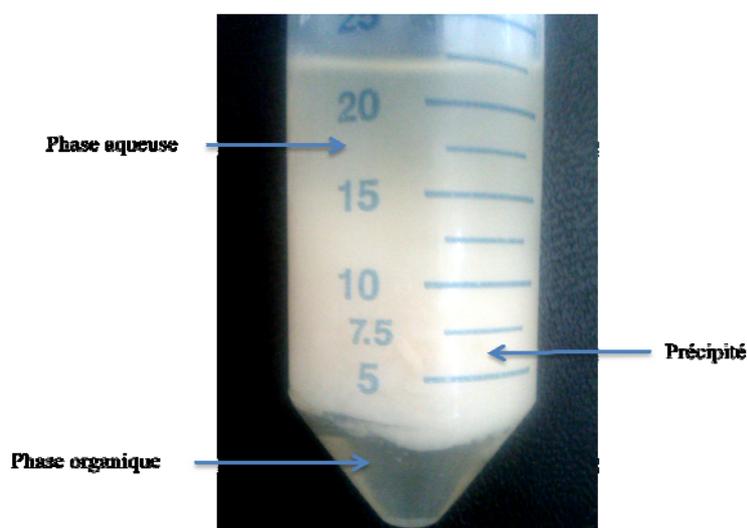


Figure 25 : Formation de précipité au cours de l'ELL du chou blanc.

La filtration ou la centrifugation du milieu réactionnel ne suffisent pas à améliorer ces rendements. C'est pourquoi un deuxième protocole avec modification du volume de solvant d'extraction, du temps et de la surface de contact entre la phase organique et la phase aqueuse, a été testé. D'après les résultats figurant au **tableau 16**, les taux de recouvrement sont satisfaisants ($\geq 93,6\%$) et nettement meilleurs que ceux obtenus avec le protocole 1. En effet, on observe une nette augmentation de ces taux essentiellement pour les composés faiblement solubles dans l'eau tels que le PEITC, le PITC et le HITC qui passent de 15,7%, 118,2% et 20,3% à 95,5%, 117,9% et 100,6% respectivement. Le BITC donne un taux de recouvrement de 130,9%. On pourrait croire qu'il ya une surestimation de la quantité de ce composé liée à la présence d'interférences. La comparaison des profils chromatographiques de l'extrait de chou blanc et celui des 8 ITCs ainsi que l'analyse d'un blanc (injection d'acétonitrile), n'ont pas révélé la présence d'interférence au niveau du pic de BITC.

L'augmentation du volume de dichlorométhane ainsi que l'ajout d'éthanol ont permis de réduire la formation de précipité à l'interface des phases organique et aqueuse. De plus, l'augmentation du temps et de la surface de contact entre ces 2 phases, ont facilité la solubilisation et l'extraction des ITCs faiblement solubles dans la phase aqueuse. Ces résultats prouvent que le 2^{ème} protocole d'ELL mis au point est efficace pour l'extraction des ITCs formés après hydrolyse des GSLs.

2.2 Extraction sur phase solide

2.2.1 Choix de la cartouche d'extraction

Pour cette étude, en raison de la variété d'ITCs étudiés, nous avons choisi de travailler sur des phases solides souvent utilisées pour l'extraction à la fois de composés polaires et apolaires. Dans un premier temps, le protocole A a été utilisé pour chaque cartouche et des rendements d'extraction ont été calculés (**Tableau 17**).

Tableau 17 : Tableau récapitulatif des rendements d'extraction des ITCs obtenus avec les 12 cartouches d'extraction et avec le protocole A

Cartouches d'extraction testées	Rendements moyens (%)*					
	MITC	AITC	proITC	PITC	BITC	PEITC
Oasis HLB	88,7 ± 6,7	87,9 ± 6,7	86,7 ± 7,5	92,1 ± 17,9	95,6 ± 13,8	93,5 ± 10,2
Strata X	89,4 ± 11,1	73,1 ± 12,6	78,8 ± 8,4	73,1 ± 16,1	89,1 ± 6,6	85,1 ± 13,3
Strata C18-E	3,5 ± 1,0	72,2 ± 11,3	68,8 ± 10,1	65,2 ± 4,9	93,2 ± 12,3	95,6 ± 13,1
Strata C18-U	1,2 ± 0,6	78,8 ± 1,1	70,9 ± 1,5	88,8 ± 2,8	107,4 ± 2,4	110,3 ± 5,1
Atoll XC	69,8 ± 2,9	79,2 ± 1,3	68,1 ± 7,1	86,7 ± 12,7	85,7 ± 12,0	81,0 ± 8,3
Bond Elut Plexa	88,9 ± 13,9	73,2 ± 13,1	69,7 ± 13,5	67,1 ± 10,6	86,6 ± 8,0	82,6 ± 13,1
Chromabond Easy	78,1 ± 5,0	73,6 ± 3,0	75,0 ± 1,7	66,2 ± 7,1	83,2 ± 5,4	65,8 ± 4,5
Chromabond PA	ND ^a	11,9 ± 2,4	12,8 ± 1,6	54,9 ± 5,9	85,8 ± 11,4	83,2 ± 8,9
SampliQ DVB	79,5 ± 6,2	70,8 ± 3,2	67,51 ± 4,4	54,4 ± 10,8	74,0 ± 4,3	60,2 ± 10,8
SampliQ OPT	31,5 ± 3,1	68,2 ± 4,3	65,8 ± 4,7	73,2 ± 3,2	87,2 ± 5,2	88,8 ± 7,6
Envicarb	0,5 ± 0,9	63,5 ± 8,7	67,7 ± 9,2	73,8 ± 13,1	101,2 ± 5,0	100,0 ± 4,2
Hypersep retain SPE	81,5 ± 2,9	73,9 ± 2,5	73,2 ± 3,6	69,4 ± 8,4	88,8 ± 5,6	79,5 ± 0,6

*Moyenne ± écart-type (les rendements inférieurs à 60% sont en gras); ^aND : non détecté

L'analyse des résultats a montré que les rendements d'extractions varient en fonction de la nature de la phase solide et en fonction de la structure chimique des ITCs. Certaines cartouches telles que la Strata C18-E, la strataC18-U, la Chromabond PA, SampliQ DVB, SampliQ OPT et l'Envicarb, ont présenté des rendements inférieurs à 60%, voire même très faibles ($\leq 3,5\%$). Ces faibles valeurs s'expliquent par le fait que les ITCs aliphatiques et principalement le MITC, ne sont pas assez retenus sur la phase solide et sont parfois élués dès les étapes de dépôt d'échantillon ou de lavage de la cartouche. Par contre, ces phases solides semblent plus adaptées aux ITCs aromatiques (BITC et le PEITC). En effet, à l'exception de la cartouche SampliQ DVB, les rendements d'extraction sont élevés ($\geq 83,2\%$).

L'extraction par SPE des ITCs va dépendre de leur affinité pour la phase solide. Plus cette affinité est grande, plus l'extraction sera efficace. L'affinité entre les ITCs et la phase solide varie en fonction du type d'interactions mise en jeu entre l'ITC et l'adsorbant (liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes, liaisons π - π etc...), et de l'énergie de cette interaction. La polarité des composés (présence ou non de groupements polaires), l'emplacement des sites polaires et la géométrie de la molécule (linéarité et planéité) interviennent également dans les phénomènes d'adsorption (129,130). Ainsi, les composés ayant moins d'affinité pour la phase solide comme les ITCs aliphatiques, y sont moins bien retenus. Alors que les composés moins polaires tels que les ITCs aromatiques auront plus d'affinités avec ces phases solides et y formeront des interactions plus fortes.

En ce qui concerne les autres cartouches (Oasis HLB, StrataX, AtollX, Bond Elut Plexa, Chromabond easy, et Hypersep retaine SPE), elles ont donné des rendements d'extraction compris entre 65,8% à 95,6% pour les ITCs testés (**Figure 26**). Ces phases solides, toutes à base de polymères, présentent un meilleur pouvoir de rétention que les autres. Ce fort caractère de rétention, est lié au fait qu'elles sont hydrophobes et possèdent une plus grande surface d'échange avec les analytes cibles (131). La comparaison des rendements d'extraction de chaque ITC par une même cartouche montre que pour les phases solides StrataX, Atoll X, Chromabond easy et Hypersep Retain SPE, les valeurs obtenues sont significativement différentes d'un ITC à l'autre. Ces phases n'extraient pas les ITCs avec la même affinité. C'est le cas par exemple de la cartouche Atoll X qui extrait mieux le PITC et le BITC par rapport aux autres ITCs. En ce qui concerne les cartouches Oasis HLB et Bond Elut Plexa, elles extraient tous les ITCs testés avec la même affinité, et présentent des valeurs moyennes d'extraction de 90,8% et 78,1%, respectivement.

Parmi toutes les phases testées, c'est la cartouche Oasis HLB qui a donné les résultats les plus intéressants (rendements compris entre 88,7% et 95,6% pour tous les ITCs). Elle a permis d'extraire avec la même affinité les ITCs aliphatiques et aromatiques. Cette capacité d'extraction de la cartouche Oasis HLB, est liée à un équilibre hydrophobie-hydrophilie dû à la combinaison divinylbenzene et N-vinylpyrrolidone. Cet équilibre améliore la surface de contact entre l'échantillon aqueux et la surface de l'adsorbant qui est un peu moins hydrophobe que les autres phases solides à base de polymère (131).

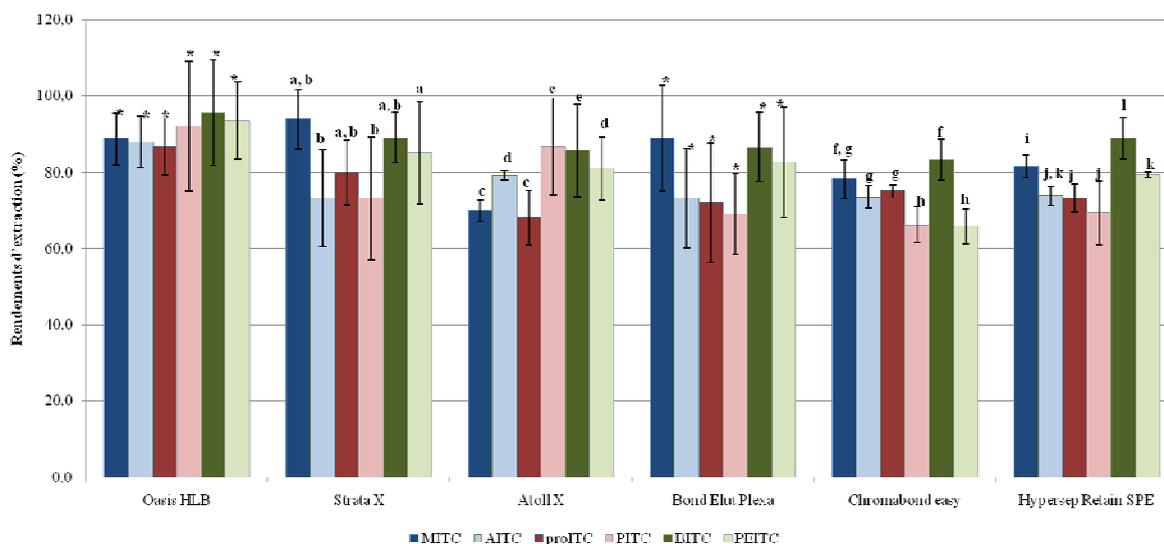


Figure 26 : Représentation graphique des rendements d'extraction d'ITCs sur les 6 cartouches SPE les plus efficaces après application du protocole A. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm écart-type. Pour chaque cartouche, les rendements d'extractions des ITCs donnés avec des lettres différentes (de a à l) sont significativement différents ($P < 0,05$). Par contre, les rendements donnés avec un (*) ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$).

En étudiant les rendements obtenus avec le protocole A dans chaque fraction organique avec la cartouche Oasis HLB (**Figure 27A**), on remarque qu'avec la première élution au méthanol, les ITCs aliphatiques sont récupérés en majorité. La deuxième élution permet de récupérer le reste de ces ITCs, et une partie d'ITCs aromatiques. La troisième élution au méthanol n'a pas permis d'éluer la totalité des ITCs aromatiques. Il faudra 2 éluions au dichlorométhane pour récupérer le reste de ces ITCs, ce qui démontre la forte affinité de ces composés pour cette phase solide. L'utilisation du protocole A inspiré de la bibliographie, nécessite donc plusieurs étapes d'élution pour récupérer la totalité des ITCs présents dans les échantillons.

Pour tenter de réduire le nombre d'élution, nous avons testé le protocole B qui a consisté à éluer les ITCs avec uniquement du dichlorométhane. Les rendements d'extraction des 3 fractions organiques obtenus après élution au dichlorométhane sont illustrés sur la **figure 27B**. Les résultats montrent que 2 éluions avec le dichlorométhane suffisent pour récupérer la totalité des ITCs fixés sur la cartouche. On remarque également que plus la chaîne latérale de l'ITC est longue, plus la première extraction est importante. C'est le cas du PEITC, le plus apolaire des ITCs testés, qui présente le rendement d'extraction le plus élevé dans la première fraction d'élution au dichlorométhane.

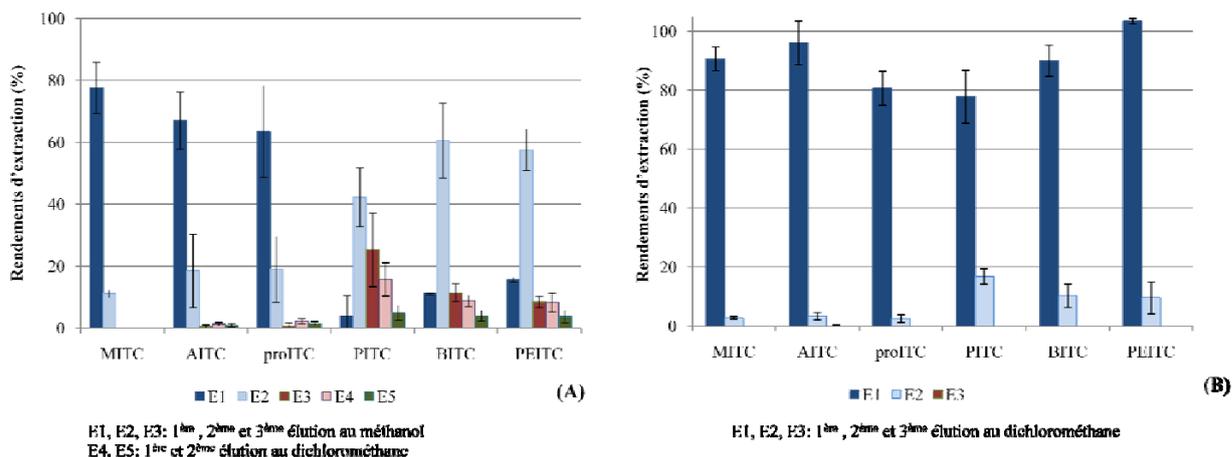


Figure 27 : Représentation graphique des rendements d'extraction d'ITCs de chaque fraction d'élution sur la cartouche Oasis HLB avec le protocole A (A) et le protocole B (B).

Ces constats supposent que sur cette phase solide, la force d'élution du dichlorométhane est plus importante que celle du méthanol. Il faut savoir que l'élution d'un composé fixé sur une phase solide va dépendre d'un ensemble d'interactions intermoléculaires « éluants-solutés » et « éluants adsorbants » (129). Les liaisons « éluant-adsorbant » naissent lorsque les molécules de l'éluant se substituent à celles des solutés sur les sites de l'adsorbant et résultent des mêmes interactions intervenant dans le phénomène d'adsorption des analytes. Selon l'énergie des forces d'adsorption des molécules de solvant vis-à-vis de l'adsorbant, le solvant va pouvoir briser l'interaction « soluté-adsorbant » et le soluté sera élué de la cartouche. Il est fort probable que l'énergie d'adsorption des molécules du dichlorométhane sur la cartouche Oasis HLB est plus importante que celle des molécules du méthanol. Ainsi le dichlorométhane parvient à « décrocher » plus rapidement les ITCs fixés sur l'adsorbant. Ces résultats sont en accord avec la littérature scientifique rapportant que sur une phase inverse, plus un solvant est apolaire (hydrophobe), plus sa force d'élution sera importante (131,132). De même, les composés hydrophobes sont plus rapidement élués que ceux qui ont une hydrophobie moins importante. Grâce au protocole B, on parvient à éluer la totalité des ITCs avec 2 éluations au dichlorométhane et s'affranchir ainsi des 3 étapes supplémentaires d'élution au méthanol du protocole A.

2.2.2 Application au chou

La méthode SPE précédemment mise au point, a été utilisée pour l'extraction des ITCs du chou. Une analyse chromatographique en CPG de cet extrait a montré la présence d'AITC (**Figure 28**).

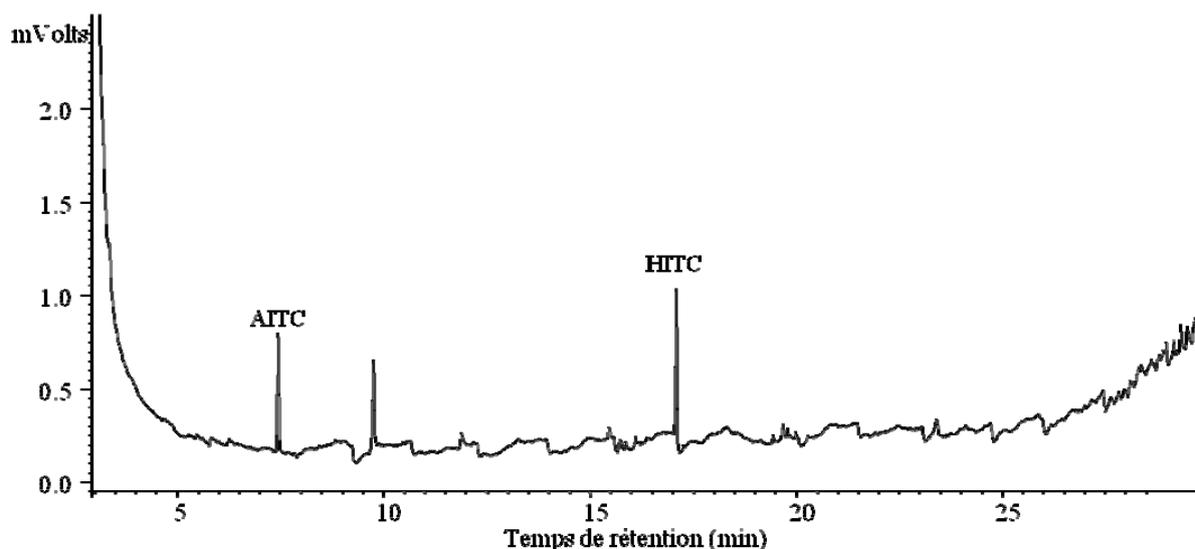


Figure 28 : Profil chromatographique d'un extrait de chou blanc analysé par CPG-FID après SPE sur une cartouche Oasis HLB.

Pour vérifier l'efficacité de la méthode, l'extraction est réalisée sur des échantillons de chou dopés en ITCs. Les premiers essais d'extraction ont été réalisés sur des échantillons filtrés après l'étape d'hydrolyse des GSLs en ITCs, pour se débarrasser des débris de chou. Cependant, les résultats n'étaient pas satisfaisants car les taux de recouvrement étaient inférieurs à 40% voir même nuls pour les ITCs aromatiques, les plus hydrophobes. Ces composés n'ont pas été récupérés en totalité parce qu'ils ont précipité et ont été retenus dans les débris de chou ou sur le filtre. L'autre alternative proposée, a été de centrifuger le milieu réactionnel d'hydrolyse puis de laver le culot de débris de chou 5 fois successivement avec de l'eau pour pouvoir récupérer au fur et à mesure les ITCs. Nous avons cherché à évaluer le nombre de lavages nécessaire à l'épuisement des ITCs dans la matrice. Après chaque lavage, le surnageant est déposé et extrait sur des cartouches différentes pour déterminer les taux de recouvrement et tracer les courbes d'épuisement en ITCs de la matrice (**Figure 29**). De plus, pour vérifier la présence d'ITCs résiduels après les 5 lavages, le culot est extrait au dichlorométhane.

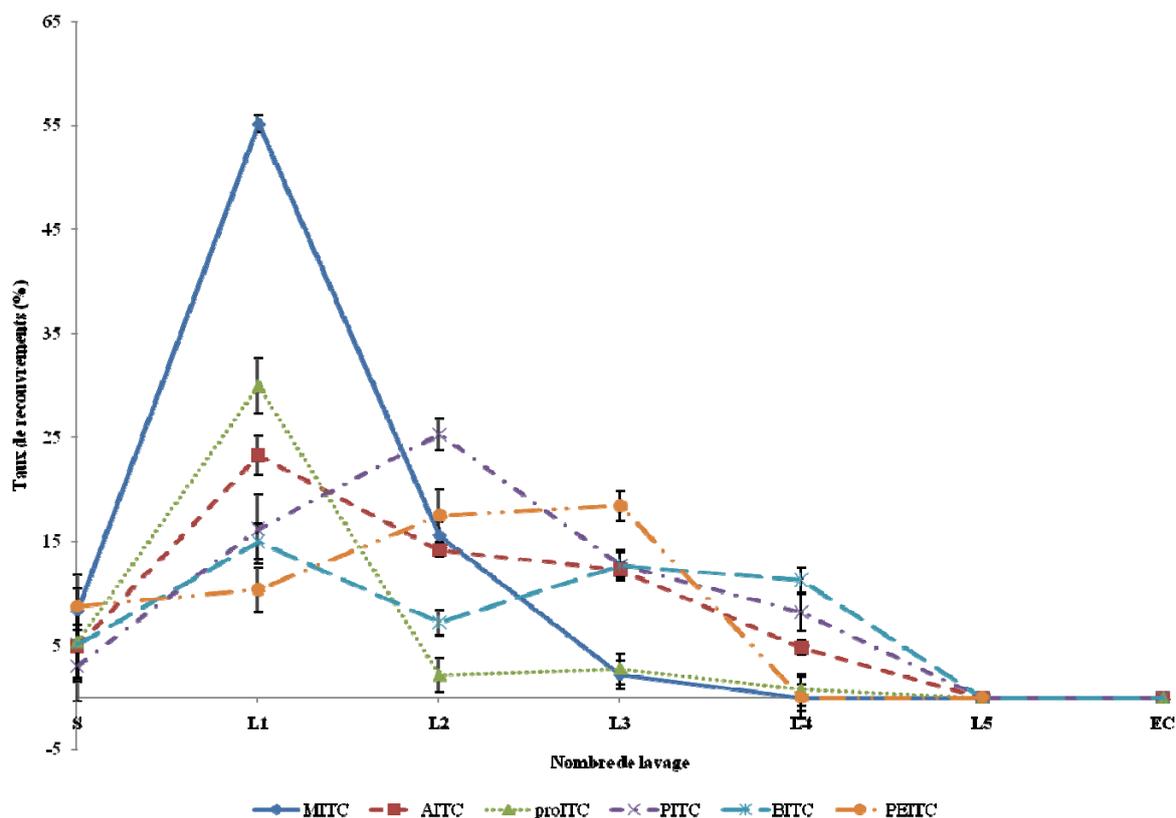


Figure 29 : Taux de recouvrement des ITC dans le milieu réactionnel centrifugé et dans chaque eau de lavage du culot. S : sans lavage du culot, L1 à L5 : 1^{er} au 5^{ème} lavage, EC : Extraction au dichlorométhane du culot.

En analysant les résultats, il apparaît que 4 lavages successifs sont nécessaires pour épuiser la matrice. Après le cinquième lavage et l'extraction liquide/liquide du culot restant, aucun ITC n'a été détecté. Cependant, les taux de recouvrement finaux sont inférieurs à 66% sauf pour le MITC (Tableau 18).

Tableau 18 : Taux de recouvrement moyen des ITCs dans le chou blanc avec SPE

ITC	Taux de recouvrement*
MITC	81,2 ± 1,3
AITC	59,4 ± 0,7
proITC	57,72 ± 1,5
PITC	65,5 ± 1,8
BITC	51,3 ± 1,2
PEITC	55,1 ± 1,9

*Moyenne ± écart-type

Plusieurs paramètres peuvent influencer le recouvrement d'une substance sur une cartouche d'extraction, tels que le volume de l'échantillon, la masse d'adsorbant et le volume du solvant d'élution (131). Dans notre cas, connaissant l'affinité des ITCs pour la phase solide Oasis HLB et pour le dichlorométhane, les pertes en ITCs sont probablement dues à une quantité insuffisante d'adsorbant. En effet, les ITCs se trouvent dans une matrice complexe (le chou blanc) contenant d'autres composés qui vont également s'adsorber sur la phase solide et saturer les sites d'adsorption.

