

Analyse des facteurs antinutritionnels du colza : Glucosinolates et esters de choline

N. CLOSSAIS-BESNARD et A. BOUCHEREAU

Laboratoire de Biologie végétale, Université de Rennes I,
Campus de Beaulieu, 35042-Rennes Cédex, France

Le colza est cultivé pour sa partie végétative et pour ses graines dont l'extraction fournit de l'huile et des tourteaux utilisables en nutrition animale. Cependant, la place de ces tourteaux dans la ration reste d'importance limitée en raison de la présence de facteurs antinutritionnels parmi lesquels les glucosinolates et les composés phénoliques ont tout particulièrement retenu notre attention.

Les produits de dégradation des glucosinolates libérés par l'action de la myrosinase lors du broyage des graines ou de l'ingestion provoquent non seulement le refus de l'aliment par les bovins, mais aussi des pathologies du foie et de la thyroïde chez les monogastriques. La Communauté économique européenne encourage la production de variétés de colza dites 00 sans acide érucique et à teneur réduite en glucosinolates: la norme est fixée à 20 micromoles.g-1 de graines contenant 7% (pour la saison 1987-1988, 35 micromoles.g-1 de graines ont cependant été tolérées.)

Parmi les composés phénoliques accumulés dans les graines, la sinapine (ester de choline de l'acide sinapique) et ses homologues sont particulièrement abondants et ceux-ci se retrouvent dans les tourteaux. Leur ingestion par les animaux peut entraîner, entre autres, une imprégnation des productions par des odeurs désagréables de triméthylamine. Ce fait, bien connu dans les productions avicoles (Fenwick, 1979), a déterminé de nouvelles recherches pour l'obtention de colza à faibles teneurs en esters de choline phénoliques et d'une manière plus générale à faibles teneurs en composés aromatiques.

Dans ce contexte, de nombreuses méthodes ont été mises en oeuvre pour l'approche qualitative et quantitative de ces composés. Nous présenterons dans cette communication les techniques les plus utilisées, celles expérimentées dans notre laboratoire et nous essaierons d'en dégager l'intérêt et les limites.

I - ETUDES DES GLUCOSINOLATES

Pour l'étude des glucosinolates, on distingue deux groupes de méthodes selon qu'elles quantifient les glucosinolates globalement ou individuellement. Parmi les premières, on retiendra:

- Les méthodes colorimétriques de dosage direct par formation d'un complexe avec le palladium ou de dosage indirect par quantification du glucose libéré après hydrolyse chimique ou enzymatique.

- Les méthodes enzymatiques de dosage du glucose après hydrolyse.

- Les méthodes physiques que sont la réfractométrie dans le proche infra-rouge et la fluorescence aux rayons-X.

Parmi les méthodes de quantification individuelle, nous citerons:

- La chromatographie gazeuse avec programmation de température des glucosinolates désulfatés. Cette technique peut être associée à la spectrométrie de masse.

- La chromatographie liquide à haute performance utilisée soit pour les glucosinolates désulfatés soit pour les glucosinolates intacts. La chromatographie des désulfoglucosinolates peut également être couplée à la spectrométrie de masse.

Nous avons choisi de développer comme méthode rapide pour caractériser de nombreux lots de graines la fluorescence aux rayons-X. En effet, diverses études réalisées sur la réfractométrie dans le proche infra-rouge (Renard et al., 1987) conduisent à nourrir un certain scepticisme quant à l'intérêt réel de cette technique pour la quantification des glucosinolates. Nous utilisons la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) pour séparer les glucosinolates intacts. Nous nous affranchissons ainsi de l'étape de désulfatation dont la maîtrise est délicate. La chromatographie gazeuse est fiable pour les composés aliphatiques, mais les glucosinolates indoliques, instables à haute température, sont très mal pris en compte par cette méthode. Nous avons également déterminé l'intérêt d'un dosage enzymatique des glucosinolates, dosage qui présente l'avantage de ne pas nécessiter d'équipement coûteux.

La technique CLHP que nous utilisons est une modification de celle de Bjerg et Sorensen (1987). En ce qui concerne l'extraction de la matière végétale, cinq extractions successives (trois avec du méthanol aqueux 70% et deux avec de l'eau) se sont avérées nécessaires pour l'obtention complète de la fraction

glucosinolates. Les extraits sont purifiés sur Ecteola Cellulose et filtrés avant l'injection dans le chromatographe. Les chromatogrammes obtenus par CLPH permettent de distinguer quantitativement mais également qualitativement les variétés de colza-0 et 00. Il est évident que la sélection pour l'obtention des colzas-00 a eu pour conséquence la diminution spectaculaire de la teneur en glucosinolates aliphatiques. Cependant, il reste une fraction encore relativement importante au plan quantitatif et constituée de glucosinolates indoliques. Pour l'approche qualitative et quantitative de cette fraction, la CLPH se révèle un moyen d'investigation performant, non seulement pour l'étude des graines, mais aussi pour des investigations sur le contenu en glucosinolates des organes végétatifs.

