HAL
open science

Activité antibactérienne du sulforaphane et d'autres isothiocyanates

Ludovic Woelffel

To cite this version:

Ludovic Woelffel. Activité antibactérienne du sulforaphane et d'autres isothiocyanates. Sciences pharmaceutiques. 2003. hal-01738899

HAL Id: hal-01738899

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01738899v1

Submitted on 20 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

M/PH/N/ Ph N 2003/ Double /208

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I
2003

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

le 05 novembre 2003

par Ludovic WOELFFEL
né le 10 janvier 1977 à Nancy (54)

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 04 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Activité antibactérienne du sulforaphane et d'autres isothiocyanates

DB 4275

Membres du jury

Président :	Pr J. Schwartzbrod
Juges :	Pr A. Lozniewski
	Dr F. Mory
	Dr X. Haristoy

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

PPN 075747995

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I
2003

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

le 05 novembre 2003

par Ludovic WOELFFEL
né le 10 janvier 1977 à Nancy (54)

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 04 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Activité antibactérienne du sulforaphane et d'autres isothiocyanates

33 24275

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE

Membres du jury

Président : Pr J. Schwartzbrod

Juges : Pr A. Lozniewski
Dr F. Mory
Dr X. Haristoy

BU PHARMA-ODONTOL
D 104 064389 4

FACULTE DE PHARMACIE **UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY 1**

Membres du personnel enseignant 2003/2004

Doyen
Chantal FINANCE

Vice Doyen
Anne ROVEL

Président du Conseil de la Pédagogie
Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche
Jean-Claude BLOCK

Responsable de la Filière officine
Gérald CATAU

Responsable de la Filière industrie
Jeffrey ATKINSON

DOYEN HONORAIRE

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger
M. HOFFMAN Maurice

PROFESSEURS HONORAIRES

Mle BESSON Suzanne
Mle GIRARD Thérèse
M. JACQUE Michel
M. LECTARD Pierre
M. LOPPINET Vincent
M. MARTIN Jean-Armand
M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice
M. SCHWARTZBROD Louis

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie cardiovasculaire
M	AULAGNER Gilles	Pharmacie clinique
M.	BAGREL Alain	Biochimie
Mle	BATT Anne-Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean-Claude	Santé publique
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON Christine	Pharmacologie cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Bactériologie -Immunologie
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Mathématiques, physique, audioprothèse
Mle	GALTEAU Marie-Madeleine	Biochimie clinique
M.	HENRY Max	Botanique, mycologie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie, orthopédie, maintien à domicile
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LEROY Pierre	Chimie physique générale
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique
M.	REGNOUF de VAINS Jean-Bernard	Chimie Thérapeutique
M.	RIHN Bertrand (Professeur associé)	Biochimie
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie, parasitologie
M.	SIEST Gérard	Biologie, pharmacologie moléculaire
M.	SIMON Jean-Michel	Droit officinal, législation pharmaceutique
M.	VIGNERON Claude	Hématologie, physiologie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratique officinale

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - virologie
Mme	BANAS Sandrine	Parasitologie
M.	BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
Mme	BOITEUX Catherine	Biophysique, Audioprothèse
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M.	CHILLON Jean-Marc	Pharmacologie
M	CLAROT Igor	Chimie analytique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, conseils vétérinaires
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Mme	FAIVRE-FIORINA Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Toxicologie
Mle	FONS Françoise	Biologie végétale, mycologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mle	HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
M.	JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mle	LAMBERT Alexandrine	Biophysique, biomathématiques
M.	LAMPRECHT Alf	Pharmacie galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Communication et santé
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MONAL Jean-Louis	Chimie thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	ROVEL Anne	Histologie, physiologie
Mme	SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria-Monika	Biochimie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR AGREGE

M.	COCHAUD Christophe	Anglais

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Mycologie
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
Mme	PAVIS Annie	Bactériologie

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

A NOTRE PRESIDENTE DE THESE

Madame le Professeur Janine SCHWARTZBROD

Elle nous a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Elle a su nous transmettre, au cours de nos années de faculté, la passion de la bactériologie. Nous l'en remercions vivement et lui exprimons notre gratitude.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur Alain Lozniewski

Il nous a accueilli dans son laboratoire et nous a fait l'honneur de diriger ce travail dont il est à l'origine. Qu'il soit remercié pour sa gentillesse, sa rigueur scientifique, son esprit de synthèse et pour tout ce qu'il nous a appris lors de notre stage au laboratoire.

Madame le Docteur Francine Mory

Elle nous a fait l'honneur de juger cette thèse. Qu'elle soit remerciée pour sa gentillesse, sa rigueur scientifique, sa disponibilité et son soutien durant la réalisation de ce travail. Qu'elle me permette de lui signifier ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur Xavier Haristoy

Il nous a fait l'honneur de juger cette thèse. Il nous a toujours guidé que ce soit en tant qu'interne puis ensuite en tant qu'assistant. Nous le remercions vivement pour sa disponibilité et son soutien durant la réalisation de ce travail. Qu'il soit assuré de notre profonde gratitude.

J'adresse également des remerciements à l'ensemble du personnel du Laboratoire de Bactériologie pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Des remerciements particuliers pour les techniciennes du secteur d'antibiologie : Isabelle SCHOLTUS, Marie-Renée BALLAND, Martine BENZAÏED qui m'ont guidé et soutenu durant ce travail.

Je remercie également le personnel de la stérilisation et de la préparation des milieux de culture pour son dévouement.

A mes parents qui m'ont beaucoup appris dans tous les domaines et m'ont toujours soutenu pendant toutes ces années d'étude. Si j'en suis là, c'est grâce à vous et aux valeurs que vous m'avez inculquées. Merci d'être toujours avec moi.

A mes grands-pères qui nous ont quittés bien trop vite.

A Karine, ma sœur, que j'aime profondément et qui m'a toujours soutenu même dans les moments difficiles.

A ma marraine qui m'a toujours soutenu depuis mon enfance.

Aux autres membres de ma famille.

A Judas, mon voisin pendant de nombreuses années, et surtout un ami très cher. Merci pour tous les bons moments passés ensemble et pour ton soutien dans les moments difficiles !

A mes amis de Fac et d'ailleurs, eh oui neuf ans passés ensemble ça en fait des souvenirs !! Merci pour tous ces moments de bonheur !

Aux Martiniquaises et aux Martiniquais qui m'ont accueilli lors de mon stage inter CHU à Fort de France. Un grand merci à Claude Olive et à Jacqueline Jouannelle. J'aurai toujours dans le cœur ce petit coin de France.

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION 4
II. LES ISOTHIOCYANATES 6
II.1. Origine 6
II.2. Pharmacocinétique 10
II.3. Pharmacologie 11
II.3.1. Effet anticarcinogène 11
II.3.1.1. Généralités 11
II.3.1.2. Mécanisme d'action 12
II.3.2. Activité antibactérienne 14
II.3.2.1. Généralités 14
II.3.2.2. Sulforaphane et *H. pylori* 16
II.3.3. Activités antifungique, antiparasitaire et insecticide 17
II.3.3.1. Activité antifungique 17
II.3.3.2. Activité antiparasitaire 17
II.3.3.3. Activité insecticide 17
II.4. Toxicité 18
II.4.1. Génotoxicité et mutagénicité in vitro 18
II.4.2. Induction des enzymes de détoxification de phase I par les glucosinolates 19
II.4.3. Effets dioxine-like 19
II.4.4. Effet goitrigène 20
III. LES CAMPYLOBACTER 21
IV. OBJECTIFS DE L'ETUDE 26
V. MATERIELS ET METHODES 27
V.1. Souches bactériennes testées 27
V.2. Molécules testées 29
V.2.1. Sulforaphane et autres isothiocyanates 29
V.2.2. Erythromycine et ciprofloxacine 31
V.3. Méthodologie 31
V.3.1. Repiquages 32
V.3.2. Préparation des dilutions d'antibiotiques 32
V.3.3. Préparation des boîtes de Pétri 33
V.3.4. Préparation des inocula bactériens 33
V.3.5. Ensemencement 34
V.3.6. Lecture 34
VI. Résultats 36
VI.1. Résultats de la première partie de l'étude (criblage) 36
VI.2. Résultats de l'étude de l'activité antibactérienne des différents isothiocyanates vis-à-vis de 18 souches de *Campylobacter* spp. 38
VI.3. Résultats de l'étude de l'activité antibactérienne du sulforaphane, de l'érythromycine et de la ciprofloxacine vis-à-vis de 60 souches de *Campylobacter* spp. et de 2 souches d'*Arcobacter butzleri* 39
VII. Discussion 43
VIII. Bibliographie 48

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

INDEX DES TABLEAUX

Tableau n°1 : Végétaux de consommation courante contenant des quantités importantes de glucosinolates.....p7

Tableau n°2 : Exemple d'isothiocyanates étudiés dans notre travail et leurs précurseurs respectifs.....p7

Tableau n°3 : Entérobactéries testées dans notre étude.....p27

Tableau n°4 : Bacilles à Gram négatif non fermentants testés dans notre étude.....p28

Tableau n°5 : Cocci à Gram positif aérobies-anaérobies facultatifs testés dans notre étude.....p28

Tableau n°6 : Bactéries anaérobies strictes testées dans notre étude.....p28

Tableau n°7 : *Campylobacteraceae* testés dans notre étude..... p28

Tableau n°8 : Activité antibactérienne du sulforaphane sur les bacilles à Gram négatif non fermentants, les cocci à Gram positif aérobies-anaérobies facultatifs et les bactéries anaérobies.....p29

Tableau n°9 : Activité antibactérienne du sulforaphane sur les entérobactéries.....p36

Tableau n°10 : Activité antibactérienne du sulforaphane sur 18 souches de *Campylobacter* spp.....p37

Tableau n°11 : Distribution des CMI du sulforaphane selon les différentes espèces de *Campylobacter*.....p38

Tableau n°12 : Activité comparée du sulforaphane, de l'érythromycine et de la ciprofloxacine sur 60 souches de *Campylobacter* spp.....p39

Tableau n°13: Distribution des CMI pour 60 souches de *Campylobacter* spp.....p40

INDEX DES FIGURES

Figure n°1 : Action de la myrosinase sur les glucosinolates.....p8
Figure n°2 : Action de la myrosinase : exemple de la glucoraphanine et du sulforaphane.....p8
Figure n°3 : Comparaison du contenu en isothiocyanates de jeunes pousses de brocolis de 2 jours et de brocolis matures.....p9
Figure n°4 : Voie métabolique des acides mercapturiques.....p10
Figure n°5 : Mécanisme d'action des inducteurs des gènes codant les enzymes de détoxification de phase II.....p13
Figure n°6 : Formule semi développée du sulforaphane.....p30
Figure n°7 : Formule semi développée de l'ITC8MSO..... p30
Figure n°8 : Formule semi développée de la cheiroline.....p30
Figure n°9 : Formule semi développée de l'erysoline.....p30
Figure n°10 : Formule semi développée de la berteroine.....p31
Figure n°11 : Formule semi développée du 4RBITC.....p31
Figure n°12 : Activité bactériostatique comparée de différents isothiocyanates sur 18 souches de *Campylobacter* spp.....p38
Figure n°13 : CMI du sulforaphane en fonction des espèces de *Campylobacter* (n=57).....p40
Figure n°14 : Distribution des valeurs de CMI du sulforaphane vis-à-vis de 62 souches de *Campylobacter* spp. en fonction de leur sensibilité à l'érythromycine et à la ciprofloxacine.....p41
Figure n°15 : Distribution des valeurs de CMI du sulforaphane vis-à-vis de 26 souches de *C. jejuni* en fonction de leur sensibilité à l'érythromycine et à la ciprofloxacine.....p41
Figure n°16 : Distribution des valeurs de CMI du sulforaphane vis-à-vis de 24 souches de *C. coli* en fonction de leur sensibilité à l'érythromycine et à la ciprofloxacine.....p42

I. INTRODUCTION

Le cancer est une des principales causes de mortalité [25, 26] dans le monde et, même si les traitements curatifs se développent, les échecs et les récidives sont encore nombreux. La prévention constitue donc plus que jamais un axe de recherche important. Ainsi, des études épidémiologiques [1, 2, 3, 4, 27] ont montré que le risque de développer un cancer, en particulier du côlon et de la prostate, est inversement corrélé à la consommation de fruits et de légumes. Ceux-ci contiennent en effet des composés, identifiés ou non, qui pourraient diminuer les processus de cancérogenèse. Parmi les végétaux contenant ce type de composés, les représentants de la famille des crucifères ont été particulièrement étudiés [5, 7, 10, 11, 16, 21, 24]. Ceux-ci renferment, en effet, en grande quantité, des composés soufrés : les glucosinolates qui peuvent être transformés en isothiocyanates après hydrolyse enzymatique.[9]

Les isothiocyanates ont fait l'objet de nombreuses évaluations qui ont permis de mettre en évidence, entre autres, leurs propriétés anticarcinogènes ainsi que leur activité antibactérienne. A ce propos, Fahey *et coll* [6] ont récemment montré que l'un de ces isothiocyanates, le sulforaphane, protégeait contre la cancérogenèse gastrique induite par le benzo[*a*]pyrène chez la souris et était de surcroît bactériostatique et bactéricide vis-à-vis de *Helicobacter pylori*, bactérie impliquée dans les processus d'ulcérogenèse et de cancérogenèse gastriques. Le sulforaphane offrirait donc un effet doublement protecteur : non seulement en inhibant les processus de carcinogenèse mais aussi en contribuant à l'éradication de *H. pylori*.

Les données concernant les propriétés antibactériennes des isothiocyanates sont limitées et incomplètes ceci nous a donc amené à nous

interroger sur les propriétés antibactériennes du sulforaphane et d'autres isothiocyanates vis-à-vis des bactéries commensales et/ou pathogènes de l'homme.

Dans cette étude nous avons tout d'abord effectué un travail de criblage qui a permis de déterminer quelles espèces bactériennes étaient préférentiellement inhibées par le sulforaphane. Nous avons ensuite évalué l'activité *in vitro* d'autres isothiocyanates sur les espèces bactériennes pour lesquelles les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du sulforaphane étaient les plus basses (bactéries appartenant au genre *Campylobacter*). Enfin, nous avons déterminé les CMI de l'érythromycine et de la ciprofloxacine vis-à-vis des souches de *Campylobacter* spp. et avons comparé l'efficacité de ces deux antibiotiques habituellement préconisés pour le traitement des entérites à *Campylobacter* spp., à celle du sulforaphane.