2.3 Extraction par solvant pressurisé

Généralement, la technique d'extraction PLE est appliquée sur des échantillons secs et solides. Pour cela, les matrices sont le plus souvent lyophilisées, mais ce procédé peut conduire à la volatilisation d'un certain nombre de substances comme c'est le cas pour les ITCs du chou. C'est pourquoi pour éviter cette étape, il était nécessaire de choisir un dispersant qui absorbe l'eau. Plusieurs dispersants ont été testés tels que la silice, le silicate de calcium, le sulfate de sodium et la terre de diatomée. Seule cette dernière était adaptée et permettait d'assécher le milieu réactionnel d'hydrolyse avant de passer à l'étape d'extraction des ITCs formés. La terre de diatomée a été utilisée par d'autres auteurs comme desséchant d'échantillon avant l'extraction par PLE (133-135).

Nous avons évalué dans un premier temps le nombre de cycles nécessaire à l'épuisement de solutions standards d'ITCs. Pour cela, des rendements ont été calculés après 4 cycles d'extraction. Il est apparu que 2 cycles suffisaient à épuiser les échantillons. Ainsi le **tableau 19** présente les rendements d'extractions obtenus avec le protocole testé. Avec les conditions choisies, les rendements sont compris entre 23,5% et 109,4%. Les composés les mieux extraits étaient le SFN et le HITC avec 81,2% et 77,9% de rendements d'extraction. Alors que le proITC, le PEITC présentaient les plus faibles rendements (< 30%).

Tableau 19 : Rendements d'extraction des ITCs par PLE

ITC	Rendements d'extraction*
SFN	81,2 ± 6,5
MITC	109,4 ± 4,1
AITC	66,2 ± 2,1
proITC	27,9 ± 5,2
BITC	49,5 ± 12,1
PEITC	23,5 ± 2,1
PITC	53,2 ± 6,9
HITC	77,9 ± 8,4

*Moyenne ± écart-type

Le MITC présentait un rendement de 109,4% ce qui nous paraissait surprenant comparé aux autres ITCs. Pour tenter de comprendre ce phénomène, nous avons réalisé une extraction de la terre de diatomée sans ajout d'ITCs. Il s'est avéré que le chromatogramme présentait un pic parasite au niveau de celui du MITC, ce qui explique la surestimation de la quantité de cet ITC dans les extraits. L'idéal serait de faire une extraction préliminaire du dispersant pour le débarrasser de toute impureté, avant de l'utiliser pour l'extraction des ITCs. Les essais de PLE avec les échantillons de chou n'ont pas donné de meilleurs résultats. Les taux de recouvrements étaient inférieurs à 17% pour tous les ITCs, à l'exception du SFN (59%) et du MITC (125%). L'ensemble de ces résultats montrent que les ITCs ne sont pas récupérés dans leur totalité.

La méthode d'extraction PLE pourrait sans doute être optimisée en modifiant plusieurs paramètres tels que la température d'extraction ainsi que le temps de contact entre le solvant et l'échantillon pour récupérer la totalité des ITCs présents dans la cellule (133), mais nous avons pour notre part, faute de temps, renoncé à cette technique pour la suite de notre travail.

Conclusion

La détermination précise des ITCs dans les légumes crucifères est de plus en plus importante compte tenu de l'intérêt nutritionnel croissant pour ces composés. Le protocole d'analyse des ITCs présents dans ces matrices comporte plusieurs étapes clés notamment la séparation chromatographique et l'extraction de ces substances.

Dans la première partie de cette étude, plusieurs alternatives ont été proposées et 3 méthodes ont été mises au point à l'aide d'un mélange de 8 ITCs ayant des propriétés physico-chimiques différentes. La première est une analyse par CPG nécessitant l'utilisation de 2 colonnes capillaires. Les 2 autres techniques sont des CLHP en phase inverse, élaborées pour éviter les problèmes liés à la faible solubilité des ITCs dans l'eau et pour augmenter la précision de la quantification. Il s'agit d'une part d'une chromatographie avec dérivation pré-colonne d'ITCs au mercaptoethanol. Les dérivés obtenus sont plus polaires et plus solubles dans l'eau, ce qui a permis une analyse quantitative des ITCs correspondants en utilisant une phase mobile aqueuse. La deuxième est une CLHP avec chauffage de colonne permettant de réduire la formation de précipités dans la phase mobile aqueuse. Ces 2 méthodes se sont avérées sensibles avec d'assez faibles valeurs de limites de détection et de quantification.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'extraction des ITCs à partir de chou. Dans les méthodes d'extraction recensées, la plus utilisée est l'ELL avec un solvant organique apolaire comme le dichlorométhane. Les premiers travaux entrepris ont consisté à tester cette technique à partir d'un protocole adapté de celui de Liang *et al.* Parmi les différents solvants testés, seul le dichlorométhane a donné des rendements satisfaisants (98 à 110%) avec des solutions témoins d'ITCs. Cependant, lorsque la méthode a été appliquée à l'extraction d'ITCs formés dans le chou, un précipité très compact s'est formé à l'interface du milieu réactionnel d'hydrolyse et du solvant d'extraction. Ce précipité piégeait le solvant ce qui était gênant pour l'extraction. Pour résoudre ce problème, il a fallu augmenter le volume de solvant d'extraction, le temps de contact entre les 2 phases (au moins 15 min) et ajouter de l'éthanol pour favoriser l'extraction des ITCs. Dans ces conditions, les taux de recouvrement dans la matrice alimentaire étaient supérieurs à 90% pour tous les ITCs testés.

En plus de l'ELL, d'autres techniques ont été testées telles que la SPE et la PLE. Pour la SPE, 12 cartouches SPE ont été sélectionnées et testées avec des solutions témoins d'ITCs. L'objectif était de choisir la phase solide la plus adaptée à l'extraction de l'ensemble des ITCs formés après hydrolyse des GSLs. Un protocole standard a été appliqué et des rendements d'extraction ont été déterminés pour chacune des cartouches testées. En testant l'extraction d'un mélange d'ITCs étalons, seule la cartouche Oasis HLB a présenté des rendements satisfaisants. Cette dernière a donc été

choisie pour effectuer des essais sur des échantillons de chou. Avant l'étape d'extraction, le milieu réactionnel d'hydrolyse des GSLs a été centrifugé puis le culot a été lavé 5 fois avec de l'eau. Ce qui a conduit à des taux de recouvrement inférieurs à 80%. En ce qui concerne la PLE, la terre de diatomée et le dichlorométhane ont été choisis respectivement comme dispersant et solvant d'extraction. Les rendements d'extraction obtenus n'étaient pas satisfaisants et démontraient que la méthode devrait être optimisée.

L'ensemble des résultats obtenus prouvent bien que l'ELL reste la méthode la plus adaptée et la plus efficace par rapport aux 2 autres. Le protocole mis au point peut donc être utilisé pour l'extraction d'ITCs dans différents légumes de la famille des Brassicacées.

Publication 1

Simultaneous Determination of Various Isothiocyanates by RP-LC Following Precolumn Derivatization with Mercaptoethanol

Eli Adjélé Wilson · Saïd Ennahar · Minjie Zhao ·
Martine Bergaentzle · Eric Marchioni ·
Françoise Bindler

Received: 8 October 2010/Revised: 16 November 2010/Accepted: 23 November 2010/Published online: 8 January 2011
© The Author(s) 2011. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Numerous isothiocyanates (ITCs) are poorly soluble in water which causes their precipitation in aqueous mobile phases used in reversed phase liquid chromatography (RP-LC), thus impacting the accuracy of the quantification. By comparing the amounts of ITCs injected and released from the column, losses could be estimated at 5–32% depending on polarities and concentrations. Results could be dramatically improved in terms of separation and quantification using RP-LC with a mercaptoethanol precolumn derivatization aimed at avoiding ITCs precipitation. The cancer chemoprotective allyl-ITC and sulforaphane were found in cabbage extracts at 1.2 and 2.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight, respectively.

Keywords Column liquid chromatography · UV-detection · Mass spectrometry · Isothiocyanates · Solubility · Mercaptoethanol

Introduction

Biological studies have shown that the consumption of cruciferous vegetables, like cabbage, is associated with a reduced risk of degenerative diseases such as cancer. This

chemo-protective action is often attributed to isothiocyanates (ITCs) which are enzymatic hydrolysis products of glucosinolates (GLS) [1]. These sulfur-containing glycosides are a group of secondary plant metabolites present in cruciferous vegetables belonging to the Brassicaceae family. When the plant tissues are damaged by chopping, crushing or chewing, GLSs are brought into contact with the endogenous plant enzyme myrosinase [2]. The types and amounts of hydrolysis products formed depend on the parent GLS that have either aliphatic or aromatic side chains and on reaction conditions. GLS are hydrolyzed into thiocyanates, nitriles, oxazolidinethiones and ITCs which constitute the main group of enzymatic hydrolysis products [3].

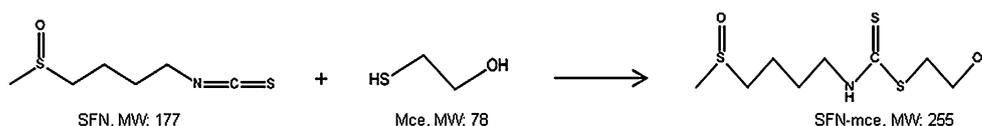
In recent years, ITCs have been studied for their potential anticarcinogenic effect. This cancer protective effect has been attributed to the ability of these molecules to inhibit phase I enzymes, responsible for the bioactivation of carcinogens, and to activate phase II detoxification enzymes [4, 5]. In addition, a recent study showed the role of ITCs in the inhibition of the growth of cancer cells through the induction of apoptosis [6]. In this way, ITCs can prevent the development of various human cancers, such as colon, oesophagus, rectum, bladder and mammary cancers [7, 8].

Due to the growing interest in their potential protective effects, dietary ITCs attracted much attention from analysts. Several analytical methods using gas chromatography (GC) [9–11] and liquid chromatography (normal phase (NP-LC) [12] and reversed phase (RP-LC) [13, 14]) have been developed. RP-LC methods based on a C18 are generally the methods of choice when it comes to analyzing specific ITCs molecular species. However, only a limited number of ITCs could be simultaneously investigated using a single chromatographic method. In fact, given that ITCs show various physicochemical properties,

Presented at: 16th International Symposium on Separation Science, Recent Advancements in Chromatography and Capillary Electromigration Techniques. Rome, Italy, 6–10 September, 2010.

E. A. Wilson · S. Ennahar · M. Zhao · M. Bergaentzle ·
E. Marchioni (✉) · F. Bindler
Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bio-Actives,
IPHC-DSA, Université de Strasbourg, CNRS,
Faculté de Pharmacie 74, route du Rhin, 67400 Illkirch, France
e-mail: eric.marchioni@unistra.fr

Fig. 1 Derivatization of ITCs with mercaptoethanol leading to the formation of ITC derivatives (ITC-mce), example of SFN



especially in terms of polarity and volatility, the analysis of a wider range of compounds often calls for the use of two methods in conjunction, e.g. GC and LC for volatile and nonvolatile ITCs, respectively, or NP-LC and RP-LC for polar and nonpolar compounds, respectively. When it comes to polarity, ITCs range from the water soluble sulforaphane (SFN) to compounds that are highly hydrophobic, such as heptyl-ITC (HITC) [15]. This may cause some ITCs to precipitate in the aqueous mobile phases, thus impacting on the accuracy of quantifications and also resulting in technical problems such as clogging of the HPLC system and pressure increase.

In this paper, an RP-LC analytical method was developed to separate, identify and quantify ITCs with various physicochemical properties. This method consisted of a mercaptoethanol (mce) precolumn derivatization aimed at avoiding precipitation during RP-LC [16]. The amount of ITCs injected was compared with those collected after separation with and without precolumn derivatization. Quantification was done by using a previously developed assay where ITCs are allowed to react quantitatively with 1,2-benzenedithiol (BDT) forming a stable cyclic dithiol thione product [1, 17, 18]. ITCs and their derivatives could be detected and identified using their UV and mass spectra.

Experimental

Chemicals and Reagent

Chemicals used were of LC grade. ITCs with various polarities were chosen for this study: D,L-SFN (97%) was purchased from Enzo Life Sciences (Villeurbanne, France); allyl-ITC (AITC) (95%), benzyl-ITC (BITC) (98%), methyl-ITC (MITC) (97%), phenyl-ITC (PITC) (99%), phenylethyl-ITC (PEITC) (99%), and propyl-ITC (proITC) (98%) were obtained from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany); HITC (97%) was purchased from Acros organics (Geel, Belgium).

1,2-benzenedithiol (96%), formic acid (98%), acetonitrile (ACN), and methanol were obtained from Sigma-Aldrich. Triethylamine (99%) and 2-mercaptoethanol (mce) (99%) were purchased from Acros Organics. Dichloromethane and ethanol were obtained from VWR (Briare, France). 1,3-benzodithiole-2-thione (BD2T) was prepared and characterized previously in our laboratory according to Kristensen et al. [17]. Ultrapure water was produced by a

Synergy UV purification system Millipore (Molsheim, France). Other chemicals were of analytical grade and were as follows: dichloromethane (for extraction) and anhydrous sodium sulfate from SDS (Vaidereuil, France); sodium dihydrogen phosphate and disodium hydrogen phosphate from Merck (Darmstadt, Germany).

ITC stock solutions (2 mg mL^{-1}) were prepared in ethanol. Working solutions at various concentrations were prepared by diluting stock solutions in ACN or in dichloromethane. Stock and working solutions were stored at 5°C for no more than 2 weeks. Before injection, all solutions were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter (Macherey–Nagel, Hoerd, France).

Determination of ITCs Losses during RP-LC

An LC system made of two Prostar 210 solvent delivery systems, a Prostar 410 autosampler and a Prostar 330 Photodiode Array (PDA) UV/vis detector (Varian, les Ulis, France) was used in this study. A mixture ($100 \mu\text{l}$) of eight ITCs at $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ each (alternatively at $1,000 \mu\text{g mL}^{-1}$) in ACN was injected and separated on a Hypersil C18 ($5 \mu\text{m}$) $4.6 \times 250 \text{ mm}$ column (Interchim, Montluçon, France). Fractions of 0.8 mL containing ITCs were collected after PDA detection.

The amounts of ITCs, injected and collected, were quantified according to Kristensen et al. [17], by using a cyclocondensation reaction of ITCs with BDT, which led to a single and stable product, the BD2T [18]. A standard curve of BD2T was constructed using a series of solutions with concentrations ranging from 0.03 to 0.81 mmol L^{-1} . Quantities of ITCs were expressed as BD2T equivalent in mmol. Each determination was done three times.

Analysis of ITCs after Mercaptoethanol Derivatization

One milliliter of a solution of ITCs (each at $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) was mixed with $500 \mu\text{L}$ of a reagent containing 20 mM triethylamine and 200 mM mce in dichloromethane (Fig. 1). The mixture was incubated at 30°C for 60 min under constant stirring, and then dried under a stream of nitrogen. The residue containing ITC derivatives (ITC-mce) was dissolved in 1 mL of ACN/water (1:1) (v/v), and $10 \mu\text{L}$ of the obtained solution was injected onto a Nucleosil C18 analytical ($5 \mu\text{m}$) $4.6 \times 150 \text{ mm}$ column (Macherey–Nagel (Hoerd, France) with the corresponding guard column ($5 \mu\text{m}$) $4.6 \times 10 \text{ mm}$. The PDA detector

was set at 271 nm. Besides, LC–MS analysis was performed on a 1200L Triple Quadrupole mass spectrometer (Varian, Les Ulis, France) equipped with an atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) interface operating in positive and negative modes. The mass range was set between 50 and 300 m/z . The conditions of the APCI source were as follows: high purity nitrogen, produced by a nitrogen generator (Domnick Hunter, Villefranche-sur-Saône, France), was used as nebulizing gas (45.8 psi, in positive mode), drying gas (18 psi, 250 °C) and auxiliary gas (31.8 psi, 400 °C); needle voltage, 600 V; Ion source pressure, 3 mTorr; collision cell pressure, 0.138 mTorr. In negative mode, air was used as nebulizing gas, and the switch was reset automatically.

Analysis of ITCs in White Cabbage

Extraction of ITCs in cabbage was conducted as described by Liang et al. [19], with several modifications. Cabbage was purchased from a local producer in the north-east of France.

In summary, 100 g of fresh food matrix were grinded in liquid nitrogen using a cryogenic grinder (6870 Freezer/Mill, Spex CertiPrep, Stanmore, Great Britain) with 2 steps of 2 min at a rate of 24 impacts s^{-1} . The obtained frozen powder was stored at -20 °C until use. For extraction, 10 g of this powder were vortexed with 10 mL of ultrapure water and left to autolyse at room temperature for 1 h under shaking to ensure that all glucosinolates were hydrolyzed. Isothiocyanates were extracted four times with 5 mL of dichloromethane. The four organic extracts were combined and dehydrated with the addition of 250 mg of anhydrous sodium sulfate. The dichloromethane fraction was reduced down to 2 mL in a rotary evaporator (30 °C, 600 mPa). ITC extracts were derivatized and analyzed by LC–UV–MS as described above. All experiments were performed in triplicates.

Quantification and Calibration

To assess linearity, six point calibration plots (1 – 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, $n = 3$) were drawn for each of the eight derivatized ITCs by plotting peak areas against concentrations. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were experimentally defined, after ten injections, as the concentration of ITC derivatives, which produced a chromatographic peak with signal to noise ratio (S/N) >3 and 10, respectively. The accuracy of the method was determined using cabbage extracts spiked with a known amount of ITCs within the working range. The analysis was performed, in triplicate, to determine the amount of ITCs present in cabbage samples. The intra-day and inter-day precision of the method was assessed by measurement of relative standard deviation (RSD, %) of results.

Results and Discussion

Loss in ITCs during RP-LC

RP-LC with C18 columns and aqueous mobile phases with up to 80% water are the most widely used methods for the determination of ITCs [13, 14, 20]. Using a similar method, a good separation of all ITCs could be achieved, the least separated peaks corresponding to BITC and PEITC, had a resolution (R_s) of 1.75 (Fig. 2a). However, due to their poor solubility in water, precipitation of ITCs in the LC system could be observed. The loss of each ITC (IL) was estimated by comparing the amounts injected and collected after separation. ITC solutions at two concentrations (80 and 1,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were tested in order to emphasize the impact of the concentration on the quantification data. Except for SFN, the most polar and hydrophilic compound (water solubility 8 g L^{-1}) [15], losses were observed at both concentrations, but were higher at 1,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ than at 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. HITC, MITC, BITC and PITC, presented the highest IL values (26, 29, 32, and 24% at 1,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). Three of these compounds have low water solubility values (0.035, 0.11 and 0.13 g L^{-1} , respectively) [15]. However, MITC which is a polar compound (water solubility 3.9 g L^{-1}) was poorly soluble in the mobile phase at the working concentrations. With regard to AITC, proITC and PEITC, losses were lower (19, 17, and 14%, at 1,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively). These results showed that mobile phases containing a high proportion of water (80%), by causing precipitation of ITCs in the LC system, could dramatically impact the accuracy of quantitative assessments.

RP-LC with Mercaptoethanol Precolumn Derivatization

The grafting of hydroxyl group (Fig. 1) makes ITC derivatives more polar and thus more likely to be soluble in aqueous mobile phases than their corresponding precursors. The optimal conditions for the reaction of derivatization were determined by using eight ITC standards. Following derivatization, the problems linked to the precipitation of ITCs in the mobile phase did not appear, even after several injections. The eight ITC-mce derivatives (Fig. 2b) were eluted in the order of their precursors' polarities, except for MITC-mce and SFN-mce whose polarities were switched by comparison to their respective precursors. By comparing the chromatograms in Fig. 2a (ITC 1,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and Fig. 2b (ITC-mce 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), it can be noticed that the UV signals of ITC derivatives were more important than the UV signal of their precursors, which shows a high sensitivity of the mce-derivatization method.

In order to confirm peak identities and molecular mass, ITC-mce was analyzed by LC–MS, a method widely used for neutral compounds [21]. In the negative mode, the

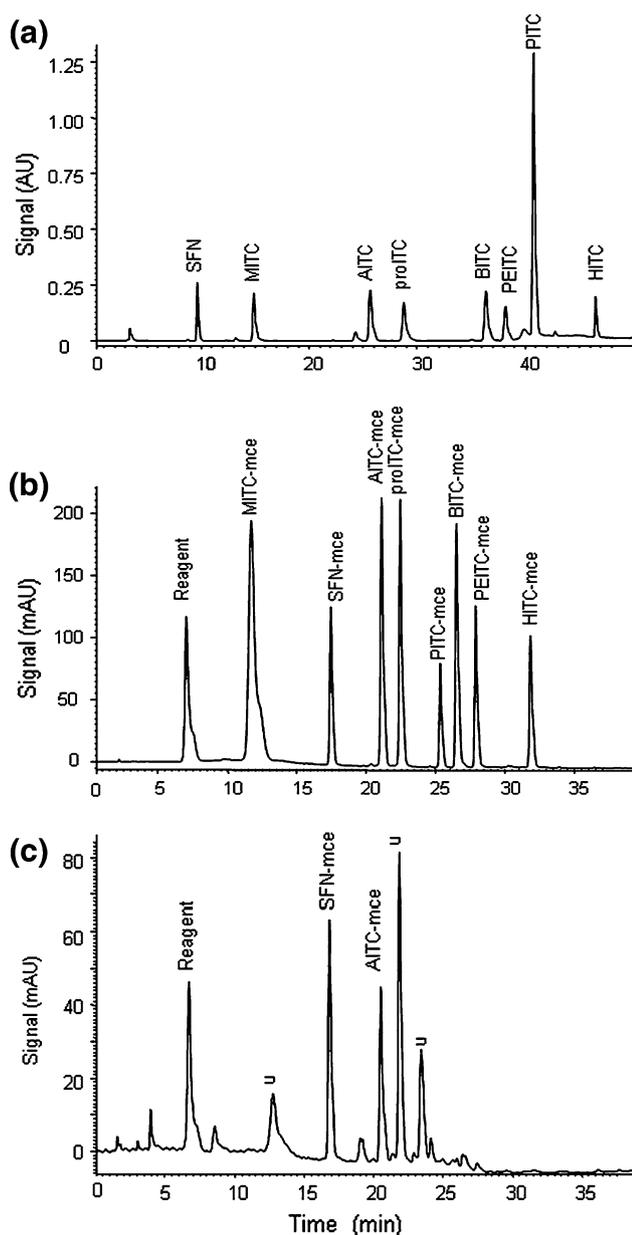


Fig. 2 Representative Chromatograms: **a** eight ITC standards ($1,000 \mu\text{g mL}^{-1}$ each) separated on a Hypersil C18 column and a mobile phase consisted of water (A) and ACN (B). The gradient was as follows: 0–8 min, 20–40% B (v/v); 8–20 min, 40–50% B; 20–35 min, 50–60% B; 35–43 min, 60–100% B; 43–49 min, 100% B; 49–50 min, 100–20% B. The flow rate was 0.8 mL min^{-1} . UV detection was carried out at 245 nm; **b** eight ITC standard derivatives ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) and **c** white cabbage extract analyzed on a Nucleosil C18. The separation was achieved at a flow rate of 0.8 mL min^{-1} using a water (A) and ACN (B) gradient as follows: 0–10 min, 10% B (v/v); 10–40 min, 10–100% B; 40–45 min, 100% B. UV detection was carried out at 271 nm. At the end of each run, columns were allowed to equilibrate for 10 min before the following injection. *u* unidentified

derivatives of MITC, SFN (Fig. 3a), AITC, proITC, BITC, PEITC and HITC showed an $[\text{M}-\text{H}]^-$ molecular ion (Table 1). For the PITC-mce, a response was obtained only in positive mode (Fig. 3b). Another $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion was

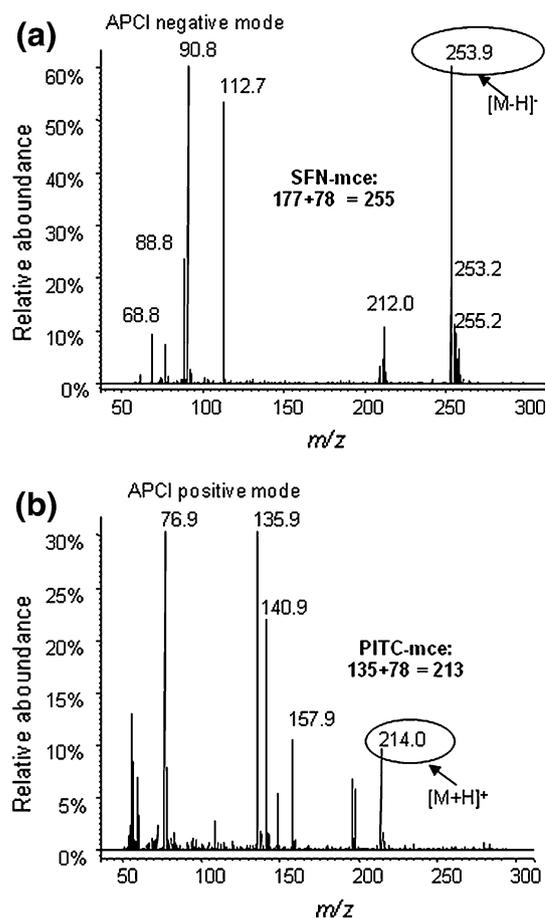


Fig. 3 **a, b** Mass spectra of SFN and PITC derivatives obtained by using APCI in positive and negative modes

observed at m/z 135.9 and corresponded to a fragment of PITC without mce. The comparison of the molecular mass of ITC-mce and the obtained m/z values allowed, therefore, the confirmation of their structures. As all tested ITCs easily reacted with mce, it is very likely that other R-NCS compounds could react in the same way.

