



Study of variations in contents and variability compositions of tocopherols and phytosterols in achenes and sunflower oil (*Helianthus annuus* L.)

Alicia Ayerdi Gotor

► To cite this version:

Alicia Ayerdi Gotor. Study of variations in contents and variability compositions of tocopherols and phytosterols in achenes and sunflower oil (*Helianthus annuus* L.). Amélioration des plantes. Institut National Polytechnique (Toulouse), 2008. Français. NNT : 2008INPT027A . tel-04277440

HAL Id: tel-04277440

<https://hal.science/tel-04277440>

Submitted on 9 Nov 2023

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Institut National Polytechnique de Toulouse*
Discipline ou spécialité : *Sciences des Agroressources*

Présentée et soutenue par *Alicia AYERDI GOTOR*
Le *09 Septembre 2008*

Titre : *Étude des variations des teneurs et de la variabilité des compositions en tocophérols et en phytostérols dans les akènes et l'huile de tournesol (Helianthus annuus L.)*

JURY

Pr. Véronique BELLON-MAUREL, Présidente
Pr. Felicity VEAR, Rapporteur
Pr. André BERVILLÉ, Rapporteur
Dr Anne CALMON
Pr. Jean DAYDÉ
Pr. Zéphirin MOULOINGUI
M. Thierry ANDRÉ, membre invité

Ecole doctorale : *Sciences de la matière*
Unité de recherche : *Laboratoire d'Agrophysiologie de l'E.I. Purpan*
Directeur(s) de Thèse : *Jean DAYDÉ*
Rapporteurs : *Mme le Pr. F.VEAR et M.le Pr. A.BERVILLÉ*

RESUME

Etude des variations des teneurs et de la variabilité des compositions en tocophérols et en phytostérols dans les akènes et l'huile de tournesol (*Helianthus annuus L.*)

La qualité de composition en acides gras et en composés mineurs de l'huile de tournesol permet de répondre aux différentes demandes alimentaire et non alimentaire. L'objectif de ce travail a été d'apporter des éléments de compréhension sur la variation de ces composés mineurs. L'étude montre que les variations des teneurs en tocophérols et en phytostérols dans l'huile de tournesol sont dues au génotype et à un effet environnemental (température). La mise en place d'un plan de croisement North Carolina II a permis d'établir les Aptitudes Générales et Spécifiques à la Combinaison (AGC, ASC) de 7 lignées mâles et de 7 lignées femelles et de leurs hybrides. L'estimation des héritabilités montre que le caractère tocophérol peut être génétiquement amélioré. La spectrométrie proche infrarouge s'avère être un outil pour discriminer des potentiels riches et faibles en tocophérols et en phytostérols dans des akènes broyés de tournesol.

MOTS CLES : Tournesol, Tocophérols, Phytostérols, Héritabilité, Spectrométrie proche infrarouge, Vitamine E

ABSTRACT

Study on the variation of tocopherols and phytosterols content and composition in sunflower (*Helianthus annuus L.*) seeds and oil.

Quality of sunflower seeds and oil in terms of tocopherol and phytosterol profile and content is largely taken into account for food and non food uses. The aim of this work was to evaluate: i) the variability of tocopherols and phytosterols composition in sunflower seeds and oil, ii) the influence of genotype and environment on this variability. Data obtained show that this variability is highly influenced by genotype and temperature. General and Specific Combining Abilities (GCA, SCA) for 7 males and 7 females have been obtained using a mating scheme for North Carolina II. Heritability estimates show that tocopherol content can be improved by breeding programs. Near Infrared Spectrometry assays show that this technique is able to differentiate high and low content of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds.

KEY WORDS : Sunflower, Tocopherols, Phytosterols, Heritability, Near Infrared Spectrometry, Vitamin E

REMERCIEMENTS

Dans cet avant-propos, je souhaite en premier lieu exprimer ma reconnaissance envers les personnes et organismes qui ont participé au bon déroulement et à la valorisation de cette thèse de doctorat. Ces travaux ont été réalisés au laboratoire d'Agrophysiologie de l'École d'Ingénieurs de Purpan, dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) signée avec la société Soltis S.A. Le projet Tophysol est co-financé par six semenciers appartenant à l'Association de semenciers du Sud-Ouest (ASEDIS-SO) : Caussade semences, Maisadour semences, Monsanto Dekalb, RAGT/R2n, Soltis et Syngenta seeds ainsi que par l'interprofession des oléoprotéagineux (ONIDOL), par Cognis France et le Conseil Régional de Midi Pyrénées. Ces travaux ont été co-dirigés par le Docteur Anne Calmon et le Professeur Jean Daydé.

Mes premiers remerciements vont aux membres du jury. J'adresse toute ma gratitude à Madame le Professeur Felicity Vear, directeur de recherche INRA à Clermont Ferrand, Monsieur le Professeur André Bervillé, directeur de recherche INRA à Montpellier, Monsieur le Professeur Zéphirin Mouloungui, directeur de recherche INRA à Toulouse, Madame le Professeur Véronique Bellon-Maurel, directeur du département Ecotechnologie et agrosystèmes au CEMAGREF de Montpellier, et Monsieur Thierry André, sélectionneur tournesol de Soltis ; pour avoir accepté le travail d'analyse et d'évaluation qu'implique ce statut.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Anne Calmon et Jean Daydé, enseignant-chercheurs de l'E.I. Purpan qui ont co-encadré les recherches engagées au cours de cette thèse. Ils m'ont permis de conjuguer la chimie analytique avec l'amélioration végétale et les applications industrielles. Merci à vous deux pour m'avoir acceptée sur ce projet, jugé mon travail, m'avoir encouragée et surtout pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ces années.

Je tiens spécialement à remercier Vassilia Théodorou, directrice du Laboratoire d'AgroPhysiologie de m'avoir accueillie dans son équipe et Monique Berger, qui m'a offert un appui précieux durant ces trois années, merci pour tes conseils éclairés sur les traitements statistiques et la génétique tout autant que sur la démarche scientifique.

Je remercie également Sylvie Centis-Aubay, Valérie Eychenne, Françoise Labalette, Pierre Castellanet, Sébastien Chatre, Olivier Cottet, Antoine Gaillard, Philippe Jouve ; pour leur participation aux comités de thèse, l'intérêt porté à mon travail, et leur précieux conseils scientifiques.

J'ai une pensée toute particulière pour Mireille, Mickaël et Christelle, pour leurs amitiés, leurs appuis et leurs conseils, pour avoir été là tous les jours.

Je remercie aussi les stagiaires qui ont participé à ces travaux : Amandine Abadie, Fabien de Flaujac, Anne Laurés, Sophie Mege, Eric Meunier, Victor Moulin, Karine Pancarte, Carolina Peña, Aude Poiriet, et Virginie Thebaud.

Un grand merci à mes collègues du « LAP » : Abder, Benoît, Claudine, Edwige, Emmanuel, Eric, Fanny, Illa, Jane, Jean-Noël, Jérôme, Julian, Khalid, Luciana, Magalie, Marc, Meijing, Muriel, Nicolas, Stéphanie, Virginie, et tous les autres que j'oublie ; pour tous les bon moments, les gâteaux, et les rires.

Mes amitiés au personnel de l'E.I.Purpan que j'ai côtoyé tous les jours.

Un clin d'œil à Larbi et à la petite.

iGracias !

LISTE DES PUBLICATIONS ET POSTERS générés par ce travail (Septembre 2008)

PUBLICATIONS

AYERDI GOTOR A, CALMON A, BERGER M, LABALETTE F, KLEIN L, 2005. Variability of tocopherols and phytosterols in sunflower hybrids. *NAFAS*, 3(6): 113-115.

AYERDI GOTOR A, BERGER M, LABALETTE F, CENTIS S, DAYDE J, CALMON A., 2006. Variabilité des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule. Partie I – Tocophérols. *Oléagineux Corps gras Lipides (O.C.L.)*. 13(2) : 206-12.

AYERDI GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., DAYDE J., CALMON A., 2007. Variability of minor components in sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil from a multi-local study. In: Current Advances in the Biochemistry and Cell Biology of Plant Lipids. Proceedings of the 17th International Symposium on Plant Lipids. Edts : C. Benning and J. Ohlrogge, 248-252.

AYERDI GOTOR A, FARKAS E, BERGER M, LABALETTE F, CENTIS S, DAYDE J, CALMON A., 2007. Determination of minor components (tocopherols and phytosterols) composition of sunflower seeds by near-infrared spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109: 525-530.

CONGRES

■ Communications avec proceedings.

AYERDI GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., KLEIN L., CALMON A., 2004. Variability of tocopherols and phytosterols in sunflower hybrids. 2ème Congrès de Lipidomique GERLI, 14-17 septembre, Paris (France).

AYERDI GOTOR A., CALMON A., BERGER M., LABALETTE F., KLEIN L., 2004. Genetic and environmental effects on tocopherols content and composition in sunflower hybrids. 2ème Colloque SAS "Symposium Aliment Santé", 21-22 octobre, Toulouse (France).

AYERDI GOTOR A., BERGER M., FARKAS E., LABALETTE F., CENTIS S., CALMON A., 2006. Quantification of sunflower minor components by near infrared spectrometry (NIR). (O & P) 1st Symposium on industrial uses on Sunflower. September 11th-13th, 2006. Lignano Sabbie D'oro - Udine (Italy).

AYERDI GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., DAYDE J., CALMON A., 2006. Variability of minor components in sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil from a three years multi-local study. 17th International Symposium on Plant Lipids. Michigan State University East Lansing (MI, USA). ISPL2006. Benning, C., J. Ohlrogge. PP 248-252..

AYERDI GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., DAYDE J., CALMON A., 2008. Estimation of breeding viability for tocopherols and phytosterols in sunflower seeds. 17th International Sunflower Conference, Cordoba(Spain) JUNTA DE ANDALUCIA vol.2: 555-559.

AYERDI GOTOR A., BERGER M., MOREAU P., GAILLARD A., DAYDE J., CALMON A., 2008. Non destructive determination of fatty acids content in intact sunflower seeds by near-infrared spectrometry. 17th International Sunflower Conference, Cordoba (Spain) JUNTA DE ANDALUCIA vol.2: 757-761.

AYERDI GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., DAYDE J., CALMON A., 2008. Near infrared spectrometry (NIRS) prediction of minor components in sunflower seeds. 17th International Sunflower Conference, Cordoba (Spain) JUNTA DE ANDALUCIA vol.2: 763-769.

■ Communications sans proceeding.

AYERDI GOTOR A., CALMON A., BERGER M., LABALETTE F., KLEIN L., 2004. Genetic and environmental effects on tocopherols content and composition in sunflower hybrids. 16th International Sunflower Conference, August 29-Sept. 2, Fargo (USA).

DAYDE J., BERGER M., CALMON A., THEODOROU V., 2006. Soybean and Sunflower Seed Micronutrients: Content / Composition Variability and Biological Effects. World conference and Exhibition on oilseed and vegetable utilization - AOCs, August 14th-16th, 2006. Istanbul (Turkey).

AYERDI-GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., CALMON A., 2007. Effects of genetic and planting location on the minor components in sunflower seeds. Colloque "Graines 2007", Angers 6-8 Juin (France).

THEBAUD V., AYERDI-GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., CALMON A., 2007. Effect of heat stress on tocopherol contents during sunflower seeds germination. Colloque "Graines 2007", Angers 6-8 Juin (France).

EN COURS

AYERDI GOTOR A, BERGER M, LABALETTE F, CENTIS S, DAYDE J, CALMON A., 2008. Variability and relationships among fatty acids, tocopherols and phytosterols content in sunflower cultivars (*Helianthus annuus* L.) from a three years multi-local study. À soumettre

AYERDI GOTOR A, BERGER M, LABALETTE F, CENTIS S, DAYDE J, CALMON A., 2008. Variabilité des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule. Partie II – Phytostérols. À soumettre *Oléagineux Corps gras Lipides (O.C.L.)*.

AYERDI GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., DAYDE J., CALMON A., 2008, Oleic conversion effect on tocopherols and phytosterols content in sunflower oil. À soumettre

AYERDI GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., DAYDE J., CALMON A., 2008. Breeding potential for tocopherols and phytosterols in sunflower (*Helianthus annuus* L.) À soumettre

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La culture du tournesol (*Helianthus annuus L.*) tient une place importante parmi les cultures oléagineuses : l'Union Européenne est le deuxième producteur mondial de tournesol et la France est la deuxième nation productrice dans l'UE à 27 après la Hongrie. Cependant, dans le secteur des oléagineux, malgré la demande croissante en huiles végétales (palme, soja), la filière du tournesol produisant essentiellement de l'huile s'est fragilisée. La mise en place de l'agenda 2000 ainsi que la concurrence d'autres cultures oléagineuses (colza) a entraîné une baisse des surfaces en tournesol qui est actuellement à son seuil le plus bas. Toutefois, une diversification des utilisations associée à une meilleure valorisation des produits et des co-produits permettrait de maintenir et de développer la culture du tournesol.

Le tournesol présente plusieurs atouts. Tout d'abord, la culture du tournesol s'inscrit dans une politique d'agriculture durable en présentant de nombreuses qualités agronomiques ; c'est une plante rustique avec de faibles exigences en eau et en intrants qui contribue à l'équilibre des rotations et favorise la biodiversité. D'autre part, l'huile de tournesol présente une grande diversité de composition en acides gras et en composés mineurs tels que les tocophérols et les phytostérols. Bien que la production d'huile de tournesol soit principalement destinée à une valorisation alimentaire, son utilisation pour des applications industrielles s'accroît. Des variétés spéciales de tournesol enrichies en différents acides gras telles que les variétés oléiques se développent dans le but de conquérir de nouveaux marchés. Dans le secteur alimentaire, l'huile de tournesol, seule ou combinée à d'autres, permet de répondre à des exigences technologiques (stabilité à la cuisson) et nutritionnelles (effets bénéfiques sur la santé). Dans le secteur non alimentaire, les huiles de variétés à haute teneur oléique sont utilisées pures ou modifiées pour des applications dans les domaines de la lubrification, de la solvatisation ou encore, pour leur teneur en phytostérols ou d'autres acides gras, dans les domaines pharmaceutique et cosmétique. Enfin, les tourteaux résiduels de l'extraction d'huile sont valorisés en tant qu'alimentation pour bétail ou comme biomatériaux.