II. LES ISOTHIOCYANATES

Depuis l'antiquité, le goût piquant et l'odeur caractéristique de la moutarde, du radis ou du wasabi (moutarde verte japonaise) sont bien connus, mais ce n'est que depuis les années 40 que ces caractères ont pu être attribués à des composés soufrés nommés isothiocyanates. Depuis, leurs structures et leurs différentes propriétés ont largement été étudiées.

II.1. Origine

Les isothiocyanates sont présents à l'état de précurseurs, les glucosinolates, dans une soixantaine de familles de plantes dicotylédones angiospermes. A ce jour, au moins 120 glucosinolates différents ont été identifiés et des travaux ont montré la présence en quantité abondante de ces composés en particulier dans les plantes de la famille des *Brassicaceae* (Crucifères) par exemple les choux, *Brassica* spp., et les radis, *Raphanus* spp.. Bon nombre de ces plantes sont comestibles et entrent dans notre régime alimentaire ce qui explique que nous absorbions quotidiennement des isothiocyanates [9]. L'apport en glucosinolates, en particulier après consommation de *Brassicaceae*, est estimé à environ 300 mg/j soit 660 µmol [7]. Généralement, une même espèce végétale contient un nombre limité de glucosinolates (moins d'une douzaine) et la répartition de ceux-ci varie selon les différents organes des végétaux : racines, feuilles, tige ou graines. Le contenu en glucosinolates peut représenter jusqu'à 10 % du poids sec de certains tissus de *Brassicaceae* [9].

Dans le tableau n°1 sont présentés quelques végétaux de consommation courante contenant des quantités importantes de glucosinolates.

Tableau n°1 : Végétaux de consommation courante contenant des quantités importantes de glucosinolates.

Nom vernaculaire	**Nom scientifique**
Brocoli	*Brassica oleracea* var *italica*
Chou de Bruxelles	*Brassica capitata polycephalos*
Chou	*Brassica oleracea*
Cresson	*Nasturtium officinale*
Colza	*Brassica napus* ssp *napus*
Radis	*Raphanus sativus*

Tableau n°2 : Les isothiocyanates et leurs précurseurs respectifs étudiés dans notre travail.

Glucosinolate	Isothiocyanate	Origine
Glucoraphanine	Sulforaphane	*Brassica oleracea* var *italica*
Glucoerysoline	Erysoline	*Cardaria draba*
Glucocheiroline	Cheiroline	*Armoracia lapathifolia*
Glucoberteroine	Berteroine	*Alyssum* sp
Glucohirsutine	ITC8mso	*Nasturtium officinale*
4RB glucosinolate	4RBITC	*Moringa oleifera*

Les glucosinolates sont des β-thioglucoside N-hydroxysulfates hydrosolubles présents en quantité importante dans les plantes à l'état frais tandis que leurs dérivés, les isothiocyanates, sont présents en quantité négligeable dans les végétaux intacts. Au sein de la plante, les glucosinolates sont systématiquement associés à une glycoprotéine ayant une activité enzymatique de type β-thioglucosidase, la myrosinase. Cette myrosinase, normalement physiquement séparée des glucosinolates au sein de la plante, est libérée lorsque la plante est cuisinée, mâchée ou triturée [9].

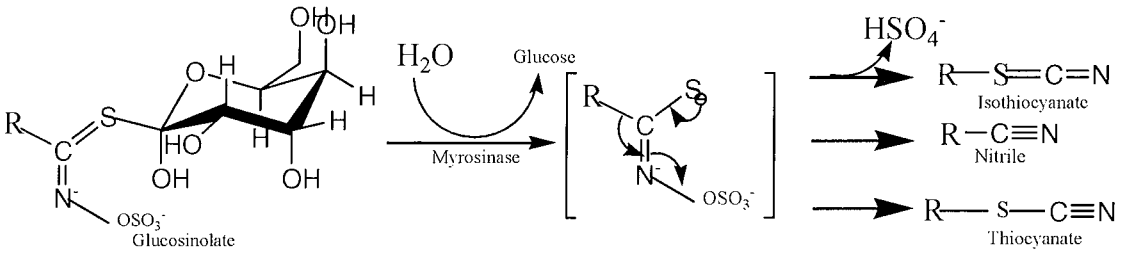


Figure n°1 : Action de la myrosinase sur les glucosinolates[9]

La myrosinase catalyse l'hydrolyse du glucose greffé sur l'atome de soufre latéral du glucosinolate. Le radical formé est instable et subit un réarrangement avec libération d'hydrogénosulfate (HSO_4^-) puis formation d'un isothiocyanate, d'un thiocyanate ou d'un nitrile.

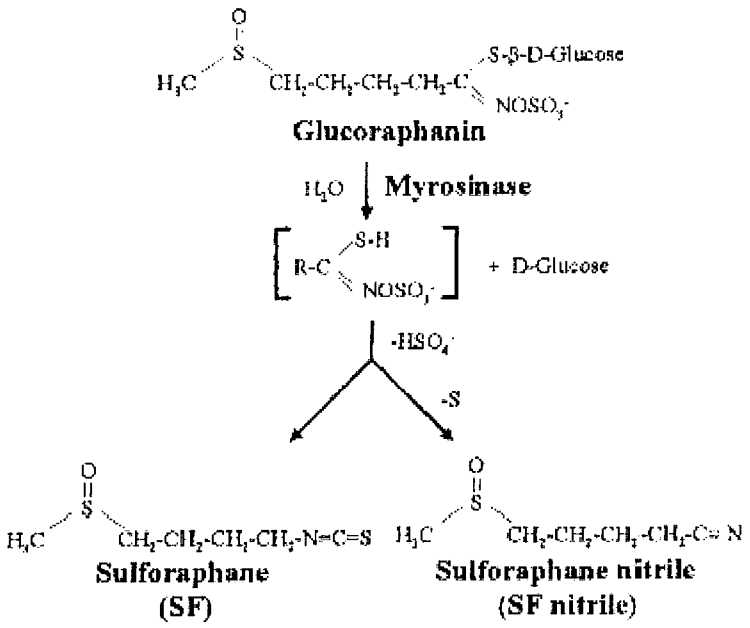


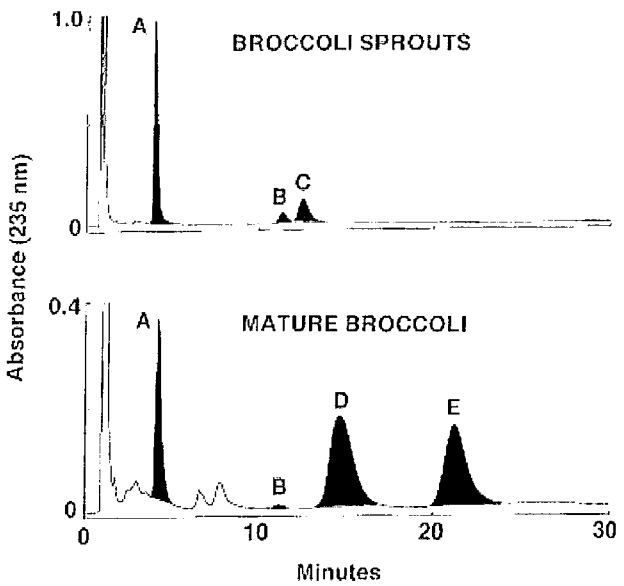
Figure n°2 : Action de la myrosinase : exemple de la glucoraphanine et du sulforaphane

La myrosinase est inactivée par la chaleur lors de la cuisson des plantes. La conversion des glucosinolates en isothiocyanates est assurée, après cuisson, par l'activité myrosinase de certaines bactéries de la flore intestinale mais l'activité catalytique de cette dernière est très inférieure à celle de la myrosinase issue de la plante[9]. Ainsi, une proportion importante

des glucosinolates alimentaires n'est pas convertie en isothiocyanates et n'est donc pas absorbée [8].

Par ailleurs le contenu en glucosinolates est extrêmement variable : il existe des différences tant qualitatives que quantitatives de composition en fonction de :

- la maturité de la plante : par exemple, les jeunes pousses de brocoli contiennent de 70 à 100 mmol de glucosinolates par gramme de plante fraîche (soit 10% du poids sec) avec moins de 1% d'indole-glucosinolate et seulement des glucosinolates à chaînes aliphatiques (glucoraphanine, glucoérucine et glucoibérine)[11]. A l'opposé les brocolis matures contiennent de 1 à 4 mmol de glucosinolates (soit 20 à 50 fois moins que dans les pousses [10]) par gramme de plante fraîche dont 50% d'indole-glucosinolate [11]. Ceci est représenté sur la figure n°3.
- la localisation au sein de la plante : suivant les végétaux, les glucosinolates sont préférentiellement concentrés dans les racines, les feuilles, la tige ou les graines [9].

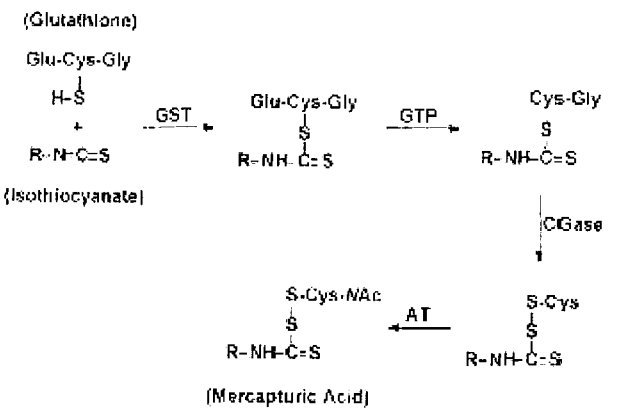


A = Glucoraphanine, B = 4-Hydroxyglucobrassicin, C = Glucoerucine, D = glucobrassicine, E = néoglucobrassicine.

Figure n°3 : Comparaison du contenu en isothiocyanates de jeunes pousses de brocolis de 2 jours et de brocolis matures [11].

II.2. Pharmacocinétique

Après consommation, les isothiocyanates sont absorbés rapidement : ainsi, après l'ingestion de 200 µmol d'isothiocyanates, contenant 80% de sulforaphane, issus de brocolis, les pics sériques, plasmatiques et érythrocytaires sont atteints en une heure et les concentrations oscillent entre 0,943 et 2,27 µmol/L. Ces produits diffusent bien dans les tissus (volume apparent de distribution = 59,9 ± 7,0 L). Les isothiocyanates sont rapidement métabolisés au niveau de la voie des acides mercapturiques. Les dithiocarbamates formés par conjugaison des isothiocyanates au glutathion réduit (GSH) sont conjugués ensuite à la cystéinylglycine, à la cystéine puis à la N-acétylcystéine et sont éliminés par voie rénale. La demi-vie des isothiocyanates est courte, de l'ordre de 1,77 ± 0,13 h avec une cinétique d'élimination d'ordre 1 et une clairance rénale de 369 ± 53 mL/min soit environ le double du débit de filtration glomérulaire calculé, ce qui indique qu'il existe une sécrétion active au niveau du tubule rénal [10,12]. Le dosage des acides mercapturiques urinaires permet d'estimer qu'environ 80 % des isothiocyanates ingérés sont effectivement absorbés au niveau intestinal.



(GST = Glutathion S transférase, GTP = gammaglutamyl transpeptidase, CGase = cystéinylglycinase, AT = acétyltransférase)

Figure n°4 : Voie métabolique des acides mercapturiques [10].

II.3. Pharmacologie

II.3.1. Effet anticarcinogène

II.3.1.1. Généralités

Des études épidémiologiques ont montré que le risque de développer un cancer est inversement corrélé à la consommation de fruits et de légumes et notamment de ceux contenant des isothiocyanates tels que les crucifères [1, 2, 3, 4 5, 7, 10, 11, 16, 21, 24]. Ces études ont également montré que les isothiocyanates avaient un effet protecteur vis-à-vis de différents cancers, localisés en particulier au poumon [2,27], au sein[75, 76], au rein [22], au côlon [77,78], à la prostate [17,20, 21], à l'estomac [6] et à la vessie [23]. L'un des isothiocyanates le plus étudié est le sulforaphane, c'est en effet l'un de ceux qui présente le plus grand potentiel anticarcinogène [13].

Des travaux réalisés sur des modèles animaux *in vivo* ont ainsi montré l'effet protecteur du sulforaphane vis-à-vis de carcinogènes tels que le benzo[*a*]pyrène, le sulforaphane a en effet entraîné une diminution du nombre de tumeurs induites par cet agent [79, 6]. Un grand nombre de travaux concerne l'effet du sulforaphane sur des lignées de cellules cancéreuses humaines (cellules HT29 issues de carcinome colique, cellules PC-3 issues d'adénome prostatique, cellules d'hépatome Hep-2) : cette molécule peut provoquer l'arrêt de la prolifération et l'apoptose des cellules cancéreuses *in vitro* [15, 17, 20, 28, 29, 31,32].

Le sulforaphane a enfin un effet puissant et prolongé de protection des cellules pigmentaires de la rétine et des kératinocytes humains vis-à-vis de différents agents toxiques provoquant un stress oxydatif *in vitro* [14].