Application of the Method

The derivatization method was used to investigate ITCs contained in white cabbage among the eight ITC standards available (Fig. 2c). With regard to the specificity, Fig. 2b, and c shows three peaks of compounds from cabbage with retention times that coincided with those of tested ITC, no other major interfering peaks are present. For the quantification, eight calibration curves were constructed by plotting the mean areas against ITC concentrations. The results indicated that there is a good correlation (r^2) between ITC peak area and concentration (Table 1). The resulting regression equations were used to determine the concentration of ITCs identified in cabbage. The LOD and LOQ of the method, shown in Table 1, suggest that low

Table 1 Results from identification and quantification of ITC derivatives

Identification				Quantification					
ITC derivatives	Molecular mass (M)	Ionization mode	<i>m/z</i> detected on the spectra	<i>r</i> ²	LOD (ng)	LOQ (ng)	Recovery (%)	Intra-day (RSD%)	Inter-day (RSD%)
MITC-mce	151	Negative	150	0.9996	2.8	9.4	99	2.5	0.1
SFN-mce	255	Negative	254	0.9995	2.9	9.7	101	1.1	1.2
AITC-mce	177	Negative	176	0.9999	2.1	7.1	97	1.6	1.3
proITC-mce	179	Negative	178	1	4.4	14.7	93	0.9	3.1
PITC-mce	213	Positive	214	0.9948	7.8	26.0	98	1.1	2.5
BITC-mce	227	Negative	226	0.9994	1.5	5.1	99	2.5	3.4
PEITC-mce	241	Negative	240	0.9994	14.2	47.7	101	0.9	1.2
HITC-mce	235	Negative	234	0.9998	6.5	21.7	90	0.6	2.6

quantities of all compounds can be determined. The results from recovery determinations indicated that there were no significant differences between the amounts of the ITCs added to samples and the amounts recovered (Table 1). With regard to the stability determined in an ACN/water solvent, solutions of ITC-mce derivatives were analyzed every week during 1 month and the peak areas obtained were compared. No decrease in the amounts of derivatives could be observed.

Compounds were identified by comparing their retention times, UV and mass spectra with those of ITC-mce derivatives previously obtained as described above. Based on these data, the chemoprotective AITC and SFN were identified and quantified in cabbage at 1.2 and 2.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ of fresh weight, respectively. A third compound whose retention time is close to that of proITC, was however found to be structurally different. Similar findings were mentioned in previous studies [19, 21]. Using LC–UV, Liang et al. [19] identified SFN in 18 varieties of Chinese cabbage, and estimated its contents in the range of 0.7–5.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ of fresh weight. Karcher et al. [22], by using laser-induced fluorescence capillary electrophoresis, identified SFN, AITC and Iberin in white cabbage grown in Oklahoma. It is noteworthy, however, that differences between studies in terms of the ITCs identified and of the amounts detected are quite common and may be attributed to differences in sample extraction methods, to genetic variability among different varieties of cabbage, and to the climate and cultivation conditions of cabbage [23, 24].

Conclusion

The accurate determination of ITCs in cruciferous vegetables is increasingly important given the growing interest surrounding these compounds. The widely used method today, which consists of RP-LC on C18 using gradient of ACN in water, did not allow accurate quantification of

ITCs, due to precipitation in the presence of water. This study showed that a sound alternative could lie in the precolumn derivatization of ITCs so as to avoid the poor water solubility issue and increase the accuracy of RP-LC determinations. A previously described method based on a derivatization with mce was used. The generated ITC derivatives were shown to be more polar and more soluble in water, which allowed the accurate analysis of their corresponding ITCs using an aqueous mobile phase. The method proved sensitive with fairly low LOD and LOQ values allowing a determination in cabbage, and suggesting that the use of this technique could be extended to the analysis of other cruciferous vegetables.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

- Getahun SM, Chung FL (1999) Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 8:447–451
- Warton B, Matthiessen JN, Shackleton MA (2001) J Agric Food Chem 49:5244–5250. doi:10.1021/jf010545s
- Shen L, Su G, Wang X, Du Q, Wang K (2010) Food Chem 119:987–994. doi:10.1016/j.foodchem.2009.08.003
- Hecht SS (1996) Adv Exp Med Biol 401:1–11
- Zhang Y, Talalay P (1994) Cancer Res 54:1976–1981
- Pappa G, Lichtenberg M, Iori R, Barillari J, Bartsch H, Gerhäuser C (2006) Mutat Res 599:76–87. doi:10.1016/j.mrfmmm.2006.01.007
- Conaway CC, Yang YM, Chung FL (2002) Curr Drug Metab 3:233–255. doi:10.2174/1389200023337496
- Higdon JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH (2007) Pharmacol Res 55:224–236. doi:10.1016/j.phrs.2007.01.009
- Ciska E, Pathak DR (2004) J Agric Food Chem 52:7938–7943
- Gerendas J, Breuning S, Stahl T, Mersch-Sundermann V, Mühling KH (2008) J Agric Food Chem 56:8334–8342. doi:10.1021/jf800399x
- Troncoso R, Espinoza C, Sanchez-Estrada A, Tiznado ME, Garcia HS (2005) Food Res Int 38:701–708. doi:10.1016/j.foodres.2005.02.004

12. Lubke M, Le Quere JU, Barron D (1995) *J Chromatogr A* 690:41–54. doi:[10.1016/0021-9673\(94\)01048-J](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)01048-J)
13. Song L, Morrison JJ, Botting NP, Thornalley PJ (2005) *Anal Biochem* 347:234–243. doi:[10.1016/j.ab.2005.09.040](https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.09.040)
14. Tian Q, Rosselot RA, Schwartz SJ (2005) *Anal Biochem* 343:93–99. doi:[10.1016/j.ab.2005.04.045](https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.04.045)
15. Anonyme (2008) *HandBook of chemistry and Physics*, 89th edn. CRC Press, Boca Raton
16. Vermeulen M, Van Den Berg R, Freidig AP, Van Bladeren PJ, Vaes WHJ (2006) *J Agric Food Chem* 54:5350–5358. doi:[10.1021/jf060723n](https://doi.org/10.1021/jf060723n)
17. Kristensen M, Krogholm KS, Frederiksen H, Duus F, Cornett C, Bügel SH (2007) *J. Chromatogr. B* 852:229–234. doi:[10.1016/j.jchromb.2007.01.022](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.01.022)
18. Choi MMF, Shuang S, Lai HY, Cheng SC, Cheng RCW, Cheung BKB (2004) *Anal Chim Acta* 516:155–163. doi:[10.1016/j.aca.2004.04.010](https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.04.010)
19. Liang H, Yuan QP, Dong HR, Liu YM (2006) *J Food Compos Anal* 19:473–476. doi:[10.1016/j.jfca.2005.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.11.005)
20. Matthäus B, Fiebig HJ (1996) *J Agric Food Chem* 44:3894–3899
21. Yamaguchi H, Noshita T, Kidachi Y, Umetsu H, Fuke Y, Ryoyama K (2008) *Chem Pharm Bull* 56:715–719. doi:[10.1248/cpb.56.715](https://doi.org/10.1248/cpb.56.715)
22. Karcher A, Melouk HA, El Rassi Z (1999) *J Agric Food Chem* 47:4267–4274. doi:[10.1021/jf990578w](https://doi.org/10.1021/jf990578w)
23. Kushad MM, Cloyd R, Babadoost M (2004) *Sci Hortic* 101:215–221. doi:[10.1016/j.scienta.2003.10.011](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.10.011)
24. VanEtten CH, Daxenbichler ME, Williams PH, Kwolek WF (1976) *J Food Compos Anal* 24:452–455

Chapitre 3 : Composition en Isothiocyanates de Brassicacées

Introduction

Les légumes de la famille des Brassicacées présentent une grande diversité de composition et de teneur en GSLs et donc en ITCs. Si l'on se réfère à la bibliographie dans le chapitre 1, au-delà de la diversité entre espèces, de nombreuses sources de variations vont moduler les teneurs en GSLs au sein de chaque espèce. Les principales variations sont inhérentes aux végétaux, d'ordre physiologique (liées au développement ou à la localisation dans le légume) ou génétique (lié au grand nombre de variétés disponibles), ou dépendantes des techniques culturales, des conditions environnementales, et enfin des conditions de conservation et de transformation après récolte. En ce qui concerne les ITCs plus précisément, ces différents paramètres ainsi que les conditions de dégradation des GSLs vont influencer leurs teneurs.

Dans le cadre d'une valorisation des qualités des crucifères et de leurs produits dérivés, la détermination de l'impact des facteurs précédemment cités sur le contenu en ITCs peut servir à révéler et à améliorer des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles de ces aliments afin d'encourager leur consommation. Pour des produits du terroir et des recettes de tradition, comme la choucroute, cette amélioration peut se faire par un meilleur choix des matières premières, l'optimisation de la formule, la modification du procédé de transformation ou l'utilisation de technologies innovantes qui préserveront à la fois les phytonutriments et le goût des aliments. La recherche d'ITCs est donc une étape importante dans ce processus de valorisation.

Pour mener à bien cette étude, en plus du chou et de la choucroute, nous avons choisi de travailler sur des végétaux appartenant à des espèces différentes de la famille des Brassicacées tels que le chou-fleur et le raifort. Pour ce dernier, l'Alsace en est la seule région productrice en France. Il est généralement consommé sous forme de condiment en accompagnement de viande ou de la traditionnelle choucroute. En ce qui concerne le chou-fleur, une partie de la production française est d'origine alsacienne (9).

Ce chapitre de thèse a consisté, dans un premier temps, à faire un dosage couvrant l'ensemble des ITCs que peut contenir un échantillon afin de déterminer l'influence de certains paramètres (processus de fabrication, variété de chou, période de récolte, etc...). La méthode employée consistait à réduire tous les ITCs en un composé unique par réaction avec le 1,2-benzenedithiol afin de pouvoir évaluer le contenu en ITCs totaux dans différentes matrices alimentaires. D'autre part, les méthodes précédemment développées, ELL et analyse par CLHP avec chauffage de colonne, ont été appliquées à la séparation, à l'identification et à la quantification d'espèces moléculaires particulières dans les légumes.

Dans un deuxième temps, des tests d'activité biologique concernant les différentes espèces moléculaires identifiées, ont été effectuées. Nous nous sommes plus spécifiquement intéressés à l'activité anticancéreuse et à l'activité antibactérienne. Cette dernière a particulièrement retenue notre attention car elle pourrait dans un avenir relativement proche présenter un intérêt technologique certain pour les industriels de l'agroalimentaire. Ainsi les spectres d'activité de 10 ITCs vis-à-vis d'une large variété de bactéries ont été réalisés en suivant la croissance des cellules bactériennes par turbidimétrie. Pour chaque composé, des Indices d'efficacité antibactérienne (I_{EA}) ainsi que des concentrations minimales inhibitrices (CMI), ont été déterminées. Ceci dans le but de classer les ITCs en fonction de leur efficacité antibactérienne.

1. Matériels et Méthodes

1.1 Analyses Chromatographiques

1.1.1 Réactifs

Différentes substances de références ont été utilisées pour identifier les différents ITCs présents dans les échantillons. Le D,L-SFN de pureté 97% et l'ibérine de pureté 97% ont été achetés chez Enzo Life Sciences (Villeurbanne, France). L'AITC de pureté 95%, le BITC de pureté 98%, le MITC de pureté 97%, le PITC de pureté 99%, le PEITC de pureté 99%, ainsi que le proITC de pureté 98% provenaient de chez Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). Le 3-(Methylthio)propyl-ITC (3mproITC) de pureté 98% ainsi que le 3-(Methylthio)phenyl-ITC (3mPITC) de pureté 97% provenaient de chez Alfa Aesar (Karlsruhe, Allemagne). L'HITC de pureté 97% est fourni par Acros organics (Geel, Belgium).

Autres réactifs : le BD2T a été préparé et caractérisé au laboratoire suivant une méthode publiée (63). Le BDT de pureté 96% a été fourni par Sigma-Aldrich. Le Na₂SO₄ est fourni par SDS (Vaidereuil, France), le dihydrogénophosphate de sodium monohydraté (98%) et l'hydrogénophosphate de sodium (99%) proviennent de chez Merck (Darmstadt, Germany).

1.1.2 Solvants

L'eau ultrapure a été produite au laboratoire par un système de purification Synergy® UV (Millipore, Molsheim, France), à partir d'eau permutée disponible à la faculté de pharmacie d'Illkirch (Université de Strasbourg). Les solvants organiques utilisés sont de qualité HPLC, sauf précision. L'acétonitrile et le méthanol, ont été fournis par Sigma-Aldrich, l'éthanol par VWR (Briare, France). L'acide formique (98-100%) fourni par Riedel de Haën (Sigma-Aldrich, Seelze, Allemagne) et le dichlorométhane (pour l'extraction) provenant de chez Merck, sont de qualité analytique.

1.1.3 Matrices alimentaires

Quatre matrices alimentaires connues pour contenir des ITCs ont été étudiées (**Tableau 20**). Il s'agit de chou, de choucroute, de chou-fleur et de Raifort (racine). Sept variétés de chou ont été fournies par des producteurs locaux. Certaines ont été récoltées en début de saison (début septembre), en milieu de saison (fin septembre) et en fin de saison (fin novembre). Après la récolte, les choux sont découpés en lanières pour être ensuite encuvés pour la production de choucroute. La variété mégaton a été fournie par 2 producteurs à environ un an d'intervalle. Nous avons disposé de 3 échantillons de

choucroute produites à partir des variétés mégaton, liberator et mandy. La fermentation de ces 2 dernières variétés a été réalisée dans la même cuve, elles ont été placées respectivement, en haut et en bas de cuve. L'ensemble des échantillons de chou et de choucroute sont réceptionnés au laboratoire, un jour après découpage ou décuve puis placés à -20°C jusqu'à l'étape de préparation.

Tableau 20 : Tableau récapitulatif des échantillons de chou et choucroute analysés

Chou			Choucroute
Variété	Fournisseur	Date de coupe	Date de décuve
Mégaton	Karst	01/09/09	16/10/09
Ramco	Wagner	17/09/09	-
Burton	Wagner	29/09/09	-
Sepdor	Wagner	30/09/09	-
Ramkila	Wagner	30/09/09	-
Mégaton	Wagner	13/09/10	-
Liberator (haut de cuve)	Wagner	25/11/10	18/02/11
Mandy (bas de cuve)	Wagner	25/11/10	18/02/11

En ce qui concerne les autres matrices alimentaires, le chou-fleur (fleur) a été acheté dans une ferme alsacienne (Hoerdt, France) et les racines de raifort (**Figure 30**) provenaient d'un jardin de particulier (Oberschaeffolsheim, France). Ces échantillons ont été conservés 1 à 2 jours à 5°C avant l'étape de préparation.



Figure 30 : Racine de Raifort

1.1.4 Préparation des échantillons

Les échantillons sont broyés à l'aide d'un broyeur cryogénique (6870 Freezer/Mill, Spex CertiPrep, Stanmore, Grande Bretagne). La méthode de broyage utilisée varie en fonction de la nature de l'échantillon. Pour le chou et la choucroute, la méthode comporte 2 cycles de broyage organisés comme suit : 2 min de refroidissement dans l'azote liquide, 2 min de broyage à raison de 24 impacts/s puis encore 1 min de refroidissement. Quant au chou-fleur et au raifort, les échantillons sont coupés en dés (environ 1,5 cm de côté) puis broyés avec une méthode comportant 3 cycles de broyage organisés comme suit : 2 min de refroidissement dans l'azote liquide, 3 min de broyage à raison de 24 impacts/s puis 1 min de refroidissement. Après avoir été broyés, les échantillons sont récupérés sous forme de poudre et stockés à -20°C .

Avant le dosage, une étape de libération des ITCs à partir des GSLs est nécessaire. Pour cela, 10 g d'échantillon sont mis en contact avec 10 ml d'eau ultrapure dans un flacon en verre de 30 mL. Le tout est placé 1h à température ambiante sous agitation constante. Il faut préciser que les échantillons de choucroute n'ont pas nécessité d'étape d'hydrolyse des GSLs en ITCs puisque cette étape a certainement lieu durant la fermentation (4 à 6 semaines) (136).

1.1.5 Dosage des Isothiocyanates totaux

1.1.5.1 Protocole de dosage

Suite à l'hydrolyse, dans chaque flacon sont ajoutés 1000 μL de tampon phosphate (100 mM) pH 8,5 et 1000 μL d'une solution de BDT 20 mM dissous dans du méthanol. L'ensemble est agité au vortex puis incubé une heure à 65°C . Après incubation et refroidissement, le milieu réactionnel est filtré à l'aide d'un filtre seringue 0,45 μm en PTFE (Macherey Nagel, Hoerdts, France) puis injecté (10 μL). Le produit de cyclocondensation est identifié et quantifié par CLHP en phase inverse. Pour les échantillons de choucroute, le dosage des ITCs totaux a été réalisé sur les extraits après ELL.

1.1.5.2 Chromatographie liquide haute performance

Le système chromatographique est constitué d'une pompe binaire Prostar 210, d'un injecteur automatique Prostar 410 et d'un détecteur à barrette de diodes UV/vis Prostar 330 (Varian, les Ulis, France). L'analyse chromatographique est réalisée sur une colonne Xbridge C18 4,6 \times 150 mm, 3,5 μm (Waters, Guyancourt, France) avec la pré-colonne correspondante (4,6 \times 20 mm, 3,5 μm). L'ensemble colonne et pré-colonne ainsi que le tube reliant la vanne d'injection à la colonne (30 cm) sont chauffés à 60°C . La séparation chromatographique se fait à l'aide d'une phase mobile constituée

de méthanol et d'eau acidifiée (1% acide formique v/v). Le débit utilisé est de 1 mL/min. Le gradient d'élution est répertorié dans le **tableau 21**. Le BD2T est détecté à une longueur d'onde de 365nm.

Tableau 21 : Gradient de composition de la phase mobile pour l'élution du BD2T

Temps (min)	% Eau acidifiée	% Méthanol
0	20	80
5	20	80
6	0	100
11	0	100
12	20	80
22	20	80

Pour la quantification du produit de cyclocondensation, une courbe d'étalonnage de BD2T est établie avec une gamme de concentrations variant de $2,7 \cdot 10^{-3}$ à $5,4 \cdot 10^{-2}$ mmol/L. Les quantités d'ITCs totaux sont exprimées en μmol d'équivalent de BD2T. Trois répétitions sont effectuées pour chaque échantillon et les résultats sont exprimés sous la forme d'une moyenne \pm écart-type. Les données sont soumises à une analyse de variance à un facteur contrôlé (one-way ANOVA) en utilisant le test de la plus petite différence significative pour la comparaison des moyennes. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Statgraphics plus version 5.1 (Manugistics, Rockville, MD, USA).

1.1.6 Détermination des isothiocyanates

1.1.6.1 Extraction liquide/liquide

Pour extraire les ITCs formés après dégradation des GSLs, 1 mL d'éthanol ainsi que 10 mL de dichlorométhane sont ajoutés au milieu réactionnel d'hydrolyse. Le mélange est agité 15 min avec un agitateur rotatif type RM Multi-1 (StarLab, Bagneux, France) puis centrifugé à 2571 g pendant 5 min à 20°C. La phase organique est récupérée dans un erlenmeyer de 50 mL. La phase aqueuse restante est re-extraite 3 fois avec 10 mL de dichlorométhane. Cinq cents milligrammes de Na_2SO_4 sont ajoutés à la fraction organique pour éliminer l'eau résiduelle. La phase organique est transvasée dans une ampoule de 25 mL après avoir été filtrée sur papier (Whatman GmbH, Dassel, Allemagne). Après ajout de 1 mL d'acétonitrile pour le transfert de phase, le dichlorométhane est évaporé sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (30°C, 600 mpa). L'extrait d'ITCs est filtré à l'aide d'un filtre seringue 0,45 μm en PTFE (Macherey Nagel, Hoerdt, France), et injecté en CLHP.

1.1.6.2 Chromatographie liquide haute performance

Le système chromatographique ainsi que la colonne de séparation utilisés, sont les mêmes que précédemment. La séparation chromatographique est effectuée avec un gradient linéaire à base d'acétonitrile et d'eau (**Tableau 22**). Le débit de la phase mobile est fixé à 0,8 mL/min. Le volume injecté est de 10 µL. La seringue et la boucle d'injection sont rincées avec du méthanol entre chaque injection. Les ITCs sont détectés à 245 nm.

Tableau 22 : Gradient de composition de la phase mobile pour la séparation des ITCs

Temps (min)	%Acétonitrile	%Eau
0	20	80
8	40	60
16	46	54
21	46	54
33	100	0
39	100	0
40	20	80
50	20	80

Les ITCs présents dans les matrices alimentaires, sont identifiés par comparaison des temps de rétention et des spectres UV avec ceux des étalons. La quantification des ITCs identifiés a été effectuée à l'aide d'un calibrage externe. Pour chaque composé identifié, une gamme d'étalonnage dans l'acétonitrile a été préparée avec des concentrations comprises entre 2 et 100 µg/mL. Les expériences sont répétées 3 fois et les résultats sont exprimés sous la forme d'une moyenne ± Ecart-type. Les données sont soumises à une analyse de variance à un facteur contrôlé (one-way ANOVA) en utilisant le test de la plus petite différence significative pour la comparaison des moyennes.

1.1.6.3 Chromatographie en phase gazeuse

Les extraits des échantillons alimentaires sont également analysés par CPG-MS. L'analyse chromatographique a été réalisée sur un appareil de type 3400CX de marque Varian équipé d'un injecteur automatique 8200CX et couplé à un spectromètre de masse (Saturne 2000, Varian) équipé d'une source d'ionisation de type impact électronique (EI, énergie d'ionisation 70eV) et fonctionnant sur une échelle de masse de m/z 40-600. La séparation a été effectuée sur une colonne VF-5ms [(5% phényl 95% diméthylpolysiloxane) 30 m × 0,25 mm, 0,10 µm]. Le gaz vecteur utilisé était de l'hélium (pureté de 99,9995%, Air Liquide, France) à un débit de 1 mL/min. Des échantillons de 1 µL sont injectés en split (1:10). L'injecteur était chauffé à 180°C. La température initiale de la colonne était de

35°C pendant 2 min. Le chauffage du four a été programmé pour atteindre une température de 96°C à raison de 20°C/min (maintenue pendant 5 min) puis celle de 170°C à raison de 8°C/min (maintenue pendant 5 min) et enfin celle de 330°C à raison de 25°C/min (maintenue pendant 5 min). La base de données permettant l'identification des ITCs a été la NIST Mass Spectral Data Base, version 2000.

1.2 Etude d'activités biologiques des isothiocyanates

1.2.1 Inhibition de croissance de cellules bactériennes

Ces tests ont été réalisés au laboratoire de microbiologie de l'Institut Technique Agro-industriel AERIAL situé à Illkirch.

L'activité antibactérienne des ITCs a été testée sur une gamme de bactéries représentative de plusieurs genres et espèces bactériens Gram+ et Gram-, pour la plupart pathogènes. Les espèces bactériennes testées dans cette étude sont présentées dans le **tableau 23**.