Ainsi le tournesol est une plante qui peut répondre aux différentes demandes de par sa diversité et la qualité de composition de son huile. Dans ce contexte, les composés mineurs tels que les tocophérols et les phytostérols présentent des effets bénéfiques sur la santé intéressants à la filière. Ces composés mineurs pourraient permettre une valeur ajoutée. A l'heure actuelle, lors du raffinage d'une huile brute, les phytostérols sont extraits et purifiés pour être valorisés. La fraction tocophérolique est quand à elle valorisée dans l'huile raffinée ; cependant, sa teneur est étroitement liée au processus de raffinage avec des pertes allant de 25 à 75%.

Les tocophérols ou Vitamine E sont connus principalement pour leurs propriétés antioxydantes mais des études montrent également qu'ils réduisent les maladies cardiovasculaires et présentent certaines propriétés anti-cancéreuses. Les tocophérols sont abondamment utilisés en cosmétique pour leur action de vasodilatation et leur pouvoir antioxydant. Les phytostérols, outre leur pouvoir hypocholestérolémiant, sont également étudiés pour leur action anticancéreuse, immunomodulatrice et anti-inflammatoire. Les phytostérols sont utilisés en cosmétique pour leur pouvoir anti-dessiccateur. En conséquence, l'akène de tournesol constitue une source intéressante de tocophérols et de phytostérols qui doit être maîtrisée tant au niveau de la production que de la transformation.

Cependant, les teneurs et compositions en tocophérols et en phytostérols dans la graine varient selon les espèces végétales et au sein d'une même espèce selon le génotype. De plus, l'expression du potentiel génétique sera conditionnée par le contexte de la culture à savoir les conditions environnementales (sol, climat), les conduites culturales (date de semis, irrigation,...) puis les conditions de récolte et de stockage.

Le Laboratoire d'Agro-Physiologie de l'EI Purpan a engagé des chercheurs sur les tocophérols et les phytostérols en partenariat avec les acteurs de la filière, sélectionneurs (ASEDIS-SO), interprofession (ONIDOL) et transformateur (Cognis-France) dans un même objectif d'apporter des éléments de compréhension pour déterminer la potentialité de richesse en composés mineurs des variétés de tournesol afin de savoir s'il est envisageable d'incorporer ces caractères dans des programmes de sélection pour améliorer la qualité finale de l'huile. La démarche suivie sera tout d'abord d'appréhender les sources de variations des teneurs et compositions en tocophérols et en phytostérols dans l'akène de tournesol puis d'établir la faisabilité d'une sélection génétique par la caractérisation de l'héritabilité de ces composés mineurs en vue d'augmenter leurs teneurs finales dans les graines.

De plus, le développement ces dernières années d'hybrides riches en acide oléique a impulsé de nombreuses études pour prédire leurs teneurs par spectrométrie proche infrarouge. Cet outil permet des analyses simultanées de plusieurs paramètres de qualité (taux d'humidité, teneur en huile, en protéines, profil d'acides gras) avec une grande rapidité, une faible quantité de produit et des coûts d'analyse réduits. Les analyses de référence des tocophérols par chromatographie liquide haute performance (HPLC) et des phytostérols par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sont longues, coûteuses et relèvent d'un personnel qualifié. Aussi, le second objectif de cette étude est d'évaluer la faisabilité d'une prédiction de ces composés mineurs par spectrométrie proche infrarouge.

Le chapitre I de ce mémoire présentera, tout d'abord le contexte de la production du tournesol et les possibilités de valorisations alimentaires et non alimentaires de la récolte du tournesol. La composition de l'akène, et principalement celle en composés mineurs d'intérêt (tocophérols et phytostérols) ainsi

que leurs caractéristiques biochimiques, leurs propriétés et leurs sources de variabilité seront détaillés. Enfin, les connaissances actuelles sur l'application de la spectrométrie proche infrarouge pour discriminer rapidement des composés chimiques seront exposées.

Le chapitre II sera consacré à la présentation des choix relatifs aux matériels végétaux, aux dispositifs expérimentaux et à celles des méthodes analytiques utilisées. Les traitements statistiques appliqués pour le traitement du plan de croisement, l'estimation des paramètres génétiques et les modèles de calibration par spectrométrie proche infrarouge seront détaillés.

Le chapitre III présentera l'étude des différentes sources de variation des teneurs en tocophérols et en phytostérols en s'appuyant sur plusieurs approches : tout d'abord sur la compréhension du remplissage de l'akène en composés mineurs pour déceler les phases clé de l'accumulation ; puis l'évaluation de l'effet de la conversion oléique de lignées et d'hybrides sur les teneurs et compositions en composés mineurs ; l'effet d'un stress thermique sera estimé par la mise en place d'un test de vieillissement accéléré lors de la maturation de la graine ; enfin la dernière partie portera sur une étude multilocale et pluriannuelle de 4 hybrides commerciaux qui permettra d'appréhender une première approche sur la variabilité des génotypes et l'influence du lieu de culture sur les teneurs en composés mineurs.

Le chapitre IV se focalisera sur le plan de croisement de lignées North Carolina II mis en place à partir de 7 lignées A femelles stériles et 7 lignées B mâles, choisies pour leur teneur en tocophérols et en phytostérols afin d'évaluer les variances génétiques et environnementales, de calculer les aptitudes générales et spécifiques des lignées et d'estimer les héritabilités des composés mineurs. Les résultats permettront de conclure sur l'efficacité d'un programme de sélection de variétés enrichies en tocophérols et en phytostérols.

Le chapitre V portera sur la faisabilité d'une prédiction des teneurs en composés mineurs (tocophérols et phytostérols) par spectrométrie proche infrarouge sur des akènes broyés ou entiers de tournesol. Cette technique, déjà utilisée pour l'analyse en routine des acides gras, est un outil présentant un intérêt certain pour une discrimination rapide des teneurs en composés mineurs de la graine.

In fine dans le cadre d'une discussion générale, les avancées de ce travail seront reprises sur i) les possibilités de sélection des tocophérols et des phytostérols dans l'huile de tournesol, eut égard aux résultats obtenus sur les sources de variations génétique et environnementale et sur l'héritabilité ; ii) la faisabilité d'utiliser la spectrométrie proche infrarouge pour prédire les teneurs en composés mineurs des graines de tournesol. Ainsi l'ensemble de ces travaux préconisent une suite vers le marquage moléculaire de populations en ségrégation afin d'identifier des QTLs responsables des teneurs en tocophérols et en phytostérols chez le tournesol.

CHAPITRE I.

Etat des connaissances.

Chapitre I.

Etat des connaissances

Avant Propos

Le tournesol cultivé, *Helianthus* (du grec Helios pour le soleil et Anthos pour fleur) *annuus*, appartient aux dicotylédones, famille des *Astéracées*. On a longtemps cru que cette espèce, dont les représentants sauvages s'étendent dans toute l'Amérique du Nord, était une des rares espèces dont la culture avait commencé en Amérique du Nord. Des résultats récents montrent qu'en fait la domestication a été réalisée dans la région de Mexico par les Aztèques vers 2600 av. J.C. (Lentz, *et al.*, 2008). Le tournesol a été introduit en Europe à partir du XVI^{ème} siècle mais c'est seulement à la fin du XIX^{ème} siècle qu'il a commencé à être cultivé en Russie sur de grandes surfaces en vue de la production d'huile (Putt, 1997). L'amélioration des plantes, avec la découverte dans les années 1970 de la stérilité mâle cytoplasmique, a permis des progrès importants notamment pour la production d'hybrides favorisant la sélection sur des critères de teneurs en huile et de résistance aux maladies. Aujourd'hui, c'est l'une des cultures oléagineuses les plus importantes dans le monde, avec le coton, le colza, le soja, l'arachide et le palmier. Le tournesol peut même être considéré comme la première plante annuelle cultivée spécifiquement pour son huile. C'est une culture connue pour sa rusticité et ses faibles exigences en intrants comme en eau (Bonjean, 1993).

Dans ce premier chapitre consacré au bilan bibliographique, après avoir resitué la production et les valorisations du tournesol dans leur contexte historique et économique, nous préciserons la physiologie du tournesol qui permet de mettre en exergue la fraction insaponifiable. Puis, nous décrirons les tocophérols et les phytostérols (rôle dans la graine ou l'embryon, variabilité,...) présents dans l'akène de tournesol. Enfin, une approche sur la qualité des semences de tournesol sera décrite au travers de la qualité germinative des akènes et de leur caractérisation par spectrométrie proche infrarouge.

1. Production du tournesol

1.1. Contexte agricole mondial de la culture de tournesol

La culture des oléagineux est essentiellement destinée à la production d'huile et de tourteaux. Depuis 1973, cette production mondiale de graines oléagineuses a été triplée : elle était de 128 millions de tonnes en 1973 contre 392,3 millions de tonnes en 2006 (Figure 1a). Bien que la production mondiale de graines de tournesol a fluctué au cours des dix dernières années avec un plancher de 21,4 millions de tonnes en 2001-2002 à un plafond de 30,4 millions de tonnes en 2006-2007, sa place dans les cultures oléagineuses a chuté au profit de l'huile de soja et de l'huile de palme (Kleingartner et Warner, 2001; FAO, 2007). En effet, le tournesol représentait, en 1993, 13% de la production des six huiles majeures contre seulement 9% en 2006 (Figure 1b), et ceci malgré une forte progression de la production d'huile (7,4 Mt en 1987 à 10,9 Mt en 2006-2007). L'introduction du soja et du colza OGM en Amérique du Nord et du Sud et la demande chinoise en protéines ont réduit l'intérêt pour le tournesol qui reste cependant la 4^{ème} huile produite au monde.

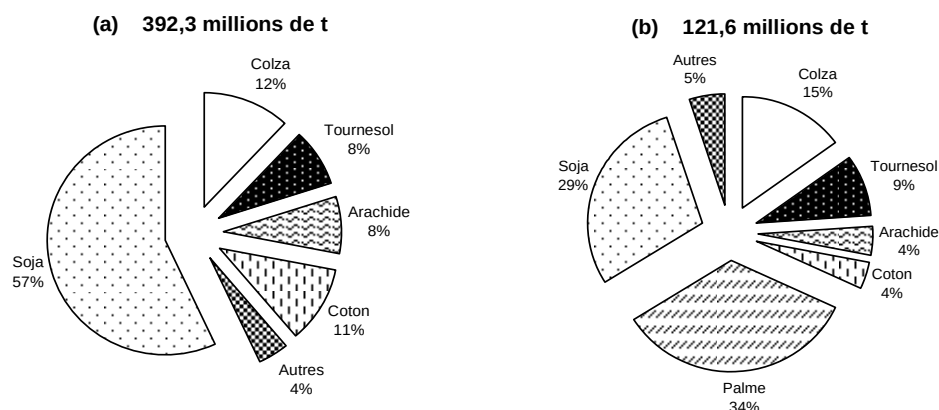


Figure 1. Répartition de la production mondiale (a) des graines d'oléagineux et (b) d'huiles végétales en 2006 (USDA, 2008).

Cette augmentation de production d'huile est liée à une augmentation de la surface mondiale de production des cultures oléagineuses qui a doublé en trente ans alors que celle des céréales a baissé (FAO, 2007). Dans ce cadre, les surfaces mondiales en tournesol sont relativement élevées entre 21 et 23 millions d'ha (Fy, 2004). L'ensemble Russie - Ukraine représente 40% des surfaces mondiales en tournesol (30% de la production) et les variations d'emblavement dans ces deux pays expliquent en grande partie l'évolution constatée au niveau mondial (Tableau 1). Durant la dernière décennie, des pays traditionnellement grands producteurs comme l'Argentine, la France, et les USA ont vu leurs surfaces en tournesol diminuer et au contraire la Russie, l'Ukraine et la Chine affirmer leur importance (Kleingartner, 2004).

Tableau 1: Bilan mondial de la production des akènes de tournesol. Source: (FAO, 2007; USDA, 2008)

	2003-2004	2004-2005	2005-2006	2006-2007	2007-2008 (p)
Surface récoltée (kha)	23 287	21 369	23 117	23 841	22 829
Rendement moyen (t/ha)	1,15	1,19	1,30	1,26	1,20
	----- milliers de tonnes -----				
Russie - Ukraine	9 102	7 850	11 150	12 050	9 700
Union Européenne (27)	6 155	6 463	9 958	6 483	4 470
Argentine	3 240	3 600	3 800	3 500	4 400
Chine	1 743	1 552	1 927	1 900	1 800
Inde	1 700	1 224	1 550	1 280	1 650
Etats-Unis	1 209	930	1 823	972	1 312
Turquie	600	650	750	850	700
Autres	3 142	3 133	3 036	3 110	3 344
Production totale	26 891	25 402	29 994	30 415	27 376

p : prévision de l'USDA.

L'Union Européenne à 25 produit 18,8 Mt de colza, 5,7 Mt de tournesol et 1,1 Mt de soja en 2006-2007 mais elle est obligée d'importer de larges quantités d'oléagineux pour satisfaire sa demande interne en protéines destinées à l'alimentation animale. En effet les taux d'autosuffisance varient largement selon les espèces : 89% pour le colza, 35% pour le tournesol et 1% pour le soja. L'élargissement de l'Union Européenne a fait entrer de grands pays producteurs de tournesol : la Hongrie, le duo Bulgarie - Roumanie. L'Union Européenne est le deuxième producteur mondial de tournesol et la France est la deuxième nation productrice de tournesol de l'Union européenne (UE-27) derrière l'ensemble Bulgarie - Roumanie et devant la Hongrie, l'Espagne et l'Italie.