II.3.1.2. Mécanisme d'action

L'effet protecteur du sulforaphane fait intervenir différents mécanismes plus ou moins bien élucidés, le premier d'entre eux consiste en une induction des enzymes de détoxification de phase II [5, 15, 16, 18, 19, 30, 31, 33, 80].
Les carcinogènes présents dans l'alimentation et l'environnement tels que les hydrocarbures polycycliques aromatiques, les amines hétérocycliques et les nitrosamines nécessitent une activation métabolique pour provoquer des dommages à l'ADN. Paradoxalement, certains agents, non carcinogènes par eux-mêmes, le deviennent après action des enzymes de détoxification de phase I dont le rôle est de transformer ces produits (par oxydation notamment) afin qu'ils puissent être pris en charge par les enzymes de phase II et ainsi être éliminés. Un effet protecteur peut donc être obtenu en inhibant les enzymes de phase I et/ou en activant les enzymes de phase II qui permettent l'excrétion et la détoxification accélérée des carcinogènes en rendant ces molécules plus solubles par conjugaison (conjugaison à l'UDP-glucuronyl, à un anion sulfate...). Parmi les molécules intervenant sur le métabolisme des xénobiotiques, les inducteurs bifonctionnels tels que les indoles agissent sur les enzymes de détoxification de phase I (inhibition) et II (induction). A l'inverse, les inducteurs monofonctionnels tels que les isothiocyanates activent seulement les enzymes de phase II ce qui permet d'expliquer, en partie, leurs propriétés anticarcinogènes. Les enzymes de phase II induites par les isothiocyanates sont principalement la Glutathion S Transférase (GST), l'UDP Glucuronyl Transférase (UDPGT) et la NAD(P)H quinone réductase (QR).
Le mécanisme par lequel les isothiocyanates induisent les enzymes de phase II a été partiellement élucidé. En effet, deux protéines participent à l'activation de la transcription des gènes de phase II : le facteur nucléaire E2 p45 (Nrf2) qui est une protéine de la famille des Leu Zipper (fermeture

éclair à Leucine) et la protéine Keap1 qui est une protéine cytoplasmique liée à l'actine du cytosquelette. A l'état basal, Keap1 est lié à Nrf2 au niveau cytoplasmique et joue donc le rôle d'un répresseur. En présence d'un inducteur se fixant sur les groupements thiols de Keap1, Nrf2 est libéré et migre *via* un pore nucléaire dans le noyau. Il forme alors un hétérodimère avec d'autres facteurs de transcription tel que Small Maf qui se lie alors à l'extrémité 5' des gènes codant les enzymes de phase II et provoque l'augmentation de la transcription de ces gènes. Ce système Keap1-Nrf2 est indispensable à la synthèse des enzymes de détoxification de phase II [34, 35, 36]. Fahey *et coll.* [6] ont mis en évidence la diminution de l'activité protectrice du sulforaphane vis-à-vis de la formation de tumeurs gastriques induites par le benzo[*a*]pyrène chez des souris knock-out pour le gène codant Nrf2. En effet, ces dernières ont développé un nombre significativement plus important de tumeurs gastriques après gavage par du benzo[*a*]pyrène et du sulforaphane par rapport à des souris témoins possédant le gène Nrf2.

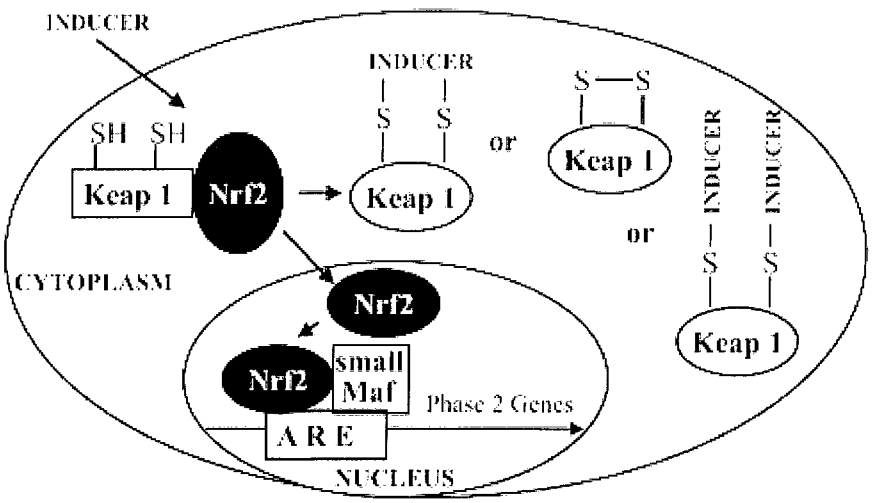


Figure n°5 : Mécanisme d'action des inducteurs des gènes codant les enzymes de détoxification de phase II

Le second mécanisme met en jeu l'apoptose des cellules malignes et prémalignes et l'arrêt du cycle cellulaire. L'apoptose induite par le

sulforaphane sur des cellules cancéreuses coliques HT29 s'accompagne d'une surexpression d'une protéine cytosolique : la protéine Bax qui provoque l'ouverture des pores situés sur la membrane mitochondriale et donc la libération du contenu mitochondrial, objectivée par le relargage du cytochrome c. Ce phénomène aboutit à l'activation de la cascade de la caspase et par voie de conséquence à l'apoptose des cellules cancéreuses. En outre, le sulforaphane induit le blocage du cycle cellulaire, ce phénomène pourrait s'expliquer par la surexpression de la protéine Bax qui induit la kinase dépendante des cyclines (cdk) (les cyclines B1 et A étant essentielles au bon déroulement du cycle cellulaire) en dégradant son inhibiteur [15,17, 28, 31, 32].

Ainsi, les isothiocyanates interviennent sur plusieurs étapes du processus de cancérogenèse en induisant les enzymes de détoxification de phase II, en inhibant la prolifération des cellules malignes par arrêt du cycle cellulaire et enfin en induisant l'apoptose des cellules malignes et prémalignes.

II.3.2. Activité antibactérienne

II.3.2.1. Généralités

Depuis les années 50, les propriétés antibactériennes des isothiocyanates ont fait l'objet de nombreux travaux concernant principalement le domaine de l'industrie alimentaire, dans le but de les utiliser comme conservateurs d'origine naturelle. Dans ce cadre, l'isothiocyanate le plus étudié a été l'allylisothiocyanate.

Isshiki *et coll.* [37] ont montré que le mode de contact entre l'isothiocyanate et les microorganismes a un impact important sur l'effet antibactérien obtenu et ont donc préconisé la vaporisation. Celle-ci est

possible du fait de la volatilité des isothiocyanates mais aussi parce que les denrées alimentaires se prêtent bien à ce type d'application.

Cependant, la méthodologie utilisée ne permet pas l'utilisation de ces résultats en bactériologie clinique. Les mêmes auteurs [37] ont également montré que les bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* ou encore *Bacillus subtilis* sont plus résistantes aux vaporisations d'allylisothiocyanate que les bactéries à Gram négatif telles que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Escherichia coli*. Toutefois, une souche de *Salmonella enterica* sérotype Thyphimurium American Type Culture Collection (ATCC) 14028 (Rockville, Maryland, USA) apparaît aussi résistante à l'allylisothiocyanate que les bactéries à Gram positif étudiées.

Dans une autre étude, Lin *et coll.* [38] ont étudié les effets antibactériens de l'allylisothiocyanate et du méthylisothiocyanate vaporisés sur des fruits et légumes «inoculés » avec différentes espèces bactériennes à raison de 10^4 Unités formant colonie (UFC)/g : *Salmonella enterica* sérotype Montevideo, *E. coli* sérogroupe O157 : H7 et *Listeria monocytogenes* Scott A. Les doses d'isothiocyanates utilisées correspondaient à la vaporisation de 400 µL d'allylisothiocyanate ou de méthylisothiocyanate dans l'atmosphère d'incubation mais la concentration finale dans l'atmosphère n'était pas connue. Les deux isothiocyanates se sont montrés bactéricides, le méthylisothiocyanate étant plus efficace sur *Listeria* et l'allylisothiocyanate plus efficace sur la souche de *Salmonella* spp. et de *E. coli*.

Enfin, un effet bactéricide sur des souches de *E. coli* entérohémorragiques (sérogroupe O157 : H7) a été obtenu à une dose de 8,4 ppm d'allylisothiocyanate dans l'atmosphère d'incubation (correspondant à la vaporisation de 8 µL d'allylisothiocyanate dans cette atmosphère) [39].

L'allylisothiocyanate a une action sur les bactéries qu'elles soient en phase de croissance ou non, ce qui est important dans l'industrie alimentaire lorsque les aliments sont réfrigérés. Selon Lin *et coll.* [40], l'allylisothiocyanate pourrait agir comme la polymyxine B en augmentant la perméabilité membranaire.

La comparaison de ces différents résultats est toutefois difficile en raison du faible nombre de souches testées et des différences méthodologiques.

II.3.2.2. Sulforaphane et *H. pylori*

Une étude réalisée sur 48 souches de *H. pylori*, en 2002, par Fahey *et coll.* [6] a montré que le sulforaphane avait une action bactériostatique et bactéricide sur cette bactérie. Les CMI déterminées dans cette étude étaient comprises entre 0,06 et 8 mg/L, la CMI_{90} (CMI pour laquelle 90% des souches sont inhibées) étant égale à 4 mg/L. D'autre part, les CMI étaient identiques à pH 7 et à pH 5,8, pH reflétant plus précisément celui du mucus gastrique dans lequel se trouve *H. pylori*. En outre, la sensibilité des souches de *H. pylori* au sulforaphane n'était pas conditionnée par leur résistance aux antibiotiques utilisés classiquement pour le traitement des infections à *H. pylori* : il n'existait en effet pas de différence significative entre les CMI du sulforaphane obtenues avec les souches sensibles ou résistantes à la clarithromycine et/ou au métronidazole. Enfin, une activité bactéricide du sulforaphane a été observée sur deux souches de *H. pylori* avec des concentrations égales à 5 fois la CMI après 24 h de contact, que ces bactéries soient en position intracellulaire ou extracellulaire. Il a par ailleurs été montré que les CMI du D,L-sulforaphane, du D - sulforaphane et du L-sulforaphane étaient identiques vis-à-vis de 20 souches de *H. pylori* [86].

II.3.3. Activités antifungique, antiparasitaire et insecticide

II.3.3.1. Activité antifungique

Les propriétés antifungiques d'une centaine d'isothiocyanates vis-à-vis de levures et de moisissures ont été étudiées par Drobnica *et coll.* [41]. Ces auteurs ont conclu que les isothiocyanates à chaîne aromatique étaient plus actifs sur les champignons que les isothiocyanates à chaîne aliphatique. Parmi ceux-ci, l'allylisothiocyanate était le plus efficace sur les souches fungiques étudiées.

Mari *et coll.* [41] ont démontré que certains isothiocyanates avaient la propriété d'inhiber la germination des conidies et la croissance des filaments mycéliens. Enfin, Isshiki *et coll.* [37] ont rapporté que les levures étaient au moins aussi sensibles aux isothiocyanates que les autres fungi en particulier que les moisissures.

II.3.3.2. Activité antiparasitaire

A dose élevée (de l'ordre de 1g/L), les isothiocyanates sont toxiques pour des parasites des végétaux appartenant à la famille des Nématodes comme *Globodera rostochiensis* [43] (nématode à kyste de la pomme de terre ou nématode doré) et *Heterodera schachtii* [42](nématode de la betterave). A l'inverse, les glucosinolates sont quant à eux dénués d'action nématodicide.

II.3.3.3. Activité insecticide

Des glucosinolates 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. Ces composés ont également une toxicité aiguë vis-à-vis de

Tribolium castaneum (ver de farine) et de *Oryzeaphilus surinamensis* (cucujidé dentelé des grains), deux parasites des céréales responsables chaque année d'importantes pertes de récoltes[44]. Des isothiocyanates utilisés en vaporisation, en particulier l'allylisothiocyanate, sont aussi efficaces sur certains insectes que des insecticides de synthèse tels que la chloropicrine et le dichlorovos en particulier sur *M. domestica* et *Rhyzopertha dominica* [45] [bostryche : insecte parasitant les céréales (blé ou maïs)].

II.4.Toxicité

II.4.1. Génotoxicité et mutagénicité in vitro

Comme toutes les molécules qui présentent une activité bénéfique potentielle, les isothiocyanates ont subi des essais d'innocuité afin de détecter une toxicité éventuelle.

Un effet génotoxique provoqué par des plantes de la famille des crucifères a été rapporté *in vitro* par plusieurs équipes [46, 47, 48, 49]. En effet, des jus préparés à partir de ces plantes crues peuvent induire des mutations chez *Salmonella* sp TA98 et TA100 (test de Ames). De plus, ces jus de crucifères provoquent, à des degrés variables, des aberrations chromosomiques ainsi que des translocations réciproques sur des cellules de mammifères (cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) et des cellules SV_{40} transformées, de muntjac indien (SVM)). Ces effets délétères ont été imputés aux isothiocyanates. Mais tous les isothiocyanates n'ont pas le même potentiel génotoxique : parmi les isothiocyanates testés, le benzyl-isothiocyanate semble être l'agent ayant la plus forte capacité à induire des altérations de l'ADN. L'allylisothiocyanate, le phénéthylisothiocyanate et le méthylisothiocyanate, trois isothiocyanates retrouvés dans l'alimentation

humaine, ont également été étudiés. Il s'est avéré que l'allylisothiocyanate était plus génotoxique vis-à-vis de *Salmonella* sp TA98 et TA100 et des cellules de mammifères que ne l'était le phenéthylisothiocyanate. Ces effets délétères sont très atténués *in vivo* en raison de l'acidité gastrique lors de la digestion : en effet l'hydrolyse des glucosinolates à pH acide conduit préférentiellement à la production de nitriles plutôt qu'à celle d'isothiocyanates. Inversement, une température élevée favorise l'hydrolyse (enzymatique et non enzymatique) des glucosinolates en isothiocyanates et contribue de ce fait à une augmentation de la génotoxicité. La génotoxicité du méthylisothiocyanate existe mais elle ne s'exprime qu'à des doses extrêmement élevées [49]. Enfin, une telle toxicité n'a pas été rapportée avec le sulforaphane.

II.4.2. Induction des enzymes de détoxification de phase I par les glucosinolates

Des travaux récents réalisés *in vitro* ont démontré que la glucoraphanine (précurseur du sulforaphane) pouvait provoquer l'activation métabolique des hydrocarbures polycycliques aromatiques en carcinogènes par induction des enzymes de détoxification de phase I et aurait donc, de ce fait, un effet pro-carcinogène [50]. Cela suggère qu'il faut préférentiellement ingérer des isothiocyanates plutôt que des glucosinolates (en permettant l'action de la myrosinase (broyage des végétaux) et en évitant son inactivation (cuisson)).