Tableau 23 : Tableau récapitulatif des souches bactériennes utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des ITCs

Espèce bactérienne	N°	Références de la souche	Gram
<i>Bacillus cereus</i>	13	CIP 78-3	+
<i>Bacillus subtilis</i>	2	CIP 5262	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	G9 h	+
<i>Enterococcus faecium</i>	12	CECT 410, ATCC 19434	+
<i>Escherichia coli</i>	6	CIP 7624	-
<i>Klebsiella pneumonia</i>	14	DSM 681	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4	299v, DSMz 9843*	+
<i>Listeria monocytogenes 1/2a</i>	10	LC 10	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	DSM 1128	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	1	LC 216	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	9	LC 443	-
<i>Serratia marcescens</i>	8	LC 448	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	ATCC 6538	+
<i>Staphylococcus xylosus</i>	5	LC 57	+

*pas d'équivalent ATCC

Avant leur utilisation, les souches de bactéries ont été cultivées pendant 24 h dans un milieu BHI à 37°C. Les cultures ont ensuite été diluées dans du BHI frais de façon à obtenir une concentration d'environ 10⁵ UFC/mL, puis 285 µL de chaque échantillon ont été placés dans les puits d'une microplaque (96 puits) contenant 15 µL de solution éthanolique d'ITCs. La croissance des souches bactériennes a été suivie par mesure de l'absorbance à 600 nm pendant 48 h. A cet effet, un

turbidimètre automatisé de type Bioscreen 200C (Labsystems, Helsinki, Finlande) a été utilisé. Pour chaque souche testée, des témoins ont été réalisés avec ajout de 15 µL d'éthanol au lieu des 15 µL de solutions d'ITC et sans ajout d'éthanol dans le milieu de culture afin de déterminer l'effet de l'éthanol à une concentration de 5% sur la croissance des cellules bactériennes.

Le retard de croissance (Lag) correspondant au temps qu'une souche met à atteindre une absorbance de 0,3, ainsi que la population maximale (maxPop) correspondant à l'absorbance maximale atteinte à la fin de la phase exponentielle de croissance ont été déterminés pour chaque courbe de croissance. L'activité antibactérienne des ITCs a été exprimée par comparaison des retards de croissance observés et des populations maximales obtenues entre les essais et le témoin contenant de l'éthanol, ce qui a permis de définir un indice d'efficacité antimicrobienne (I_{EA}) dont la formule de calcul est la suivante :

$$I_{EA} = (\text{Lag E} / \text{Lag T}) \times (\text{maxPop T} / \text{maxPop E})$$

Dans laquelle Lag E et Lag T sont respectivement les retards de croissance de l'essai et du témoin avec éthanol ; maxPop E et maxPop T sont respectivement les populations maximales observées pour l'essai et le témoin avec éthanol.

Les expériences sont répétées 3 fois et les données sont soumises à une analyse de variance à un facteur contrôlé (one-way ANOVA) en utilisant le test de la plus petite différence significative pour la comparaison des moyennes.

1.2.2 Inhibition de croissance de cellules cancéreuses

Ces tests d'inhibition ont été réalisés au Laboratoire de Prévention Nutritionnelle du cancer (INSERM UMR S 392) au sein de l'Institut de Recherche sur les Cancers de l'Appareil Digestif (IRCAD) de l'Hôpital Civil de Strasbourg.

Les études d'inhibition de croissance cellulaire ont été réalisées sur une lignée cellulaire issue d'un adénocarcinome humain. Il s'agit des cellules SW620 provenant d'un prélèvement de métastases. Ces cellules se multiplient moins vite en présence d'un agent anticancéreux. Elles ont été obtenues de l'European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Salisbury, Royaume-Uni) et mises en culture dans un milieu DMEM à 25 mM de glucose (Gibco, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplémenté avec 3% de sérum de cheval (inactivé pendant 30 min à 56°C), 1% d'acides aminés non essentiels, 100 unités/mL de pénicilline G, 100 µg/mL de Streptomycine, 5 µg/mL de transferrine, 5 ng/mL de Sélélium et 10 µg/mL d'insuline (Gibco, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

Pour les tests d'inhibition de croissance, les cellules ont étéensemencées à une densité de 4.10^3 cellules par puits sur des microplaques. Les cellules sont mises en contact avec différentes solutions d'ITCs à différentes concentrations 24h après l'ensemencement. Les concentrations testées étaient comprises entre 0 et 40 $\mu\text{mol/L}$. Le milieu de culture est aspiré puis remplacé par le milieu contenant le produit à tester. Les courbes de croissance sont établies sur 7 jours pendant lesquels une mesure de la croissance est réalisée quotidiennement. Cette mesure est effectuée sur des cellules fixées (tuées). Pour cela, 50 μL d'acide trichloracétique à 50% sont ajoutés dans chaque puits (la concentration finale dans le puits étant de 10%). La plaque est maintenue à 4°C pendant 1h. Après cette période, le milieu est enlevé par inversion de la plaque qui est ensuite rincée cinq fois à l'eau isotonique. Au final, la microplaque est laissée à sécher sur papier absorbant. La coloration des microplaques est effectuée le même jour en fin d'étude de croissance. Dans chaque puits, 125 μL d'une solution à 0,04% (p/v) de sulforhodamine B dans une solution à 1% d'acide acétique (Sigma-Aldrich Chemicals, St. Quentin Fallavier, France) ont été ajoutés. Après 30 min d'incubation, à température ambiante, les plaques sont lavées 5 fois avec de l'acide acétique à 1 %. Après séchage, 200 μL de tampon Tris-HCl, pH 10,5 sont ajoutés dans chaque puits. Au final, après agitation de 20 min, une lecture d'absorbance est réalisée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Shimadzu, Kyoto, Japon). Cette méthode a été décrite en détails par plusieurs auteurs (137,138).

2. Résultats et discussion

2.1 Composition en isothiocyanates des matrices alimentaires

2.1.1 Dosage des isothiocyanates totaux

Les publications concernant l'analyse des ITCs totaux dans des matrices complexes, mentionnent le plus souvent des étapes de centrifugation (63) ou filtration (61) des échantillons. Toute fois comme nous l'avons montré précédemment (Chapitre 2) ces deux techniques sont à l'origine de pertes en ITCs, essentiellement des composés faiblement solubles dans l'eau. C'est pourquoi, le dosage a été réalisé directement, sur les matrices alimentaires.

2.1.1.1 Conditions de dosage

Avant d'analyser le contenu en ITCs totaux des matrices alimentaires, il est important de déterminer les conditions optimales de réaction. Plusieurs études ont montré que la température idéale pour la conversion des ITCs en BD2T était de 65°C, que le temps d'incubation nécessaire variait entre 1 et 2 h et qu'un excès de réactif permettait une transformation totale des ITCs présents dans un échantillon (61,63,139,140). A partir de ces conditions, des essais de cyclocondensation ont été réalisés sur un mélange d'étalons en faisant varier d'une part, les quantités de réactif et d'ITCs dans le mélange standard et d'autre part, le temps d'incubation. Les résultats obtenus ont confirmé qu'un excès de réactif est favorable à une conversion totale des ITCs ; la comparaison des quantités théoriques d'ITCs à celles déterminées lors du dosage a montré que la réaction était bien quantitative (mole à mole). De plus, l'étude de la cinétique d'apparition du produit de cyclocondensation a permis de choisir 1 h d'incubation pour une transformation complète des ITCs.

Pour vérifier l'efficacité de la méthode, un mélange standard d'ITCs a été ajouté à un échantillon de chou avant l'étape de dosage par cyclocondensation. Le taux de recouvrement calculé ($88,8\% \pm 13,3\%$) est proche des valeurs obtenues par d'autres auteurs (comprises entre 83,2% et 97,8%) (62,63,103).

Remarque :

Des études portant sur la spécificité du dosage des ITCs totaux, ont montré que tous les ITCs (aliphatique et aromatiques) réagissaient quantitativement avec le BDT. Les thiocyanates, les cyanates, les isocyanates, les cyanures et les composés apparentés n'interfèrent pas dans la réaction de cyclocondensation (106,120). Le BDT peut par contre réagir avec des composés thiocarbonyles tels que les dithiocarbamates (**Figure 31**), les polydithiocarbamates, les dérivés thiourées, etc... et produire du BD2T. Parmi ces substances, les dithiocarbamates pourraient être une source d'interférence pour la quantification des ITCs dans les échantillons de chou analysés car ces composés sont utilisés comme pesticides (141). Cependant, en raison des limites maximales résiduelles (3 mg/kg de chou pommé), l'apport en dithiocarbamates est négligeable par rapport aux contenus en ITCs des choux.

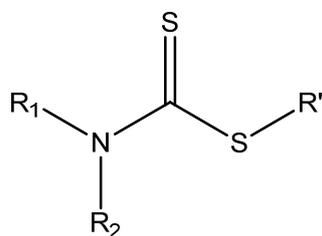


Figure 31 : Formule semi-développée d'un dithiocarbamate. R_1 et R_2 peuvent être des chaînes alkyles ou des groupements aryles. R' peut être un groupement alkyle.

2.1.1.2 Teneurs en isothiocyanates totaux des matrices alimentaires

En utilisant la méthode de dosage précédemment décrite, nous avons pu évaluer le contenu en ITCs totaux des échantillons mis à disposition. Les teneurs en ITCs ont été calculées après la réaction de cyclocondensation et comparées entre-elles avec un test statistique (one-way ANOVA) pour chaque espèce et variété de Brassicacées analysées (**Tableau 24**).

Tableau 24 : Teneur en ITCs totaux des matrices alimentaires mises à disposition

Espèce		Teneur en ITCs totaux ($\mu\text{mol}/100\text{g}$ de MF)*	
<i>Brassica oleracea</i> <i>var. capitata</i>	Chou (variété et période de récolte)	Mégaton, début de saison 2009	$25,7 \pm 1,2^{\text{a,b}}$
		Ramco, début de saison 2009	$23,8 \pm 0,2^{\text{a}}$
		Burton, milieu de saison 2009	$34,9 \pm 1,6^{\text{c}}$
		Sepdor, milieu de saison 2009	$36,3 \pm 0,4^{\text{c}}$
		Ramkila, milieu de saison 2009	$48,6 \pm 0,8^{\text{d}}$
		Mégaton, début de saison 2010	$27,8 \pm 0,1^{\text{b}}$
		Liberator, fin de saison 2010	$24,3 \pm 0,1^{\text{a}}$
		Mandy, fin de saison 2010	$44,8 \pm 2,4^{\text{d}}$
Choucroute (variété de chou utilisé)	Mégaton	$0,3 \pm 0,1^{\text{A}}$	
	Liberator	$1,9 \pm 0,3^{\text{B}}$	
	Mandy,	$1,8 \pm 0,1^{\text{B}}$	
<i>Brassica oleracea</i> <i>var. botrytis</i>	Chou-fleur		$49,0 \pm 0,5$
<i>Armoracia rusticana</i>	Raifort		$274,8 \pm 4,1$

*MF : matière fraîche

Les données sont exprimées en tant que moyenne \pm écart-type des résultats de trois expériences indépendantes. Pour le chou, les moyennes données avec des lettres différentes (de a à e) sont significativement différentes ($P < 0,05$). Pour la choucroute, les moyennes données avec des lettres différentes (A et B) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

D'après les résultats, 3 paramètres semblent avoir une influence sur la teneur en ITCs totaux : l'espèce de la plante, la variété de chou et le processus de transformation (fermentation). La comparaison des teneurs en ITCs des 2 espèces de Brassicacées analysées montre que la racine de raifort est 5 à 12 fois plus riche en ITCs que le chou-fleur et le chou. La forte teneur en ITCs du raifort a également observée par Vermeulen *et al* (64). Cette différence de teneur inter-espèce a été mise en évidence par d'autres auteurs qui ont mesuré le contenu en ITCs totaux dans différents légumes de la famille des crucifères produits et consommés sur l'île de Singapour ou aux Etats-Unis (61,142). Toutefois, les teneurs en ITCs des légumes sont également variables suivant la partie de la plante analysée. Dans deux études de 2009, l'une portant sur l'analyse du contenu en GSLs dans les racines et les feuilles de 29 espèces de plantes et l'autre portant sur l'analyse du contenu en ITCs dans les racines, les feuilles et les souches de Radis, il a été noté que les racines des légumes présentaient des concentrations plus élevées et une plus grande diversité en GSLs et en ITCs que les feuilles (143,144). La teneur élevée en ITC du raifort pourrait en partie être due au fait que nous avons analysé la racine, ce qui pourrait être confirmé par l'analyse des parties inférieures et supérieures des plantes étudiées : raifort, chou et chou-fleur. Toutefois, notre étude étant focalisée sur les propriétés nutritionnelles, elle s'est limitée aux parties consommables de ces plantes.

En ce qui concerne les choux à choucroute, nous avons disposé de 7 variétés récoltées sur 2 années successives et provenant du même fournisseur. L'analyse des résultats montre que les variétés ramkila et mandy contiennent environ 1,3 fois plus d'ITCs que les variétés sepdor et burton et 2 fois plus d'ITCs que les variétés mégaton, ramco et libérateur. Il faut remarquer que les teneurs en ITCs de la variété mégaton récoltée en 2009 et 2010 ne sont pas significativement différentes d'une année à l'autre.

On remarque par ailleurs que le processus de fermentation engendre des différences de teneur en ITCs entre le chou avant fermentation et la choucroute. Ces différences sont de l'ordre de 92% à 98% quelque soit la variété de chou. Cette variation de teneur en ITCs entre ces 2 matrices est liée aux conditions d'hydrolyse des GSLs. Dans le cas du chou non fermenté, la matrice est placée dans un milieu à pH neutre favorisant la dégradation enzymatique des GSLs en ITCs. En revanche, dans le chou fermenté, les différents mécanismes biochimiques qui ont lieu en début de fermentation vont entraîner une hydrolyse enzymatique ou chimique des GSLs et donner différents produits de dégradation dont les ITCs (36,43). La prédominance des composés de dégradation des GSLs ainsi que leurs teneurs vont dépendre du pH, de la présence ou non d'ion Fe^{2+} et de protéine ESP (19).

Une cinétique de cette évolution de la teneur en ITCs a été réalisée à partir de chou de la variété burton mis en fermentation et pour lequel des prélèvements ont été analysés pendant 13 semaines (**Figure 32**). Il apparaît clairement que plus le temps de fermentation augmente, plus le contenu en ITCs totaux diminue. Cette diminution est d'environ 50% dès la deuxième semaine. Pour certains auteurs, cette baisse au cours du temps de la teneur en ITCs dans le chou fermenté pourrait en partie être due à la volatilisation ou à la dégradation de ces composés durant le stockage à froid et les longues périodes de conservation avant l'analyse des échantillons (116,136),

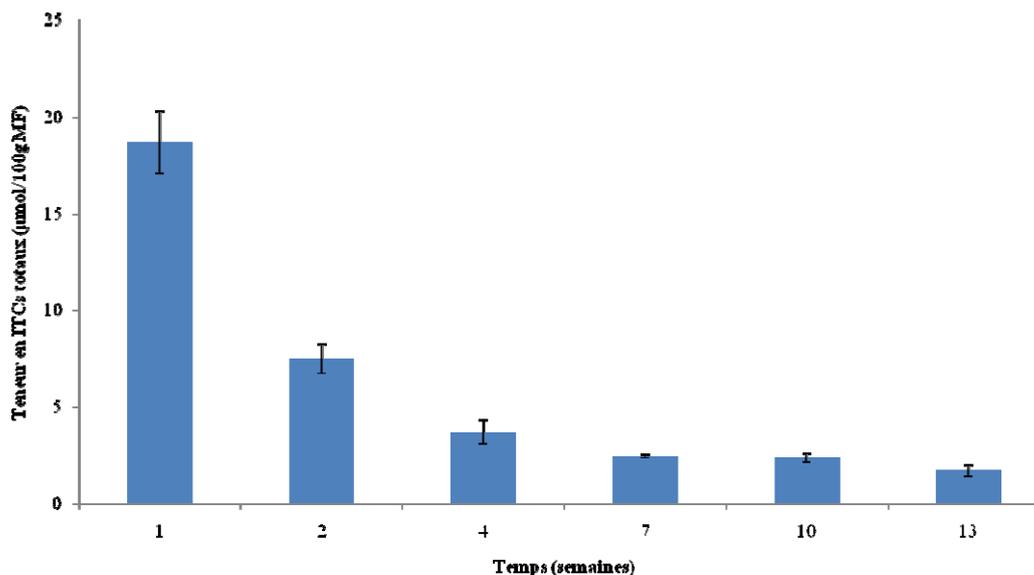


Figure 32 : Teneurs en ITCs totaux du chou fermenté ($\mu\text{mol}/100\text{ g de MF}$) des échantillons prélevés entre 1 et 13 semaines de fermentation

2.1.2 Détermination des composés majeurs

2.1.2.1 Analyse qualitative

L'analyse qualitative effectuée en CLHP et en CPG comme décrit précédemment a révélé la présence d'ibérine, d'AITC et de SFN dans les choux analysés (**Figure 33**). Il est à noter que ces substances ont des propriétés biologiques intéressantes (voire chapitre 1, paragraphe 2.5). La présence de ces composés avait déjà été relevée dans des échantillons de choux produits en Oklahoma, au Mexique ou aux Pays-Bas (99,104,128).

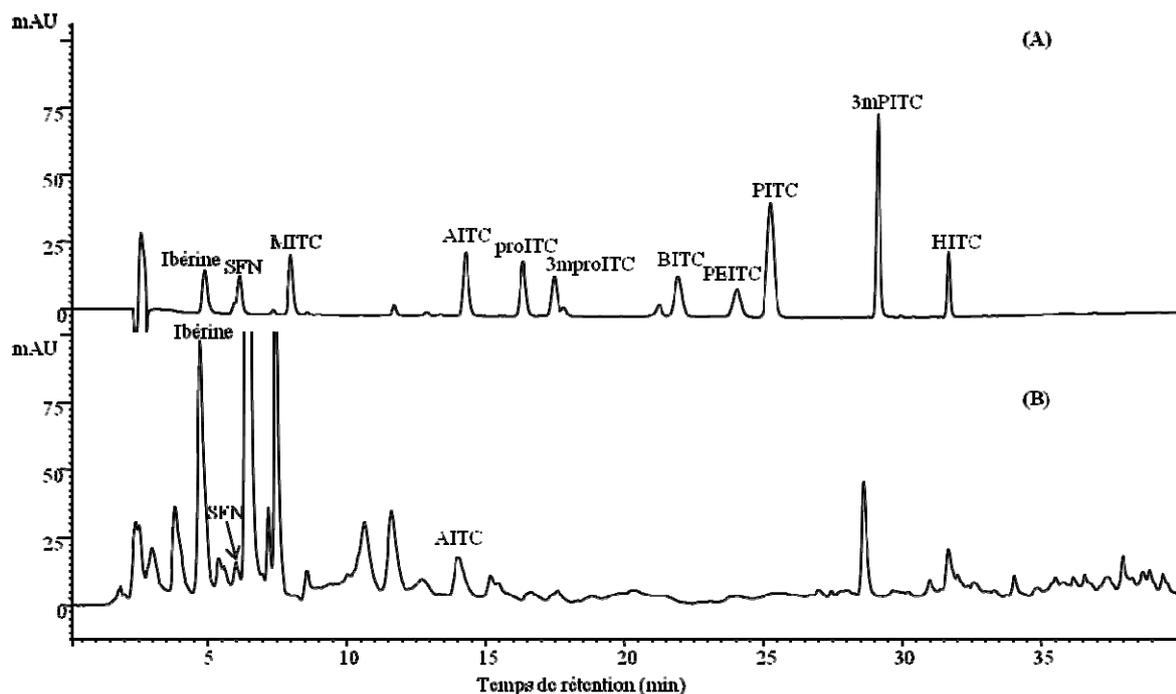


Figure 33 : Profils chromatographiques de 11 ITCs (A) et d'extrait de chou blanc (B) analysés par CLHP en phase inverse sur Xbridge C18 chauffée à 60°C. La séparation chromatographique est réalisée avec un gradient à base d'acétonitrile et d'eau et une détection à 245 nm.

En ce qui concerne les autres matrices alimentaires, l'analyse chromatographique :

- n'a pas permis de mettre en évidence d'ITCs dans la choucroute, contrairement aux résultats obtenus lors de l'analyse des ITCs totaux. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'ils sont sans doute présents à des concentrations inférieures aux limites de détection de la méthode.
- a montré la présence d'AITC et de PEITC dans le raifort et celle d'ibérine et de SFN dans le chou-fleur (**Figure 34**).

Ces observations sont en accord avec les résultats de Vermeulen *et al* qui ont retrouvé les précurseurs de l'ibérine et du SFN (glucoibérine et glucoraphanin) dans du chou-fleur ainsi que de l'AITC et du PEITC dans un condiment à base de raifort (64).

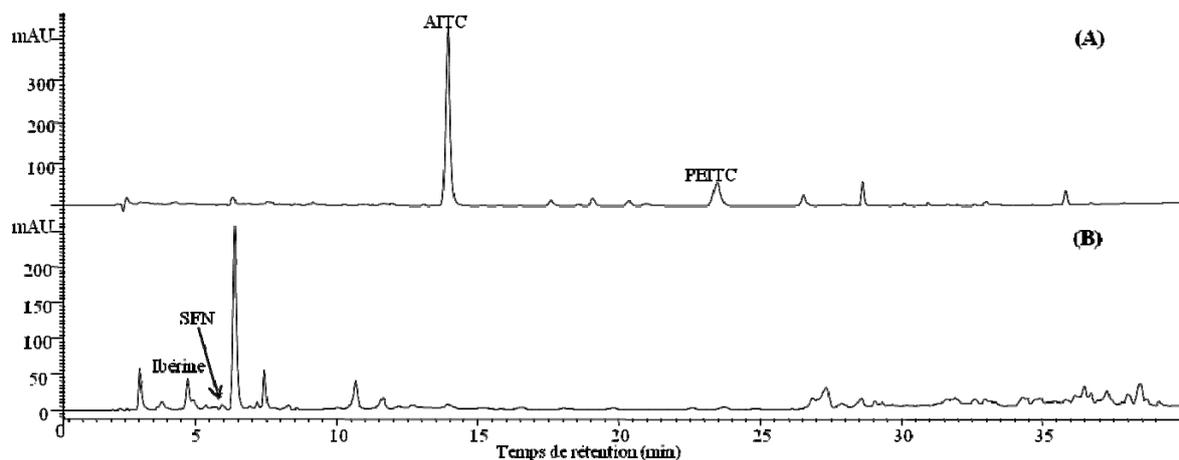


Figure 34 : Profils chromatographiques d'extrait de raifort (A) et de chou-fleur (B) analysés par CLHP en phase inverse sur Xbridge C18 chauffée à 60°C. La séparation chromatographique est réalisée avec un gradient à base d'acétonitrile et d'eau et une détection à 245 nm.

2.1.2.2 Analyse quantitative

Les **Tableau 25** et **26** présentent les teneurs en ITCs identifiés dans les différentes matrices alimentaires analysées. Afin de permettre une comparaison quantitative entre les échantillons, les teneurs en ITCs sont exprimés en $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de MF. Elles ont été comparées avec un test statistique (one-way ANOVA) pour chaque échantillon de chou.

Tableau 25 : Teneurs des ITCs identifiés dans les différentes variétés de chou

Variété et période de récolte	Teneurs en ITCs identifiés ($\mu\text{mol}/100\text{g}$ de MF*)			
	Ibérine	SFN	AITC	Totale
Mégaton, début de saison 2009	$8,6 \pm 0,7^a$	$5,2 \pm 1,4^f$	$2,8 \pm 0,6^g$	16,6
Ramco, début de saison 2009	$7,2 \pm 1,0^a$	$2,0 \pm 0,6^{d,e}$	$3,7 \pm 0,3^{g,h}$	12,9
Burton, milieu de saison 2009	$25,3 \pm 2,8^c$	$5,9 \pm 0,3^f$	$8,6 \pm 1,5^i$	39,7
Sepdor, milieu de saison 2009	$9,5 \pm 0,4^a$	$2,6 \pm 0,3^{d,e}$	$4,2 \pm 0,7^h$	16,3
Ramkila, milieu de saison 2009	$24,0 \pm 6,1^c$	$1,5 \pm 0,2^d$	$4,8 \pm 1,2^h$	30,3
Mégaton, début de saison 2010	$10,1 \pm 0,3^{a,b}$	$5,9 \pm 0,8^f$	$4,0 \pm 0,3^{g,h}$	20,0
Liberator, fin de saison 2010	$9,8 \pm 0,9^a$	$2,8 \pm 0,6^e$	$7,1 \pm 0,7^j$	19,7
Mandy, fin de saison 2010	$14,1 \pm 0,5^b$	$4,9 \pm 0,1^f$	$16,0 \pm 0,6^k$	35,0

*MF : matière fraîche

Données exprimées en tant que moyenne \pm écart-type de trois expériences indépendantes. Pour chaque ITC identifié, les moyennes données avec des lettres différentes (de a à c, de d à f et de g à k) sont significativement différentes ($P < 0,05$).