En France, la culture du tournesol occupe une place importante dans les assolements avec $\frac{1}{4}$ des emblavements et des rendements compris entre 20 et 25 q/ha (Tableau 2). Cependant, l'importance du tournesol a diminué en France au cours de la dernière décennie même si les huiles de tournesol et de colza constituent près de 90% de la production française d'huiles végétales. En effet, les emblavements ont chuté d'environ 50% entre 1995 (963.000 ha) et 2007 (540.000 ha) (PROLEA, *et al.*, 2006).

Tableau 2: Evolution de la culture du tournesol en France (European Community, 2007).

	1965	1973	1981	1985	1991	1995	2000	2003	2004	2005	2006	2007
Surface (1000 ha)	11	41	168	639	1070	978	729	695	616	646	645	525
Production (10 ³ t graines)	18	85	423	1513	2611	2018	1833	1512	1457	1511	1440	1405
Rendement (q/ha)	15,1	20,4	26	24	24	21	25	22	24	23	22	27

La mise en application de l'agenda 2000 a entraîné une baisse des surfaces en tournesol qui est actuellement à son seuil le plus bas, mais l'émergence des valorisations industrielles explique la montée en puissance du colza et dans une moindre mesure du tournesol. Le contexte actuel est à l'accroissement des surfaces en tournesol oléique au détriment du tournesol conventionnel (Figure 2).

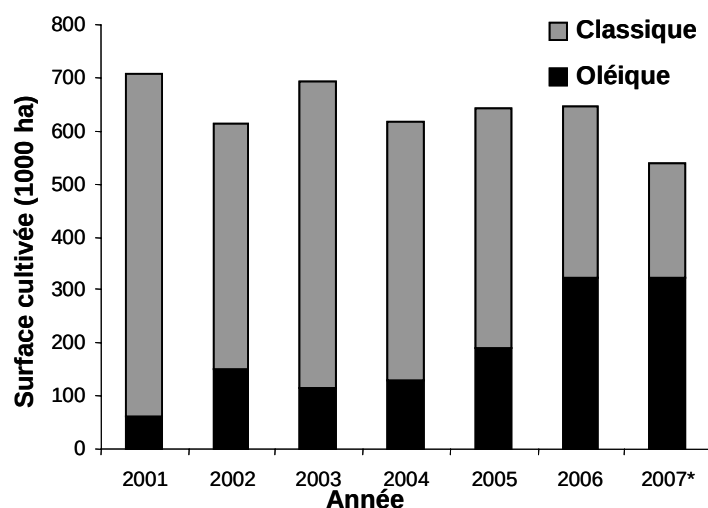


Figure 2. Surfaces françaises en tournesol (* = estimations) (CETIOM, 2006; PROLEA, *et al.*, 2006)

1.2. Contexte politico-économique de la filière tournesol

Les producteurs de tournesol ne peuvent concurrencer des huiles à bas prix (soja, palme) sur le marché mondial. Ainsi, plusieurs pays producteurs de tournesol ont développé des variétés spéciales, telles que le tournesol oléique, dans le but de conquérir des niches de marché. Cette production assure des débouchés vers les usages alimentaires au travers des huiles recomposées mais aussi vers le biodiesel. En effet, les biocarburants se développent autant en France qu'en Europe. Pour répondre aux objectifs d'incorporation de 5,75% de biocarburants en 2010, une surface importante d'oléagineux est nécessaire. Mais, la surface française actuelle : 692.000 ha colza et 100.000 ha tournesol, est insuffisante pour répondre à la demande non alimentaire; c'est 2 millions ha dont 300.000 ha de tournesol qui seront nécessaires dans 3 ans. Ainsi, au-delà des contrats de cultures alimentaires mis en place par les organismes collecteurs, les agriculteurs ont la possibilité, de la même

façon qu'avec le colza Diester[®], de cultiver du tournesol oléique dans le cadre de jachère industrielle ou de l'Aide aux Cultures Energétiques (ACE). Ces productions exclusivement destinées à l'énergie permettent au producteur de percevoir une aide de 45€ par hectare en 2007 mais qui sera revue à la baisse en 2008 (15€/ha).

Cependant, dans un contexte de forte demande et de disponibilités limitées des matières premières (mauvaise récolte de l'Argentine et de l'Ukraine), les cours des graines de tournesol atteignent des niveaux inégalés. La graine de tournesol varie actuellement aux alentours de 585€/t rendu au port de St Nazaire (avril 2008) ; son prix a plus que doublé en un an et l'huile de tournesol devient l'huile végétale la plus chère au monde : 1.400 €/t au départ de Rotterdam en mars 2008 (Agreste, 2008). Depuis plusieurs années, la valeur de la graine de tournesol diminue régulièrement, en raison notamment du déplacement des productions vers des zones à faibles potentiels de production et de systèmes de production globalement moins intensifs que les autres productions. Dans ce contexte actuel d'exigences politiques, économiques et écologiques, le tournesol s'inscrit dans une agriculture durable en présentant de nombreuses qualités agronomiques (économe en eau et en intrants). Cependant, la filière mono-produit de production de l'huile de tournesol a besoin de nouveaux débouchés.

1.3. Créer de la valeur ajoutée par des valorisations alimentaire et non-alimentaire

La diversification des utilisations de la récolte vers de nouveaux marchés permettrait une meilleure rémunération. Il est nécessaire d'améliorer la productivité du tournesol par le développement d'outils qui permettront de lever les facteurs limitants (adaptation des variétés, conduites de culture...) mais également qui apporteront de la valeur ajoutée à la culture par la qualité et la diversification des constituants majeurs et mineurs (tocophérols, phytostérols) de la graine afin d'alimenter des filières d'utilisation alimentaire et non alimentaire et gagner en attractivité face aux huiles de colza et d'olive. Cette démarche de diversification permettra de maintenir et développer la culture du tournesol en France et dans le monde.

2. Valorisations de la culture du tournesol

A l'heure actuelle, ce sont effectivement les graines qui apportent la plus grande valeur ajoutée au tournesol, et déterminent sa valeur économique. Elles contiennent 40 à 45% d'huile, qui représente 80% de leur valeur économique. La quasi totalité des graines de tournesol produites est triturée pour la production d'huile. L'extraction de l'huile fut longtemps effectuée de façon artisanale par pressage à froid; elle est maintenant réalisée de façon industrielle, à grande échelle. Cette transformation des graines en huile met en œuvre une succession d'étapes.

2.1. Transformation des graines de tournesol en huile

2.1.1. Procédés d'obtention des huiles

Les différentes étapes industrielles commencent par la trituration des graines (procédé d'extraction de l'huile brute) et se poursuivent par le raffinage permettant d'obtenir une huile de qualité. Il existe de multiples alternatives pour certaines étapes du procédé, en particulier pour le raffinage des huiles brutes. Cependant, il existe deux grands processus de fabrication de l'huile :

- la **méthode mécanique**. Cette méthode permet d'obtenir l'appellation « huile vierge ». Cette huile est issue d'une seule pression à froid (Figure 3). Après nettoyage des graines et décorticage, les akènes sont pressés dans une presse à vis tournant lentement afin d'éviter l'échauffement mécanique de l'huile.

Après centrifugation, clarification, décantation et filtration, une huile avec une odeur, une saveur et une couleur très marquée est obtenue. Selon ce procédé, cette huile conserve ainsi tous ses nutriments tels que les omégas 3 et 6 et les vitamines E et F (Brevedan, *et al.*, 2000).

- la **méthode industrielle**. Cette méthode permet d'obtenir des huiles raffinées, obtenues par pressage ou extraction au solvant à haute température puis d'un raffinage (Figure 3). Ces huiles brutes ainsi obtenues contiennent des éléments indésirables (matières colorantes et odorantes, acides gras libres) qui influent négativement sur le goût, l'odeur, la qualité visuelle et la capacité de conservation. Un raffinage chimique est conventionnellement appliqué et comprend quatre étapes. Tout d'abord, le dégommeage consiste à éliminer les résidus solides, les stérols et les lécithines conférant un goût amer. Puis, un processus de désacidification suivie d'une neutralisation permet d'éliminer les acides gras libres. L'huile est ensuite décolorée à l'aide d'une terre décolorante. La séparation des éléments traces métalliques, des stérols, des hydroperoxydes et des matières colorantes sont éliminés. La dernière étape est une désodorisation de l'huile au cours duquel les composantes olfactives et gustatives sont supprimées. Lors de cette étape des températures élevées (100-250°C) peuvent être atteintes. Des substances telles que les peroxydes, les pesticides, les tocophérols et autres matières volatiles peuvent être éliminées (Brevedan, *et al.*, 2000).

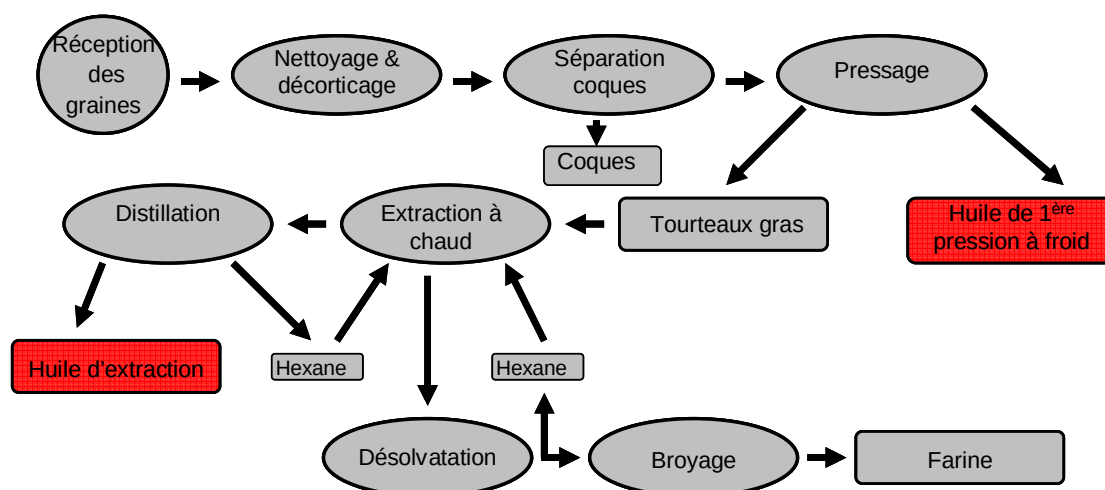


Figure 3. Extraction de l'huile de tournesol.

L'ensemble de ces différents traitements d'extraction et surtout de raffinage des huiles brutes génèrent des effluents et des résidus (savons, terres, charbons usagés...) qui sont difficilement valorisables et dont le retraitement est de plus en plus coûteux (Kartika, 2005). De plus, la trituration des graines génère aussi un tourteau, qui représente 47% de la graine et contient 40 à 45% de protéines. Dans la conjoncture actuelle, cette fraction doit être valorisée et sera abordée dans la description des valorisations des coproduits.

2.1.2. Effet des procédés sur la qualité et la stabilité de l'huile

Les procédés industriels permettent d'extraire quasiment toute l'huile, mais les différentes opérations d'extraction au solvant suivi du raffinage, altèrent la composition de l'huile en diminuant les composés bénéfiques tels que les antioxydants vitamine E et en faisant apparaître des acides gras *trans*, très néfastes pour la santé (De Greyt, *et al.*, 1998; Brevedan, *et al.*, 2000).

Ainsi, la qualité et la stabilité d'une huile dépend d'une part de ces caractéristiques chimiques telles que sa composition en acides gras (plus le degré d'insaturations est élevé, plus l'huile est instable) et de sa teneur en antioxydants (tocophérols, tocotriénols, flavonoïdes,...). De plus, la stabilité de l'huile est influencée par les différents procédés d'extraction et de raffinage et les conditions de stockage en présence de lumière et/ou d'oxygène (Verleyen, 2002).

Bien que le but du raffinage de l'huile soit d'étendre la durée de conservation d'une huile en enlevant les composés indésirables, les pertes en tocophérols et en phytostérols pendant le procédé sont conséquentes (Tableau 3). L'étape la plus déterminante est la phase de désodorisation ; le distillat contient des acides gras libres, des tocophérols, des glycérides, des stérols estérifiés et libres qui peuvent être valorisés.

Tableau 3 : Comparaison des teneurs en tocophérols et phytostérols totaux avant et après raffinage de l'huile (Ferrari, *et al.*, 1996; Tasan, 2005; Fernandes et Cabral, 2007).

Huile	Teneur en tocophérols (mg.kg ⁻¹ d'huile)			Teneur en phytostérols (mg.100g ⁻¹ d'huile)		
	Brute	Raffinée	Perte (%)	Brute	Raffinée	Perte (%)
Maïs	1114	715	36	850	730	14
Colza	820	393	52	820	770	6
Tournesol	779	502	36	430	350	19
Soja	359	295	18	350	260	26

Depuis quelques années, l'effet bénéfique des phytostérols a entraîné une demande sur le marché. Les phytostérols peuvent être valorisés à partir de ce distillat de désodorisation mais des recherches sont menées afin d'améliorer les procédés d'extraction de ces composés soit sur l'huile brute ou sur le distillat par des méthodes douces (Fernandes et Cabral, 2007). De plus, la stabilité des phytostérols peut être améliorée en conservant les lots à l'obscurité et à basse température sous formulation d'huile ou de granulés (Thanh, *et al.*, 2006).