II.4.3. Effets dioxine-like

Il a été rapporté qu'une famille particulière de glucosinolates, les indoles glucosinolates, présentait une toxicité similaire à celle de la dioxine. Les isothiocyanates formés à partir d'indole-glucosinolates sont instables et se décomposent spontanément en indole-3-carbinol, en indole-

acétonitrile, en ions thiocyanates et en 3,3'-diindoylméthane [9]. En milieu acide comme c'est le cas dans l'estomac, l'indole-3-carbinol peut spontanément se condenser pour former des composés de structure et de toxicité proche du 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD ou dioxine).

II.4.4. Effet goitrigène

L'apparition de goitres thyroïdiens en l'absence de carence en iode chez les mammifères a conduit les chercheurs à s'interroger sur la présence éventuelle de composés goitrigènes dans certains végétaux de la famille des crucifères. Le transfert intra-thyroïdien de l'iode est placé sous la dépendance de la pompe à iodures. Il s'agit d'un mécanisme de transfert actif nécessitant de l'ATP (Adénosine triphosphate) mettant en jeu l'ATPase membranaire. Certains thiocyanates et isothiocyanates peuvent bloquer la captation de l'iodure sans être eux-mêmes captés et être ainsi à l'origine d'un effet goitrigène. Différents travaux ont permis d'imputer ces effets à des β-hydroxyalkenyl glucosinolates (progoitrine et épi-progroitrine) qui, après hydrolyse, produisent des β-hydroxyalkenyl isothiocyanates capables de se cycliser en générant des oxazolidine-2-thiones, composés connus comme étant goitrigènes chez les mammifères. Ces β-hydroxyalkenyl glucosinolates étaient notamment retrouvés dans certaines variétés de colza avant le développement du colza variété « Canola » contenant de faibles quantités de glucosinolates et d'acide érucique [9].

III. LES CAMPYLOBACTER

D'un point de vue taxonomique, la superfamille VI des bacilles à Gram négatif comprend quatre genres : *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter et Wollinella*. Les deux premiers genres ont été regroupés dans la famille des *Campylobacteraceae* [53].

Les bactéries appartenant au genre *Campylobacter* sont des bactéries à Gram négatif caractérisées par [53, 81] :

- leur morphologie : ces bactéries se présentent sous la forme de bacilles fins mesurant de 0,5 à 5 µm de long et de 0,2 à 0,9 µm de diamètre, incurvés en forme de virgule ou de S. Les formes longues ont une forme hélicoïdale. Des formes coccoïdes peuvent apparaître dans les cultures anciennes.
- leur mobilité caractéristique « dite en tire-bouchon » est due à une ciliature polaire le plus souvent monotriche.
- leur métabolisme respiratoire microaérophile (leur croissance nécessite une concentration d'oxygène proche de 5 %)
- une réaction oxydase positive (excepté *C. gracilis*)
- l'absence de fermentation et d'acidification des sucres (ce qui les différencie des *Vibrio*)
- un coefficient G+C compris entre 29 et 47 %

Au sein du genre *Campylobacter*, il est possible de classer les espèces en trois groupes : le groupe « thermophile » (dénommé ainsi car la température optimale de croissance est de 42°C) comprenant, entre autres espèces, *C. jejuni* et *C. coli*, le groupe « fetus » et le groupe des

Campylobacter dits « anaérobies » (nécessitant pour leur croissance une concentration en oxygène inférieure à 5 %)[53]. Les espèces les plus fréquemment isolées en pathologie humaine sont *C. jejuni*, *C. coli* et *C. fetus*, leur fréquence d'isolement en France est respectivement de 68 %, 19 % et 8 %. Les autres espèces sont beaucoup plus rarement isolées [54].

Les *Campylobacter* appartenant au groupe thermophile provoquent principalement des entérites : celles-ci sont caractérisées par des diarrhées aqueuses d'une durée de 2 à 4 jours pouvant devenir muco-sanglantes. L'épisode diarrhéique dure en moyenne une semaine et est généralement précédé par de la fièvre et des douleurs abdominales intenses [56, 58]. *C. fetus* est parfois aussi impliqué en pathologie digestive mais provoque plus fréquemment des bactériémies [53, 54]. Chez les patients immunodéprimés, les bactériémies sont plus fréquentes et plus graves, et des entérites récidivantes sont plus volontiers observées [58]. En outre, *C. jejuni et C. coli* peuvent être impliqués dans des pathologies extra-intestinales, ils peuvent en effet atteindre les voies lymphatiques après avoir colonisé le mucus et avoir été internalisés au sein des entérocytes (translocation extra intestinale) [57]. Des complications non infectieuses liées à *C. jejuni* peuvent également survenir, elles peuvent être :

- neurologiques : syndrome de Guillain-Barré pouvant apparaître après des entérites provoquées par certaines souches de *C. jejuni* appartenant souvent à un sérotype particulier. Les patients porteurs de certains antigènes HLA notamment DQB1*03 auraient également plus de risques de développer ce syndrome [53, 58, 60].
- articulaires : arthrites réactionnelles et syndrome de Reiter plus fréquemment observés chez les patients porteurs de l'antigène HLA B27 [53, 58].

Des études réalisées *in vitro* ont permis de mettre en évidence différents facteurs de pathogénicité. Il a été ainsi montré que *C. jejuni* pouvait coloniser le mucus intestinal notamment du fait de sa mobilité importante. Il peut également adhérer aux entérocytes puis être internalisé dans ceux-ci. Enfin, de nombreuses souches de *C. jejuni* et *C. coli* sécrètent une entérotoxine proche de la toxine thermolabile de *E. coli*. Le rôle de ces différents facteurs de pathogénicité n'est pas encore bien précisé en pathologie humaine. En effet, chez l'homme, l'expression du pouvoir pathogène des *Campylobacter* semble dépendre de la virulence de la souche infectante et de la susceptibilité de l'hôte [53, 57].

Les infections à *Campylobacter* spp. sont des anthropozoonoses. La contamination survient le plus souvent à l'occasion de la consommation de viande de volailles ou de porc et à l'ingestion de lait. Elles sont parfois transmises par l'eau, les personnes ou les animaux infectés. Le mode de transmission est bien connu pour les *Campylobacter* appartenant au groupe thermophile et est vraisemblablement similaire pour les autres espèces [53, 55, 82].

L'incidence des entérites à *Campylobacter* spp. est largement sous-estimée du fait de l'absence de prescription systématique de coprocultures en cas de diarrhées [53, 54]. Aux Etats-Unis [82], le taux d'isolement est estimé à 21 pour 100.000 habitants soit environ le double de celui des *Salmonella* spp. En France, l'infection est plus fréquente chez les nourrissons et les jeunes enfants (50 % des isolements sont réalisés chez des enfants de moins de 10 ans), de sexe masculin et avec une incidence plus importante en été [53,54].

Le diagnostic bactériologique des entérites à *Campylobacter* spp. repose sur la mise en évidence de ces bactéries dans les selles grâce à l'utilisation de milieux sélectifs (tel que le milieu de Karmali (Oxoïd®, Dardilly, France)) incubés en atmosphère microaérophile. L'identification

de ces bactéries est basée sur leur morphologie, la présence d'une oxydase et l'absence de fermentation et d'acidification des sucres. L'identification au niveau de l'espèce nécessite des tests complémentaires notamment la recherche de la production d'une catalase, la sensibilité à la céfalotine et à l'acide nalidixique et l'hydrolyse de l'hippurate. Ces caractères phénotypiques ne permettent pas toujours l'identification de l'espèce et il est parfois nécessaire d'avoir recours à des méthodes génotypiques [53].

Le traitement de référence des entérites à *Campylobacter* spp. repose sur l'utilisation d'érythromycine ou de ciprofloxacine administrés *per os* [53, 56, 58, 64]. Cependant, la ciprofloxacine est à réserver à l'adulte du fait de ses effets secondaires au niveau des os et des tendons chez les enfants [83]. L'initiation précoce d'un traitement antibiotique améliorerait la symptomatologie et raccourcirait la durée de portage. L'efficacité d'un tel traitement a été démontrée lors d'infections « sévères », d'infections chroniques ou survenant chez des patients immunodéprimés ou lorsqu'il existe un risque épidémique (institutions) [53, 56, 58].

En France, la résistance aux macrolides est stable depuis une vingtaine d'années ; elle concerne environ 3 à 4 % des souches [54] de *Campylobacter* spp. et touche essentiellement *C. coli* ce qui peut s'expliquer par l'utilisation de macrolides tels que la tylosine pour supplémenter l'alimentation des porcs (principal réservoir de *C. coli*). Cette résistance est cependant extrêmement variable selon les pays et peut atteindre 50 % en Asie du Sud-Est (par exemple à Singapour) [63]. Le mécanisme de résistance à cette famille d'antibiotiques a été élucidé pour l'espèce *C. jejuni* : il s'agit d'une mutation chromosomique du gène codant la sous-unité 23S de l'ARNr[64].

En France, environ 30 % des souches de *C. jejuni et* de *C. coli* sont résistantes aux fluoroquinolones et une forte progression de cette résistance a été observée au cours des 15 dernières années [54, 61] : l'évolution de la

résistance pourrait s'expliquer par l'utilisation, depuis 1991, d'enrofloxacine en médecine vétérinaire [59, 63, 64]. La résistance aux fluoroquinolones observée chez *C. jejuni* résulte d'une mutation chromosomique des gènes *gyrA* et/ou *parC* codant respectivement l'ADNgyrase et la topoisomérase IV [59, 62]. Des souches de *Campylobacter* spp. résistantes à la fois à l'érythromycine ou à l'azithromycine (un autre macrolide pouvant être utilisé pour le traitement des entérites à *Campylobacter* spp.) et à la ciprofloxacine ont été rapportées [51, 52].

IV. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les données concernant l'activité antibactérienne des isothiocyanates sur les bactéries pathogènes et commensales de l'homme sont incomplètes. En effet, les seules données utilisables en bactériologie clinique concernent le sulforaphane et *H. pylori* [6]. L'objectif de notre étude était donc de contribuer à améliorer la connaissance du spectre antibactérien des isothiocyanates. Dans un premier temps, nous avons évalué l'activité *in vitro* du sulforaphane sur des espèces bactériennes commensales et/ou pathogènes de l'homme. Ce travail de criblage a permis de détecter une activité bactériostatique du sulforaphane à des concentrations relativement faibles sur *Campylobacter* spp.. La deuxième partie de notre travail a concerné l'étude de l'activité *in vitro*, sur *Campylobacter* spp., d'autres isothiocyanates (qui s'étaient montrés actifs sur *H. pylori*) de l'érythromycine et de la ciprofloxacine (antibiotiques recommandés dans le traitement des entérites à *Campylobacter* spp.)

V. MATERIELS ET METHODES

V.1. Souches bactériennes testées

Les espèces bactériennes incluses dans notre étude figurent dans les tableaux n° 3, 4, 5, 6, 7. Toutes les souches (hormis les *Campylobacteraceae*) ont été isolées au Laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy entre 2000 et 2003 et provenaient de coprocultures (n=55), d'hémocultures (n=20), de prélèvements respiratoires (n=13) et d'abcès profonds (n=12). Concernant les *Campylobacteraceae*, notre étude a porté sur 60 souches de *Campylobacter* spp. et 2 souches d'*Arcobacter butzleri* isolées au Laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy entre décembre 1991 et juillet 2003 et qui provenaient de coprocultures (n=55) et d'hémocultures (n=7). L'identification des différents isolats cliniques a été réalisée par des méthodes conventionnelles.

Tableau n°3 : Entérobactéries testées dans notre étude.

Espèces bactériennes	Nombre de souches
Escherichia coli	n =4
Klebsiella pneumoniae	n =2
K. oxytoca	n =2
Salmonella enterica	n =5
Shigella flexnerii	n =1
S. sonnei	n =2
S. dysenteriae	n =1
Yersinia enterocolitica	n =2
Proteus mirabilis	n =2
Citrobacter freundii	n =2
Enterobacter cloacae	n =2
E. aerogenes	n =1
Serratia marcescens	n =2

Tableau n°4 : Bacilles à Gram négatif non fermentants testés dans notre étude.

Espèces bactériennes	Nombre de souches
Pseudomonas aeruginosa	n =1
Burkholderia cepacia	n =1
Stenotrophomonas maltophilia	n =1
Acinetobacter baumanii	n =1

Tableau n°5 : Cocci à Gram positif aérobies-anaérobies facultatifs testés dans notre étude.

Espèces bactériennes	Nombre de souches
Staphylococcus aureus	n =2
S. epidermidis	n =2
Streptococcus pyogenes	n =3
S. agalactiae	n =2
S. bovis	n =2
S. intermedius	n = 2
S. pneumoniae	n =11
Enterococcus faecalis	n =3
E. faecium	n =2
E. casseliflavus	n =2

Tableau n°6 : Bactéries anaérobies strictes testées dans notre étude.

Espèces bactériennes	Nombre de souches
Bacteroides fragilis	n =3
B. thetaiotaomicron	n =3
Prevotella spp.	n =3
Porphyromonas spp.	n =2
Veillonella spp.	n =1
Finegoldia magna (ex *Peptostreptococcus magnus*)	n=1
Clostridium perfringens	n =2
C. difficile	n =19
C. clostridioforme	n =1
C. innocuum	n =1
Eggerthela lenta	n =1

Tableau n°7 : *Campylobacteraceae* testés dans notre étude.

Espèces bactériennes	Nombre
Campylobacter jejuni	n=26
C. coli	n=24
C. fetus	n=7
C. upsaliensis	n=2
C. hyointestinalis	n=1
Arcobacter butzleri	n=2

Différentes souches de référence ont été utilisées comme souches contrôles : *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *C. jejuni* ATCC 29428, *B. fragilis* ATCC 25285 et *E. lenta* ATCC 43055 (ex *Eubacterium lentum* [65]).

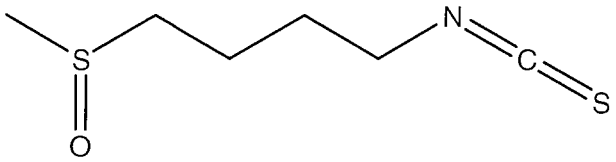
Les streptocoques, les pneumocoques, *Campylobacter* spp., les bactéries anaérobies strictes et les souches de référence étaient conservées à -80°C dans du bouillon Brucella (BBL®, Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) additionné de 15% de glycérol. Les autres souches étaient conservées en gélose nutritive (Nutrient Agar (Oxoïd®).