Tableau 26 : Teneurs des ITCs identifiés dans les extraits de chou-fleur et de raifort

Matrices alimentaires	Teneurs en ITCs identifiés ($\mu\text{mol}/100\text{g}$ de MF*)				
	Ibérine	SFN	AITC	PEITC	Totale
Chou-fleur	$35,4 \pm 1,9$	$5,6 \pm 0,4$	-	-	41,1
Raifort (racines)	-	-	$221,7 \pm 22,5$	$47,7 \pm 5,2$	269,4

*MF : matière fraîche

Données exprimées en tant que moyenne écart-type de trois expériences indépendantes.

L'analyse des résultats obtenus pour les choux montre que :

- pour chaque ITC identifié, les teneurs diffèrent selon la variété de chou analysée. Ainsi pour l'ibérine, elles sont comprises entre $2,5 \pm 0,2$ et $25,3 \pm 2,8$ $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de MF, pour le SFN entre $1,5 \pm 0,2$ et à $5,9 \pm 0,8$ $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de MF et enfin pour l'AITC entre $2,8 \pm 0,6$ et $16,0 \pm 0,6$ $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de MF,
- l'ibérine est l'ITC nettement plus abondant pour les choux burton et ramkila puisqu'il représente 65 à 80 % de la somme des ITCs détectés,
- le SFN est l'ITC dont les teneurs sont les plus faibles par rapport aux autres ITCs présents dans l'échantillon sauf pour le chou mégaton où les teneurs en SFN sont supérieures à celles de l'AITC,
- le chou mandy est le seul échantillon pour lequel l'AITC est l'ITC majoritaire
- bien qu'ayant été récoltées sur 2 années différentes, les échantillons de chou mégaton ne présentent aucune différence significative quant à leur teneur en ITC.

Cette diversité quantitative au sein d'une même variété de Brassicacées, a également été mentionnée par d'autres auteurs (99) et peuvent être attribuées à de facteurs agronomiques, climatiques ou génétiques (36,145).

En ce qui concerne les résultats obtenus pour le chou-fleur et le raifort, ils sont très différents de ceux du chou, qualitativement et quantitativement. Le raifort présente une forte teneur en AITC. Ce composé est responsable de la forte odeur et du caractère piquant de cet aliment.

Remarque :

Nos teneurs en ITCs dans ces matrices alimentaires diffèrent parfois de celles mentionnées dans la littérature (36,64,104). Ces différences peuvent également être attribuées à l'origine génétique, à l'environnement et aux conditions de culture qui sont différents de ceux des végétaux analysés dans notre étude (146,147).

2.1.3 Comparaison du dosage d'ITCs totaux et de la détermination des ITCs individuels

La comparaison des teneurs totales en ITCs calculées avec la méthode de dosage de ITCs totaux (**Tableau 24**) et celles obtenues avec la méthode de détermination des composés majeurs (**Tableau 25**), montrent que les échantillons de chou contiendraient d'autres ITCs qui n'ont pas été identifiés. Par exemple, prenons le cas de la variété ramkila qui a présenté une teneur en ITCs totaux de 48,6 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de MF alors que la somme des teneurs en ITCs identifiés n'est que de 30,3 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de MF.

Pour mettre en évidence l'éventuelle présence d'ITCs non identifiés dans l'échantillon, les extraits (500 μL) ont été soumis à la réaction de cyclocondensation. Connaissant la réactivité de ces composés vis-à-vis du BDT, tous les ITCs réagiront avec la même affinité. Après cyclocondensation, les milieux réactionnels sont analysés par CLHP avec la méthode de détermination des composés individuels présentée au paragraphe 1.1.6.2. La **figure 35** présente les chromatogrammes d'extraits de chou ramkila soumis ou non à la cyclocondensation.

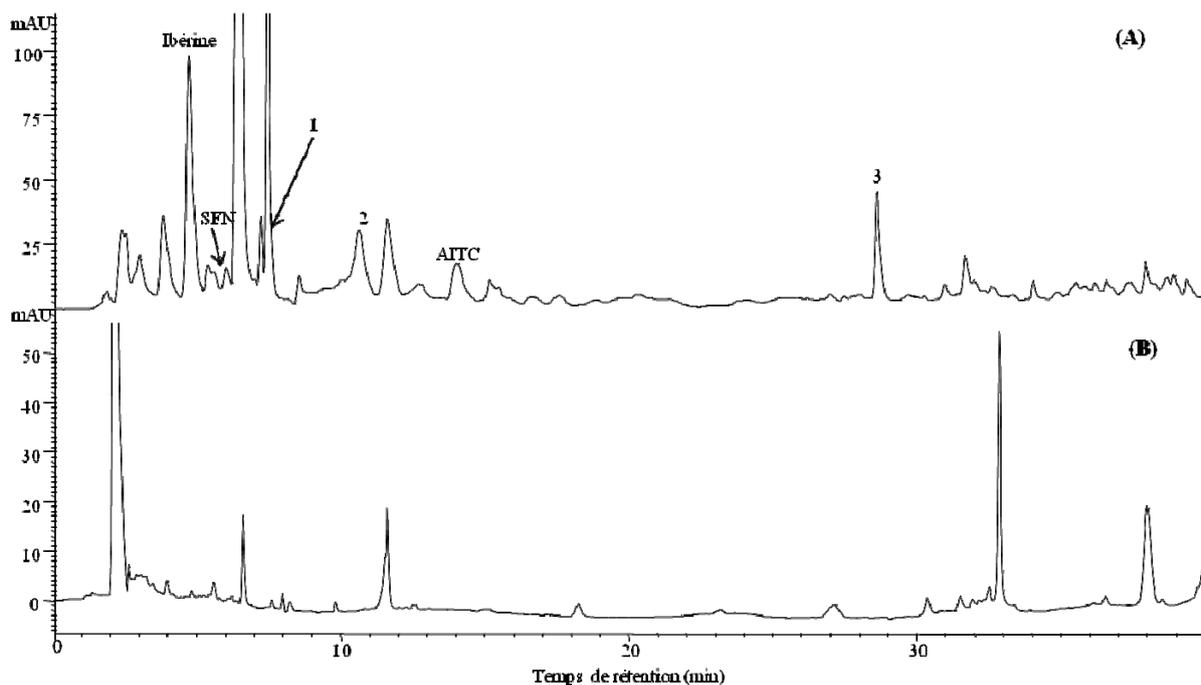


Figure 35 : Profils chromatographiques d'extraits de chou ramkila avec (B) et sans cyclocondensation (A) analysés par CLHP en phase inverse avec la méthode de chauffage de colonne. La séparation chromatographique est réalisée avec un gradient à base d'acétonitrile et d'eau. La détection est effectuée à 245 nm

On remarque qu'après la réaction avec le BDT, les pics correspondants aux ITCs identifiés ont disparu ainsi que 3 autres pics majoritaires. Pour les autres échantillons de chou, les mêmes pics de composés inconnus ont été retrouvés. Pour tenter d'identifier et caractériser ces substances inconnues, nous avons utilisé la spectrométrie de masse couplée à la CLHP et à la CPG. Cependant la CLHP/MS n'a pas permis d'identifier des ITCs.

Quant à l'analyse par CPG/MS, elle nous a servi d'une part à identifier les ITCs connus et d'autre part à identifier des pics inconnus par interrogation de la bibliothèque de spectre NIST. Ainsi pour un extrait de chou, en plus des pics de composés identifiés, 3 autres pics ont été proposés comme étant des ITCs. Les chromatogrammes de masse de ces produits ont été extraits du chromatogramme de l'extrait du chou (TIC) et sont présentés sur la **figure 36**. D'après les recherches effectuées dans la base de données NIST avec un Rmatch d'au moins 700 qui permet d'appréhender le degré de similitude, le composé « **a** » serait le 1-butenyl-4-ITC, « **b** » le 3-methylbenzyl-ITC et « **c** » le diethylaminophenyl-ITC. Cependant, il faut émettre une réserve à l'encontre de ces résultats puisque des structures de composés autre que des ITCs, ont été proposées.

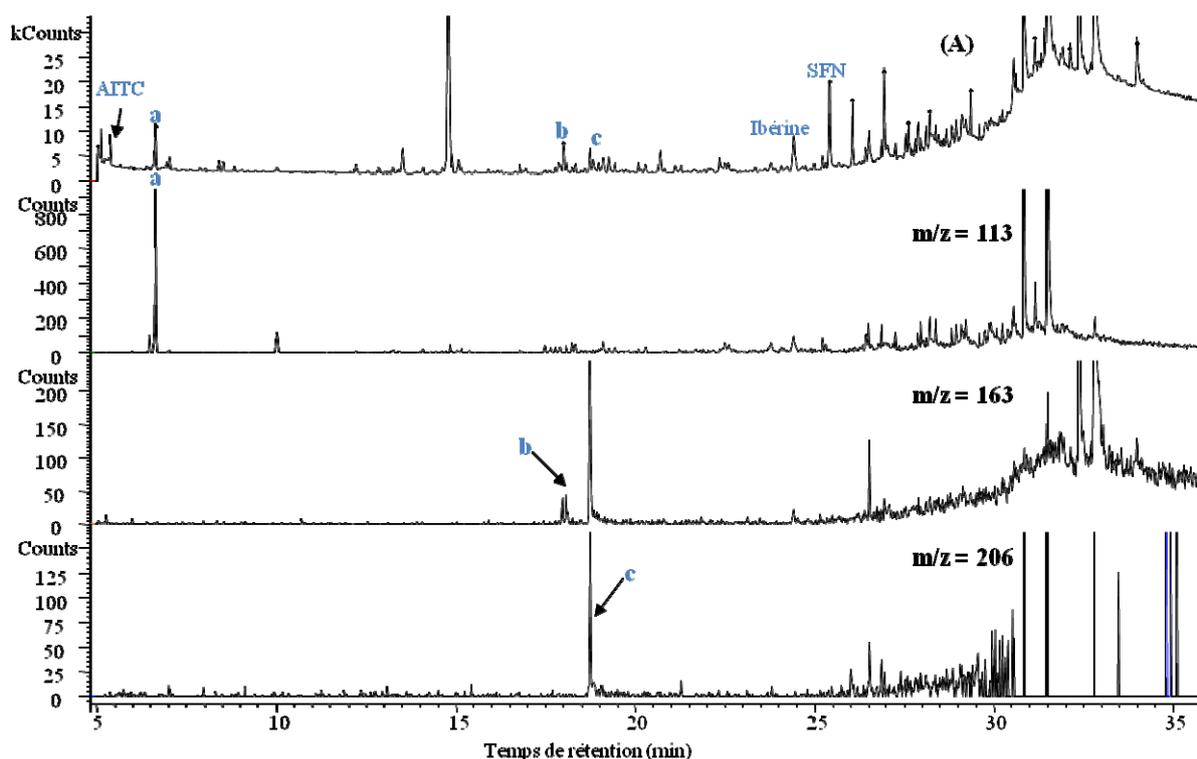


Figure 36 : Chromatogramme d'extrait de chou blanc (A) accompagné des chromatogrammes de masse sur le courant ionique des ions m/z 113, 163 et 206 caractéristiques des 3 composés proposés.

2.2 Etude d'activités biologiques des isothiocyanates

2.2.1 Inhibition de la croissance de cellules bactériennes

Dans ce travail, la capacité de survie et de croissance de 14 souches de bactéries en présence d'ITCs a été testée. Ces souches ont été mises en culture dans un milieu BHI supplémenté de solutions éthanoliques d'ITCs à différentes concentrations (concentration finale d'éthanol 5%). L'effet antibactérien de 10 ITCs a été testé et leurs concentrations ont été choisies en fonction de leur solubilité dans l'eau afin d'éviter la précipitation de ces composés dans le milieu de culture (**Tableau 27**).

Tableau 27 : Concentrations finales des 10 ITCs dans le milieu de croissance des souches bactériennes

ITCs	Concentration en ITCs dans le milieu de culture (mmol/L)				
	C1	C2	C3	C4	C5
MITC	0,25	1	2,5	5	10
AITC	0,25	1	2,5	5	10
BITC	0,05	0,25	1	2,5	5
PITC	0,05	0,25	1	5	10
PEITC	0,01	0,25	0,5	1	2,5
Ibérine	0,05	0,25	1	2,5	5
SFN	0,05	0,25	1	2,5	5
proITC	0,25	1	2,5	5	10
3MproITC	0,25	1	2,5	5	10
3MPITC	0,01	0,025	0,05	0,075	1,125

Un exemple de courbe de croissance enregistrée par le turbidimètre Bioscreen, où sont indiqués les retards de croissance ainsi que les populations maximales des témoins et des échantillons avec ITCs, est montré dans la **figure 37**.

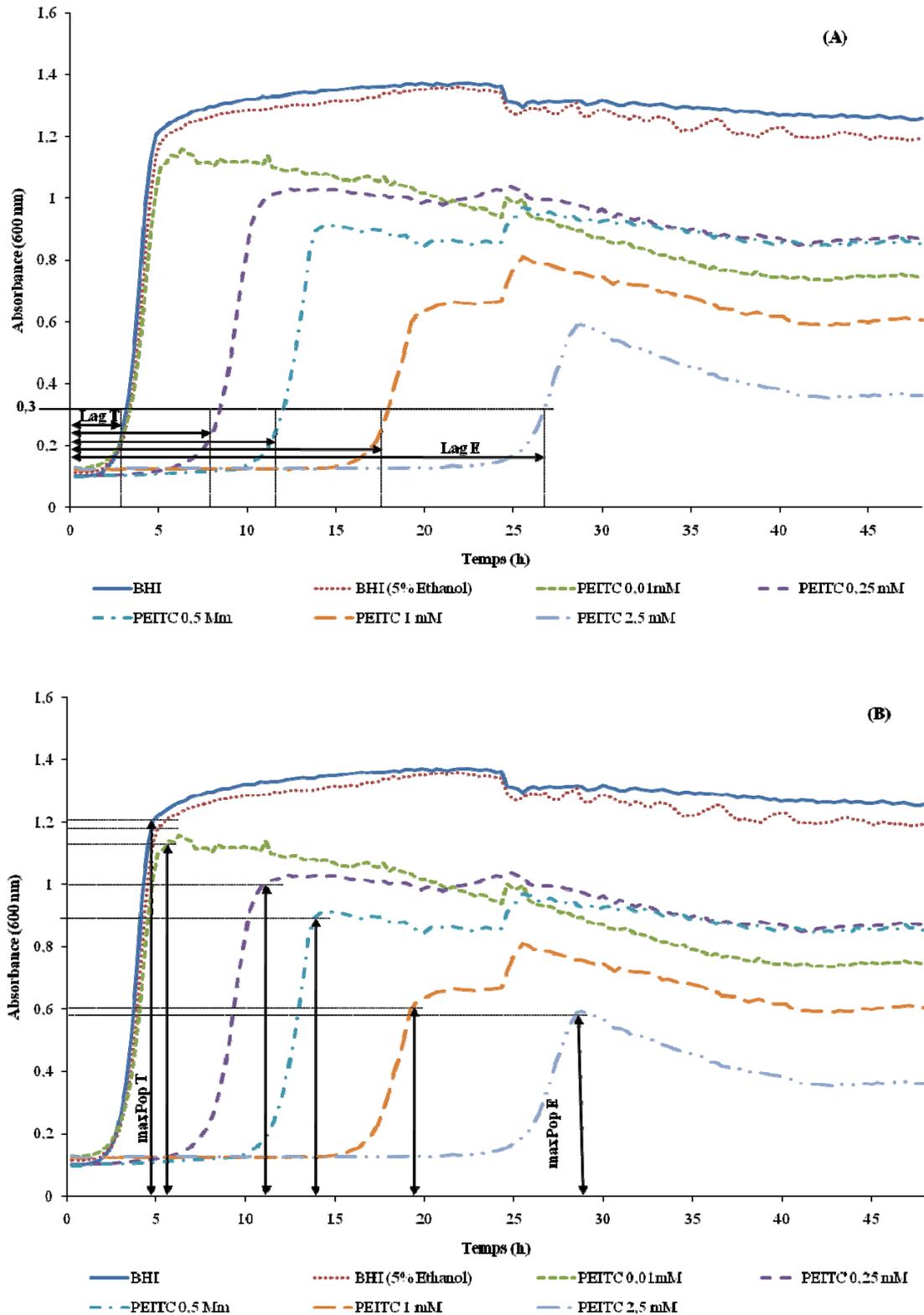


Figure 37 : Graphiques représentatifs de l'effet antibactérien d'un ITC, ici le PEITC sur la souche *Salmonella enteritidis*. Les flèches horizontales (A) et verticales (B) indiquent respectivement, les retards de croissance (Lag) ainsi que les populations finales (maxPop) des témoins et des échantillons avec différentes concentrations de PEITC. BHI : témoin sans éthanol, BHI (5% éthanol) : témoin avec 5% d'éthanol

La présence d'un ITC dans le milieu de culture au niveau de la mesure de l'absorbance peut se traduire par un retard de croissance et/ou une diminution de la population maximale, selon la souche de bactérie testée et selon la nature de l'ITC testé. L'activité antibactérienne des ITCs, a été évaluée à partir du facteur I_{EA} résultant de la combinaison des paramètres précédemment cités et traduisant leurs effets sur la croissance des cellules.

Il faut noter que pour la détermination de l' I_{EA} d'ITCs, nous n'avons pas tenu compte de la vitesse de croissance puisque ce paramètre ne semble pas être influencé par la présence d'ITCs. En effet, la comparaison des taux de croissance pendant la phase exponentielle des courbes de croissance en présence et en absence d'ITCs a montré que les vitesses de croissance ne changeaient pas et ce quelque soit la concentration en ITC dans le milieu de culture (**Figure 37**). Ce constat était le même pour toutes les courbes de croissances établies.

Le **tableau 28** présente les indices d'efficacité antibactérienne (I_{EA}) moyens, pour chaque ITC contre chacune des bactéries testées, calculés sur trois concentrations identiques à l'exception du 3mPITC. En effet, en raison de sa faible solubilité dans l'eau, les concentrations testées pour cet ITC étaient très faibles par rapport aux autres composés.

Tableau 28 : Activité antibactérienne de 10 ITCs sur 14 souches de bactéries

N° souche bactérienne	Indices d'efficacité antibactérienne sur 3 concentrations en ITC identiques *									
	SFN	Ibérine	AITC	MITC	PITC	3mPITC	ProITC	3mproITC	BITC	PEITC
1	2,0 ± 0,6 ^{a,b,c}	1,8 ± 0,5 ^{ij}	1,3 ± 0,3 ⁿ	1,2 ± 0,2 ^{qr}	2,0 ± 0,5 ^u	1,5 ± 0,3 ^{A,B}	0,8 ± 0,3^F	4,8 ± 1,6 ^{J,K,L}	37,6 ± 14,5 ^S	28,7 ± 7,2 ^{X,Y}
2	5,4 ± 2,2 ^d	3,8 ± 0,9 ^j	2,8 ± 3,4 ^{n,o}	1,3 ± 0,6 ^{qr}	1,2 ± 0,3 ^u	2,7 ± 0,9 ^B	2,0 ± 0,9 ^{F,G}	5,3 ± 1,6 ^{J,K,L}	5,2 ± 0,8 ^O	5,3 ± 0,7 ^{T,U}
3	1,8 ± 0,4 ^{a,b,c}	1,6 ± 0,3 ^{ij}	0,8 ± 0,2ⁿ	0,8 ± 0,1^{qr}	1,4 ± 0,1 ^u	1,5 ± 0,2 ^{A,B}	1,0 ± 0,1^F	7,9 ± 2,8 ^{K,L}	32,5 ± 9,3 ^S	20,2 ± 16,4 ^{W,X}
4	7,2 ± 2,2 ^{d,e}	6,7 ± 2,7 ^k	1,3 ± 0,3 ⁿ	1,0 ± 0,2 ^{qr}	1,2 ± 0,3 ^u	6,9 ± 2,3 ^C	4,6 ± 1,4 ^{F,G,H}	5,4 ± 2,0 ^{J,K,L}	6,2 ± 1,1 ^{O,P}	5,6 ± 1,2 ^{T,U,V}
5	8,9 ± 1,3 ^e	8,4 ± 0,7 ^k	11,8 ± 6,9 ^p	15,0 ± 6,8 ^t	10,7 ± 7,6 ^{w,x}	8,2 ± 0,9 ^C	8,4 ± 1,5 ^{H,I}	8,9 ± 1,5 ^L	16,0 ± 8,4 ^{Q,R}	14,8 ± 7,6 ^{V,W}
6	1,0 ± 0,1^{a,b}	0,7 ± 0,2ⁱ	1,2 ± 0,2 ⁿ	1,3 ± 0,2 ^{qr}	1,7 ± 0,2 ^u	0,3 ± 0,1^{A,B}	0,6 ± 0,1^F	4,8 ± 1,6 ^{J,K,L}	32,1 ± 5,8 ^S	27,4 ± 6,6 ^{X,Y}
7	3,2 ± 0,8 ^c	2,0 ± 0,4 ^{ij}	1,0 ± 0,2ⁿ	1,1 ± 0,2 ^{qr}	1,5 ± 0,1 ^u	1,6 ± 0,1 ^A	1,5 ± 0,2 ^{F,G}	14,9 ± 6,4 ^M	39,9 ± 3,4 ^S	35,8 ± 3,8 ^Y
8	14,3 ± 1,5 ^f	8,1 ± 0,7 ^k	4,1 ± 1,0 ^{n,o}	5,2 ± 1,2 ^s	4,6 ± 1,1 ^v	19,4 ± 1,6 ^E	12,6 ± 2,5 ^I	17,4 ± 3,1 ^M	8,1 ± 2,7 ^{O,P,Q}	5,9 ± 2,2 ^{T,U,V}
9	18,3 ± 2,6 ^g	12,1 ± 7,7 ^l	2,2 ± 0,2 ^{n,o}	2,9 ± 0,6 ^f	10,0 ± 1,4 ^w	15,6 ± 3,9 ^D	7,0 ± 1,1 ^{G,H,I}	46,3 ± 6,1 ^N	17,7 ± 2,8 ^R	10,3 ± 3,5 ^{U,V}
10	6,8 ± 0,4 ^d	1,3 ± 0,1 ^{ij}	0,4 ± 0,1ⁿ	0,5 ± 0,1^{qr}	3,0 ± 0,3 ^{u,v}	1,3 ± 0,2 ^{A,B}	1,2 ± 0,1 ^{F,G}	6,9 ± 0,5 ^{J,K,L}	5,6 ± 1,2 ^O	4,8 ± 0,9 ^{T,U}
11	0,8 ± 0,1^a	3,0 ± 3,5 ^{ij}	6,0 ± 4,6 ^o	7,1 ± 4,6 ^s	1,6 ± 1,6 ^u	0,6 ± 0,1^{A,B}	9,9 ± 3,1 ^{H,I}	15,7 ± 4,1 ^M	5,9 ± 4,5 ^O	0,4 ± 0,1^T
12	2,4 ± 0,7 ^{a,b,c}	1,8 ± 0,6 ^{ij}	1,1 ± 0,3 ⁿ	1,0 ± 0,5 ^{qr}	1,1 ± 0,4 ^u	0,9 ± 0,3^{A,B}	1,0 ± 0,2^F	3,3 ± 0,5 ^J	15,1 ± 3,9 ^{P,Q,R}	5,6 ± 5,0 ^{T,U,V}
13	2,8 ± 0,9 ^{b,c}	1,9 ± 0,8 ^{ij}	1,5 ± 0,2 ⁿ	0,9 ± 0,3^{qr}	1,2 ± 0,4 ^u	0,7 ± 0,1^{A,B}	1,2 ± 0,5 ^{F,G}	3,7 ± 1,1 ^{J,K}	15,6 ± 1,6 ^{Q,R}	2,6 ± 0,4 ^{T,U}
14	29,7 ± 2,9 ^h	27,4 ± 2,9 ^m	2,5 ± 1,1 ^{n,o}	1,3 ± 0,3 ^{qr}	12,7 ± 1,9 ^x	2,6 ± 0,2 ^B	11,9 ± 12,3 ^I	49,0 ± 2,5 ^N	39,8 ± 10,9 ^S	24,4 ± 11,1 ^X
Moyenne des I_{EA}	7,5	5,7	2,7	2,9	3,8	4,6	4,5	13,8	19,8	13,7

*Données exprimées en tant que moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes. Les I_{EA} inférieurs ou égaux à 1 sont en gras.

Pour chaque ITC testé, les moyennes données avec des lettres différentes (de a à h, de i à m, de n à p, de q à t, de u à x, de A à E, de F à I, de J à N, de O à S et de T à X) sont significativement différentes (P<0,05).

1 : *S. enteritidis*, 2 : *B. subtilis*, 3 : *E. faecalis*, 4 : *L. plantarum*, 5 : *S. xylosum*, 6 : *E. coli*, 7 : *S. aureus*, 8 : *S. marcescens*, 9 : *S. typhimurium*, 10 : *Li. monocytogenes 1/2a*, 11 : *P. aeruginosa*, 12 : *E. faecium*, 13 : *B. cereus*, 14 : *K. pneumonia*.