La teneur en tocophérols est significativement affectée par le procédé de raffinage. En effet, les principaux facteurs affectant cette perte sont la température, la durée du chauffage, la pression et le flux d'air. De plus, ces composés sont sensibles à la lumière, au milieu alcalin et aux métaux. Pendant les différentes étapes de raffinage, la synergie de ces facteurs peut conduire à des pertes de 25 à 70% de la teneur totale en tocophérols (Alpaslan, *et al.*, 2001; Tasan, 2005). Cependant, les tocophérols sont des éléments clés pour la stabilité oxydative d'une huile ; la richesse d'une huile en α -tocophérol permet de limiter son oxydation (Warner, 2005). Actuellement, les tocophérols ne sont pas valorisés par extraction et purification à contrario des phytostérols ; les trop faibles teneurs en tocophérols dans les matrices ne permettant pas d'envisager la mise en place d'une production de tocophérols naturels. Cependant, l'amélioration des procédés de raffinage a permis de diminuer la perte en tocophérols des huiles et ainsi promouvoir des huiles plus riches en tocophérols conférant une stabilité oxydative de l'huile et un pouvoir vitaminique pour l'homme.

Ainsi, l'huile extraite de l'akène est la fraction la plus valorisée. Toutefois, la conjoncture actuelle entraîne une évolution de cette filière d'une production d'huile de tournesol vers une valorisation plus complète de la plante entière. On assiste, à l'heure actuelle, non plus à une filière mono-produit de production de l'huile de tournesol mais on cherche à valoriser, au travers de multiples travaux, la plante entière.

2.2. Evolution des débouchés alimentaires

2.2.1. Huile et profil d'acides gras

L'huile de tournesol, seule ou combinée à d'autres, est capable de répondre à de nombreuses exigences du secteur de l'agro-alimentaire. Elle est le plus souvent utilisée comme huile de table pure ou en mélange et dans l'industrie alimentaire pour la fabrication d'assaisonnements, de sauces, de margarines.

De nombreux travaux de recherche en nutrition ont montré l'intérêt de combiner l'huile de tournesol classique et l'huile de tournesol oléique en y intégrant également l'huile de colza pour optimiser le ratio oméga 6 / oméga 3. En effet, ces huiles apportent des acides gras essentiels. Ainsi, l'huile de tournesol classique constitue une source d'acide linoléique, précurseur des acides gras oméga 6 tandis que le colza apporte l'acide alpha-linolénique, précurseur des acides gras oméga 3. La richesse en acide oléique confère des effets positifs sur la santé (prévention de l'athérosclérose) (Zock et Katan, 1998; Brouwer, *et al.*, 2004) et une bonne stabilité à la cuisson et de bonnes aptitudes technologiques à la friture (Choe et Min, 2006; Romero, *et al.*, 2006; Choe et Min, 2007). Ainsi, la diversité des acides gras dans l'alimentation humaine et leurs apports en quantités appropriées sont nécessaires pour la prévention des maladies cardiovasculaires (Delplanque, 2000).

2.2.2. Composés mineurs

La richesse en composés mineurs de l'huile de tournesol apporte à l'huile de table ou à la margarine un intérêt nutritionnel supplémentaire.

a. Effets des tocophérols sur la santé humaine

Lors de sa découverte, la vitamine E a été définie comme facteur indispensable à la reproduction chez le rat (Evans et Bishop, 1922). Ce composé s'est avéré présent dans l'huile, a des teneurs variables selon leur origine. Ainsi, l'huile de germe de blé a été très tôt reconnue comme très riche en vitamine E (Traber, 2007). En fait, l'activité vitaminique E est due à un ensemble de 8 molécules, les tocochromanols, qui, bien qu'absorbés de la même manière par l'organisme, sont inégalement retenus, ce qui leur confère une activité vitaminique variable. Le composé le plus actif (le mieux retenu) étant l' α -tocophérol présent en quantité importante (95% des tocophérols totaux) dans l'huile de tournesol (Di Mascio, *et al.*, 1991; Riccioni, *et al.*, 2007b). En fait, l'essentiel de l'activité vitaminique E *in vivo* est une activité de piégeage des radicaux libres, la forme oxydée (radicaux tocophéroxyles) est recyclée par des antioxydants hydrosolubles, essentiellement la vitamine C et le sélénium (Traber, 2007). Les tocophérols de synthèse sont des mélanges racémiques dont le pouvoir vitaminique est inférieur à celui de l' α -tocophérol naturel (Hoppe et Krennrich, 2000; Brigelius-Flohe, 2006).

Les tocophérols préviennent l'oxydation des acides gras poly-insaturés dans le réseau sanguin et protègent les lipoprotéines de basse densité (LDL) de l'oxydation causée par les radicaux libres provoquant le développement des lésions artériosclérotiques (Azzi, *et al.*, 2000; Azzi, *et al.*, 2001; Niki, 2004; Morris, *et al.*, 2005; Schneider, 2005; Azzi, 2007; Riccioni, *et al.*, 2007a). Outre ces propriétés anti-oxydantes, des études montrent que les tocophérols réduisent les maladies cardiovasculaires et ont certaines propriétés anti-cancéreuses (Bramley, *et al.*, 2000; Beardsell, *et al.*, 2002; Riccioni, *et al.*, 2007b). Il a été montré que l' α -tocophérol succinate a un rôle d'inhibition sur la croissance des cellules cancéreuses (Prasad et Edwards-Prasad, 1982; Villacorta, *et al.*, 2003).

D'autre part, le γ -tocophérol est un nucléophile qui piège les mutagènes électrophiles dans des compartiments lipophiles. Ainsi, il peut protéger les lipides, l'ADN et les protéines du dommage dépendant des peroxy-nitrites (Brigelius-Flohé et Traber, 1999). De plus, il forme un métabolite, le γ -CEHC (2, 5, 7, 8-tétraméthyl-2-(2'-carboxyéthyl)-6-hydroxycromane), qui présente des propriétés natriurétiques (excrétion du sodium dans l'urine). Ainsi, l'ingestion excessive de sel provoque des problèmes d'hypertension, la consommation du γ -tocophérol pourrait réduire ces troubles (Wagner, *et al.*, 2004).

Actuellement, les tocophérols commercialisés en tant que supplément vitaminique sont majoritairement des produits de synthèse, mélange racémique des stéréoisomères de tocophérols (Netscher, 1999; Chênevert et Courchesne, 2002). Weiser, *et al.* (1996) ont montré que le ratio de biodisponibilité entre des tocophérols issus des végétaux vs synthétiques était de 1,36/1. Cependant, ce ratio a été établi sur des rats, l'étude de l'absorption chez l'homme est difficile mais il semble que ce ratio pourrait atteindre 2/1 (Hoppe et Krennrich, 2000; Lodge, 2005; Bramley, *et al.*, 2000).

b. Effets des phytostérols sur la santé humaine

Les effets des phytostérols sur la santé font l'objet de nombreux travaux depuis quelques années (Awad et Fink, 2000; Orzechowski, *et al.*, 2002; St-Onge et Jones, 2003; Trautwein, *et al.*, 2003; Brufau, *et al.*, 2008). C'est en raison de leur pouvoir hypocholestérolémiant que les stérols d'origine végétale ont suscité le plus d'intérêt. Par leurs propriétés amphiphiles, ils inhibent l'absorption intestinale du cholestérol en le remplaçant dans les micelles de sels biliaires (Ikeda, *et al.*, 1988; Normen, *et al.*, 2000; Sudhop, *et al.*, 2002; Tapiero, *et al.*, 2003; Trautwein, *et al.*, 2003; Calpe-Berdiel, *et al.*, 2005). Il a été également suggéré que les phytostérols inhibent la biosynthèse du cholestérol et que le β -sitostérol en particulier interfère avec l'absorption du cholestérol micellaire (Field, *et al.*, 1990). L'huile de tournesol, pauvre en squalène, est préconisée dans les régimes hypocholestérolémiants. En 2000, la Food and Drug Administration a reconnu officiellement que les produits contenant des phytostérols diminuaient les risques des maladies cardiovasculaires s'ils étaient associés à une alimentation pauvre en graisses saturées et en cholestérol (FDA, 2007).

Outre leur effet sur la réduction du taux de cholestérol sanguin, les phytostérols sont aussi étudiés pour leur action anticancéreuse (Awad et Fink, 2000; Tapiero, *et al.*, 2003; Bradford et Awad, 2007), immunomodulatrice (Zangenberg, *et al.*, 2004) et anti inflammatoire (Bouic, *et al.*, 1999). Cependant, l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a fixé une dose maximale journalière à 3g de stérols et/ou stanols (European Community, 1995) suite à des travaux montrant qu'une surconsommation de phytostérols entraînait une diminution de la teneur en α - et β -carotène dans le sang (Law, 2000). Les phytostérols peuvent s'oxyder par chauffage ou radiation donnant des oxyphytostérols. Cet état oxydé présente, *in vitro*, un risque de toxicité en diminuant la viabilité cellulaire (Adcox, *et al.*, 2001; Lutjohann, 2004), mais des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider le possible impact des oxyphytostérols sur la santé humaine (Hovenkamp, *et al.*, 2008).

2.3. Débouchés de la valorisation non alimentaire

Par ses caractéristiques technologique et physico-chimique, l'huile de tournesol a de fortes potentialités pour substituer partiellement les ressources pétrochimiques. Le tournesol oléique suscite un grand intérêt dans certains secteurs d'applications : l'acide oléique, mono insaturé est plus stable que l'acide linoléique polyinsaturé. Les industries non alimentaires utilisent les huiles de tournesol natives ou sous forme d'esters méthyliques d'acides

gras. Les huiles semi-raffinées trouvent des applications dans la cosmétique (Rahate et Nagarkar, 2007) tandis que les huiles raffinées dans le secteur des lubrifiants et des peintures. Les esters méthyliques d'huile de tournesol (EMHT), issus de la transestérification des acides gras, trouvent des applications dans la lubrification (Nik, *et al.*, 2005; Schneider, 2006), la solvatisation (encre d'imprimerie) (Novance®), les tensioactifs (Parant, 2001), les adjuvants phytosanitaires (Langer, *et al.*, 2006), dans le secteur des travaux publics (fluxuant pour bitume) (Bioflux®) mais également comme matière première pour la production de biodiesel (Diester®) (Granados, *et al.*, 2007; Huber, *et al.*, 2007; Cervero, *et al.*, 2008). Le développement de variétés à très hautes teneurs en acide oléique, supérieur à 90%, permettra de renforcer la position du tournesol dans les applications existantes mais également de conquérir de nouveaux marchés dans la lipochimie.

2.4. Valorisation des co-produits

2.4.1. Tourteaux & protéines

Du fait de sa haute teneur en protéines (20-35%), le tourteau de tournesol a été étudié afin de le valoriser en alimentation humaine. Dans ce cas, ce sont des concentrés de protéines ou des farines de tourteau de tournesol déshuilé qui sont valorisés : i.e. l'incorporation de 15 à 30 % de farine de tournesol mélangée à de la viande de bœuf permet d'améliorer la texture en retenant l'eau (Rossi, 1988). Les débouchés du tourteau pour l'alimentation animale présentent plusieurs limites. En effet, le tourteau de tournesol ne présente pas les qualités nutritionnelles aussi intéressantes que le tourteau de soja ou encore de colza. Malgré, une forte concentration en protéines (20-35%), le tourteau de tournesol a une déficience en acide aminé essentiel : la lysine, d'autre part, il contient une quantité importante de composés phénoliques, et il est riche en composés lignocellulosiques qui réduisent fortement sa digestibilité. Mais en vue de l'augmentation de la demande mondiale en protéines végétales après la crise de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et l'interdiction en 1996 d'utiliser des protéines d'origine animales pour l'élevage, il est nécessaire de trouver de nouvelles sources de protéines facilement exploitables. Une revue récente (González Pérez et Vereijken, 2008) montre que les protéines de tournesol ont peu de composés antinutritionnels et d'excellentes propriétés physico-chimiques qui les rendraient intéressantes autant en alimentation humaine qu'en alimentation animale. Leur principaux inconvénients sont *i*) la présence de composés phénoliques qui leur confère une coloration brune et *ii*) une sensibilité à la dénaturation qui impliquerait une modification des procédés de triturations si l'on veut exploiter des tourteaux de bonne qualité.

2.4.2. Résidus lignocellulosiques

Les résidus de récolte (tiges, feuilles, capitules évidés) peuvent être réincorporés au sol afin de l'enrichir mais ils peuvent également être collectés pour entrer dans la fabrication de biomatériaux (Rouilly, *et al.*, 2006; Ramaraj, 2007).

2.4.3. Composés mineurs

Le raffinage des huiles alimentaires élimine une partie des tocophérols et des phytostérols qui se retrouvent concentrés dans la fraction insaponifiable de l'huile. Ces composés mineurs n'apportent pas de plus-value lors de la réaction de trans-estérification pour la production des esters méthyliques. Par conséquent, ces biomolécules peuvent être récupérées et valorisées, en particulier dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique. Par leur propriétés de surfactants, les phytostérols permettent de solubiliser les hormones stéroïdes dans la formulation

des crèmes (Holmberg, 2001; Korhonen, *et al.*, 2001). De plus, ils présentent une action anti-inflammatoire similaire à celle de la cortisone (de la Puerta, *et al.*, 1997; Folmer, 2003). Les phytostérols sont également utilisés en cosmétique où ils sont souvent employés comme agents anti-dessicateurs de l'épiderme et du cuir chevelu grâce à leur pouvoir émulsifiant et pénétrant (Folmer, 2003; Borlescu, *et al.*, 2007). Les tocophérols sont abondamment utilisés en cosmétologie : par leur action de vasodilatation, ils améliorent la texture de la peau et leur pouvoir anti-oxydant, allié à leur hydrophobicité est d'un grand intérêt en formulation.

3. Le tournesol (*Helianthus annuus* L.), la plante et sa culture.

3.1. Biologie florale et système de reproduction

Les variétés de tournesol cultivé sont essentiellement non ramifiées ; la tige mesure de 1 à 4 cm de diamètre et de 50 à 300 cm de haut. L'initiation florale a lieu lorsque 6 feuilles sont visibles. L'inflorescence d'un tournesol est composée d'un plateau parenchymateux de 1 à 4 cm d'épaisseur sur lequel sont disposées des fleurs ou fleurons organisés en hélices multiples. Le capitule porte de 50 à 3000 fleurons et mesure à maturité entre 5 et 50 cm de diamètre, selon le génotype et le milieu. Les fleurons sont de deux types : les fleurs extérieures ligulées (jaunes et stériles) destinées à attirer les pollinisateurs ; et les fleurs intérieures tubulées, caractérisées par une corolle courte, qui donneront naissance à maturité aux akènes. La floraison du capitule peut durer plus d'une semaine, elle se produit par cercles de fleurons, en progressant vers le centre.