V.2. Molécules testées

V.2.1. Sulforaphane et autres isothiocyanates

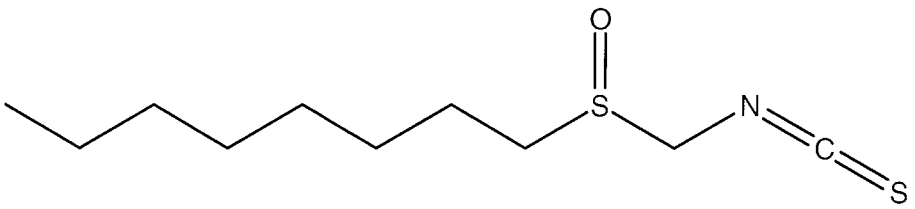
Le D,L-sulforaphane, le 8-isothiocyanatométhylsulfinyloctane (ITCmso), la cheiroline, l'erysoline et la berteroine ont été commandés au laboratoire Coger® (Paris, France). Le 4(L-rhamnopyranosyloxy) benzylisothiocyanate (4RBITC) a été fourni par J. Fahey (Department of Pharmacology and Molecular Sciences, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore). Ce composé a été extrait des graines de moringa [84] (petit arbuste des régions tropicales), *Moringa oleifera*. Tous ces isothiocyanates se présentaient sous forme de liquides huileux jaunes dont la pureté minimale était de 97 %.

Les formules de ces différents composés sont détaillées dans les figures n° 6, 7, 8, 9, 10 et 11.



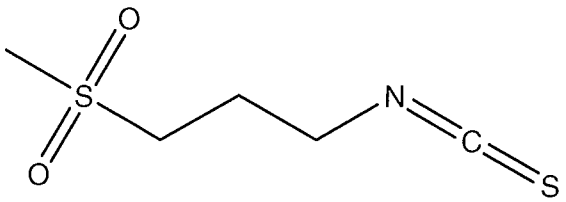
[(-)-1-isothiocyanato-(4R)-(methylsulfinyl)butane]
SULFORAPHANE

Figure n°6 : Formule semi développée du sulforaphane



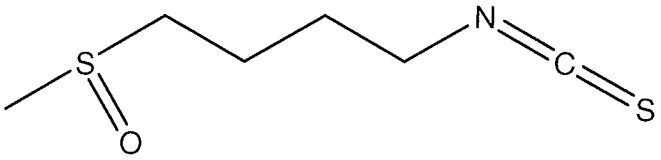
8 isothiocyanatomethylsulfinyloctane
ITC8MSO

Figure n°7 : Formule semi développée de l'ITC8MSO



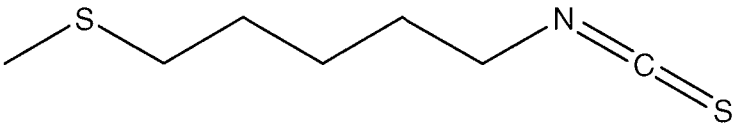
[(-)-1-isothiocyanato-(3)(methylsulfonyl)propane]
CHEIROLINE

Figure n°8 : Formule semi développée de la cheiroline



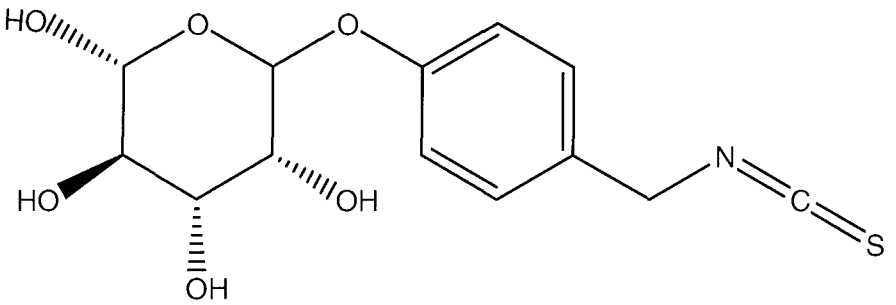
[(-)-1-isothiocyanato-(4R)(methylsulfonyl)butane]
ERYSOLINE

Figure n°9 : Formule semi développée de l'erysoline



[(-)-1-isothiocyanato-(5)(methylthio)pentane]
BERTEROINE

Figure n°10 : Formule semi développée de la berteroine



4(L-rhamnopyranosyloxy)benzylisothiocyanate
4RBITC

Figure n°11 : Formule semi développée du 4RBITC

V.2.2. Erythromycine et ciprofloxacine

Concernant *Campylobacter* spp. (n=60) et *Arcobacter butzleri* (n=2), l'évaluation de l'activité *in vitro* du sulforaphane et de celle d'autres isothiocyanates, a été suivie de la détermination des CMI de l'érythromycine (Aventis®, Romainville, France) et de la ciprofloxacine (Bayer®, Leverkusen, Allemagne).

V.3. Méthodologie

La détermination des CMI a été réalisée par la méthode de dilution en milieu gélosé suivant les recommandations du National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [66, 67, 68].

V.3.1. Repiquages

Les souches de *Campylobacter* spp. ont été repiquées trois fois sur gélose Chocolat Polyvitex (bioMérieux®, Marcy l'étoile, France) avant de réaliser les essais.

Les souches bactériennes anaérobies ont été repiquées trois fois sur gélose Brucella supplémentée avec 5 % de sang de mouton défibriné (Oxoïd®), 1 µg/mL de vitamine K_1 (Sigma-Aldrich®, Saint-Quentin-Fallavier, France) et 5 µg/mL d'hémine (Sigma-Aldrich®).

Les souches de streptocoques et de pneumocoques ont été repiquées une fois sur milieu Mueller-Hinton (bioMérieux®) additionné de 5 % de sang de mouton avant la détermination des CMI.

Les autres souches bactériennes ont été repiquées une fois sur milieu Mueller-Hinton avant réalisation des essais.

V.3.2. Préparation des dilutions d'antibiotiques

Des gammes de dilutions de raison géométrique 2 de chaque molécule ont été réalisées de manière à obtenir les concentrations finales suivantes :

- 0,06 à 16 mg/L pour le 4RBITC
- 0,06 à 64 mg/L pour le sulforaphane et les autres isothiocyanates
- 0,06 à 128 mg/L pour l'érythromycine et la ciprofloxacine

L'érythromycine base a été dissoute dans du méthanol et le chlorhydrate de ciprofloxacine dans de l'eau bidistillée stérile. Les solutions d'isothiocyanates ont été, quant à elles, préparées dans l'acétonitrile. Les dilutions ultérieures ont été réalisées dans de l'eau bidistillée stérile.

V.3.3. Préparation des boîtes de Pétri

Deux millilitres de chaque dilution d'antibiotique ont été incorporés à 18 mL de milieu gélosé maintenu en surfusion :

- Mueller-Hinton pour les entérobactéries, les bacilles à Gram négatif non fermentants, les staphylocoques et les entérocoques.
- Mueller-Hinton additionné de 5 % de sang de mouton défibriné pour les streptocoques, les pneumocoques et les *Campylobacter*.
- Brucella supplémenté pour les bactéries anaérobies.

V.3.4. Préparation des inocula bactériens

Les inocula ont été préparés de la façon suivante :

- pour *Campylobacter* spp. et les bactéries anaérobies, une suspension a été réalisée, à partir de cultures sur milieux gélosés âgées de 48 h, en bouillon Brucella (préalablement régénéré). L'opacité a ensuite été ajustée au point 0,5 de l'échelle de McFarland (~10^8 UFC/mL).
- pour les autres espèces bactériennes, une suspension a été réalisée, à partir de cultures sur milieux gélosés âgées de 18-24 h, en solution saline (NaCl 0,9 %). L'opacité a ensuite été ajustée au point 0,5 de l'échelle de McFarland (~10^8 UFC/mL). L'inoculum final a été obtenu en diluant cette suspension au 1/10ème dans de l'eau distillée stérile.

V.3.5. Ensemencement

Les milieux gélosés contenant les différentes concentrations d'antibiotiques ont ensuite été ensemencés grâce à un inoculateur à tiges multiples (appareil de Steers, Denley, Billinghurst, GB) qui délivre environ 2 µL de chaque suspension. Les milieux contenant les plus faibles concentrations d'antibiotiques ont été ensemencés les premiers. Des milieux dépourvus d'antibiotiques ont également été ensemencés au début et à la fin de chaque série et ont été utilisés comme témoins de croissance. De plus, concernant *Campylobacter* spp. et les bactéries anaérobies strictes, des milieux dépourvus d'antibiotiques ont été incubés en aérobiose pour vérifier l'absence de contamination. Afin de permettre l'absorption de l'inoculum, les boîtes ont été maintenues 30 minutes à température ambiante avant leur incubation dans une atmosphère appropriée.

V.3.6. Lecture

Les lectures ont été effectuées :

- après 24 h d'incubation à 35°C pour les entérobactéries, les bacilles à Gram négatif non fermentants, les staphylocoques et les entérocoques.
- après 24 h d'incubation à 35°C dans une atmosphère enrichie avec 5 % de CO_2 pour les streptocoques et les pneumocoques.
- après 48 h d'incubation à 35°C dans une atmosphère microaérophile pour *Campylobacter* spp. et *A. butzleri*.
- après 48 h d'incubation à 35°C en atmosphère anaérobie pour les bactéries anaérobies strictes.

Les atmosphères microaérophile et anaérobie ont été obtenues grâce à des des sachets générateurs respectivement (GenBox microaer, bioMérieux®) et (GenBox anaer, bioMérieux®) introduits dans des jarres hermétiques.

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe toute croissance bactérienne visible ou qui entraîne un changement marqué de celle-ci. Dans notre étude, tous les essais ont été dupliqués afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats.

VI. Résultats

VI.1. Résultats de la première partie de l'étude (criblage)

Les CMI du sulforaphane obtenues pour les bacilles à Gram négatif non fermentants, les cocci à Gram positif aérobies-anaérobies facultatifs, les bactéries anaérobies strictes testés étaient toutes supérieures à 64 mg/L (tableau n°8).

Tableau n°8 : Activité antibactérienne du sulforaphane sur les bacilles à Gram négatif non fermentants, les cocci à Gram positif aérobies-anaérobies facultatifs et les bactéries anaérobies.

Souches bactériennes	CMI (mg/L)
Bacilles à Gram négatif non fermentants (n=4)	>64
Staphylocoques (n=4)	>64
Entérocoques (n=7)	>64
Streptocoques et Pneumocoques (n=20)	>64
Bactéries anérobies strictes (n=37)	>64

Les CMI du sulforaphane vis-à-vis des entérobactéries étaient comprises entre 16 et 64 mg/L et les CMI les plus basses étaient observées pour certaines espèces entéropathogènes (*Y. enterocolitica*, *S. enterica* Thyphimurium , S. *dysenteriae* et *S. flexnerii)*. Cependant, pour certaines souches de *S. enterica* et de *S.sonnei*, les CMI (64 mg/L) étaient plus élevées et étaient proches de celles obtenues avec les autres espèces d'entérobactéries.

Tableau n°9 : Activité antibactérienne du sulforaphane sur les entérobactéries.

Souches bactériennes	CMI (mg/L) Valeurs extrêmes
S. enterica Paratyphi A (n=1)	32
S. enterica Typhimurium (n=2)	16-64
S. enterica Agona (n=1)	64
S. enterica Enteritidis (n=1)	64
S. sonnei (n=2)	64
S. dysenteriae (n=1)	16
S. flexnerii (n=1)	16
Y. enterocolitica (n=2)	16
P. mirabilis (n=2)	32
E. coli, K. pneumoniae, K. oxytoca, C. freundii, E. cloacae, E. aerogenes, S. marcescens (n=15)	≥ 64

La meilleure activité bactériostatique du sulforaphane a été obtenue sur les espèces bactériennes microaérophiles appartenant au genre *Campylobacter* (CMI comprises entre 4 et 32 mg/L). La distribution des CMI du sulforaphane pour ces bactéries est présentée dans le tableau n°11.

Tableau n°10 : Activité antibactérienne du sulforaphane sur 18 souches de *Campylobacter* spp.

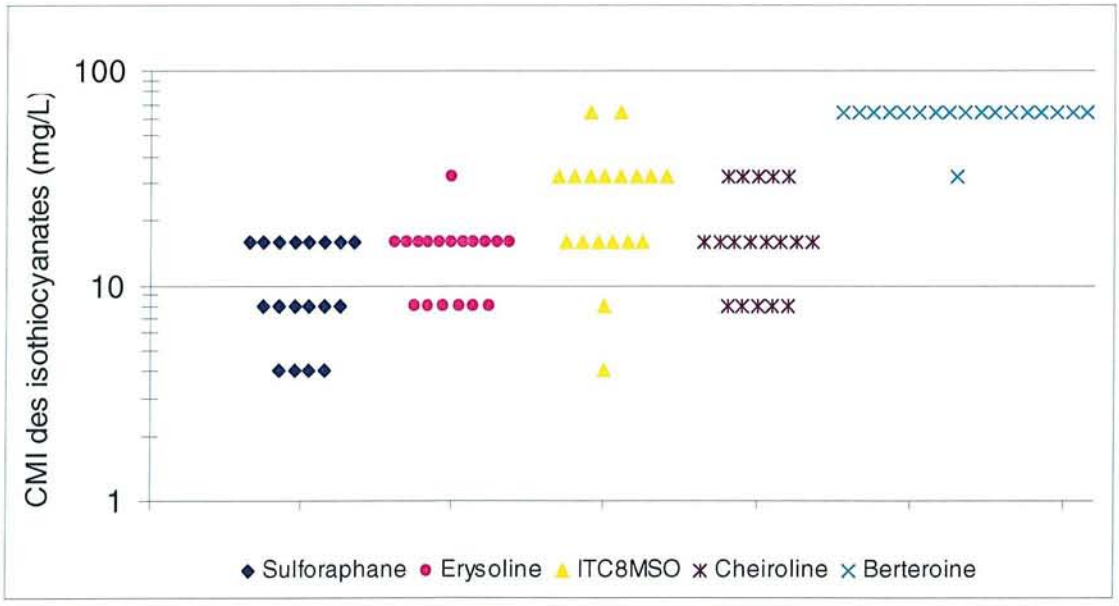
Espèce bactérienne	CMI (mg/L) Valeurs extrêmes
C. jejuni (n=8)	4-16
C.coli (n=7)	4-16
C. fetus (n=3)	16-32

Tableau n°11 : Distribution des CMI du sulforaphane selon les différentes espèces de *Campylobacter*.