Une souche est considérée comme sensible quand sa croissance est partiellement ou complètement inhibée en présence d'ITCs. Ceci se traduit par un effet de l'ITC sur le temps de latence (Lag) et/ou sur la taille de la population finale. Dans ces cas, l' I_{EA} de l'ITC responsable de l'inhibition de la croissance sera supérieur à 1. La **figure 38A** présente un exemple d'inhibition de croissance de la bactérie *S. xylosus* en présence d'AITC avec un I_{EA} de 11,8. Quelque soit la concentration en AITC, les courbes de croissance n'excèdent pas une absorbance de 0,3. A l'inverse, un I_{EA} inférieur ou égal à 1 traduit une résistance de la bactérie vis-à-vis d'un ITC. Par exemple sur la **figure 38B**, on remarque que la bactérie *E. faecalis* mise en présence des différentes concentrations en MITC se développe aussi bien que les témoins. Il n'y a ni retard de croissance, ni diminution de la population maximale. Le MITC n'a pas d'effet sur cette bactérie ($I_{EA} = 0,8$).

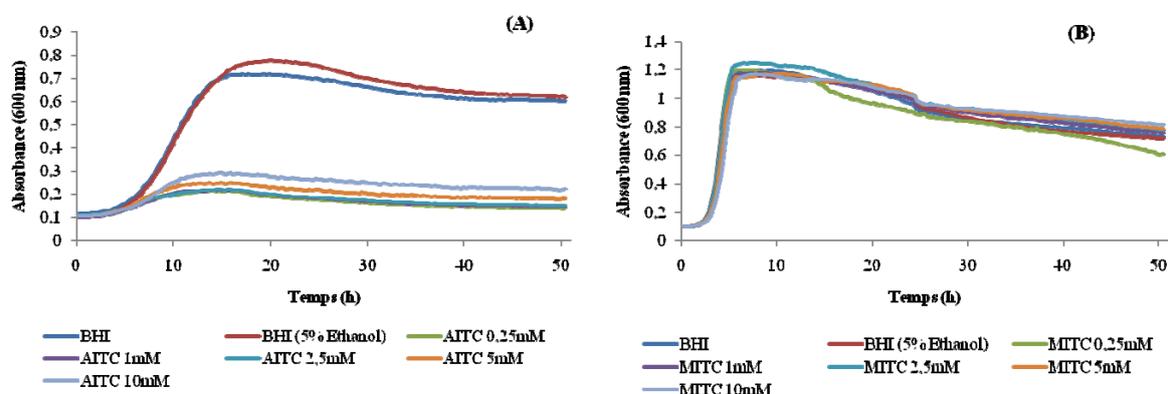


Figure 38 : Graphiques représentatifs de l'inhibition complète de croissance bactérienne (A) avec l'exemple de la bactérie *S. xylosus* vis-à-vis de l'AITC et de la résistance d'une souche bactérienne (B) avec l'exemple de la bactérie *E. faecalis* vis-à-vis du MITC.

La **figure 39** présente le spectre d'activité et l'efficacité (I_{EA}) comparés des ITCs sur les souches de bactéries étudiées. On constate d'emblais des différences importantes à la fois en termes de spectre d'activité et en termes d'efficacité antibactérienne.

En ce qui concerne le spectre d'activité, il apparaît que l'action des ITCs sur les bactéries ne se fait pas de manière indiscriminée. Certaines espèces, ex. *S. xylosus*, sont très sensibles aux ITCs quelque soit leur nature. D'autres semble être plus sensibles à certains groupes structuraux, comme par ex. *S. enteridis*, *S. aureus* et *E. coli*, qui sont très sensibles aux ITCs de nature aromatique, BITC et PEITC, et peu sensibles aux aliphatiques. Toutefois, le spectre d'activité des ITCs ne semble pas être influencé par le type de Gram. Par exemple, les spectres du SFN, de l'ibérine et du 3mProITC présentent des espèces Gram - comme bactéries les plus sensibles (*K. pneumonia* et *S. typhimurium*), mais aussi d'autres espèces Gram - parmi les plus résistantes (*S. enteridis* et *E. coli*). L'activité des ITCs n'est donc pas influencée par la différence de structure de l'enveloppe cellulaire caractéristique

du type de Gram, et ceci contrairement à ce qu'avait affirmé Jang *et al* qui avaient évalué l'activité antibactérienne de 4 ITCs (148).

En fonction de leur spectre d'activité, une répartition des ITCs, qui semble également liée à leurs structures, peut être faite :

- le PEITC et le BITC ont présenté une différence nette avec le reste des composés et des spectres très proches avec une activité maximale vis-à-vis des bactéries *S. aureus*, *S. xylosus*, *P. aeruginosas*, *E. faecalis*, *E. coli* etc.... Par contre ces ITCs ont eu moins d'effet sur les bactéries *B. subtilis* et *P. aeruginosas*, *L. monocytogenes*.

- dans la deuxième catégorie, se retrouvent le SFN et l'ibérine actifs vis-à-vis des mêmes espèces bactériennes. Ils inhibent la croissance des souches bactériennes *K. pneumonia* et *S. typhimurium* alors que les bactéries *E. coli* et *P. aeruginosa* sont résistantes vis-à-vis de ces ITCs.

- pour ce qui concerne la troisième catégorie, il y a l'AITC et le MITC qui sont plus actifs vis-à-vis des bactéries *S. xylosus* et *P. aeruginosa* alors qu'ils n'ont pas d'effet sur les bactéries *E. faecalis*, *L. monocytogenes* et *S. aureus*.

- et enfin la quatrième catégorie regroupe les ITCs qui ont présenté des spectres d'activité divers, mais qui parfois ont présenté des activités vis-à-vis d'une même bactérie. C'est par exemple le cas du PITC et du 3mproITC qui sont actifs contre *K. pneumonia*. Cependant, ces composés ont très peu d'effet sur les bactéries *E. faecium* et *B. cereus*. Nous avons observé le même phénomène avec le proTIC et le 3mPITC pour lesquels la bactérie *E. coli* est résistante alors que la souche *S. marcescens* y est sensible.

La structure des ITCs semble ainsi être déterminante dans le spectre d'activité antimicrobienne.

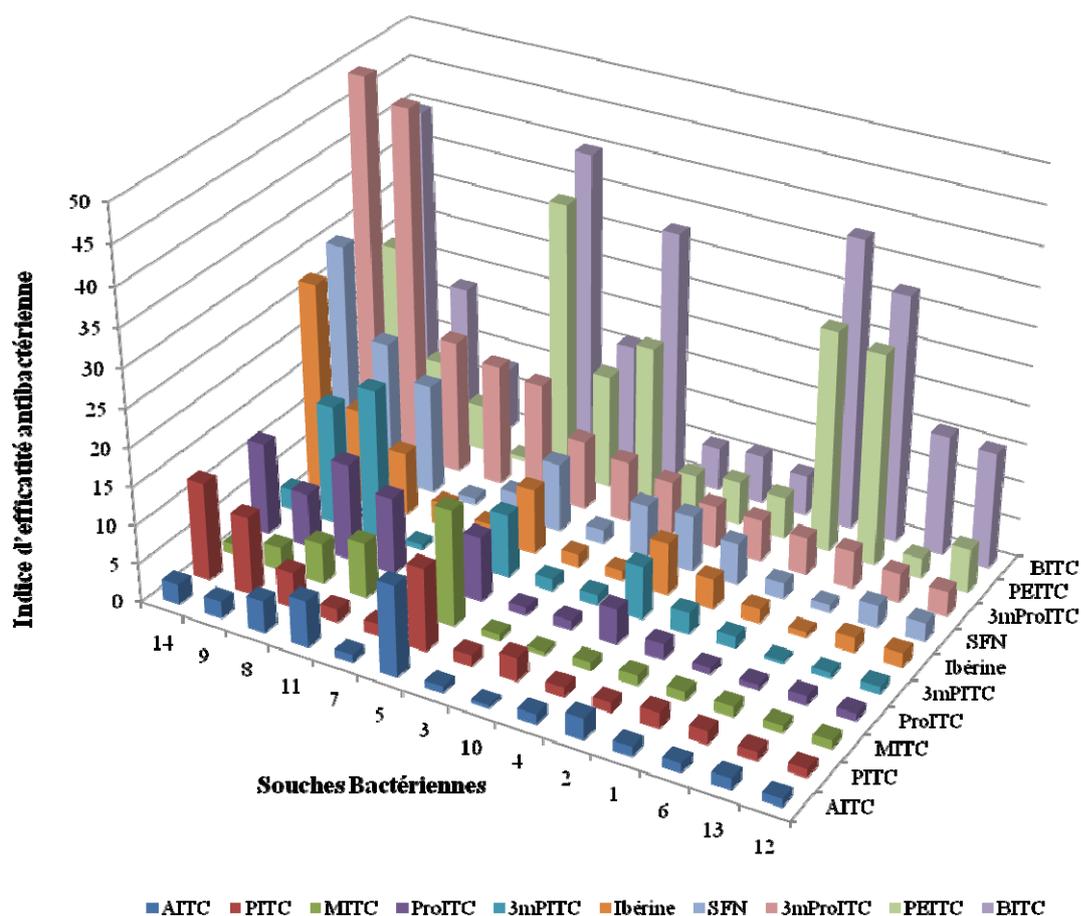


Figure 39 : Répartition des indices d'efficacité antibactérienne en fonction des différentes souches bactériennes et des différents ITCs. 1 : *S. enteritidis*, 2 : *B. subtilis*, 3 : *E. faecalis*, 4 : *L. plantarum*, 5 : *S. xylosum*, 6 : *E. coli*, 7 : *S. aureus*, 8 : *S. marcescens*, 9 : *S. typhimurium*, 10 : *L. monocytogenes 1/2a*, 11 : *P. aeruginosa*, 12 : *E. faecium*, 13 : *B. cereus*, 14 : *K. pneumoniae*.

En ce qui concerne l'efficacité de l'activité antibactérienne, on observe des variations importantes du facteur I_{EA} en fonction des ITCs et des souches bactériennes. L'activité du BITC est en moyenne de 19,8 et peut atteindre un I_{EA} de 39,9 sur *S. aureus*. De même, le PEITC et le 3mproITC ont une activité moyenne de 13,7 et de 13,9, respectivement, avec des valeurs d' I_{EA} maximales de 35,8 sur *S. aureus* et 49,0 sur *K. pneumoniae*, respectivement (**Tableau 28**). Ces 3 composés ont présenté des I_{EA} supérieurs à 25 pour 2 à 5 bactéries. Les autres composés ont présenté de façon générale de plus faibles valeurs d' I_{EA} par rapport aux composés précédemment cités. Par exemple, l'AITC et le MITC ont donné une activité moyenne de 2,7 et 2,9 respectivement avec des valeurs d' I_{EA} maximales de 11,8 et 15,0 sur *S. xylosum*.

Pour chaque ITC testé, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice d'ITC (CMI) pour un I_{EA} moyen d'au moins 1,5 (**Tableau 29**). Pour certains ITCs, les CMI n'ont pas pu être

déterminées car elles sont probablement supérieures aux concentrations maximales choisies pour la réalisation des tests.

Tableau 29 : Tableau récapitulatif des concentrations minimales inhibitrices des 10 ITCs

N° souche bactérienne*	Concentrations minimales inhibitrices (mmol/L) donnant un I _{EA} d'au moins 1,5									
	SFN	Ibérine	AITC	MITC	PITC	3mPITC	ProITC	3mProITC	BITC	PEITC
1	2,50	5,00	5,00	10,00	1,00	1,13	10,00	1,00	0,25	0,25
2	5,00	5,00	0,25	1,00	5,00	>1,13	0,25	5,00	1,00	0,50
3	5,00	1,00	>10	>10	5,00	0,01	0,25	0,25	0,25	0,25
4	0,05	0,05	10,00	10,00	5,00	0,01	0,25	0,25	1,00	0,25
5	0,05	0,05	0,25	0,25	0,05	0,01	0,25	0,25	0,05	0,01
6	5,00	>5	10,00	5,00	5,00	>1,13	>10	1,00	0,05	0,25
7	1,00	1,00	>10	10,00	5,00	0,05	2,50	0,25	0,25	0,25
8	0,05	0,25	1,00	1,00	0,25	0,01	0,25	0,25	0,05	0,25
9	0,05	0,25	0,25	0,25	0,05	0,01	0,25	0,25	0,05	0,01
10	2,50	5,00	10,00	>10	5,00	0,01	5,00	0,25	1,00	0,50
11	>5	5,00	0,25	0,25	5,00	>1,13	0,25	0,25	0,25	>5
12	1,00	2,50	5,00	5,00	5,00	>1,13	10,00	1,00	1,00	0,50
13	1,00	2,50	5,00	10,00	5,00	>1,13	5,00	1,00	1,00	0,50
14	0,25	0,25	2,50	2,50	1,00	0,05	1,00	0,25	0,25	0,25
Classement par efficacité	4	5	8	8	7	6	6	2	1	3

*1 : *S. enteritidis*, 2 : *B. subtilis*, 3 : *E. faecalis*, 4 : *L. plantarum*, 5 : *S. xylosum*, 6 : *E. coli*, 7 : *S. aureus*, 8 : *S. marcescens*, 9 : *S. typhimurium*, 10 : *L. monocytogenes 1/2a*, 11 : *P. aeruginosa*, 12 : *E. faecium*, 13 : *B. cereus*, 14 : *K. pneumoniae*.

On remarque que les composés ayant donné des valeurs élevées d'I_{EA}, présentent des faibles valeurs de CMI. C'est principalement le cas du BITC et du PITC dont les CMI déterminées sont comprises entre 0,01 et 0,05 µmol/L, ce qui démontre bien que ces composés sont les plus efficaces. En ce qui concerne les ITCs avec des plus faibles valeurs d'efficacité, les CMI déterminées sont plus élevées que celles du BITC ou du PEITC. Ces composés sont moins actifs que les précédents. C'est le cas de l'AITC et du MITC.

Grace aux moyennes d'I_{EA} calculées pour chaque ITC et en tenant compte de leur CMI nous avons pu classer ces substances en fonction de leur efficacité d'inhibition. Il apparaît clairement qu'à l'exception du 3mproITC et du PITC, les composés les plus actifs sont des ITCs aromatiques (BITC, PEITC). Le fort pouvoir d'inhibition des ITCs aromatiques sur la croissance de cellules bactériennes avait été démontré par d'autres auteurs (148,149). D'après Troconso *et al*, la capacité de ces ITCs à

inhiber la croissance d'une bactérie est due à leur caractère lipophile, leur permettant de réagir et d'inactiver les enzymes de la membrane plasmique nécessaires à la survie des cellules (104).

On remarque que le BITC est 1,5 fois plus actif que le PEITC mais 5 fois plus que le PITC. Bien que ce soit un composé aromatique, cet ITC présente un profil particulier puisque son efficacité antibactérienne est beaucoup moins importante comparée aux autres aromatiques. Ces observations confirment bien qu'il y a une relation entre la structure des ITCs et leur efficacité antibactérienne, puisque la petite différence structurale entre le PEITC et le PITC génère une différence significative au niveau de l'intensité de l'activité antibactérienne.

L'importance de la structure des ITCs est aussi bien illustrée par la modification structurale 3mproITC/proITC et 3mPITC/PITC qui est associée, non seulement à une modification du spectre, mais aussi à une augmentation de l'efficacité antibactérienne. En effet, le 3mproITC a présenté une activité antibactérienne 3 fois plus importante que celle du proITC. Dans la même logique, on remarque que l'efficacité d'inhibition du 3mPITC est plus élevée que celle du PITC. L'efficacité antibactérienne de ces composés est améliorée grâce à la présence du groupement méthyl-thiol (nucléophile) qui pourrait favoriser l'interaction des ITCs avec des composés intervenant dans la résistance et la survie des cellules bactériennes. La structure des ITCs est donc importante, comme on l'a vu, non seulement dans la détermination du spectre d'activité, mais également dans la détermination de l'intensité de cette activité.

Il faut noter aussi que pour des composés analogues ou de structures chimiques proches, le spectre d'activité peut être le même, mais les efficacités d'inhibition sont différentes. C'est le cas de du SFN dont l'efficacité antibactérienne est plus importante que celle de l'ibérine.

La nature de l'action des ITCs sur les cellules bactériennes n'est pas connue. Au vu de nos résultats toutefois, aucun effet sur les taux de croissance des bactéries n'a été observé : les mesures d'absorbance traduisaient soit un allongement du temps de latence (Lag), soit une population finale moins importante. Ce constat, signifierait, *à priori*, un effet des ITCs qui serait de nature bactéricide et non bactériostatique. La mise en culture des cellules en présence d'un ITC résulterait en l'élimination d'une partie de la population initiale ; aucun effet sur la capacité de croissance des survivants n'aurait lieu puisque ces derniers pourront se multiplier normalement, à la même vitesse que les témoins. Le retard observé serait simplement lié au temps nécessaire pour avoir une augmentation de population détectable.

Suite à ce travail, les activités antibactériennes d'extraits de chou (variété mégaton) et de raifort ont été testées sur les 14 souches de bactéries. Pour cette analyse, les ITCs formés après hydrolyses des GSLs sont extraits au dichlorométhane puis repris dans de l'éthanol par transfert de phase. Chaque extrait a été analysé par CLHP afin de déterminer leur contenu en ITCs et évaluer leurs concentrations finales dans le milieu de croissance des cellules. Ainsi, l'extrait de chou contenait de l'ibérine, du SFN et de l'AITC à des concentrations finales de 0,07, 0,04 et 0,03 mmol/L. Dans le raifort, du PEIT et de l'AITC ont été identifiés et leurs concentrations finales étaient de 2,8 et 8,4 mmol/L, respectivement.

Des cinétiques de croissances des bactéries en présence de chaque extrait ont ensuite été réalisées (**Figure 40**). Pour chaque matrice alimentaire testée, nous avons déterminé les I_{EA} correspondants aux différentes souches bactériennes et les résultats sont présentés dans le **tableau 30**.

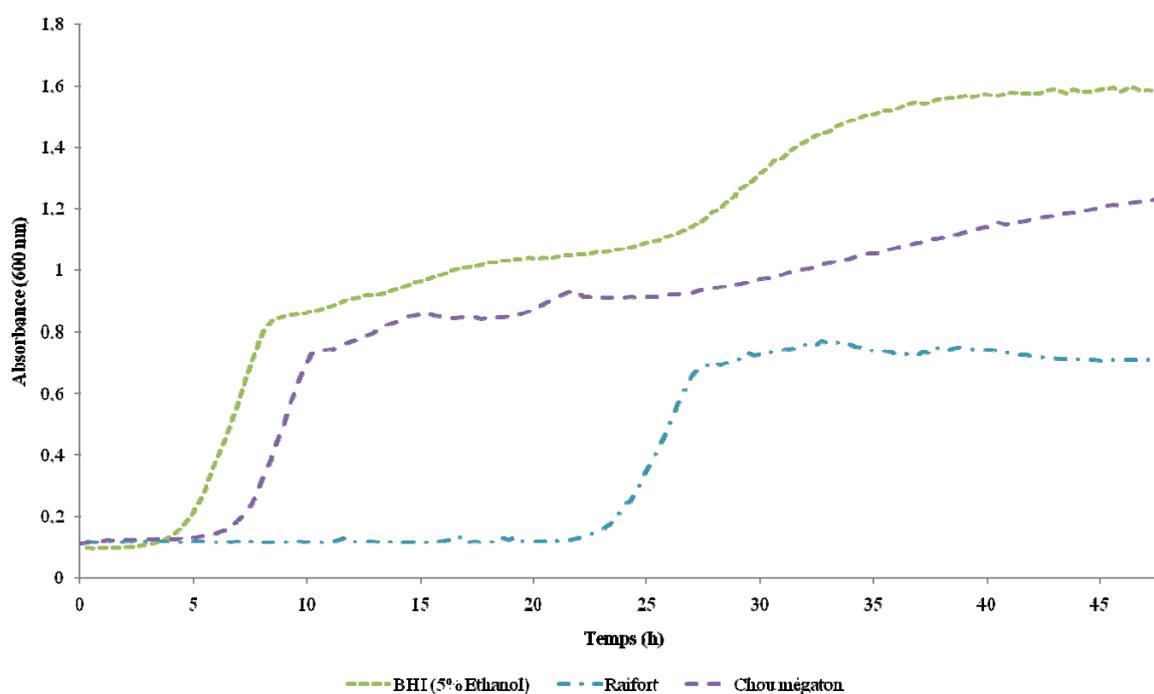


Figure 40 : Graphique représentatif de l'effet antibactérien d'extrait de raifort et de chou blanc de la variété Mégaton sur la souche *S. typhimurium*. BHI (5% Ethanol) : témoin avec 5% d'éthanol.

Tableau 30 : Tableau récapitulatif des indices d'efficacité antibactérienne d'extraits de chou et de raifort

N° souches bactériennes	Indices d'efficacité antibactérienne des extraits de choux et de raifort *	
	Chou	Raifort
1	1,3 ± 0,1	3,7 ± 0,2
2	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,1
3	1,3 ± 0,1	4,4 ± 0,2
4	2,6 ± 1,3	3,0 ± 2,4
5	1,7 ± 0,8	3,1 ± 0,1
6	2,3 ± 0,4	5,8 ± 0,6
7	1,4 ± 0,1	6,1 ± 0,7
8	3,8 ± 0,5	4,8 ± 0,3
9	1,0 ± 0,1	4,7 ± 0,5
10	1,2 ± 0,1	3,3 ± 0,4
11	1,1 ± 0,2	25,2 ± 4,3
12	1,1 ± 0,1	2,5 ± 0,2
13	1,6 ± 0,1	2,5 ± 0,4
14	1,3 ± 0,1	50,6 ± 4,1
Moyenne des I_{EA}	1,6	8,6

*Données exprimées en tant que moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes. Les I_{EA} inférieurs ou égaux à 1 sont en gras.

1 : *S. enteritidis*, 2 : *B. subtilis*, 3 : *E. faecalis*, 4 : *L. plantarum*, 5 : *S. xylosus*, 6 : *E. coli*, 7 : *S. aureus*, 8 : *S. marcescens*, 9 : *S. typhimurium*, 10 : *L. monocytogenes 1/2a*, 11 : *P. aeruginosa*, 12 : *E. faecium*, 13 : *B. cereus*, 14 : *K. pneumonia*.

On remarque que les extraits de ces 2 matrices inhibent la croissance des bactéries à l'exception des souches bactériennes suivantes : *B. subtilis*, résistante au raifort et au chou et *S. typhimurium*, résistante au chou.

La différence entre ces extraits se situe essentiellement au niveau de l'efficacité antibactérienne. En effet, le Raifort est plus actif que le chou, il a présenté des I_{EA} supérieurs à 25 pour les bactéries *P. aeruginosa* et *K. pneumonia*. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, le raifort est riche en ITC et particulièrement en PEITC qui a présenté un fort pouvoir antibactérien par rapport à l'AITC. Pour la bactérie *P. aeruginosa*, il avait été remarqué que le PEITC seul ne présentait aucun effet, alors que l'extrait est plus efficace pour l'inhibition de la croissance de cette bactérie. Cette augmentation d'efficacité pourrait s'expliquer par l'action synergique des ITCs (PEITC et AITC) présents dans l'extrait (104). Cependant, il apparaît que pour des bactéries comme *E. coli* et *S. enteritidis* ou *S. aureus*, l'extrait de raifort est 4 à 8 fois moins efficace que le PEITC. Ces observations sont probablement liées d'une part au fait que d'autres composés présents dans les extraits favorisent la croissance des bactéries malgré la présence d'ITCs ou et d'autres part à un effet d'antagonisme entre les composés présents dans la matrice (144).

En ce qui concerne l'extrait de chou, à l'exception de *B. subtilis* et *S. typhimurium*, on observe une inhibition de la croissance des cellules bactériennes (I_{EA} >1). Les faibles valeurs des

indices d'efficacité antibactérienne mesurées s'expliquent par un effet moins important de cet extrait sur le retard de croissance et/ou sur la population maximale, voire aucun effet. Les ITCs identifiés dans le chou (ibérine, AITC, SFN) ont présenté des efficacités antibactériennes moins importantes que ceux du raifort. De plus, leurs concentrations dans le milieu de croissance bactérienne est faible et donc parfois inférieurs à leurs CMI vis-à-vis des bactéries testées.

L'association de ces ITCs devrait favoriser l'inhibition de la croissance bactérienne comme l'avaient démontré d'autres auteurs qui ont déterminé l'effet d'un mélange standard d'ITCs sur la croissance de bactéries (104,149). Cependant, comme pour le raifort, il est probable que des composés présents dans ces matrices favorisent la croissance des cellules ou qu'il y ait un effet antagoniste entre les composés présents dans le chou.