Le tournesol sauvage est une plante à fécondation allogame (assurée par un système relativement complexe d'autostérilité sporophytique), à pollinisation entomophile (Vear, 1992). L'abeille domestique et le bourdon sont les principaux agents pollinisateurs. Le tournesol présente néanmoins une certaine autogamie à l'échelle du capitule. Selon les variétés, on observe de 10 à 90 % d'autofécondation (Vear, 1992). Etant donné son importance en sélection et en production pour la maîtrise des flux génétiques, l'autocompatibilité est un critère de sélection chez le tournesol. Les variétés sauvages sont fortement autoincompatibles.

3.2. Cycle de développement

Le cycle de développement du tournesol est d'environ 140 à 150 jours selon la précocité des variétés (CETIOM, *et al.*, 2000). La croissance de la plante peut être subdivisée en stades repères bien distincts (Figure 4).

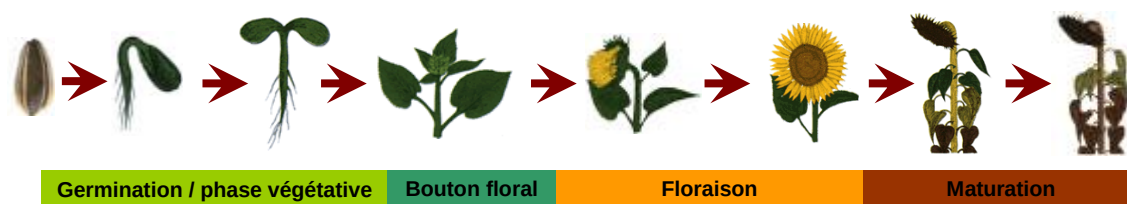


Figure 4. Principaux stades physiologiques du tournesol (CETIOM, *et al.*, 2000).

Le tournesol peut se cultiver sur tout type de sol moyennement riche à très fertile. Les sols légèrement acides à neutre sont les plus favorables à la culture mais des résultats satisfaisants sont obtenus sur des terres faiblement alcalines (Putnam, *et al.*, 1990).

Le tournesol est une plante rustique avec une faible exigence en eau et en intrants. En effet, il possède un système racinaire pivotant très performant qui peut venir puiser l'eau et les éléments nutritifs situés à 2 mètres de

profondeur. Cet appareil racinaire est ainsi capable d'exploiter les ressources hydriques disponibles dans chaque horizon du sol. Les conséquences du stress hydrique sur le rendement dépendent du stade de développement de la plante. Lorsque les ressources en eau sont limitées le tournesol est capable de poursuivre sa production de matière sèche plus longtemps que les autres cultures. Cependant, des études ont montré que l'irrigation améliore à la fois le rendement et la teneur en huile (Lagravère, 1999).

La culture du tournesol optimise la rentabilité des céréales en restructurant le sol, en interrompant le cycle des maladies et en limitant le développement des adventices du blé. En effet, on a pu montrer que sur une période de 5 ans, la densité des adventices diminuait significativement dans les cultures de tournesol, et que des extraits de tiges ou de feuilles de tournesol inhibaient la croissance de plantules de liseron, datura, moutarde ou airelles (Leather, 1993 ; Bogatek *et al.*, 2006). Cet effet allélopathique serait dû à des composés sesquiterpéniques, les héliannanes, présents dans les tiges, feuilles, racines et exudats racinaires des tournesols (Macias *et al.*, 1994, 2000). Ces composés sont d'ailleurs synthétisés et testés actuellement (Macias *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2007 ; Kamei *et al.*, 2006). Doté d'atouts agronomiques majeurs, le tournesol contribue ainsi à l'équilibre des rotations et favorise la biodiversité en participant à l'attrait des paysages (AMSOL, 2002).

3.3. Sélection

3.3.1. Evolution du potentiel génétique

Le développement de la culture du tournesol est lié à son potentiel génétique. On peut distinguer trois étapes dans la domestication du tournesol :

- (i) On a longtemps cru que le tournesol était une des rares plantes domestiquée en Amérique du Nord, mais il a été montré récemment qu'après une domestication en Amérique centrale par les indiens, le tournesol avait été introduit en Amérique du Nord par les conquérants espagnols (Lentz *et al.* 2008). Les premières variétés de tournesol étaient des populations hétérogènes avec une architecture à plusieurs capitules qui passera à une architecture à capitule unique
- (ii) L'introduction en Europe (XVI^{ème}) entraîne un développement mieux caractérisé des variétés. La sélection du tournesol débute en Russie au début du XX^{ème} siècle. Tout d'abord empirique, puis raisonnée, cette sélection est basée sur la comparaison de différentes populations de tournesol existantes. La précocité et la teneur en huile sont les deux principaux critères qui ont été améliorés.
- (iii) La découverte d'une stérilité mâle cytoplasmique (Leclercq, 1969) a facilité la création de variétés hybrides. Ainsi, les techniques de sélection ont permis d'élargir le pool génétique disponible (Vear, 1992).

A l'heure actuelle, dans les programmes de sélection, différentes types d'orientation sont choisies :

- *L'exploitation du pool génétique naturel* pour sélectionner puis recombinaison des critères d'intérêt par croisements entre lignées, pour introduire des caractéristiques issues de lignées de collection par rétrocroisements. Ces programmes permettent de faire évoluer les performances agronomiques du tournesol cultivé par l'utilisation de gènes tels que les gènes de résistance aux maladies (mildiou, sclérotinia) ou à l'infection par l'orobanche.
- *Les méthodes de mutations génétiques*. Ces programmes utilisent la ressource naturelle soumise à des traitements de mutagenèse, et s'accompagnent d'une sélection dirigée par croisements permettant de fixer les critères d'intérêt et de les conserver. C'est ainsi que la mutation dominante

oléique a été obtenue par Soldatov en 1976 dans la population Pervenets après mutagenèse de la population VNIIMK8931 (Lacombe, *et al.*, 2002). Cette mutation est à l'origine de l'ensemble des variétés oléiques actuelles.

La sélection chez le tournesol s'est orientée vers la recherche et l'identification de variétés à fort potentiel de production. Des hybrides de plus en plus résistants aux maladies (mildiou, rouille, sclérotinia, phomopsis) ont été créés pour gagner en productivité (Vear et Tourvieille de Labrouhe, 1988; Vear, *et al.*, 2003). Parallèlement, des travaux ont été réalisés ou sont en cours afin d'améliorer les teneurs en huile et les profils d'acides gras (Lagravère, 1999).

3.3.2. Utilisation de la stérilité mâle cytoplasmique pour la production d'hybrides commerciaux

Comme pour de nombreuses cultures, le tournesol présente un fort phénomène d'hétérosis, c'est-à-dire que les hybrides F1 entre lignées fixées ont une vigueur et une productivité bien supérieure à celle de leurs parents. Cependant, pour utiliser ce phénomène, il faut avoir la possibilité de fabriquer en grande quantité des semences hybrides. Le croisement est par exemple assez facile dans le cas du maïs chez lequel les floraisons mâles et femelles sont physiquement séparées sur la plante. Ainsi, l'élimination des panicules permet de produire des plantes femelles (mâles stériles), et la pollinisation croisée peut être maîtrisée. Dans le cas du tournesol, une stérilisation mécanique des plantes "femelles" est impossible. Un tel problème peut être résolu par moyen chimique (castration chimique, utilisée par exemple sur le blé), ou de manière génétique, en utilisant une mutation qui rend le pollen inactif, ou qui empêche sa production. La difficulté est alors de créer une lignée mâle stérile stable (= lignée femelle), et de rétablir la fertilité chez l'hybride.

Le système largement utilisé actuellement chez le tournesol a été mis au point à l'INRA par Patrice Leclercq à la fin des années 1960 (Leclercq, 1969) ; il utilise une incompatibilité entre *Helianthus petiolaris* et *Helianthus annuus* : dans les descendants de ces croisements interspécifiques, on observe une stérilité mâle due à une spécificité des mitochondries de *petiolaris*, mais il est possible d'observer des descendants qui présentent une fertilité normale, grâce à une allèle de restauration de la fertilité, R, dominant, présent chez certaines lignées *H. annuus*.

- Les lignées choisies comme pollinisatrices (mâles) devront donc être porteuses de l'allèle R (Horn, 2002; Horn, *et al.*, 2003) à l'état homozygote (Figure 5).
- Les lignées femelles doivent être mâles stériles : elles seront donc homozygotes rr, et auront un cytoplasme *petiolaris*. Le cytoplasme étant transmis par les gamètes femelles, on fabrique cette lignée stérile en fécondant une lignée porteuse ("donneuse") de cytoplasme *petiolaris*, issue du croisement interspécifique, par le pollen de la lignée choisie comme lignée femelle de l'hybride. Une série de rétrocroisements permet d'obtenir deux lignées dont les gènes nucléaires sont identiques (isogéniques) : la lignée femelle *H. annuus* totalement fertile (lignée A), et une lignée interspécifique, mâle stérile, présentant un cytoplasme *petiolaris* (lignée B).

La lignée B est aussi appelée "mainteneur", car elle permet de reproduire la lignée A. On appelle "restaurateur" la lignée mâle R qui permettra d'obtenir un hybride fertile, bien que porteur du cytoplasme *petiolaris* (Figure 5).

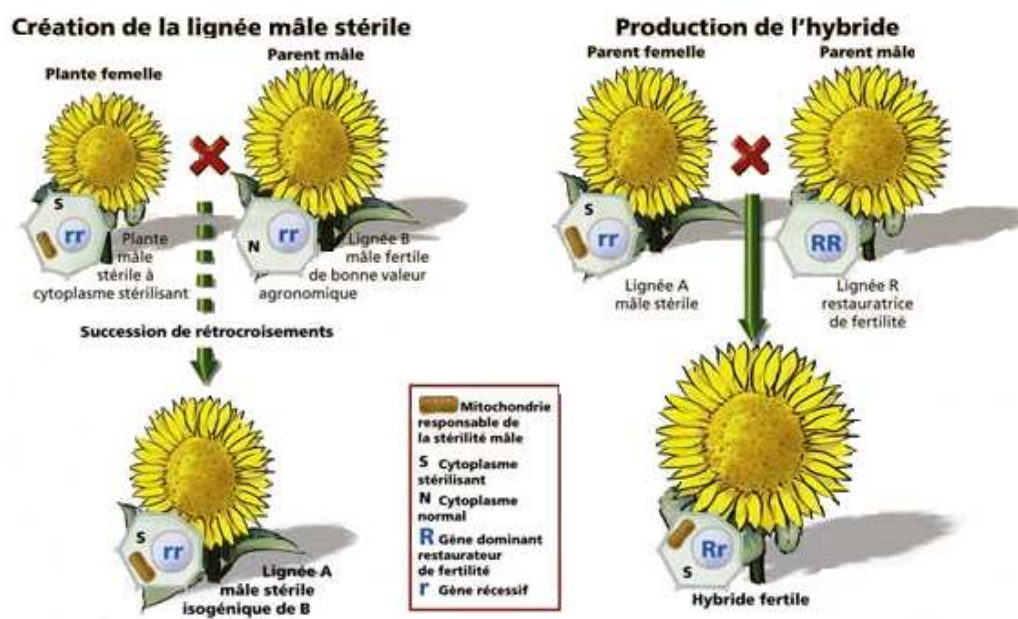


Figure 5. Création d'un hybride de tournesol (Gnis, 2008)

Depuis presque une trentaine d'années, cette sélection a évolué non seulement vers une augmentation du rendement mais aussi vers une modification des caractéristiques de l'huile afin de s'adapter aux nouvelles exigences des industries alimentaire ou non alimentaire :

- (i) fortes teneurs en acide oléique (Lagravère, 1999) et en phytostérols conférant des propriétés nutritionnelles et/ou fonctionnelles de l'huile (Roche, 2005),
- (ii) fortes teneurs en acides gras saturés évitant l'hydrogénation des margarines et matières grasses (Pérez-Vich, *et al.*, 2000; Pérez-Vich, *et al.*, 2002a; Pérez-Vich, *et al.*, 2002b),
- (iii) faibles teneurs en acide linoléique et des teneurs élevées en anti-oxydants (β - et γ -tocophérols) tolérant de fortes températures lors de l'extraction de l'huile et une meilleure conservation de l'huile (Velasco, *et al.*, 2004b; Velasco, *et al.*, 2004c; Vera-Ruiz, *et al.*, 2006),
- (iv) faibles teneurs en acides gras saturés et fortes teneurs en tocophérols et phytostérols.
- (v) très fortes teneurs en acide linoléique pour la fabrication de peintures et margarines.

4. Composition de l'akène de tournesol

La graine de tournesol est un akène, fruit sec situé dans le capitule. Cet akène est constitué d'une amande ou d'une graine au sens botanique et d'une coque ou péricarpe (Figure 6).

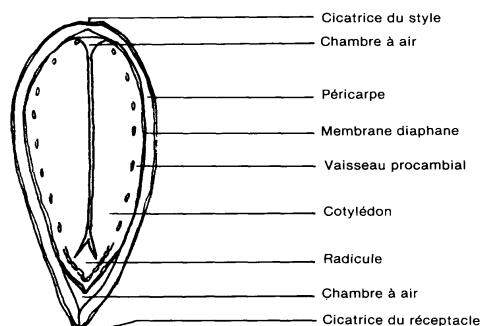


Figure 6. Coupe longitudinale d'un akène de tournesol.