	CMI (mg/L)			
Espèce bactérienne	4	8	16	32
C. jejuni (n=8)	3	4	1	
C. coli (n=7)	1	2	4	
C. fetus (n=3)			1	2

VI.2. Résultats de l'étude de l'activité antibactérienne des différents isothiocyanates vis-à-vis de 18 souches de *Campylobacter* spp.

Parmi les isothiocyanates testés, le sulforaphane est celui qui présente l'activité bactériostatique la plus marquée vis-à-vis des bactéries appartenant au genre *Campylobacter*.



Remarque : les résultats concernant le 4RBITC ne sont pas montrés sur cette figure car ils étaient tous supérieurs à 16 mg/L donc inexploitables.

Figure n°12 : Activité comparée de différents isothiocyanates sur 18 souches de *Campylobacter* spp.

VI.3. Résultats de l'étude de l'activité antibactérienne du sulforaphane, de l'érythromycine et de la ciprofloxacine vis-à-vis de 60 souches de *Campylobacter* spp. et de 2 souches d'*Arcobacter butzleri*

Les CMI du sulforaphane déterminées pour les deux souches d'*A. butzleri* testées dans notre travail étaient de 64 mg/L. En revanche, concernant *Campylobacter* spp., les valeurs extrêmes des CMI (4-32 mg/L) du sulforaphane obtenues pour les 60 souches testées dans la deuxième partie de notre travail étaient identiques à celle observées pour les 18 souches étudiées dans notre travail préliminaire. Les CMI_{50} et CMI_{90} du sulforaphane vis-à-vis de *Campylobacter* spp. étaient respectivement égales à 16 mg/L et 32 mg/L.

Tableau n°12 : Activité comparée du sulforaphane, de l'érythromycine et de la ciprofloxacine sur 60 souches de *Campylobacter* spp.

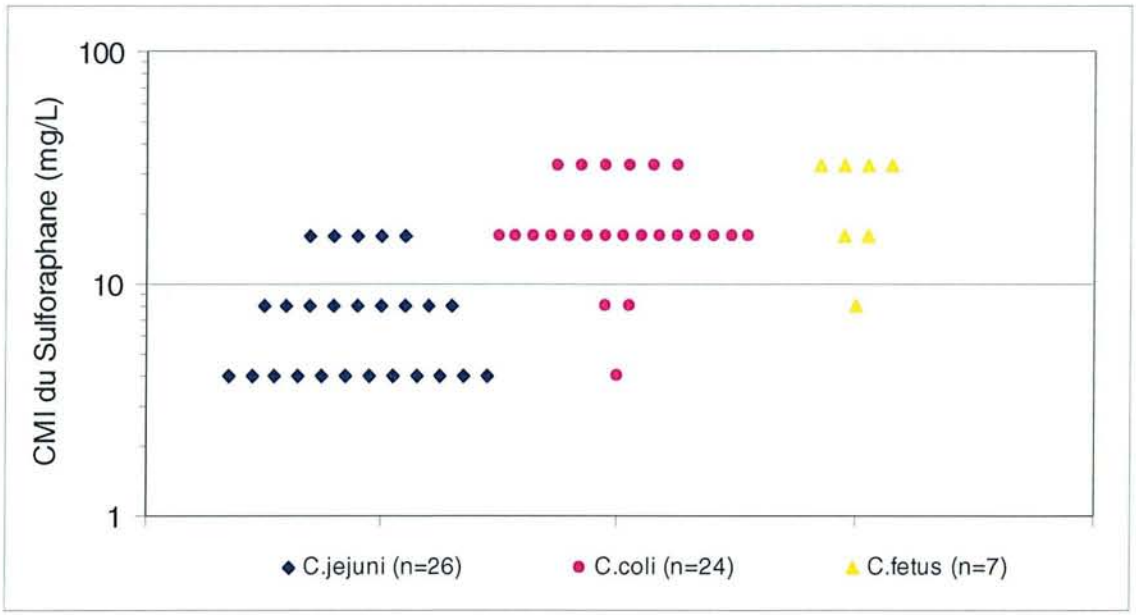
	CMI (mg/L)				
Molécule testée	Valeurs extrêmes	CMI_{50}	CMI_{90}	Concentrations critiques [87]	Pourcentage de souches I/R
Sulforaphane	4-32	16	32	Non déterminée	Non calculable
Erythromycine	0.125-128	1	4	≤ 1- >4	23% (14/60)
Ciprofloxacine	0.06-64	0.25	16	≤ 1- >2	27% (16/60)

Les valeurs des CMI modales du sulforaphane, de l'érythromycine et de la ciprofloxacine étaient respectivement de 16, 1 et 0,125 mg/L.

Tableau n°13: Distribution des CMI pour 60 souches de *Campylobacter* spp.

Molécules testées	CMI (mg/L)											
	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
Sulforaphane							14	14	21	11		
Erythromycine		6	4	12	24	4	5	1	2	1		1
Ciprofloxacine	1	21	10	6	6	2		2	6	5	1	

Les résultats de notre étude semblaient montrer une variation des CMI obtenues selon les espèces de *Campylobacter* étudiées et la différence d'activité antibactérienne était surtout marquée entre *C. jejuni* (CMI_{50} = 8 mg/L, n = 26) et *C. fetus* (CMI_{50} = 32 mg/L, n = 7).



Les CMI du sulforaphane obtenues pour *C. upsaliensis* (n=2) et*C. hyointestinalis* (n=1) étaient respectivement égales à 8 et 32 mg/L.

Figure n°13 : CMI du sulforaphane en fonction des espèces de *Campylobacter* (n=57).

Par ailleurs, nous avons observé que l'activité inhibitrice du sulforaphane sur *Campylobacter* spp. n'était pas influencée par la sensibilité (ou la résistance) de ces bactéries à l'érythromycine et/ou à la ciprofloxacine et cela quelle que soit l'espèce considérée. (Figure n° 14, 15, 16)

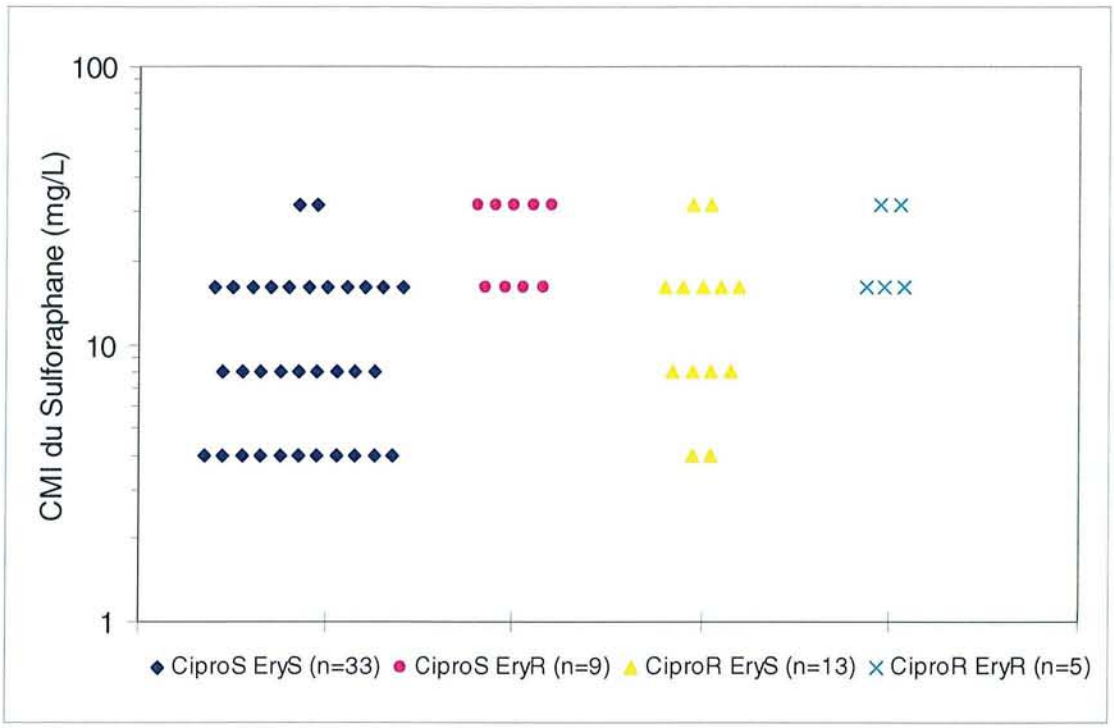


Figure n°14 : Distribution des valeurs de CMI du sulforaphane vis-à-vis de 60 souches de *Campylobacter* spp. en fonction de leur sensibilité à l'érythromycine et à la ciprofloxacine.

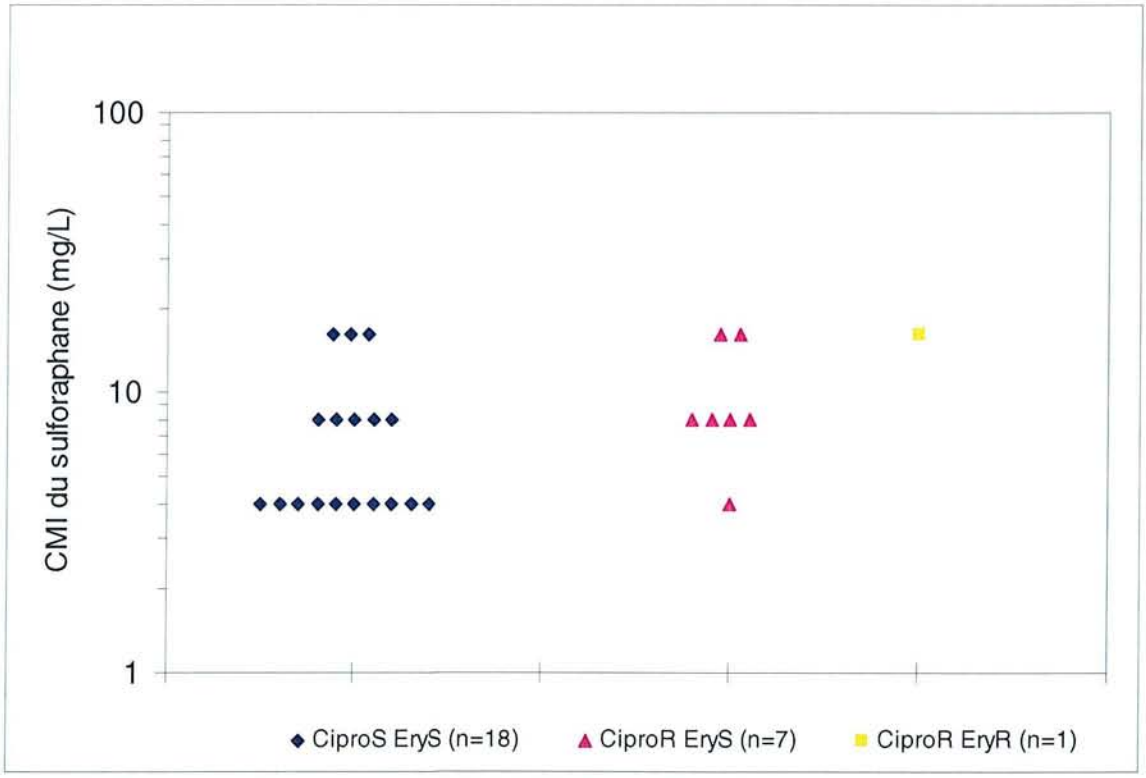


Figure n°15 : Distribution des valeurs de CMI du sulforaphane vis-à-vis de 26 souches de *C. jejuni* en fonction de leur sensibilité à l'érythromycine et à la ciprofloxacine.

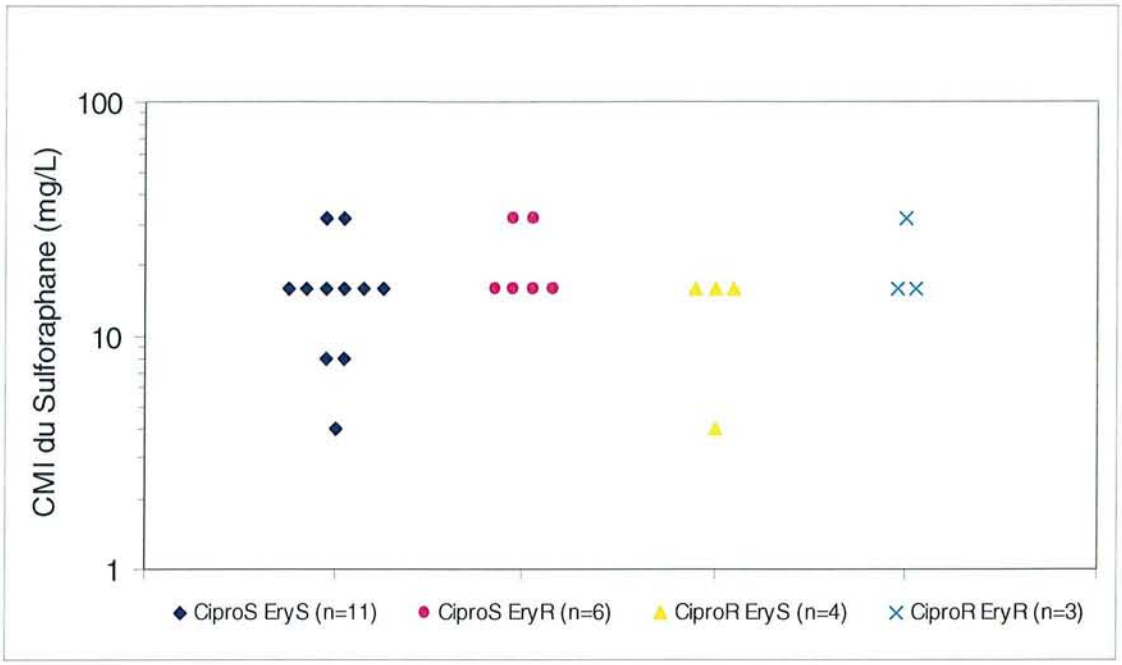


Figure n°16 : Distribution des valeurs de CMI du sulforaphane vis-à-vis de 24 souches de *C. coli* en fonction de leur sensibilité à l'érythromycine et à la ciprofloxacine.