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus montre bien que les ITCs ainsi que les extraits de Brassicacées possèdent des propriétés d'inhibition contre un large spectre de bactéries pathogènes. Cette activité est sélective car elle varie à la fois en fonction de la souche bactérienne et en fonction de la nature de la chaîne latérale des ITCs.

2.2.2 Inhibition de la croissance de cellules cancéreuses

Des travaux menés en parallèle sur le chou au sein du laboratoire de biochimie et nutrition d'AERIAL, ont montré que des extraits de cette plante présentaient une activité d'inhibition de croissance de cellules cancéreuses SW620. L'analyse chromatographique de ces extraits avec la méthode de chauffage de colonne a révélé la présence de SFN et d'ibérine. Nous avons donc choisis de tester *in vitro* le potentiel d'inhibition de ces 2 composés sur la croissance de cellules métastatiques colorectales SW620. La **figure 41** montre l'effet antiprolifératif de ces ITCs sur ces cellules traitées entre 10 et 40 $\mu\text{mol/L}$. Le contrôle négatif est constitué par des cellules non traitées.

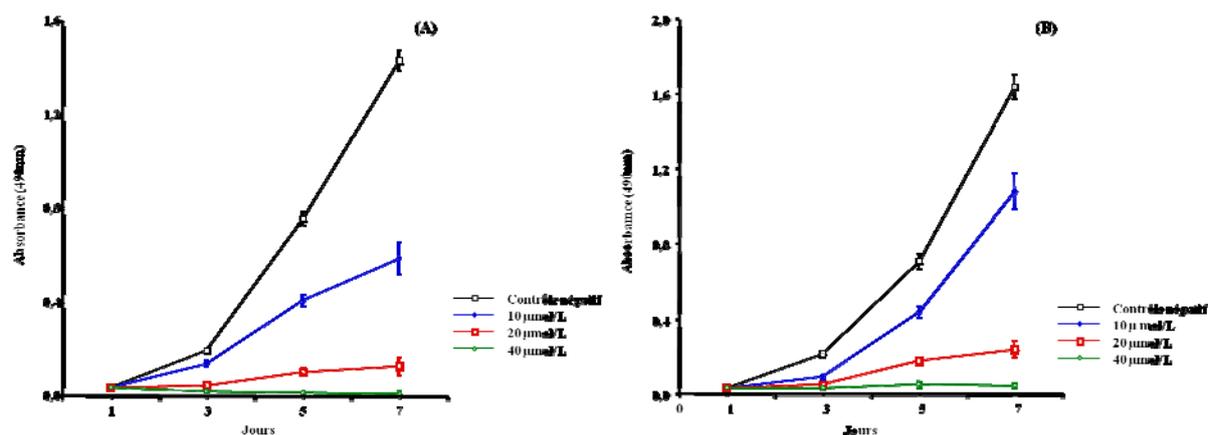


Figure 41 : Effet du SFN (A) et de l'ibérine (B) sur la croissance de cellules SW620

Il apparaît que le SFN et l'ibérine inhibent de façon dose-dépendante la croissance des cellules métastatiques SW620. Pour le SFN, on note par exemple 43 % d'inhibition en 4 jours à la dose de 10 µmol/L, et 88 % d'inhibition à la dose de 20 µmol/L en 6 jours de traitement. On obtient une CI_{50} de 8,5 µmol/L avec le SFN. Ces observations sont en accord avec les résultats de précédents travaux portant sur l'étude du pouvoir anticancéreux du SFN (150,151).

En ce qui concerne l'ibérine, moins de 15 µmol/L d'ITC est nécessaire pour inhiber de 50% la croissance cellulaire. Bien que ce composé soit 2 fois moins actif que le SFN, les résultats obtenus démontrent bien sa capacité à inhiber les cellules cancéreuses coliques SW620. Les études bibliographiques effectuées n'ont pas fait état d'évaluation de l'activité antiproliférative de l'ibérine sur des cellules cancéreuses SW620. Cependant, Jakubikova *et al* ont évalué son effet sur la croissance de cellules cancéreuses coliques Caco-2. Ils ont trouvé qu'un traitement pendant 72h avec 18 µmol/L d'ibérine inhibait de 50% la prolifération cellulaire (152). Après 24h de traitement, ces auteurs ont remarqué, une augmentation du taux d'ARNm codant pour les enzymes de détoxification de la phase II et codant pour le gène d'une enzyme antioxydante (thiorédoxine réductase), entraînant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules cancéreuses.

Ces résultats démontrent bien que la capacité du SFN et de l'ibérine à inhiber les cellules cancéreuses SW620, serait à l'origine de l'activité anticancéreuse de l'extrait de chou. Il serait intéressant de tester le pouvoir anticancéreux de l'ensemble des ITCs utilisés dans cette étude.

Conclusion

Au cours de ce travail, nous nous sommes attachés dans un premier temps à évaluer le contenu en ITCs (totaux et individuels) dans différentes matrices alimentaires puis dans un deuxième temps à étudier leurs activités biologiques (anticancéreuses et antibactériennes). Ceci dans un but final de contribution à la valorisation des propriétés nutritionnelles des Brassicacées et de leurs produits dérivés.

Les données du dosage des ITCs totaux ainsi que celles de la détermination des composés majeurs, ont révélé une diversité qualitative et quantitative du contenu en ITCs en fonction de l'espèce et de la variété de Brassicacées. Le raifort a présenté des teneurs en ITCs beaucoup plus élevées que le chou-fleur et chou. Parmi les échantillons de chou analysés, les variétés burton, ramkila et mandy contenaient plus d'ITCs que les autres. D'autres facteurs tel que l'origine génétique, le climat, l'environnement, les méthodes de culture des plantes, les conditions de stockage ainsi que le processus de transformation peuvent également avoir un impact sur la composition en ITCs des Brassicacées. Le dernier facteur concerne plus précisément le chou et la choucroute. Il a été remarqué qu'après fermentation, la teneur en ITCs est très faible, ce qui n'a pas permis leur identification dans le produit fini.

En ce qui concerne les propriétés biologiques des ITCs, l'étude de l'activité antibactérienne des différentes espèces moléculaires, a révélé que tous ces composés sont capables d'inhiber la croissance des bactéries. L'efficacité antibactérienne va dépendre à la fois de l'espèce bactérienne, de la structure chimique de la chaîne latérale des ITCs et de la concentration en ITCs. Pour chaque ITC, nous avons déterminé un facteur d'efficacité antibactérienne et une concentration minimale inhibitrice vis-à-vis de chaque bactérie pathogène. Il s'est avéré que le BITC, le PEITC et le 3mproITC sont plus actifs que les autres composés. Ces 3 ITCs ont présenté des effets d'inhibition de croissance contre une large gamme de bactéries pathogènes. L'AITC et le MITC se sont révélés moins actifs que le BITC mais ils ont également inhibé la croissance de plusieurs bactéries. L'activité antibactérienne d'extrait de chou et de raifort a été testée. Le raifort a présenté une activité plus importante que le chou. Ces propriétés permettent d'envisager l'utilisation des ITCs ainsi que les extraits de ces matrices comme conservateurs naturels pour prolonger la durée de vie des produits alimentaires.

D'autre part, l'étude de l'activité anticancéreuse du SFN et de l'ibérine, a révélé que ces composés étaient très actifs pour l'inhibition des cellules cancéreuses coliques SW620.

Toutes ces observations suggèrent qu'il faudrait varier sa consommation en crucifères pour pouvoir bénéficier de bienfaits de chaque ITC présent dans la nature. Le choix des variétés, des

conditions de culture, des conditions de conservation et éventuellement de transformation vont avoir une influence sur la qualité nutritionnelle des Brassicacées.

Conclusion générale

La relation entre la consommation de légumes de la famille des Brassicacées et la diminution du risque de développer des maladies chroniques, n'est plus à démontrer. Ces propriétés de chimioprotection des crucifères sont attribuées aux phytonutriments qu'ils contiennent et plus précisément aux ITCs. Cependant, bien que des propriétés pharmacologiques expliquant les effets positifs sur la santé de l'Homme de certaines de ces molécules aient été démontrées, leurs mécanismes d'action ne sont pas encore élucidés. L'étude de ces mécanismes nécessite de pouvoir disposer de molécules pures en quantités suffisantes, d'où la nécessité de développer des stratégies analytiques pour les isoler, les identifier et les caractériser. C'est dans ce contexte que ce travail de thèse s'est inscrit afin de mettre au point des méthodes analytiques fiables et validées pour la recherche d'ITCs dans les Brassicacées produites dans la Région Alsace. Un intérêt particulier a été accordé au chou blanc et à son produit dérivé, la choucroute.

Dans la première partie de cette thèse, nous nous sommes d'abord intéressés à l'analyse chromatographique des ITCs. Plusieurs alternatives ont été proposées et trois méthodes ont été mises au point en utilisant un mélange d'ITCs ayant des propriétés physicochimiques différentes. La première méthode est basée sur la CPG qui a nécessité l'utilisation de deux colonnes capillaires de polarité différente. Les deux autres sont des méthodes d'analyse par CLHP en phase inverse mises au point pour résoudre les problèmes liés à la faible solubilité des ITCs dans l'eau. Il s'agissait dans un premier temps d'une CLHP avec dérivation pré-colonne au mercaptoéthanol. Les produits de dérivation plus polaires, ont permis une analyse quantitative des ITCs correspondants en utilisant une phase mobile aqueuse. La deuxième méthode est une CLHP avec chauffage de colonne permettant de réduire la formation de précipités dans la phase mobile aqueuse. Ces deux méthodes de CLHP se sont avérées sensibles avec de faibles valeurs de limites de détection et de quantification.

Une fois les méthodes chromatographiques mises au point, nous avons cherché à élaborer une méthode d'extraction des ITCs afin d'optimiser les quantités extraites à partir du chou. Trois techniques ont été testées, toujours à l'aide d'un mélange d'ITCs ayant des propriétés physicochimiques différentes. Les premiers travaux entrepris ont consisté à tester l'ELL avec différents solvants. Seul le dichlorométhane a donné des rendements satisfaisants (< 98%). Cependant, lorsque la méthode a été appliquée à l'extraction d'ITCs formés dans le chou, les taux de recouvrement n'étaient pas satisfaisants, principalement pour les ITCs ayant une faible solubilité dans l'eau. Pour favoriser l'extraction de ces composés, il a fallu optimiser les paramètres ayant une influence sur l'efficacité de la méthode d'extraction ELL tels que le volume du solvant d'extraction et le temps de contact entre la phase aqueuse et la phase organique. Ceci a permis d'obtenir des taux de recouvrement supérieurs à 90% pour tous les ITCs. La deuxième technique d'extraction testée était la SPE. Des essais ont été effectués sur 12 cartouches d'extraction avec des solutions témoins d'ITCs. Un protocole standard a été appliqué afin de choisir la phase solide la plus adaptée à l'extraction des ITCs formés après hydrolyse des GSLs. Seule la cartouche Oasis HLB a présenté des rendements

satisfaisants (< 88,5%). Cependant, l'application de la méthode SPE au chou, a donné des taux de recouvrement inférieurs à 80%. Et enfin la dernière technique utilisée était la PLE. La terre de diatomée et le dichlorométhane ont été choisis, respectivement comme dispersant et solvant d'extraction. Les rendements d'extraction ainsi que les taux de recouvrement calculés étaient faibles. Les résultats obtenus dans cette partie ont montré que l'ELL restait la méthode la plus adaptée à l'extraction des ITCs.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes attachés à l'évaluation du contenu en ITCs dans trois matrices alimentaires (chou, chou-fleur et raifort). Une première analyse a consisté à faire un dosage des ITCs totaux par cyclocondensation avec un réactif dithiol. Ensuite, les ITCs présents dans ces différentes matrices ont pu être identifiés et quantifiés individuellement grâce aux méthodes mises au point dans la première partie. Les résultats des deux méthodes de dosage ont révélé une diversité qualitative et quantitative du contenu en ITCs en fonction de l'espèce et de la variété de Brassicacées. Le processus de fermentation a également un effet sur la composition en ITCs puisque la comparaison des teneurs en ITCs totaux du chou et de la choucroute a montré d'importantes différences entre ces deux matrices alimentaires. Après fermentation, les teneurs en ITCs sont réduites de façon importante; ce qui n'a pas permis leur identification dans le produit fini, alors que dans le chou frais, la présence d'ibérine, de SFN et d'AITC, a été mise en évidence. Quant aux autres matrices alimentaires : le chou-fleur s'est révélé être une source d'ibérine et de SFN, et le raifort, une source d'AITC et de PEITC.

Parallèlement à ce travail, nous avons cherché à évaluer la capacité des ITCs à inhiber la croissance de cellules bactériennes et de cellules cancéreuses. L'activité antibactérienne de 10 ITCs a été testée sur 14 souches de bactéries pathogènes. Tous ces composés ont montré une action antibactérienne contre au moins 7 des souches testées. Le spectre d'activité des ITCs ainsi que leur efficacité antibactérienne variaient à la fois en fonction de la souche bactérienne et de la structure de la chaîne latérale des ITCs. Certains composés comme le BITC, le PEITC ou le 3mproITC se sont révélés être de puissants antibactériens en inhibant un grand nombre de bactéries. En ce qui concerne l'activité anticancéreuse, elle a été déterminée pour 2 ITCs (SFN et ibérine). Les résultats ont montré que ces composés étaient très actifs en tant qu'inhibiteurs de prolifération des cellules cancéreuses coliques SW620. L'inclusion dans une telle étude d'une plus large gamme d'ITCs permettrait de sélectionner les espèces moléculaires les plus efficaces sur ce modèle biologique.

En ce qui concerne les extraits des crucifères, une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries pathogènes a été observée avec des extraits de raifort et de chou, bien que moins importante que celle des étalons d'ITCs. Pour pouvoir vérifier la synergie ou l'antagonisme entre les composés de ces extraits, il serait intéressant de comparer les activités antibactériennes d'extrait de matrices alimentaires avec celles d'un mélange d'ITCs standards (identifiés dans la matrice).

Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation des ITCs et des extraits de crucifères dans des compléments alimentaires ou pour une supplémentation alimentaire. Les ITCs pourraient ainsi être utilisés dans la prévention de cancers en tant que compléments alimentaires à l'aide de formes galéniques gastro-résistantes ou de microcapsules dont la libération est régulée selon le pH de l'intestin. Des paramètres de biodisponibilité des ITCs tels que leur libération dans le tractus digestif, leur résistance à l'acidité, ainsi que les transformations métaboliques éventuelles devront être pris en compte.

En ce qui concerne la supplémentation alimentaire, elle nécessitera la prise en compte des effets des procédés de transformations sur la stabilité des ITCs, ainsi que des éventuels effets de ces derniers sur les propriétés technologiques et sensorielles des aliments. L'un des procédés susceptibles de provoquer des modifications ou des dégradations est le traitement thermique. Cette application implique donc d'évaluer la stabilité thermique des ITCs ajoutés et de prendre en considération les transformations qui peuvent se produire au cours du stockage des aliments supplémentés.

Ce travail de thèse est une étape importante à la fois dans la valorisation des crucifères, des produits ou des sous-produits de leur transformation, de leurs extraits ou encore des ITCs purifiés. Toutefois, une confirmation de ces activités devrait être faite via des tests *in vivo* sur des extraits et sur des ITCs purifiés.

D'autres aspects restent encore à étudier, aussi bien au niveau de la chimie que de la biologie. Nous n'avons malheureusement pas eu le temps de finir toutes les investigations et plusieurs perspectives se dégagent. L'une d'elles serait de poursuivre l'optimisation de l'extraction des ITCs par PLE par modification de la température d'extraction et du temps de contact entre le solvant et l'échantillon. Il serait intéressant aussi d'approfondir la caractérisation des pics de composés inconnus dans les extraits des matrices alimentaires. Il s'agirait plus précisément de recueillir des fractions pures de ses substances et de les analyser avec des méthodes de caractérisation performantes telles que la spectrométrie de masse haute résolution, la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie infrarouge.

Cette étude a finalement permis de confirmer l'intérêt qu'on attribue aux ITCs et montre bien qu'il faudrait varier sa consommation en crucifères pour pouvoir bénéficier des bienfaits des différents ITCs présents qu'elles contiennent. Cependant, la bio-activité des ITCs n'est sans doute pas limitée à l'effet antibactérien et à l'activité anticancéreuse, c'est pour cela que d'autres activités méritent d'être explorées. Ceci est évidemment d'autant plus aisé que les méthodes permettant d'isoler et d'identifier ces composés sont aujourd'hui au point.

Références bibliographiques

- (1) REGIME ALIMENTAIRE, NUTRITION ET PREVENTION DES MALADIES CHRONIQUES. <http://www.fao.org/WAIRDOCS/WHO/AC911F/AC911F00.HTM>. Consulté le 24/06/11.
- (2) CRUCIFÈRES- <http://www.universalis.fr/encyclopedie/cruciferes/>. Consulté le 6/03/11.
- (3) Cancer, T. I. A. for R. on *Cruciferous Vegetables, Isothiocyanates and Indoles*; 1^{er} éd. World Health Organization, 2004.
- (4) Corine Enard; Smile Les Brassicacées ou crucifères, une famille nombreuse. http://www.versailles-grignon.inra.fr/serre_expo/expo_temporaire/expo/fiches_plantes/crucifere. Consulté le 8/03/11 **2011**.
- (5) Björkman, M. Klingen, I. Birch, A. N. E. Bones, A. M. Bruce, T. J. A. Johansen, T. J. Meadow, R. Mølmann, J. Seljåsen, R. Smart, L. E.; Stewart, D. Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health - Influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry* **2011**, 72, 538-556.
- (6) Naska, A. Fouskakis, D. Oikonomou, E. Almeida, M. D. V. Berg, M. A. Gedrich, K. Moreiras, O. Nelson, M. Trygg, K. Turrini, A. Remaut, A. M. Volatier, J. L.; Trichopoulou, A. Dietary patterns and their socio-demographic determinants in 10 European countries: data from the DAFNE databank. *Eur J Clin Nutr* **2005**, 60, 181-190.
- (7) Bosetti, C. Negri, E. Kolonel, L. Ron, E. Franceschi, S. Preston-Martin, S. McTiernan, A. Dal Maso, L. Mark, S. D. Mabuchi, K. Land, C. Jin, F. Wingren, G. Galanti, M. R. Hallquist, A. Glatte, E. Lund, E. Levi, F. Linos, D.; La Vecchia, C. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. VII. Cruciferous and other vegetables (International). *Cancer Causes and Control* **2002**, 13, 765-775.
- (8) Voorrips, L. E. Goldbohm, R. A. Van Poppel, G. Sturmans, F. Hermus, R. J. J.; Van Den Brandt, P. A. Vegetable and fruit consumption and risks of colon and rectal cancer in a prospective cohort study: The Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *American Journal of Epidemiology* **2000**, 152, 1081-1092.
- (9) Choux en **2009**. http://driaif.ile-de-france.agriculture.gouv.fr/IMG/xlsChoux_en_2009_surfaces_rendements_productions_varietes_Ilede-France_et_regions_francaises_cle01f513.xls. Consulté le 9/03/11.
- (10) L'Agriculture en Alsace. http://www.region-alsace.eu/medias/publications/agriculture/essentiel_agri.pdf. Consulté le 9/03/11.
- (11) Pitrat, M.; Foury, C. *Histoires de légumes: des origines à l'orée du XXIe siècle*; Editions Quae, 2003.
- (12) <http://www.labonnegraine.com/217-898-large/chou-pointu-bacalan-de-rennes.jpg>. Consulté le 11/03/11.
- (13) <http://www.willemsefrance.fr/plantes/graines-potager/legumes-de-a-a-z/choux/les-choux-cabus.html>. Consulté le 11/03/11.
- (14) http://www.graines-voltz.com/Images/catalogue/Apercu/22111_94412716_milan_clarissa_BEJO.jpg, consulté le 11/03/11.
- (15) Chou cabus - Quintal d'alsace - Potagères - Caillard. <http://www.graines-caillard.com/produits/fiche-produit.php?mod=potageres&product=59>. Consulté le 11/03/11.
- (16) Guignard, J.-L.; Dupont, F. *Abrégés de botanique systématique moléculaire*; 13^e éd. Editions

Masson, **2004**.

- (17) Aubert, C. *Les aliments fermentés traditionnels*; Terre Vivante, **1990**.
- (18) Bourgeois, C.-M. Larpent, J.-P. Accolas, J.-P. Arnoux, M.; Collectif *Microbiologie alimentaire : Tome 2, Aliments fermentés et fermentations alimentaires*; 2^e éd. Tec & Doc Lavoisier, **2006**.
- (19) Tolonen, M. Rajaniemi, S. Pihlava, J.-M. Johansson, T. Saris, P. E. J.; Ryhänen, E.-L. Formation of nisin, plant-derived biomolecules and antimicrobial activity in starter culture fermentations of sauerkraut. *Food Microbiology* **2004**, *21*, 167-179.
- (20) Yoon, S. S. Barrangou-Pouey, R. Breidt, F. Klaenhammer, T. R.; Fleming, H. P. Isolation and Characterization of Bacteriophages from Fermenting Sauerkraut. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 973-976.
- (21) Rosa, E. A. S. Heaney, R. K. Fenwick, G. R.; Portas, C. A. M. Glucosinolates in crop plants. *Horticultural reviews (USA)* **1997**.
- (22) Chou.
http://www.passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliments/Fiche.aspx?doc=chou_nu, consulté le 11/03/11.
- (23) Souci, S. W. Fachmann, W.; Kraut, H. *Food Composition and Nutrition Tables, Seventh Edition*; 7^e éd. Medpharm, **2008**.
- (24) Larsson, S. C. Håkansson, N. Näslund, I. Bergkvist, L.; Wolk, A. Fruit and Vegetable Consumption in Relation to Pancreatic Cancer Risk: A Prospective Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **2006**, *15*, 301 -305.
- (25) Willcox, J. K. Ash, S. L.; Catignani, G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2004**, *44*, 275-295.
- (26) Brennan, P. Hsu, C. C. Moullan, N. Szeszenia-Dabrowska, N. Lissowska, J. Zaridze, D. Rudnai, P. Fabianova, E. Mates, D. Bencko, V. Foretova, L. Janout, V. Gemignani, F. Chabrier, A. Hall, J. Hung, R. J. Boffetta, P.; Canzian, F. Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: A mendelian randomisation approach. *Lancet* **2005**, *366*, 1558-1560.
- (27) Chu, Y.-F. Sun, J. Wu, X.; Liu, R. H. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 6910-6916.
- (28) Chun, O. K. Smith, N. Sakagawa, A.; Lee, C. Y. Antioxidant properties of raw and processed cabbages. *Int J Food Sci Nutr* **2004**, *55*, 191-199.
- (29) Lee, K.-J. Sok, D.-E. Kim, Y.-B.; Kim, M. R. Protective effect of vegetable extracts on oxidative stress in brain of mice administered with NMDA. *Food Research International* **2002**, *35*, 55-63.
- (30) Singh, J. Upadhyay, A. K. Bahadur, A. Singh, B. Singh, K. P.; Rai, M. Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). *Scientia Horticulturae* **2006**, *108*, 233-237.
- (31) Cooke, D. Steward, W. P. Gescher, A. J.; Marczyklo, T. Anthocyanins from fruits and vegetables - Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *European Journal of Cancer* **2005**, *41*, 1931-1940.
- (32) Higdon, J. V. Delage, B. Williams, D. E.; Dashwood, R. H. Cruciferous vegetables and

human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research* **2007**, *55*, 224-236.

(33) Verhoeven, D. T. Goldbohm, R. A. van Poppel, G. Verhagen, H.; van den Brandt, P. A. Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **1996**, *5*, 733 -748.

(34) Wang, N. Shen, L. Qiu, S. Wang, X. Wang, K. Hao, J.; Xu, M. Analysis of the isothiocyanates present in three Chinese Brassica vegetable seeds and their potential anticancer bioactivities. *Eur Food Res Technol* **2010**, *231*, 951-958.

(35) Greenwald, P. Milner, J. A.; Clifford, C. K. Creating a New Paradigm in Nutrition Research within the National Cancer Institute. *The Journal of Nutrition* **2000**, *130*, 3103 -3105.

(36) Verkerk, R. Schreiner, M. Krumbein, A. Ciska, E. Holst, B. Rowland, I. de Schrijver, R. Hansen, M. Gerhäuser, C. Mithen, R.; Dekker, M. Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition and Food Research* **2009**, *53*, 219-265.

(37) Song, L.; Thornalley, P. J. Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. *Food and Chemical Toxicology* **2007**, *45*, 216-224.