4.1. Constituants de la coque et de l'amande

La *coque* est essentiellement formée de fibres de cellulose, de lignine et d'hémicellulose (70 à 90% de la matière sèche) (Connor et Hall, 1997). Cependant, dans la littérature, il est rapporté que de larges différences de composition en constituants sont observées sur la teneur en lipides (0,9 à 7,1% /MS), en protéines (2,8 à 7,1% /MS), en lignine, cellulose et hémicellulose. La faible teneur en protéines dans la coque réduit significativement l'utilisation du tourteau de tournesol dans l'alimentation animale par son faible pouvoir nutritionnel.

L'*amande*, constituée d'un embryon et de deux cotylédons, est le lieu de stockage des réserves nécessaires au développement de l'embryon. Les réserves de l'embryon du tournesol, indispensable à la germination et au développement de la plantule, sont donc constituées de deux types de substances de réserve, les protéines et les lipides représentant respectivement 20 et 50% de matière sèche de l'akène (USDA, 2004).

4.2. Constituants lipidiques

L'huile de tournesol est majoritairement constituée de triglycérides ou triacylglycérols (TAG) (95 à 99% d'huile). Le reste de la fraction lipidique (1 à 5%) renferme des composés dits « mineurs » en raison de leur faible teneur, tels que des phospholipides, des alcools aliphatiques et triterpéniques, des cires, des pigments, des tocophérols et des stérols.

4.2.1. Acides gras

Les triglycérols d'acides gras (TAG) sont constitués d'un glycérol estérifié par trois acides gras (Figure 7)

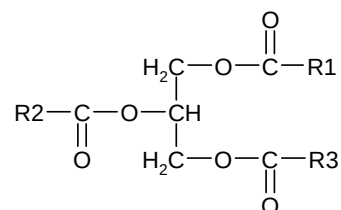


Figure 7. Structure d'un triglycéride d'acides gras (R1, R2, R3 désignent les chaînes carbonées d'acides gras).

Les TAG sont présents généralement dans tous les tissus en tant que constituants des membranes et s'accumulent dans les tissus de stockage des graines oléagineuses. Ils sont considérés comme chimiquement inertes et non toxiques. Ce sont des composés à fort potentiel énergétique pour la cellule et à ce titre, ils contribuent fortement aux réserves germinatives de la plantule.

Les acides gras sont des molécules caractérisées par une chaîne aliphatique présentant une fonction acide carboxylique à l'une de ses extrémités. Dans les huiles végétales, la chaîne aliphatique contient un nombre pair de carbones compris entre 6 et 24 atomes de carbone. La chaîne aliphatique peut contenir une ou plusieurs insaturations (double liaison) de type *cis* généralement en position 6, 9, 12 ou 15 (par rapport au carbone 1 de la fonction carboxylique). La composition relative en acides gras des huiles de différentes espèces oléagineuses est présentée dans le Tableau 4.

Tableau 4. Composition en acides gras des principales huiles et graisses végétales.

Huile	Teneur en huile	Acides gras saturés		Acides gras insaturés			Source bibliographique
		C16:0	C18:0	C18:1 (Ω9)	C18:2 (Ω6)	C18:3 (Ω3)	
Amande	54,2	-	5	78	17	-	(www.foodscience.az.nz, 2007)
Argan	40	-	20	45	35	-	(Khallouki, <i>et al.</i> , 2005)
Avocat	12	-	20	70	10	-	(Erasmus, 1993)
Beurre de cacao	-	26	35	3	1	1	
Cacahuète	47,5	-	18	47	29	-	
Carthame	59,5	-	12	13	75	-	(www.cyberlipid.org, 2005))
Chanvre	35	6	2	12	60*	20	(Codina.net, 2007)
Chia	30	-	-	-	40	30	(Erasmus, 1993)
Colza	30	-	7	54	30	7	(Lampi et Piironen, 1999)
Coprah	-	9	3	8	2	-	(Lagravère, 1999)
Coton	40	-	25	21	50	-	(Erasmus, 1993)
Germe de blé	10,9	0	18	25	50	5	(Ostlund, <i>et al.</i> , 2003)
Gland	50	-	8	54	32	-	(Erasmus, 1993)
Kukui	30	-	-	-	40	29	
Lin	35	5	4	19	14	58	
Noix de macadamia	71,6	-	12	71	10	-	(Sheabutter, 2007)
Maïs	4	-	17	24	59	-	(Verleyen, 2002)
Neem (Margousier)	40	-	20	41	20	1	(Erasmus, 1993)
Noisette	62,4	-	5	54	16	-	(Crews, <i>et al.</i> , 2005a)
Noix	60	11	5	28	51	5	(Crews, <i>et al.</i> , 2005b)
Noix coco	35,3	91	0	6	3	-	(Erasmus, 1993)
Noix du Brésil	66,9	-	24	48	24	-	
Noix de cajou	41,7	-	18	70	6	-	
Noix de carya	68,7	-	9	68	17	-	
Noix de pecan	71,2	-	7	63	20	-	(1001huiles, 2008)
Olive	20	-	16	75	8	-	(Cabrini, <i>et al.</i> , 2001)
Onagre	17	6	2	11	81**	-	(Krzyzaniak et Kerjama, 1001)
Palme	35,3	85	0	13	2	-	(Verleyen, 2002)
Pépin de courge	46,7	9	0	34	42-57	0-15	(Murkovic et Pfannhauser, 2000)
Pistache	53,7	-	9	65	19	-	(1001huiles, 2008)
Raisin	20	-	12	17	71	-	
Riz complet	10	-	17	48	35	1	(Erasmus, 1993)
Sésame	49,1	-	13	42	45	-	(1001huiles, 2008)
Soja	17,7	9	6	26	50	7	(Cabrini, <i>et al.</i> , 2001)
Tournesol	47,3	-	12	23	65	-	(Warner, <i>et al.</i> , 2006)

L'huile de tournesol se compose d'environ 90% d'acides gras insaturés (acides oléique (C16 :1) et linoléique (C18 : 2)) et 10% d'acides gras saturés (acides palmitique (C16 :0) et stéarique (C18 :0)). Cette composition en acides gras des triglycérides de l'huile de tournesol varie en fonction du génotype. Jusqu'en 1960, la production d'huile de tournesol provenait de variétés standards ayant une composition dominante en acides polyinsaturés (acide linoléique). Suite aux travaux de Soldatov (1976), une lignée mutante riche en acide oléique a été isolée à partir de la population Pervenets. Cette mutation est dominante ou partiellement dominante selon le fond génétique et met en jeu 3 locis indépendants agissant en *trans* sur la suppression de l'activité oléate désaturase responsable de la synthèse d'acide linoléique à partir de l'acide oléique (Lacombe *et al.* 2004). Malgré la complexité de son déterminisme, cette mutation a révolutionné en France l'utilisation de l'huile de tournesol grâce à la mise sur le marché de nombreuses variétés hybrides riches ou très riches en acide oléique (Lampi et Kamal-Eldin, 1998).

Actuellement, quatre types de variétés de tournesol peuvent être rencontrés :

- ✓ Standards (ou classiques) : 20 à 50% d'acide oléique
- ✓ Mid Oléiques (MO) ou NuSun, développées aux Etats-Unis, dont les teneurs en acide gras oléique sont comprises entre 50 et 70%.
- ✓ Oléiques, variétés cultivées en Europe depuis les années 90, dont les teneurs en acide gras oléique varient de 75% à environ 88%.
- ✓ High Oléiques (HO), cultivées en Europe depuis 2000, dont le potentiel de teneur en acide gras oléique est supérieur à 88%.

Le Tableau 5 reporte la composition moyenne en acides gras des huiles de tournesol standard, mi-oléique et oléique.

Tableau 5. Composition moyenne en acides gras de l'huile de différents types de tournesol (Warner, *et al.*, 2006; NSA, 2008)

Teneur en Acides Gras de l'huile de tournesol (%)			
Type	Saturés	C18 :1	C18 :2
Classique	11	20	69
Mid-oléique	9	65	26
Oléique – HO	9	82	9

4.2.2. Fraction insaponifiable

La fraction insaponifiable d'un corps gras donné comprend l'ensemble de ses constituants (composés mineurs) qui, après une hydrolyse basique (saponification), restent hydrophobes et solubles dans les solvants aprotiques (Figure 8).

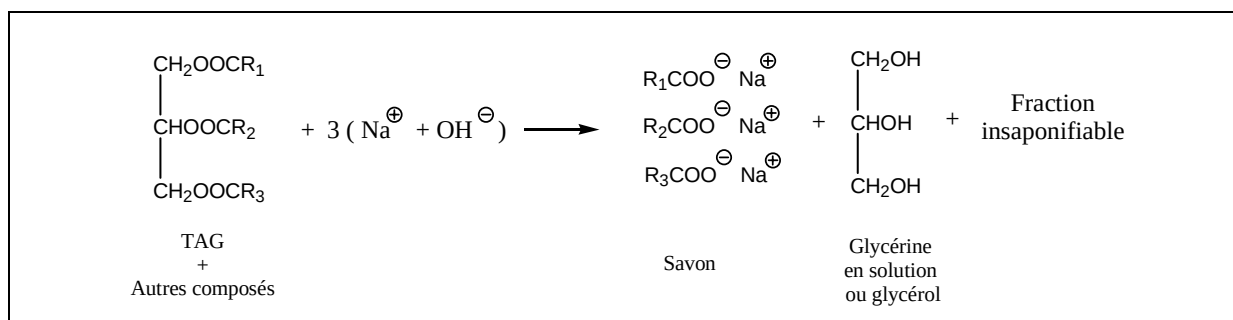


Figure 8. Réaction d'hydrolyse alcaline (saponification) des corps gras.

Les constituants chimiques de la fraction insaponifiable peuvent être extrêmement variés en nature et en proportions :

- ✓ *des hydrocarbures divers* : hydrocarbures aliphatiques saturés et insaturés, hydrocarbures triterpéniques (squalène) ou tétraterpéniques (carotènes) etc.
- ✓ *des composés terpéniques* : alcools triterpéniques penta et tétracycliques, ainsi que des 4-méthylstérols et des stérols, produits d'évolution du cycloarténol et du lanostérol. Outre les carotènes, on rencontre des

tétraterpènes comportant des fonctions oxygénées (alcools, époxydes, cétones,...) connus sous le nom de xanthopylles.

- ✓ *des alcools gras* : les cires sont des esters d'acides et d'alcool gras.
- ✓ *des vitamines liposolubles* : les vitamines A, D, E peuvent être rencontrées dans les corps gras ; en particulier, la vitamine E (tocophérols et tocotriénols) est observée de façon systématique; avant saponification, ils sont présents à la fois sous forme libre et sous forme d'esters d'acides gras.

Cependant, la composition de l'insaponifiable contenue dans un corps gras dépend de l'origine biologique de ce corps gras, des traitements qu'il a pu subir (raffinage), ainsi que de la nature du solvant d'extraction (éther diéthylique, hexane). Cette fraction représente environ 0,2 à 2% de l'huile (Tableau 6), mais des proportions pouvant aller exceptionnellement jusqu'à 10% sont observées dans le beurre de karité (Merrien, *et al.*, 1992).

5. Composés mineurs de l'akène de tournesol

5.1. Les tocophérols

5.1.1. Structures et caractéristiques

Les tocophérols désignent un ensemble de molécules composées d'un noyau 2-méthyl-6-chromanol et d'une chaîne latérale de 16 atomes de carbone saturée en C₂ (Verleyen, 2002). La chaîne carbonée existe sous deux formes : une forme comprenant trois insaturations qui caractérise les tocotriénols et une forme totalement saturée caractérisant les tocophérols. Les quatre formes de tocophérols (α , β , γ et δ) diffèrent par la position des substitutions en C5, C7 et C8 de l'anneau aromatique (Figure 9).

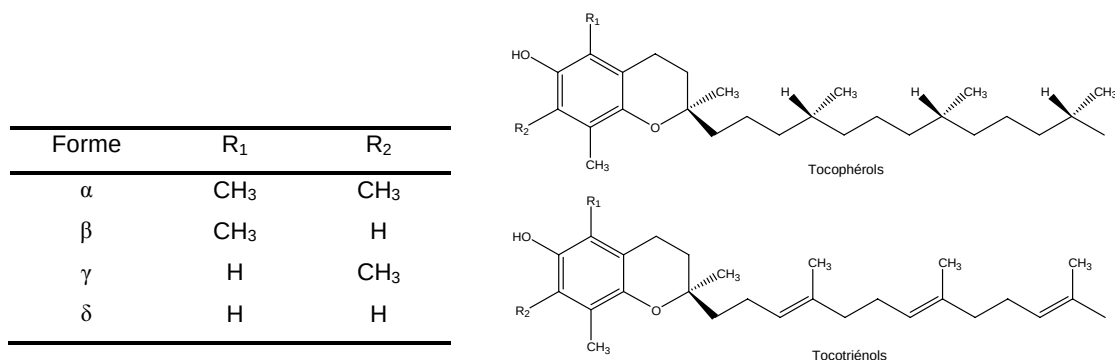


Figure 9. Structure des tocophérols et des tocotriénols.

Tous les isomères naturels des tocophérols ont la même configuration moléculaire, la forme RRR (Elmadfa et Wagner, 2003; Lodge, 2005) qui est par ailleurs, parmi les 8 stéréoisomères possibles, la forme la plus efficace biologiquement (Burton, *et al.*, 1998; Igarashi et Kiyose, 1999; Stone, *et al.*, 2003).

Les tocophérols purs se présentent à température ambiante sous la forme d'une huile jaune pâle, visqueuse (température de fusion : 3°C), solubles dans les solvants apolaires comme l'hexane et insolubles dans l'eau. Ils sont très facilement oxydés en contact avec l'air mais également avec d'autres oxydants tels que les ions métalliques et la lumière. Sous conditions inertes, les tocophérols sont résistants à la chaleur (distillation à 200°C) (Netscher, 1999).