VII. Discussion

De nombreux travaux réalisés au cours de ces 20 dernières années ont permis d'établir que les isothiocyanates, et en particulier le sulforaphane, étaient des molécules douées de propriétés anticarcinogènes [5, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 19]. Leurs propriétés antibactériennes vis-à-vis de *H. pylori* [6] les rendent également attractives dans le domaine de l'antibiothérapie. En l'absence de données exploitables concernant leur activité antibactérienne sur d'autres espèces, il nous a paru pertinent de déterminer si des bactéries autres que *H. pylori* pouvaient être inhibées par ces molécules.

Cette étude a tout d'abord permis de montrer l'absence d'activité des isothiocyanates sur les bactéries anaérobies strictes testées qu'elles soient à Gram positif ou à Gram négatif (CMI > 64mg/L). Concernant les autres bactéries, l'activité antibactérienne des isothiocyanates était meilleure vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, en particulier les espèces microaérophiles testées. En effet, les CMI du sulforaphane vis-à-vis des bactéries à Gram positif étaient supérieures ou égales à 64 mg/L alors qu'elles étaient comprises entre 4 et 64 mg/L pour les bactéries à Gram négatif, les CMI les plus basses étant observées pour certaines espèces entéropathogènes (*Y. enterocolitica*, *S. enterica*, *Shigella* spp. et *Campylobacter* spp.). Cependant, bien que le sulforaphane se soit montré plus actif sur les bactéries à Gram négatif, il existe des souches (appartenant par exemple aux genres *Salmonella* et *Shigella*) pour lesquelles les CMI sont plus élevées (64 mg/L).

D'autres auteurs [37, 38, 39, 40, 41] ont montré que l'activité d'un autre isothiocyanate à chaîne aliphatique, l'allylisothiocyanate, était plus importante sur les bactéries à Gram négatif. Ces auteurs[37] ont également observé l'existence de souches de moindre sensibilité, en particulier au sein du genre *Salmonella*. Il est cependant difficile de comparer ces résultats aux nôtres en raison de différences à la fois méthodologiques (vaporisation des antibiotiques) et de mode d'expression des résultats (en ppm ou en µL d'isothiocyanate dans l'atmosphère) dues à une approche différente (utilisation des isothiocyanates comme conservateurs alimentaires).

Lorsque nous avons évalué l'activité bactériostatique du sulforaphane sur les bactéries à Gram négatif, nous avons obtenu des valeurs de CMI plus basses pour les bactéries appartenant au genre *Campylobacter*. Ces résultats sont à rapprocher des travaux de Fahey *et coll.* [6] qui ont montré que le sulforaphane possède une activité bactériostatique et bactéricide vis-à-vis de *H. pylori*, bactérie également microaérophile. En revanche, les CMI du sulforaphane obtenues pour les deux souches d'*A. butzleri* testées dans notre travail étaient de 64 mg/L. *A. butzleri,* espèce bactérienne appartenant à la famille des *Campylobacteraceae*, se développe en microaérophilie mais peut être aérotolérante. Le fait que les CMI du sulforaphane soient élevées pour cette espèce suggère que la microaérophilie pourrait jouer un rôle dans l'activité antibactérienne du sulforaphane et des autres isothiocyanates. Ceci reste cependant à être confirmé sur un plus grand nombre de souches d'*Arcobacter* spp.. Parmi tous les isothiocyanates testés, nous avons observé, à l'instar de ce qui a également été montré pour *H. pylori* [86], que le sulforaphane possédait l'activité bactériostatique la plus importante vis-à-vis de *Campylobacter* spp..

Nos résultats suggèrent que le spectre antibactérien du sulforaphane est étroit et se limite aux bactéries à Gram négatif notamment celles se développant en atmosphère microaérophile. L'absence d'activité significative des isothiocyanates sur les espèces anaérobies testées suggère que l'ingestion de ces molécules ne devrait pas entraîner des modifications importantes des flores commensales du tractus gastro-intestinal, composées en majorité de bactéries anaérobies. L'activité antibactérienne des isothiocyanates vis-à-vis des espèces bactériennes testées (staphylocoques, streptocoques oraux ...) appartenant aux flores extra digestives est limitée, ce qui suggère qu'en cas de diffusion systémique des isothiocyanates et du sulforaphane en particulier, ces flores ne devraient pas non plus être affectées. Cependant nous n'avons pas testé toutes les espèces bactériennes appartenant à ces flores et des travaux ultérieurs devront être entrepris afin de connaître l'impact des isothiocyanates sur ces écosystèmes.

Notre étude a montré que les CMI du sulforaphane variaient selon les espèces de *Campylobacter* étudiées et que la différence d'activité antibactérienne était surtout marquée entre *C. jejuni* (CMI_{50} = 8 mg/L, n = 26) et *C. fetus* (CMI_{50} = 32 mg/L, n = 7). Cette différence reste à être confirmée sur un nombre plus élevé de souches. Par ailleurs, nous avons observé que l'activité inhibitrice du sulforaphane sur *Campylobacter* spp. n'était pas influencée par la sensibilité (ou la résistance) de ces bactéries à l'érythromycine et/ou à la ciprofloxacine. Ces constatations concordent avec les travaux de Fahey *et coll.* [6] qui ont montré que l'activité du sulforaphane vis-à-vis de *H. pylori* n'est pas influencée par l'existence d'une résistance à la clarithromycine et/ou au métronidazole ce qui suggère que le mécanisme d'action du sulforaphane est différent de celui des macrolides, des fluoroquinolones et des imidazolés. Par ailleurs, le sulforaphane pourrait présenter un intérêt thérapeutique chez l'homme, en

particulier en cas d'infection par des souches de *Campylobacter* spp. résistantes aux macrolides et/ou aux fluoroquinolones. En effet, la résistance à l'érythromycine ou à la ciprofloxacine est observée chez respectivement 4% et 30% des souches de *Campylobacter* spp. isolées chez l'homme en France [54]. La résistance aux fluoroquinolones y est en constante progression depuis 15 ans alors que la résistance aux macrolides est relativement stable [54]. Dans d'autres régions du monde, en particulier dans certains pays d'Asie du Sud-est et en Espagne, le taux de résistance aux macrolides est cependant plus élevé et avoisine 50 % [63]. Il a été montré que l'émergence de la résistance à ces deux familles d'antibiotiques était favorisée par l'utilisation intensive de macrolides (tylosine) dans l'alimentation des animaux et par l'administration fréquente de fluoroquinolones (enrofloxacine) en médecine vétérinaire [59, 63, 64]. Ceci a notamment induit l'apparition de souches résistantes à la fois aux macrolides et aux fluoroquinolones chez l'homme [51, 52].

Un autre intérêt de l'utilisation potentielle du sulforaphane chez l'homme en cas d'infection à *Campylobacter* spp. repose sur la pénétration intracellulaire importante de cette molécule [69, 70, 71, 72]. Il a en effet été montré, du moins *in vitro*, que de fortes concentrations intracellulaires du sulforaphane pouvaient être obtenues [69, 70, 71, 72]. Ceci a été observé dans différentes lignées cellulaires et en particulier, pour ce qui concerne le système digestif, dans des hépatocytes [71]. Par ailleurs, *Campylobacter jejuni* est considéré comme une bactérie potentiellement entéro-invasive [57]. En effet, après avoir traversé le mucus et adhéré aux entérocytes, cette bactérie pénètre à l'intérieur des entérocytes et peut de ce fait échapper à la défense immunitaire et/ou à l'action des antibiotiques à faible diffusion intracellulaire[57]. Ainsi, il reste à démontrer l'activité du sulforaphane sur *Campylobacter* spp. en situation intracellulaire.

L'intérêt potentiel de l'administration du sulforaphane par voie orale reste cependant subordonné aux concentrations atteignables au niveau du site de l'infection. La pharmacocinétique des isothiocyanates chez l'homme est cependant encore mal connue, ceci étant notamment dû à l'impossibilité de différencier par le dosage les isothiocyanates de leurs métabolites [10, 12]. Il a été montré qu'une heure après l'ingestion de 160 µmol (28,5 mg) de sulforaphane, les concentrations sériques de ce composé et de son métabolite (dithiocarbamate) variaient de 0,943 à 2,27 µmol/L [12]. Les pharmacocinétiques sérique et tissulaire spécifiques de chacune de ces molécules ne sont cependant pas connues à ce jour et l'activité antibactérienne des métabolites n'a jamais été étudiée. Ceci ne permet donc pas d'extrapoler nos résultats à l'homme. Il reste donc à démontrer que l'ingestion de brocoli ou de sulforaphane purifié permette d'obtenir des concentrations intestinales suffisamment élevées pour éradiquer *Campylobacter* spp. : ceci pourrait être réalisé, dans un premier temps chez l'animal [53,85], puis chez l'homme. C'est en effet cette démarche qui a permis d'affirmer l'intérêt du sulforaphane pour le traitement d'éradication de *H. pylori* [73, 74].

VIII. Bibliographie

1. A case-control study of pancreatic cancer and cigarettes, alcohol, coffee and diet. Olsen GW, Mandel JS, Gibson RW, Wattenberg LW, Schuman LM. *Am J Public Health.* 1989 Aug;79(8):1016-9.

2. Vegetable consumption and lung cancer risk: a population-based case-control study in Hawaii. Le Marchand L, Yoshizawa CN, Kolonel LN, Hankin JH, Goodman MT. *J Natl Cancer Inst.* 1989 Aug 2;81(15):1158-64.

3. A population-based case-control study of colorectal cancer in Majorca. I. Dietary factors. Benito E, Obrador A, Stiggelbout A, Bosch FX, Mulet M, Munoz N, Kaldor. *J. Int J Cancer.* 1990 Jan 15;45(1):69-76.

4. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. Cohen JH, Kristal AR, Stanford JL. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Jan 5;92(1):61-8.

5. Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. Steinkellner H, Rabot S, Freywald C, Nobis E, Scharf G, Chabicovsky M, Knasmuller S, Kassie F. *Mutat Res.* 2001 Sep 1; 480-481:285-297.

6. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[*a*]pyrene-induced stomach tumors. Fahey JW, Haristoy X, Dolan PM, Kensler TW, Scholtus I, Stephenson KK, Talalay P, Lozniewski A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 May 28;99(11):7610-5.

7. Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. Talalay P, Fahey JW. *J Nutr.* 2001 Nov;131(11 Suppl):3027-3033.

8. Conversion of glucosinolates to isothiocyanates in humans after ingestion of cooked watercress. Getahun SM, Chung FL. *Cancer Epidemiol Biomarkers* Prev. 1999 May;8(5):447-51.

9. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. *Phytochemistry.* 2001 Jan;56(1):5-51.

10. Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans. Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P. *Cancer Epidemiol Biomarkers* Prev. 2001 May;10(5):501-8.

11. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. *Proc Natl Acad Sci* U S A. 1997 Sep 16;94(19):10367-72.

12. Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans.Ye L, Dinkova-Kostova AT, Wade KL, Zhang Y, Shapiro TA, Talalay P. *Clinica Chimica Acta,* Volume 316, Issues 1-2, February 2002, Pages 43-53 Erratum in: *Clin Chim Acta* 2002 Jul;321(1-2):127-9.

13. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Mar 15;89(6):2399-403.

14. Powerful and prolonged protection of human retinal pigment epithelial cells, keratinocytes, and mouse leukemia cells against oxidative damage: the indirect antioxidant effects of sulforaphane. Gao X, Dinkova-Kostova AT, Talalay P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Dec 18;98(26):15221-6.

15. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. Gamet-Payrastre L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S, Gasc N, Tulliez J, Terce F. *Cancer Res.* 2000 Mar 1;60(5):1426-33.

16. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA, van den Brandt PA, van Poppel G. *Chem Biol Interact.* 1997 Feb 28;103(2):79-129.

17. Sulforaphane and its metabolite mediate growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. Chiao JW, Chung FL, Kancherla R, Ahmed T, Mittelman A, Conaway CC. *Int J Oncol.* 2002 Mar;20(3):631-6.

18. Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. Brooks JD, Paton VG, Vidanes G. *Cancer Epidemiol Biomarkers* Prev. 2001 Sep;10(9):949-54.

19. Chemoprevention of cancer by isothiocyanates, modifiers of carcinogen metabolism. Hecht SS. *J Nutr.* 1999 Mar;129(3):768-774.

20. The effect of indole-3-carbinol and sulforaphane on a prostate cancer cell line. Frydoonfar HR, McGrath DR, Spigelman AD. *ANZ J Surg.* 2003 Mar;73(3):154-6.

21. Plant foods, antioxidants, and prostate cancer risk: findings from case control studies in Canada. Jain MG, Hislop GT, Howe GR, Ghadirian P. *Nutr Cancer.* 1999;34(2):173-84.

22. Cruciferous vegetables in relation to renal cell carcinoma. Yuan JM, Gago-Dominguez M, Castelao JE, Hankin JH, Ross RK, Yu MC. *Int J Cancer.* 1998 Jul 17;77(2):211-6.

23. Fruit and vegetable intake of bladder cancer in a male prospective cohort. Michaud DS, Spiegelman D, Clinton SK, Rimm EB, Willett WC, Giovannucci EL. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Apr 7;91(7):605-13.

24. Diet in the epidemiology of cancer of the colon and rectum. Graham S, Dayal H, Swanson M, Mittelman A, Wilkinson G. *J Natl Cancer Inst.* 1978 Sep;61(3):709-14.

25. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. *Int J Cancer.* 1999 Sep 24;83(1):18-29.

26. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. *Int J Cancer.* 1999 Mar 15;80(6):827-41.

27. Vegetable and fruit intake and the risk of lung cancer in women in Barcelona, Spain. Agudo A, Esteve MG, Pallares C, Martinez-Ballarin I, Fabregat X, Malats N, Machengs I, Badia A, Gonzalez CA. *Eur J Cancer.* 1997 Jul;33(8):1256-61.