Pour la fluorescence aux rayons-X, nous avons adopté le protocole de Schnug et Haneklaus (1987). Les graines broyées sont compactées en présence d'une solution liante et la pastille formée est placée dans le spectrophotomètre directement en contact avec les rayons-X. Cette méthode quantifie non les glucosinolates, mais le soufre total de l'échantillon. Elle nécessite donc un étalonnage soigné. Deux méthodes ont été testées pour l'étalonnage, celle utilisant le dosage enzymatique avec mise en oeuvre successive de la myrosinase, l'hexokinase et la glucose 6P-déshydrogénase et la méthode de CLPH. Dans les deux cas, les corrélations obtenues sont tout à fait satisfaisantes. Cependant, l'obtention de valeurs légèrement supérieures lors de la quantification par CLPH nous a conduits à préférer cette dernière méthode pour l'étalonnage.

II - ETUDE DE LA SINAPINE ET DE SES HOMOLOGUES

Afin de réaliser une approche de la variabilité du contenu en sinapine et en autres esters phénoliques de choline dans les graines de Brassicacées d'intérêt agronomique, il nous a fallu rechercher les méthodologies les plus adaptées pour leur analyse qualitative et leur quantification.

Il est à noter qu'aucune étude n'a permis, jusqu'à maintenant, d'obtenir de la sinapine à l'état pur et que les résultats disponibles dans la littérature ont été obtenus par référence à une "préparation de sinapine" isolée de graines de Moutarde blanche selon Clandinin (1960), préparation de pureté insuffisante.

Dans notre laboratoire, après une extraction des graines broyées au méthanol bouillant, les esters de choline sont rapidement mis en évidence à la suite d'une électrophorèse à haute tension sur papier, en conditions acides (pH 2,0) et révélation par leur fluorescence lors d'une exposition aux ultraviolets et leur réaction positive au réactif de Dragendorff. On peut, de la même façon, détecter les produits d'hydrolyse des esters de choline et plus particulièrement la choline. Cette technique peut être associée aux méthodes chromatographiques classiques (chromatographie sur papier, chromatographie sur couche mince).

Pour une analyse plus fine, les extraits sont fractionnés sur résine échangeuse d'ions avant d'être soumis à une CLHP. Il s'agit plus précisément d'une chromatographie en phase inverse et appariement d'ions.

L'identification des homologues de la sinapine a nécessité l'utilisation de techniques spectroscopiques parmi lesquelles la spectroscopie d'absorption dans l'ultra-violet nous a fourni des renseignements précieux. De plus, avec la collaboration des chimistes organiciens, les techniques de RMN et de spectrométrie de masse sont utilisées. Les échantillons étudiés sont isolés par électrophorèse à haute tension ou chromatographie liquide haute performance.

Sur ces bases, une étude de la variabilité du contenu en esters de choline chez les Brassicacées ainsi qu'une approche du métabolisme de ces composés à divers stades du développement ont été entreprises.

Du fait des difficultés d'obtention des produits de référence à l'état pur, il nous a fallu dans un premier temps établir une courbe d'étalonnage de la sinapine aussi précise que possible. Celle-ci a été réalisée à partir d'une solution mère préparée à partir de sinapine synthétisée par des chimistes organiciens. Sur ces bases, le contenu en esters de choline totaux des graines de nombreux génotypes de colza (printemps, hiver, **, 0*,00) et celui d'autres Brassicacées du triangle de U (1935) a été appréhendé par spectrométrie d'absorption dans l'UV. Parallèlement, un dosage de la sinapine et de ses homologues par CLHP est en cours de mise au point au laboratoire.

En conclusion, on peut souligner que les deux familles de composés aromatiques qui ont retenu notre attention posent un certain nombre de problèmes convergents au niveau analytique. Nous pensons que dans les deux cas, la CLHP peut apporter des informations nouvelles et permettre en retour l'approche du métabolisme de ces composés. Au plan de la quantification de ces composés, problème essentiel dans la perspective d'une mise en conformité avec les normes communautaires, l'étape limitante qu'il reste à franchir est de toute évidence celle de la synthèse organique de composés de référence. L'étude simultanée des deux familles de composés (glucosinolates et esters phénoliques de choline) pourrait nous conduire à appréhender leur interaction éventuelle dans l'expression de la toxicité des tourteaux de colza.

Références

- BJERG B. > SORENSEN H., 1987. - World Crops Prod., Utiliz., Deser., 13, 125-150.
CLANDININ D.R., 1960. - Poultry Sci. 40, 484-487.
FENWICK G.R., 1979. - J. Sci. Food. Agric. 30, 661-663.
RENARD M., BERNARD C., DESCHAMPS M., FURTOSS V., LILA M., QUINSAC A., REGNIER J.M. > RIBAILLIER D., 1987. - World Crops Prod., Utiliz., Deser., 13, 173-176
SCHNUG E. > HANEKLAUS S., 1987. - Fett, Wiss., Technol. 89, 32-36. UN., 1935. - Jap J. Bot. 7, 389-452.