Tableau 6. Composition de l'insaponifiable des principales graines des zones tempérées (Merrien, et al., 1992)

Huiles Insaponifiable	Tournesol	Colza	Soja	Maïs	Pépin de raisin	Carthame	Sésame	Lin	Amande	Noisette	Noix
	0,5-1,5	0,7-1,8	0,5-1,6	0,8-2	0,8-1,5	0,5-1,5	0,5-1	0,5-1,3	0,2-0,3	0,3-0,7	0,5-1
STÉROLS											
Teneur (mg / g CG)	325-515	540-880	250-418	830-2550	259-418	240-380	539-636	200-410	120-400	75-195	170-245
Composition (%)											
Cholestérol	< 0,4	< 4	< 1	< 1	< 0,5	< 0,2	< 0,3	1- 2	< 1	< 1	< 0,5
Brassicastérol	-	13-17	-	-	-	-	<0,1	0-1	-	<0,5	< 0,4
Campestérol	8-11	28-40	19-23	16-21	11-15	10-16	18-19	28-29	2-3	4-7	4-7
Stigmastérol	7-10	< 1	17-19	4-10	8-12	8-15	6-7	9-10	0-1	< 2	< 2
β-sitostérol	58-64	45-61	47-59	63-70	66-73	52-60	59-62	44-53	74-87	82-88	82-90
Δ ⁵ -avénastérol	2-7	1-3	2-4	1-9	2-4	-	10-11	10-13	7-20	2-5	4-7
Δ ⁷ -stigmastérol	9-14	1-3	1-3	< 1	< 3	15-22	0,6-0,8	1-4	0-5	1-3	<4
Δ ⁷ -avénastérol	4-6	1-3	1-2	< 1	1-3	-	0,8-1,1	< 1	0-4	1-6	<1
Isofucostérol	0,4-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fucostérol	2-3	-	-	-	< 2	-	< 0,5	-	-	-	< 0,3
Ergostérol	-	-	< 3	1-2	< 2	-	-	-	-	-	< 1
TOCOPHÉROLS											
Teneur (mg / 100g CG)	44-120	60-87	80-107	113-183	32-52	30-60	20-50	110-130	25-56	30-55	55-60
Composition (%)											
α- tocophérol	91-97	25-38	5-10	8-22	26-39	83-96	4	-	92-99	79-98	1-5
β-tocophérol	3-6	0-5	2-3	< 3	2-14	2-3	2	-	< 1	2-4	< 2
γ-tocophérol	< 2	62-70	44-60	68-89	10-34	7-17	83	-	1-7	2-19	82-95
δ-tocophérol	-	0-6	30-43	2-7	< 2	1-4	11	-	-	1-6	4-15
Tocotriénol	-	-	-	-	24-60	-	-	-	-	-	-
HYDROCARBURES											
Teneur (mg / 100g CG)	15-20	35-44	-	40	-	126-162	200	80-100	470	-	270-392
TRITERPÈNES											
Teneur (mg / 100 g CG)	100	76-108	-	-	>2	60-66	180	150	40-70	-	50-180

La synthèse chimique de l' α -tocophérol (Netscher, 1999; Chênevert et Courchesne, 2002) est possible à partir des autres formes, mais cette synthèse produit un mélange racémique de 8 stéréoisomères (RRR, RRS, RSR, RSS, SSS, SRR, SRS, SSR) ; c'est ce mélange qui est vendu comme complément vitaminique E.

5.1.2. Biosynthèse des tocophérols

Les tocophérols sont des composés membranaires essentiels synthétisés dans l'enveloppe des chloroplastes (Soll, *et al.*, 1985). La biosynthèse des tocophérols se faisant dans la membrane interne des plastes, l'existence d'un transport vésiculaire permettant de véhiculer les tocophérols de la membrane interne vers la membrane externe a été proposée (Soll, *et al.*, 1985). Ils sont, de plus, situés dans les parties les plus fluides de la membrane (Gómez-Fernández, *et al.*, 2002).

Les tocophérols sont synthétisés par l'union de deux composés issus de deux voies métaboliques différentes : la chaîne prényl latérale (phytyl-diphosphate), produite par la voie de biosynthèse des isoprénoïdes et le noyau chromanol (acide homogentisique-HGA), produit par la voie du shikimate (Vandamme, 1992; Elmadfa et Wagner, 2003; DellaPenna et Pogson, 2006). On obtient alors le 2-méthyl-6-phytylbenzoquinone (MPBQ), premier vrai tocophérol, précurseur commun des quatre formes α , β , γ , δ . Ce précurseur peut subir une méthylation supplémentaire en R2 (2,3-diméthyl-6-phytylplastoquinol – DMPBQ) et la synthèse des tocophérols est alors divisée en deux voies : ces composés seront à l'origine soit des formes δ (précurseurs MPBQ), soit des formes γ (précurseurs DMPBQ). Ces formes δ ou γ peuvent alors être à nouveau méthylées en position R1 (par la γ -méthyltransférase) pour donner respectivement les formes β -, ou α . Cette dernière est finalement la forme la plus hautement méthylée. (DellaPenna et Pogson, 2006) (Figure 10).

Très probablement, les γ - et δ -tocophérols sont synthétisés via la même cyclase. Parallèlement, la méthylation finale qui donne les formes α et β - tocophérols pourrait être catalysée par le même Tocophérol Méthyl Transférase (γ -TMT) (Hofius et Sonnewald, 2003; DellaPenna et Pogson, 2006).

L'augmentation de la teneur en tocophérols et plus particulièrement de la forme alpha (α -tocophérol) reste possible avec la surexpression des Tocophérol Méthyl Transférases (TMT) qui permettent de diminuer la teneur des autres formes tocophérols (Van Eenennaam, *et al.*, 2003; Ajjaw et Shintani, 2004). Cependant, la biosynthèse de l' α -tocophérol est limitée par des conditions stressantes sur la plante (températures élevées et stress hydrique) : d'une part l'activité des γ -TMTs est réduite (Shintani et DellaPenna, 1998; Collakova et DellaPenna, 2003b; Collakova et DellaPenna, 2003a; Kanwischer, *et al.*, 2005), et d'autre part, la teneur en tocochromanols est limitée par la disponibilité des précurseurs tels que l'acide homogentisique (HGA) et le phytol (Karunanandaa, *et al.*, 2005).

Sur des graines de soja, la modification des gènes codant pour les enzymes homogentisate phytilyltransférase (VTE2) et p-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase (HPPD) peut augmenter la teneur en tocophérols jusqu'à 14 fois par rapport au témoin (Karunanandaa, *et al.*, 2005; Valentin et Qi, 2005; Chen, *et al.*, 2006), mais elle exige deux transformations enzymatiques successives la première pour augmenter la teneur en DMPBQ (Activité MPBQ méthyl transférase) et une deuxième impliquant l'activité Tocophérol Méthyl Transférase (γ -TMT) pour transformer le γ -tocophérol résultant en α -tocophérol.

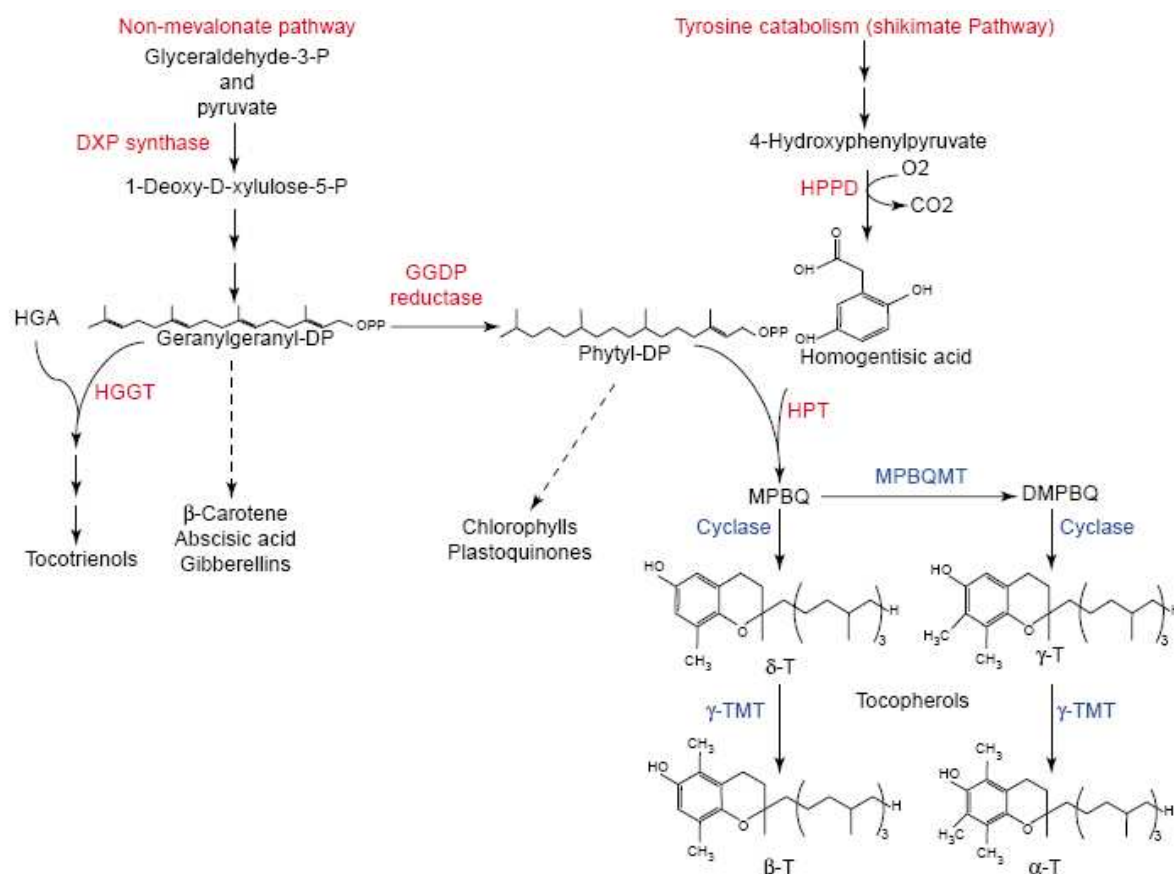


Figure 10. Biosynthèse des tocophérols selon Hofius et Sonnewald, (2003) ; Ajjawi et Shintani, (2004) ; DellaPenna et Pogson, (2006).

Une expérimentation portant sur la localisation de la biosynthèse des tocophérols dans l'épinard montre que la phase finale de cette biosynthèse se produit dans les enveloppes membranaires internes des chloroplastes (Soll, *et al.*, 1985). On suppose que dans les graines en développement, la synthèse a lieu au niveau des proplastides, mais les spécificités de la synthèse des tocophérols dans les graines n'ont pas été étudiées à ce jour.

5.1.3. Rôle physiologique des tocophérols dans la plante

a. Localisation des tocophérols

La distribution des tocophérols dans la plante est variable selon les espèces végétales ; ils sont présents dans les fruits, graines, feuilles et autres parties vertes. Les tocophérols sont localisés dans les plastides, en particulier dans les amyloplastides des graines et des tubercules. On les trouve aussi dans les chloroplastes des tissus photosynthétiques. Les leucoplastes des pétales et les chromoplastes des fruits en contiennent également (Munné-Bosch et Alegre, 2002a).

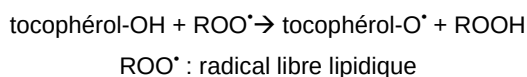
L' α -tocophérol est situé uniquement à l'intérieur des plastides, et le γ -tocophérol principalement à l'extérieur (Booth, 1963; Goffman et Becker, 2002). La forte concentration dans les membranes des chloroplastes peut être liée à la propriété des tocophérols à capter les oxygènes actifs et les radicaux peroxydes (Hofius et Sonnewald, 2003) ; ainsi les tocophérols auraient un rôle protecteur lors de l'assimilation photochimique de la lumière (Munné-Bosch et Alegre, 2002b; Dörmann, 2007).

La fonction et la localisation des tocophérols dans la graine sont moins bien connues. Leur activité antioxydante et leur activité de protection des chaînes polyinsaturées des acides gras implique leur association intime avec les réserves lipidiques (Sattler *et al.*, 2003), et il a été montré chez le tournesol qu'effectivement, les tocophérols font partie intégrante des oléosomes (Fisk *et al.* 2006) qui constituent probablement la seule fraction enrichie de la graine.

b. Rôle des tocophérols dans la plante et la graine

La principale fonction des tocophérols est de stabiliser, rigidifier et réguler la perméabilité des membranes. Par leur activité antioxydante, ils peuvent bloquer la propagation de la peroxydation des lipides à l'intérieur de la membrane, en particulier lors de stress hydriques, où ils contribuent à la photoprotection des chloroplastes (Munné-Bosch et Alegre, 2002b). Une des principales fonctions des tocophérols de la graine serait d'assurer leur viabilité en préservant de l'oxydation les lipides de réserve (Sattler, *et al.*, 2004). Ainsi, durant le stockage des graines, la teneur des différents tocophérols diminue progressivement (Daood, *et al.*, 1996; Lampart-Szczapa, *et al.*, 2003).

L' α -tocophérol protège les lipides tissulaires de l'attaque des radicaux libres en limitant la propagation de la peroxydation dans les membranes car ils forment à partir des radicaux lipidiques des composés plus stables. À la pression d'oxygène normale, le radical lipidique majeur est le radical peroxyde ($\text{ROO}^\bullet$) qui peut se convertir en hydroperoxyde (ROOH) grâce à un donneur d'électrons. Les tocophérols ont la propriété de pouvoir donner un hydrogène de leur groupement phénolique aux radicaux pour les stabiliser et ainsi stopper la propagation en chaîne de l'oxydation (Frankel, 1984; Bramley, *et al.*, 2000) suivant la réaction :



In vivo, l' α -tocophérol a pour fonction de protéger les structures sensibles à l'oxydation comme les lipides et le classement des tocophérols naturels selon leur activité anti-oxydante est : α -tocophérol > β -tocophérol > γ -tocophérol > δ -tocophérol. La réactivité *in vitro* est à l'inverse (Lampi et Kamal-Eldin, 1998; Verleyen, 2002).