28. Sulforaphane induces caspase mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo. Singh AV, Xiao D, Lew KL, Dhir R, Singh SV. *Carcinogenesis.* 2003 Sep 26.

29. Sulforaphane and quercetin modulate PhIP-DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes. Bacon JR, Williamson G, Garner RC, Lappin G, Langouet S, Bao Y. *Carcinogenesis.* 2003 Aug 29.

30. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. Zhang Y, Talalay P. *Cancer Res.* 1994 Apr 1;54(7 Suppl):1976s-1981s.

31. Isothiocyanates inhibit cell cycle progression of Hela Cells at Gé/M phase. Hasegawa T, Nishino H, Iwashima A. *Anticancer Drugs.* 1993 Apr;4(2):273-9.

32. Chemopreventive isothiocyanates induce apoptosis and capsase-3-like activity. Yu R, Mandlekar S, Harvey KJ, Ucker DS, Kong AN. *Cancer Res.* 1998 Feb 1;58(3):402-8.

33. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. Taningher M, Malacarne D, Izzotti A, Ugolini D, Parodi S. *Mutat Res.* 1999 May;436(3):227-61.

34. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. *Cancer Res.* 2002 Sep 15;62(18):5196-203.

35. A sulforaphane analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. Morimitsu Y, Nakagawa Y, Hayashi K, Fujii H, Kumagai T, Nakamura Y, Osawa T, Horio F, Itoh K, Iida K, Yamamoto M, Uchida K. *J Biol Chem.* 2002 Feb 1;277(5):3456-63. Epub 2001 Nov 12.

36. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 3;99(18):11908-13. Epub 2002 Aug 22.

37. Preliminary Examination of Allyl Isothiocyanate Vapor for Food Preservation. Isshiki K, Tokuoka K, Mori R and Chiba S. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992, 56 (9), 1476-1477.

38. Bactericidal activity of isothiocyanate against pathogens on fresh produce. Lin C-M, Kim J, Du W-X, Wei C-I. *J Food Prot.* 2000 Jan;63 (1):25-30.

39. Efficacy of allyl isothiocyanate in killing enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. Park CM, Taormina PJ, Beuchat LR. *Int J Food Microbiol.* 2000 May 25;56(1):13-20.

40. Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. Lin CM, Preston JF 3rd, Wei CI. *J Food Prot.* 2000 Jun;63(6):727-734.

41. Antimicrobial Properties of Isothiocyanates in Food Preservation. P.J Delaquis and G.Mazza. *Food Technology* 1995 Nov, 73-83.

42. *In vivo* activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*. Lazzeri L, Tacconi R, PalmieriS. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41:825-829.

43. Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (Globodera rostochiensis Cv. Woll). Buskov S, Serra B, Rosa E, Sorensen H, Sorensen JC. *J Agric Food Chem.* 2002 Feb 13;50(4):690-5.

44. Insecticidal toxicity of glucosinolate-containing extracts from crambe seeds. Tsao, R, Reuber, M, Johnson, L, & Coats, JR. *J. Agric. Entomol.* 1996, 13:109-120.

45. Glucosinolate breakdown products as insect fumigants and their effect on carbon dioxide emission of insects. Tsao R, Peterson CJ, Coats JR. *BMC Ecol.* 2002 Mar 22;2(1):5

46. Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). Kassie F, Knasmuller S. *Chem Biol Interact.* 2000 Jul3;127(2):163-80.

47. Genotoxic effects of crude juices from *Brassica* vegetables and juices and extracts from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells. Kassie F, Parzefall W, Musk S, Johnson I, Lamprecht G, Sontag G, Knasmuller S. *Chem Biol Interact.* 1996 Sep 27;102(1):1-16.

48. Cytotoxic and clastogenic effects of benzyl isothiocyanate towards cultured mammalian cells. Musk SR, Astley SB, Edwards SM, Stephenson P, Hubert RB, Johnson IT. *Food Chem Toxicol.* 1995 Jan;33(1):31-7.

49. Genotoxic effects of methyl isothiocyanate. Kassie F, Laky B, Nobis E, Kundi M, Knasmuller S. *Mutat Res.* 2001 Jan 25;490(1):1.

50. Induction of cytochrome P450, generation of oxidative stress and in vitro cell-transforming and DNA-damaging activities by glucoraphanin, the bioprecursor of the chemopreventive agent sulforaphane found in brocoli. Paolini M, Perroco P, Canistro D, Valgimigli L, Pedulli GF, Iori R, Della Croce C, Cantelli-Forti G, Legator MS, Abdel-Rahman SZ. *Carcinogenesis.* 2003 Sep 26.

51. Emergence of multidrug resistance in *Campylobacter jejuni* isolates from three patients infected with human immunodeficiency virus. Tee W, Mijch A, Wright E, Yung A. *Clin Infect Dis.* 1995 Sep;21(3):634-8.

52. Trends in antibiotic resistance among diarrheal pathogens isolated in Thailand over 15 years. Hoge CW, Gambel JM, Srijan A, Pitarangsi C, Echeverria P. *Clin Infect Dis.* 1998 Feb;26(2):341-5.

53. *Campylobacter*. Mégraud F. In : Feney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C, Eds. Précis de Bactériologie Clinique. ESKA. Paris, 2000 : 1369-1377.

54. Les infections à *Campylobacter* en France (1986 – 1997). Mégraud F. Bulletin épidémiologique annuel 1998;2:83-4.

55. Les modes de transmission des campylobactérioses humaines. Dromigny E. *Méd Mal Infect* 1989 ; Hors série Les Campylobacters et leur pathologie. 35-42.

56. Pathologie intestinale à *Campylobacter*. P.Begue, B.Broussin, I.Carros et H.Vu Thien. *Méd Mal Infect* 1989 ; Hors série Les Campylobacters et leur pathologie. 48-54.

57. Interactions of *Campylobacter* with eukaryotic cells: gut luminal colonization and mucosal invasion mechanisms. Lan Hu and Dennis J.Kopecko. In : Irving Nachamkin, Martin J.Blaser, Ed : *Campylobacter* 2nd Edition. ASM. Washington, 2000, 191-215.

58. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. Martin B. Skirrow and Martin J. Blaser. In : Irving Nachamkin, Martin J.Blaser, Ed : *Campylobacter* 2nd Edition. ASM. Washington, 2000, 69-88.

59. Antimicrobial resistance in animals and relevance to human infections. Kirk E. Smith, Jeffrey B. Bender, and Michael T. Osterholm. In : Irving Nachamkin, Martin J.Blaser, Ed : *Campylobacter* 2nd Edition. ASM. Washington, 2000, 483-495.

60. *Campylobacter jejuni* infection and the association with Guillain-Barré syndrome. Irving Nachamkin, Ban Mishu Allos, and Tony W. Ho. In : Irving Nachamkin, Martin J.Blaser, Ed : *Campylobacter* 2nd Edition. ASM. Washington, 2000, 155-175.

61. Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. Aarestrup FM, Nielsen EM, Madsen M, Engberg J. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Oct;41(10):2244-2250.

62. Antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human and animal sources. Aquino MH, Filgueiras AL, Ferreira MC, Oliveira SS, Bastos MC, Tibana A. *Lett Appl Microbiol.* 2002;34(2):149-53.

63. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, Gerner-Smidt P, Nachamkin I. *Emerg Infect Dis.* 2001 Jan-Feb;7(1):24-34.

64. *Campylobacter* spp in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. Padungton P, Kaneene JB. *J Vet Med Sci.* 2003 Feb;65(2):161-170.

65. Phylogenetic evidence for the transfer of *Eubacterium lentum* to the genus *Eggerthella* as *Eggerthella lenta* gen. nov., comb. nov. Kageyama A, Benno Y, Nakase T. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Oct;49 Pt 4:1725-32.

66. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999) *Performance Standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility Test for bacteria isolated from Animals; Approved Standard* (National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA).

67. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000) *Approved Standard M7–A5: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* (National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA), 5th Ed.

68. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000) *Approved Standard M11–A5: Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria* (National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA), 5th Ed.

69. High cellular accumulation of sulphoraphane, a dietary anticarcinogen, is followed by rapid transporter-mediated export as a glutathione conjugate. Zhang Y, Callaway EC. *Biochem J.* 2002 May 15;364(Pt 1):301-7.

70. Molecular mechanism of rapid cellular accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates. Zhang Y. *Carcinogenesis.* 2001 Mar;22(3):425-31.

71. Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. Zhang Y. *Carcinogenesis.* 2000 Jun;21(6):1175-82.

72. Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. Ye L, Zhang Y. *Carcinogenesis.* 2001 Dec;22(12):1987-92.

73. Efficacy of sulforaphane in eradicating *Helicobacter pylori* in human gastric xenografts implanted in nude mice. Haristoy X, Angioi-Duprez K, Duprez A, Lozniewski A. *Antimicrob Agents Chemotherap.* 2003, 47 (in press)

74. Oral broccoli sprouts eradicate Helicobacter pylori infection. Mark V. Galan, M.D., Arfana A., Kishan, M.D., Ann L.Silverman, M.D. *Am J Gastroenterol* 2003 Sep., 98(9): supplement 1, 57.

75. Urinary isothiocyanate levels, brassica, and human breast cancer. Fowke JH, Chung FL, Jin F, Qi D, Cai Q, Conaway C, Cheng JR, Shu XO, Gao YT, Zheng W. *Cancer Res.* 2003 Jul 15;63(14):3980-6.

76. Diet and breast cancer. Bradlow HL, Sepkovic DW.*Ann N Y Acad Sci.* 2002 Jun;963:247-67.

77. Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer risk in the Singapore Chinese Health Study. Seow A, Yuan JM, Sun CL, Van Den Berg D, Lee HP, Yu MC. *Carcinogenesis. 2002* Dec;23(12):2055-61.

78. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in Fischer rats by sulforaphane and phenethyl isothiocyanate. Chung FL, Conaway CC, Rao CV, Reddy BS. *Carcinogenesis.* 2000 Dec;21(12):2287-91.

79. Effects of mustard sprouts and allylisothiocyanate on benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human-derived cells: a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay. Uhl M, Laky B, Lhoste E, Kassie F, Kundi M, Knasmuller S. *Teratog Carcinog Mutagen.* 2003;Suppl 1:273-82.

80. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. H.J. Prochaska, P. Talalay. *Cancer Res.* 48 (1988) 4776–4782.

81. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of species. Irving Nachamkin, Jorgen Engberg, and Franck Moller Aarestrup. In : Irving Nachamkin, Martin J.Blaser, Ed : *Campylobacter* 2nd Edition. ASM. Washington, 2000, 45-66.

82. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. C.R. Friedmann, J. Neimann, H.C. Wegener, and R.V. Tauxe. In : Irving Nachamkin, Martin J.Blaser, Ed : *Campylobacter* 2nd Edition. ASM. Washington, 2000, 121-138.

83. VIDAL. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. (AFFSAPS). Saint Denis, 2003.

84. Separation and purification of glucosinolates from crude plant homogenates by high-speed counter-current chromatography. Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Chou FE. *J Chromatogr A.* 2003 May 9;996(1-2):85-93.

85. Animal models of *Campylobacter* infection. Vincent B. Young, David B. Schauer, and James G. Fox. In : Irving Nachamkin, Martin J.Blaser, Ed : *Campylobacter* 2nd Edition. ASM. Washington, 2000, 287-301.

86. Haristoy X, Lozniewski A. (Données non publiées)

87. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Communiqué 2003.

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

N° d'identification PH Nancy 03 n° 208

Activité antibactérienne du sulforaphane et d'autres isothiocyanates

Thèse soutenue le 05 novembre 2003

Par Ludovic WOELFFEL

RESUME

De nombreux travaux réalisés au cours de ces 20 dernières années ont permis d'établir que les isothiocyanates et en particulier le sulforaphane étaient des molécules dotées de propriétés anticarcinogènes. Il a de plus été récemment démontré que le sulforaphane était bactériostatique et bactéricide sur *H. pylori*. En l'absence de données exploitables concernant leur activité antibactérienne sur d'autres espèces, il nous a paru pertinent de déterminer si des bactéries autres que *H. pylori* étaient inhibées par ces molécules.

Notre étude s'est donc déroulée en 2 temps : nous avons tout d'abord évalué l'activité *in vitro* du sulforaphane sur des espèces bactériennes commensales et/ou pathogènes de l'homme. Ce travail de criblage a permis de détecter une activité bactériostatique du sulforaphane à des concentrations relativement faibles sur *Campylobacter* spp.. La deuxième partie de notre travail a concerné l'étude de l'activité sur *Campylobacter* spp., d'autres isothiocyanates (notamment ceux qui s'étaient montrés actifs sur *H. pylori*) de l'érythromycine et de la ciprofloxacine (antibiotiques recommandés dans le traitement des entérites à *Campylobacter* spp.).

Nous avons montré que le sulforaphane présentait une activité bactériostatique plus marquée sur les bactéries à Gram négatif et notamment celles se développant dans une atmosphère microaérophile. Parmi tous les isothiocyanates testés vis-à-vis de *Campylobacter* spp., le sulforaphane est l'isothiocyanate qui a montré la meilleure activité bactériostatique. Cette activité semble varier selon l'espèce de *Campylobacter* considérée. Enfin, nous avons observé que l'activité inhibitrice du sulforaphane sur les *Campylobacter* n'était pas influencée par la sensibilité (ou la résistance) de ces bactéries à l'érythromycine et/ou à la ciprofloxacine.

In fine, l'activité bactériostatique du sulforaphane vis-à-vis de *Campylobacter* observée *in vitro* devra être confirmée *in vivo* avant de proposer l'utilisation de cette molécule comme complément thérapeutique lors des entérites à *Campylobacter* spp..

MOTS CLES : Sulforaphane, Isothiocyanates, *Campylobacter* spp., Concentrations minimales inhibitrices.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Pr A. LOZNIEWSKI	Laboratoire de Bactériologie Hôpital Central (CHRU) 54035 NANCY	Expérimentale ☒ Bibliographique ☐ Thème 5

Thèmes
1- Sciences fondamentales
2- Hygiène/Environnement
3- Médicament
4- Alimentation – Nutrition
5- Biologie
6- Pratique professionnelle