(38) Holst, B.; Williamson, G. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 425.

(39) Zhang, Y. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2004**, *555*, 173-190.

(40) Cartea, M. E.; Velasco, P. Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem Rev* **2007**, *7*, 213-229.

(41) Fenwick, G. R. Heaney, R. K.; Mullin, W. J. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *Crit Rev Food Sci Nutr* **1983**, *18*, 123-201.

(42) Fahey, J. W. Zalcmann, A. T.; Talalay, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 5-51.

(43) Ciska, E. Martyniak-Przybyszewska, B.; Kozłowska, H. Content of Glucosinolates in Cruciferous Vegetables Grown at the Same Site for Two Years under Different Climatic Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 2862-2867.

(44) Kushad, M. M. Brown, A. F. Kurilich, A. C. Juvik, J. A. Klein, B. P. Wallig, M. A.; Jeffery, E. H. Variation of glucosinolates in vegetable crops of Brassica oleracea. *J. Agric. Food Chem* **1999**, *47*, 1541-1548.

(45) Shapiro, T. A. Fahey, J. W. Wade, K. L. Stephenson, K. K.; Talalay, P. Chemoprotective Glucosinolates and Isothiocyanates of Broccoli Sprouts. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **2001**, *10*, 501 -508.

(46) Fahey, J. W. Zhang, Y.; Talalay, P. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94*, 10367 -10372.

(47) Rouzaud, G. Young, S. A.; Duncan, A. J. Hydrolysis of Glucosinolates to Isothiocyanates after Ingestion of Raw or Microwaved Cabbage by Human Volunteers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **2004**, *13*, 125 -131.

- (48) Guo, Z. Smith, T. J. Wang, E. Sadrieh, N. Ma, Q. Thomas, P. E.; Yang, C. S. Effects of phenethyl isothiocyanate, a carcinogenesis inhibitor, on xenobiotic-metabolizing enzymes and nitrosamine metabolism in rats. *Carcinogenesis* **1992**, *13*, 2205-2210.
- (49) Bones, A. M.; Rossiter, J. T. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1053-1067.
- (50) Ohtsuru, M.; Hata, T. The interaction of L-ascorbic acid with the active center of myrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *567*, 384-391.
- (51) Wilkinson, A. P. Rhodes, M. J. C.; Fenwick, R. G. Myrosinase activity of cruciferous vegetables. *J. Sci. Food Agric.* **1984**, *35*, 543-552.
- (52) Van Eylen, D. Oey, I. Hendrickx, M.; Van Loey, A. Kinetics of the Stability of Broccoli (*Brassica oleracea* Cv. *Italica*) Myrosinase and Isothiocyanates in Broccoli Juice during Pressure/Temperature Treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 2163-2170.
- (53) EC 3.2.1.147 - thioglucosidase, http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.147. Consulté le 15/06/11.
- (54) Shen, L. Su, G. Wang, X. Du, Q.; Wang, K. Endogenous and exogenous enzymolysis of vegetable-sourced glucosinolates and influencing factors. *Food Chemistry* **2010**, *119*, 987-994.
- (55) Rask, L. Andréasson, E. Ekbom, B. Eriksson, S. Pontoppidan, B.; Meijer, J. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol. Biol* **2000**, *42*, 93-113.
- (56) Johnson, I. T. Glucosinolates: bioavailability and importance to health. *Int J Vitam Nutr Res* **2002**, *72*, 26-31.
- (57) Höglund, A.-S. Lenman, M. Falk, A.; Rask, L. Distribution of Myrosinase in Rapeseed Tissues. *Plant Physiology* **1991**, *95*, 213-221.
- (58) Grob, K.; Matile, P. H. Vacuolar location of glucosinolates in horseradish root cells. *Plant Science Letters* **1979**, *14*, 327-335.
- (59) Conaway, C. C. Krzeminski, J. Amin, S.; Chung, F. L. Decomposition rates of isothiocyanate conjugates determine their activity as inhibitors of cytochrome p450 enzymes. *Chemical research in toxicology* **2001**, *14*, 1170-1176.
- (60) Blau, K.; Halket, J. M. *Handbook of Derivatives for Chromatography*, 2E; 2^e éd. Wiley, **1993**.
- (61) Jiao, D. Yu, M. C. Hankin, J. H. Low, S.-H.; Chung, F.-L. Total Isothiocyanate Contents in Cooked Vegetables Frequently Consumed in Singapore. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 1055-1058.
- (62) Kristensen, M. Krogholm, K. S. Frederiksen, H. Bügel, S. H.; Rasmussen, S. E. Urinary excretion of total isothiocyanates from cruciferous vegetables shows high dose-response relationship and may be a useful biomarker for isothiocyanate exposure. *Eur J Nutr* **2007**, *46*, 377-382.
- (63) Kristensen, M. Krogholm, K. S. Frederiksen, H. Duus, F. Cornett, C. Bügel, S. H.; Rasmussen, S. E. Improved synthesis methods of standards used for quantitative determination of total isothiocyanates from broccoli in human urine. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2007**, *852*, 229-234.
- (64) Vermeulen, M. Van Den Berg, R. Freidig, A. P. Van Bladeren, P. J.; Vaes, W. H. J. Association between consumption of cruciferous vegetables and condiments and excretion in urine of isothiocyanate mercapturic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 5350-5358.

- (65) Song, L. Morrison, J. J. Botting, N. P.; Thornalley, P. J. Analysis of glucosinolates, isothiocyanates, and amine degradation products in vegetable extracts and blood plasma by LC-MS/MS. *Analytical Biochemistry* **2005**, *347*, 234-243.
- (66) Jin, Y. Wang, M. Rosen, R. T.; Ho, C. T. Thermal degradation of sulforaphane in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem* **1999**, *47*, 3121-3123.
- (67) Chen; Ho Thermal Degradation of Allyl Isothiocyanate in Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem* **1998**, *46*, 220-223.
- (68) Pecháček, R. Velíšek, J.; Hrabcová, H. Decomposition Products of Allyl Isothiocyanate in Aqueous Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 4584-4588.
- (69) Chiang, W. C. K. Pusateri, D. J.; Leitz, R. E. A. Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method for the Determination of Sulforaphane and Sulforaphane Nitrile in Broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 1018-1021.
- (70) Tsao, R. Yu, Q. Potter, J.; Chiba, M. Direct and Simultaneous Analysis of Sinigrin and Allyl Isothiocyanate in Mustard Samples by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 4749-4753.
- (71) Krul, C. Humblot, C. Philippe, C. Vermeulen, M. van Nuenen, M. Havenaar, R.; Rabot, S. Metabolism of sinigrin (2-propenyl glucosinolate) by the human colonic microflora in a dynamic in vitro large-intestinal model. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 1009 -1016.
- (72) Rouzaud, G. Rabot, S. Ratcliffé, B.; Duncan, A. J. Influence of plant and bacterial myrosinase activity on the metabolic fate of glucosinolates in gnotobiotic rats. *Br. J. Nutr* **2003**, *90*, 395-404.
- (73) Kensler, T. W. Chen, J.-G. Egner, P. A. Fahey, J. W. Jacobson, L. P. Stephenson, K. K. Ye, L. Coady, J. L. Wang, J.-B. Wu, Y. Sun, Y. Zhang, Q.-N. Zhang, B.-C. Zhu, Y.-R. Qian, G.-S. Carmella, S. G. Hecht, S. S. Benning, L. Gange, S. J. Groopman, J. D.; Talalay, P. Effects of glucosinolate-rich broccoli sprouts on urinary levels of aflatoxin-DNA adducts and phenanthrene tetraols in a randomized clinical trial in He Zuo township, Qidong, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* **2005**, *14*, 2605-2613.
- (74) Herr, I.; Büchler, M. W. Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treat. Rev* **2010**, *36*, 377-383.
- (75) Juge, N. Mithen, R. F.; Traka, M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1105-1127.
- (76) Reen, R. K. Dombkowski, A. A. Kresty, L. A. Cukovic, D. Mele, J. M. Salagrama, S. Nines, R.; Stoner, G. D. Effects of phenylethyl isothiocyanate on early molecular events in N-nitrosomethylbenzylamine-induced cytotoxicity in rat esophagus. *Cancer Res* **2007**, *67*, 6484-6492.
- (77) Thejass, P.; Kuttan, G. Inhibition of endothelial cell differentiation and proinflammatory cytokine production during angiogenesis by allyl isothiocyanate and phenyl isothiocyanate. *Integr Cancer Ther* **2007**, *6*, 389-399.
- (78) Fimognari, C.; Hrelia, P. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **mai**, *635*, 90-104.
- (79) Conaway, C. C. Yang, Y.-M.; Chung, F.-L. Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents: Their biological activities and metabolism in rodents and humans. *Current Drug Metabolism* **2002**, *3*, 233-255.
- (80) Bodo, J. Duraj, J. Jakubikova, J.; Sedlak, J. Isothiocyanate E-4IB induces MAPK activation, delayed cell cycle transition and apoptosis. *Cell Prolif* **2007**, *40*, 316-326.

- (81) Zhang, Y. Allyl isothiocyanate as a cancer chemopreventive phytochemical. *Mol Nutr Food Res* **2010**, *54*, 127-135.
- (82) Fowke, J. H. Head and neck cancer: a case for inhibition by isothiocyanates and indoles from cruciferous vegetables. *European Journal of Cancer Prevention* **2007**, *16*, 348-356.
- (83) Fahey, J. W. Haristoy, X. Dolan, P. M. Kensler, T. W. Scholtus, I. Stephenson, K. K. Talalay, P.; Lozniewski, A. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2002**, *99*, 7610-7615.
- (84) Kim, M. G.; Lee, H. S. Growth-inhibiting activities of phenethyl isothiocyanate and its derivatives against intestinal bacteria. *J. Food Sci* **2009**, *74*, M467-471.
- (85) Lin, C. M. Kim, J. Du, W. X.; Wei, C. I. Bactericidal activity of isothiocyanate against pathogens on fresh produce. *Journal of Food Protection* **2000**, *63*, 25–30.
- (86) Lin, C. M. Preston, J. F., 3rd; Wei, C. I. Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. *J. Food Prot* **2000**, *63*, 727-734.
- (87) Luciano, F. B.; Holley, R. A. Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* **2009**, *131*, 240-245.
- (88) Olivier, C. Vaughn, S. F. Mizubuti, E. S. G.; Loria, R. Variation in allyl isothiocyanate production within Brassica species and correlation with fungicidal activity. *Journal of chemical ecology* **1999**, *25*, 2687–2701.
- (89) Muehlchen, A. M. Rand, R. E.; Parke, J. L. Evaluation of crucifer green manures for controlling *Aphanomyces* root rot of peas. *Plant disease* **1990**, *74*, 651–654.
- (90) Williams-Woodward, J. L. Pflieger, F. L. Fritz, V. A.; Allmaras, R. R. Green manures of oat, rape and sweet corn for reducing common root rot in pea (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. *Plant and soil* **1997**, *188*, 43–48.
- (91) Sellam, A. Dongo, A. Guillemette, T. Hudhomme, P.; Simoneau, P. Transcriptional responses to exposure to the brassicaceous defence metabolites camalexin and allyl-isothiocyanate in the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Mol. Plant Pathol* **2007**, *8*, 195-208.
- (92) Sellam, A. Iacomi-Vasilescu, B. Hudhomme, P.; Simoneau, P. In vitro antifungal activity of brassinin, camalexin and two isothiocyanates against the crucifer pathogens *Alternaria brassicicola* and *Alternaria brassicae*. *Plant Pathology* **2007**, *56*, 296-301.
- (93) Kenji, I. Keiko, T. Risaburo, M.; Saiko, C. Preliminary Examination of Allyl Isothiocyanate Vapor for Food Preservation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **1992**, *56*, 1476-1477.
- (94) Whittaker, R. H.; Feeny, P. P. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science* **1971**, *171*, 757-770.
- (95) Tsao, R. Reuber, M. Johnson, L.; Coats, J. R. Insecticidal toxicities of glucosinolate-containing extracts from crambe seeds. *J. Agric. Entomol* **1996**, *13*, 109–120.
- (96) Tsao, R. Peterson, C. J.; Coats, J. R. Glucosinolate breakdown products as insect fumigants and their effect on carbon dioxide emission of insects. *BMC* **2002** *Ecol* *2*, 5-5.
- (97) Liang, H. Yuan, Q.; Xiao, Q. Purification of sulforaphane from Brassica oleracea seed meal using low-pressure column chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci* **2005**, *828*, 91-96.

- (98) Liang, H. Li, C. Yuan, Q.; Vriesekoop, F. Separation and purification of sulforaphane from broccoli seeds by solid phase extraction and preparative high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem* **2007**, *55*, 8047-8053.
- (99) Liang, H. Yuan, Q. P. Dong, H. R.; Liu, Y. M. Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, *19*, 473-476.
- (100) Sivakumar, G. Aliboni, A.; Bacchetta, L. HPLC screening of anti-cancer sulforaphane from important European Brassica species. *Food Chemistry* **2007**, *104*, 1761-1764.
- (101) Valette, L. Fernandez, X. Poulain, S. Lizzani-Cuvelier, L.; Loiseau, A.-M. Chemical composition of the volatile extracts from Brassica oleracea L. var. botrytis 'Romanesco' cauliflower seeds. *Flavour Fragr. J.* **2006**, *21*, 107-110.
- (102) Wu, H. Zhang, G.-A. Zeng, S.; Lin, K.-chun Extraction of allyl isothiocyanate from horseradish (*Armoracia rusticana*) and its fumigant insecticidal activity on four stored-product pests of paddy. *Pest Manag. Sci* **2009**, *65*, 1003-1008.
- (103) Bertelli, D. Plessi, M. Braghiroli, D.; Monzani, A. Separation by solid phase extraction and quantification by reverse phase HPLC of sulforaphane in broccoli. *Food Chemistry* **1998**, *63*, 417-421.
- (104) Troncoso, R. Espinoza, C. Sánchez-Estrada, A. Tiznado, M. E.; García, H. S. Analysis of the isothiocyanates present in cabbage leaves extract and their potential application to control *Alternaria* rot in bell peppers. *Food Research International* **2005**, *38*, 701-708.
- (105) Papadopoulos, A.; Alderson, P. A new method for collecting isothiocyanates released from plant residues incorporated in soil. *Annals of applied biology* **2007**, *151*, 61-65.
- (106) Zhang, Y. Wade, K. L. Prestera, T.; Talalay, P. Quantitative determination of isothiocyanates, dithiocarbamates, carbon disulfide, and related thiocarbonyl compounds by cyclocondensation with 1,2-benzenedithiol. *Anal. Biochem* **1996**, *239*, 160-167.
- (107) Lubke, M. Le Quere JU., -L.; Barron, D. Normal-phase high-performance liquid chromatography of volatile compounds. Selectivity and mobile phase effects on polar bonded silica. *Journal of Chromatography A* **1995**, *690*, 41-54.
- (108) Ono, H. Tesaki, S. Tanabe, S.; Watanabe, M. 6-Methylsulfinylhexyl isothiocyanate and its homologues as food-originated compounds with antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **1998**, *62*, 363-365.
- (109) Tsao, R. Yu, Q. Potter, J.; Chiba, M. Direct and Simultaneous Analysis of Sinigrin and Allyl Isothiocyanate in Mustard Samples by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 4749-4753.
- (110) Matthäus, B.; Fiebig, H.-J. Simultaneous Determination of Isothiocyanates, Indoles, and Oxazolidinethiones in Myrosinase Digests of Rapeseeds and Rapeseed Meal by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, *44*, 3894-3899.
- (111) Yamaguchi, H. Noshita, T. Kidachi, Y. Umetsu, H. Fuke, Y.; Ryoyama, K. Detection of 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MITC) and its conjugate with N-acetyl-L-cysteine (NAC) by high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (HPLC-MS/APCI). *Chem. Pharm. Bull* **2008**, *56*, 715-719.
- (112) Matusheski, N. V. Wallig, M. A. Juvik, J. A. Klein, B. P. Kushad, M. M.; Jeffery, E. H. Preparative HPLC Method for the Purification of Sulforaphane and Sulforaphane Nitrile from Brassica oleracea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 1867-1872.

- (113) Tian, Q. Rosselot, R. A.; Schwartz, S. J. Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **2005**, *343*, 93-99.
- (114) Liang, H. Li, C. Yuan, Q.; Vriesekoop, F. Application of high-speed countercurrent chromatography for the isolation of sulforaphane from broccoli seed meal. *J. Agric. Food Chem* **2008**, *56*, 7746-7749.
- (115) Song, L. Morrison, J. J. Botting, N. P.; Thornalley, P. J. Analysis of glucosinolates, isothiocyanates, and amine degradation products in vegetable extracts and blood plasma by LC-MS/MS. *Anal. Biochem* **2005**, *347*, 234-243.
- (116) Ciska, E.; Pathak, D. R. Glucosinolate derivatives in stored fermented cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 7938-7943.
- (117) Gerendás, J. Breuning, S. Stahl, T. Mersch-Sundermann, V.; Mühling, K. H. Isothiocyanate concentration in kohlrabi (*Brassica oleracea* L. Var. *gongylodes*) plants as influenced by sulfur and nitrogen supply. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 8334-8342.
- (118) Lide, D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 89th Edition*; 89^e éd. CRC Press, 2008.
- (119) Getahun, S. M.; Chung, F.-L. Conversion of glucosinolates to isothiocyanates in humans after ingestion of cooked watercress. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **1999**, *8*, 447-451.
- (120) Zhang, Y. Cho, C.-G. Posner, G. H.; Talalay, P. Spectroscopic quantitation of organic isothiocyanates by cyclocondensation with vicinal dithiols. *Analytical Biochemistry* **1992**, *205*, 100-107.
- (121) Mohn, T. Cutting, B. Ernst, B.; Hamburger, M. Extraction and analysis of intact glucosinolates--a validated pressurized liquid extraction/liquid chromatography-mass spectrometry protocol for *Isatis tinctoria*, and qualitative analysis of other cruciferous plants. *J Chromatogr A* **2007**, *1166*, 142-151.
- (122) Pretsch, E. Buhlmann, P.; Badertscher, M. *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*; 4^e éd. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K, **2009**.
- (123) Dreyer, A. Temme, C. Sturm, R.; Ebinghaus, R. Optimized method avoiding solvent-induced response enhancement in the analysis of volatile and semi-volatile polyfluorinated alkylated compounds using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1178*, 199-205.
- (124) Emmrich, M. Lahrz, T.; Spyra, W. Influence of solvents and gas chromatographic injector conditions on the detectability of nitroaromatic compounds. *Journal of Chromatography A* **2001**, *918*, 121-126.
- (125) Liu, R. Zhou, J. L.; Wilding, A. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1022*, 179-189.
- (126) Rostagno, M. A. Palma, M.; Barroso, C. G. Solid-phase extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1076*, 110-117.
- (127) Garcia-Salas, P. Morales-Soto, A. Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules* **2010**, *15*, 8813-8826.
- (128) Karcher, A. Melouk, H. A.; El Rassi, Z. High-performance liquid phase separation of glycosides. 5. Determination of individual glucosinolates in cabbage and rapeseed by laser-induced

fluorescence capillary electrophoresis via the enzymatically released isothiocyanate aglycon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 4267-4274.

(129) G Mahuzier; Hamon, M. Ferriey, D.; Prognon *CHIMIE ANALYTIQUE. Tome 2, Méthodes de séparation. 3ème édition.*

(130) Self, R. *Extraction of Organic Analytes from Foods: A Manual of Methods*; 1^{er} éd. Royal Society of Chemistry, 2005.

(131) Mitra, S. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*; LibreDigital, 2003; Vol. 162.

(132) Suzuki, T. Yaguchi, K. Suzuki, S.; Suga, T. Monitoring of Phthalic Acid Monoesters in River Water by Solid-Phase Extraction and GC-MS Determination. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 3757-3763.

(133) Benthin, B. Danz, H.; Hamburger, M. Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *Journal of Chromatography A* **1999**, *837*, 211-219.

(134) Draisci, R. Marchiafava, C. Palleschi, L. Cammarata, P.; Cavalli, S. Accelerated solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantitation of corticosteroid residues in bovine liver. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **2001**, *753*, 217-223.

(135) Richter, B. E. Extraction of hydrocarbon contamination from soils using accelerated solvent extraction. *Journal of Chromatography A* **2000**, *874*, 217-224.

(136) Tolonen, M. Taipale, M. Viander, B. Pihlava, J.-M. Korhonen, H.; Ryhänen, E.-L. Plant-Derived Biomolecules in Fermented Cabbage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 6798-6803.

(137) Roussi, S. Winter, A. Gosse, F. Werner, D. Zhang, X. Marchioni, E. Geoffroy, P. Miesch, M.; Raul, F. Different apoptotic mechanisms are involved in the antiproliferative effects of 7beta-hydroxysterol and 7beta-hydroxycholesterol in human colon cancer cells. *Cell Death Differ* **2005**, *12*, 128-35.

(138) Maldonado-Celis, M. E. Bousserouel, S. Gossé, F. Lobstein, A.; Raul, F. Apple procyanidins activate apoptotic signaling pathway in human colon adenocarcinoma cells by a lipid-raft independent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **2009**, *388*, 372-376.

(139) Liebes, L. Conaway, C. C. Hochster, H. Mendoza, S. Hecht, S. S. Crowell, J.; Chung, F. L. High-performance liquid chromatography-based determination of total isothiocyanate levels in human plasma: application to studies with 2-phenethyl isothiocyanate. *Anal. Biochem* **2001**, *291*, 279-289.

(140) Chung, F. L. Jiao, D. Getahun, S. M.; Yu, M. C. A urinary biomarker for uptake of dietary isothiocyanates in humans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* **1998**, *7*, 103-108.

(141) Legifrance Arrêté du 17 décembre 2007 modifiant l'arrêté du 5 août 1992 relatif aux teneurs maximales en résidus de pesticides admissibles sur et dans certains produits d'origine végétale. www.legifrance.gouv.fr/affichTexteArticle.do;jsessionid=7C3CA8BB716D822B41014E04E4186E8B.tpdjo12v_2?cidTexte=JORFTEXT000017883847&idArticle=LEGIARTI000017985115&dateTexte=20080117&categorieLien=cid#LEGIARTI000017985115. Consulté le 08/06/2011.

(142) Shapiro, T. A. Fahey, J. W. Wade, K. L. Stephenson, K. K.; Talalay, P. Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* **1998**, *7*, 1091-1100.

(143) Dam, N. M. Tytgat, T. O. G.; Kirkegaard, J. A. Root and shoot glucosinolates: a comparison

of their diversity, function and interactions in natural and managed ecosystems. *Phytochem Rev* **2008**, *8*, 171-186.

(144) Beevi, S. S. Mangamoori, L. N. Dhand, V.; Ramakrishna, D. S. Isothiocyanate profile and selective antibacterial activity of root, stem, and leaf extracts derived from *Raphanus sativus* L. *Foodborne Pathog. Dis* **2009**, *6*, 129-136.

(145) Schreiner, M. Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *Eur J Nutr* **2004**, *44*, 85-94.

(146) Kushad, M. M. Cloyd, R.; Babadoost, M. Distribution of glucosinolates in ornamental cabbage and kale cultivars. *Scientia Horticulturae* **2004**, *101*, 215-221.

(147) Lee, K.-C. Cheuk, M.-W. Chan, W. Lee, A. W.-M. Zhao, Z.-Z. Jiang, Z.-H.; Cai, Z. Determination of glucosinolates in traditional Chinese herbs by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2006**, *386*, 2225-2232.

(148) Jang, M. Hong, E.; Kim, G.-H. Evaluation of antibacterial activity of 3-butenyl, 4-pentenyl, 2-phenylethyl, and benzyl isothiocyanate in Brassica vegetables. *J. Food Sci* **2010**, *75*, M412-416.

(149) Aires, A. Mota, V. R. Saavedra, M. J. Rosa, E. A. S.; Bennett, R. N. The antimicrobial effects of glucosinolates and their respective enzymatic hydrolysis products on bacteria isolated from the human intestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* **2009**, *106*, 2086-2095.

(150) Rudolf, E. Andelová, H.; Cervinka, M. Activation of several concurrent proapoptotic pathways by sulforaphane in human colon cancer cells SW620. *Food Chem. Toxicol* **2009**, *47*, 2366-2373.

(151) Andelová, H. Rudolf, E.; Cervinka, M. In vitro antiproliferative effects of sulforaphane on human colon cancer cell line SW620. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **2007**, *50*, 171-176.

(152) Jakubikova, J. Bao, Y. Bodo, J.; Sedlak, J. Isothiocyanate iberin modulates phase II enzymes, posttranslational modification of histones and inhibits growth of Caco-2 cells by inducing apoptosis. *Neoplasma* **2006**, *53*, 463-470.