Sur des graines de pavot *Papaver somniferum* L. le degré d'oxydation des acides gras augmente de façon corrélée avec le degré d'endommagement des graines et la dégradation du γ -tocophérol (Wagner, *et al.*, 2003). Ce rôle protecteur pourrait expliquer la corrélation mise en évidence par certaines études entre la teneur en tocophérols et le degré d'insaturation des huiles. De même, lors de la thermo-oxydation d'huile de tournesol HO la polymérisation des triacylglycérols est liée à la diminution de la teneur en α - tocophérol (Zacheo *et al.*, 2000 ; Quiles *et al.*, 2002 ; Lampi et Kamal-Eldin, 1998).

Les variétés de tournesol enrichies en δ -tocophérol limitent également la polymérisation des huiles (Neff, *et al.*, 2003; Warner, *et al.*, 2003). Seule la présence de tocophérols, et non la quantité, inhibe la polymérisation des triacylglycérols (Lampi et Piironen, 1999). L'action des tocophérols semble être potentialisée par les phospholipides membranaires (Bandarra, *et al.*, 1999).

5.1.4. Facteurs de variation de la teneur et de la composition en tocophérols dans les graines

La teneur et composition en tocophérols dans les huiles varient selon les espèces végétales et au sein d'une même espèce selon les génotypes (Tableau 7). Parmi les oléagineux, le tournesol se situe entre le colza et le soja avec une teneur totale en tocophérols de 546 à 1872 mg.kg⁻¹ d'huile selon les génotypes (Demurin, *et al.*, 1996; Velasco, *et al.*, 2002; Ayerdi Gotor, *et al.*, 2006).

Tableau 7. Teneur et composition en tocophérols (mg.kg⁻¹ d'huile) dans les principales huiles végétales.

Huiles	Teneur totale en tocophérols	Tocophérols (%)				Auteurs
		α	β	γ	δ	
Amande douce	215	70	1	29	/	(www.foodscience.az.nz, 2007)
Arachide	332	56	1	42	1	(Verleyen, 2002)
	396	40	/	46	14	(De Greyt, <i>et al.</i> , 1998)
	365	36	/	58	6	(Bramley, <i>et al.</i> , 2000)
Argan	600	10	1	75	14	(Khallouki, <i>et al.</i> , 2005)
Carthame	413	83	/	17	/	(Bramley, <i>et al.</i> , 2000)
	n.s.	92	2	5	1	(Lampi, <i>et al.</i> , 2002)
Chanvre	690	7	1	5	87	(Kriese, <i>et al.</i> , 2004)
Colza	n.s.	28	/	71	2	(Grusak et DellaPenna, 1999)
	254	35	1	63	2	(Bramley, <i>et al.</i> , 2000)
	739	26	/	71	2	(Verleyen, 2002)
Germe de blé	2571	52	28	10	10	(Bramley, <i>et al.</i> , 2000)
	n.s.	64	13	23	/	(Lampi, <i>et al.</i> , 2002)
Maïs	782	14	6	77	3	(Bramley, <i>et al.</i> , 2000)
	540	22	2	73	3	(Warner et Mounts, 1990)
	770	33	/	63	3	(Sánchez-Pérez, <i>et al.</i> , 2000)
Noisette	n.s.	93	>2	3	<1	(Crews, <i>et al.</i> , 2005a)
	n.s.	99	/	1	/	(Bramley, <i>et al.</i> , 2000)
Noix	400	3	/	93	4	(Crews, <i>et al.</i> , 2005b)
Noix coco	11	45	/	55	/	(Bramley, <i>et al.</i> , 2000)
Olive	140	93	/	7	/	(Sánchez-Pérez, <i>et al.</i> , 2000)
	126	94	/	6	/	(Bramley, <i>et al.</i> , 2000)
	108	41	/	58	1	(Verleyen, 2002)
Pépin de courge	678	11	/	72	17	(Stevenson, <i>et al.</i> , 2007)
Soja	1153	7	1	69	23	(Bramley, <i>et al.</i> , 2000)
	1000	12	1	61	26	(Warner et Mounts, 1990)
	1173	12	/	68	20	(Verleyen, 2002)
Sésame	447	32	/	68	/	(Verleyen, 2002)
Tournesol	n.s.	96	2	2	/	(Grusak et DellaPenna, 1999)
	546	90	/	9	1	(Bramley, <i>et al.</i> , 2000)
	660	92,4	1,5	4,4	1,5	(Warner et Mounts, 1990)
	709	88	7	5	/	(Sánchez-Pérez, <i>et al.</i> , 2000))
	1872	88-96	3-9	1-4	/	(Velasco, <i>et al.</i> , 2002)
	/	/	/	60-97	/	
	n.s.	30	0-77	/	/	(Velasco, <i>et al.</i> , 2004b; Velasco, <i>et al.</i> , 2004c)
		/	/	/	0-68	

n.s. : non spécifié

La variation à la récolte des teneurs en composés mineurs dans l'akène de tournesol est tributaire de deux catégories de facteurs. D'une part, le potentiel génétique va déterminer la composition de l'akène et d'autre part, l'expression du potentiel génétique va être conditionnée par le contexte plus ou moins maîtrisable de la culture (sol & climat et conditions culturales).

a. Facteurs environnementaux

Quelles que soient les espèces, on trouve une part significative de variation due à des effets environnementaux. Ainsi, l'effet du lieu de culture s'est montré significatif sur colza (Marwede, *et al.*, 2004), sur avoine et orge (Peterson et Qureshi, 1993), sur soja (Dolde, *et al.*, 1999) et sur tournesol (Nagao et Yamazaki, 1983; Velasco, *et al.*, 2002).

Bien qu'une action indirecte de la température par le biais des teneurs relatives en acides gras polyinsaturés ait été suggérée (Almonor, *et al.*, 1998), une augmentation de la température entraîne une diminution des tocophérols libres, comme cela a été démontré chez le soja (Dolde, *et al.*, 1999). Cependant ce mécanisme est complexe, et d'autres études, sur le soja, ont mis en évidence une augmentation du métabolisme du δ - ou du γ -tocophérol pour former l' α -tocophérol, en outre l'augmentation totale des tocophérols n'est pas dépendante des niveaux individuels de chaque tocophérol (Britz et Kremer, 2002; McCord, *et al.*, 2004). Cependant, la transposition au tournesol n'est peut être pas aussi simple car cette espèce n'accumule pratiquement que de l' α -tocophérol. Une étude réalisée sur du tournesol montre que l'augmentation de température (3 – 5°C) pendant la phase de remplissage de la graine (0–30 JAF) diminue la teneur totale en tocophérols tandis qu'elle est sans effet sur la période de remplissage 30–45JAF (Izquierdo, *et al.*, 2007).

Le déficit en eau provoque une augmentation de la teneur en tocophérols totaux chez le soja (Britz et Kremer, 2002) et cet effet serait dépendant de la variété. La teneur en tocophérols diminue avec un stockage prolongé des graines simultanément à une réduction de la viabilité des graines (Daood, *et al.*, 1996; Tammela, *et al.*, 2000; Zacheo, *et al.*, 2000; Lampart-Szczapa, *et al.*, 2003). La teneur en tocophérols diminue d'autant plus rapidement que la graine est décortiquée ou endommagée (Zacheo, *et al.*, 1998; Zacheo, *et al.*, 2000; Wagner, *et al.*, 2003).

b. Facteur génétique

La variabilité génétique des teneurs et compositions en tocophérols a été démontrée chez de nombreuses espèces cultivées : colza, soja, avoine, blé, maïs, riz (Dolde, *et al.*, 1999; Kurilich et Juvik, 1999; Goffman et Becker, 2002; Velasco, *et al.*, 2002; Bergman et Xu, 2003; Hampshire, 2003).

Des travaux spécifiques d'amélioration génétique, par sélection ou par transformation sont en cours sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Van Eenennaam, *et al.*, 2003; Ajjawi et Shintani, 2004; Van Eenennaam, *et al.*, 2004), et sur espèces cultivées (maïs, colza) (Rocheford, *et al.*, 2002; Egesel, *et al.*, 2003; Marwede, *et al.*, 2004). Les travaux publiés sur le tournesol sont orientés vers une modification du profil afin d'augmenter son degré de stabilité oxydative. L'huile de tournesol est la seule espèce oléagineuse de grande culture à accumuler essentiellement de l' α -tocophérol (Merrien, *et al.*, 1992). Cependant, de récentes études proposent des génotypes dont la teneur en β -, δ - ou γ -tocophérol est supérieure à celle de l' α -tocophérol (Velasco, *et al.*, 2004b; Velasco, *et al.*, 2004c; Demurin, *et al.*, 2007). L'accumulation des tocophérols serait sous l'influence de deux gènes (Tph1 et Tph2). Ces gènes contrôlent l'accumulation des tocophérols dans la graine de tournesol. Tph1 interviendrait sur la concentration en α - et en β - tocophérol, si l'on se réfère aux voies de synthèse, cette fonction concernerait probablement l'activité MPBQ méthyl transférase (Figure 10). Le gène Tph2 contrôlerait le niveau d' α - et de γ -tocophérols, c'est-à-dire l'activité Gamma Tocophérol Méthyl Transférase (Demurin, *et al.*, 1996). Ces deux locus seraient indépendants (Vera-Ruiz, *et al.*, 2006) car ils sont localisés dans des groupes de liaison différents. Des mutants avec des teneurs élevées en γ -tocophérol (85%), en β -tocophérol (jusqu'à 77%) ou en δ -tocophérol (jusqu'à 73%) ont été obtenus par recombinaison de deux mutations (Velasco, *et al.*, 2004b; García-Moreno, *et al.*, 2006). La teneur en β -tocophérol (jusqu'à 70%) peut être augmentée par une triple mutations des méthyltransférases (Hass, *et al.*, 2006; Tang, *et al.*, 2006).

La conversion des variétés en « High Oleic » semble entraîner une augmentation significative de la teneur en α et β -tocophérol chez le colza (Goffman et Becker, 2002). Il est possible que ce comportement présente une interaction avec l'effet année, et plus particulièrement, la température durant le remplissage de la graine. Des interactions entre profils d'acides gras, température et profils ou teneurs en tocophérols ont aussi été démontrées chez le soja (Britz et Kremer, 2002; McCord, *et al.*, 2004). Demurin *et al.* (1996) ont mis en évidence une corrélation négative entre la teneur en acide oléique (C18 :1) et l'accumulation des tocophérols dans la graine de tournesol tandis que Dolde *et al.* (1999) ont remarqué une évolution similaire avec la teneur totale en acides gras saturés.

L'héritabilité semble plutôt faible pour les lignées fixées, qui présentent une forte interaction génotype $\times$ environnement, comme observé chez le colza (Marwede, *et al.*, 2004). Par contre, la sélection d'hybrides semble plus favorable avec de bonnes valeurs d'héritabilité et un effet moindre de l'environnement chez le maïs (Egesel, *et al.*, 2003). Chez le tournesol, aucune étude de l'héritabilité des teneurs en tocophérols n'a été recensée.

5.2. Les phytostérols

5.2.1. Structures et caractéristiques

Les stérols des plantes, appelés phytostérols, sont des alcools stéroïdes, membres de la famille des terpènes. Les phytostérols sont constitués d'un assemblage tétracyclique cyclopentaphénanthrénique (A, B, C, D) comprenant un groupement hydroxyle en position 3 du cycle A et une chaîne latérale. Les phytostérols ont une structure chimique similaire au cholestérol (Figure 11).

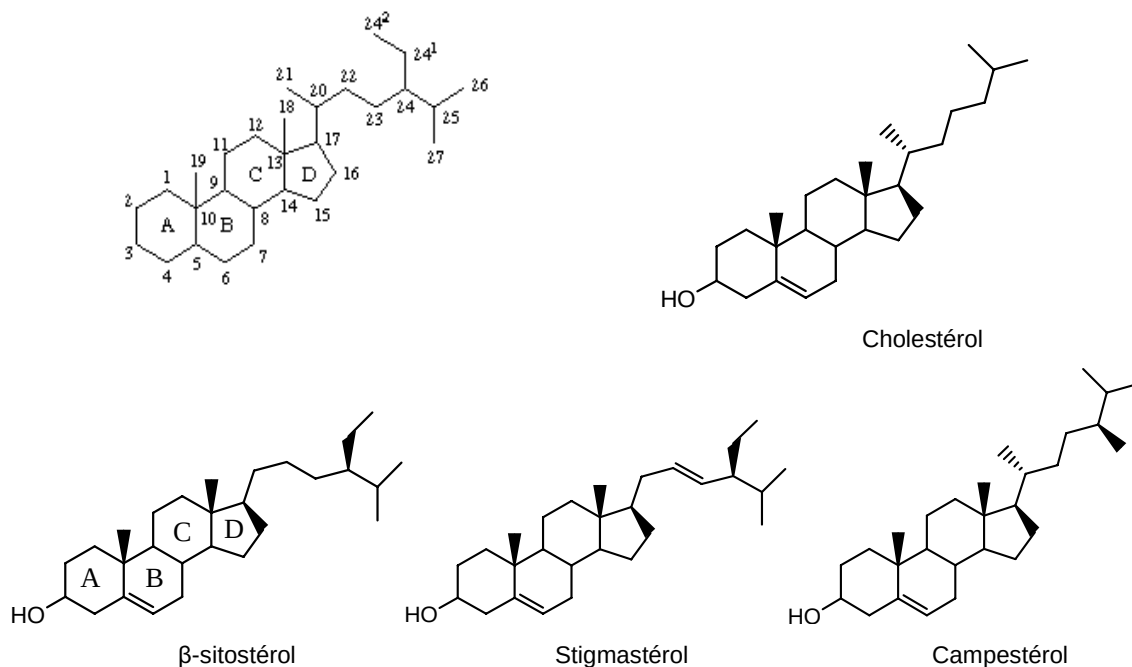


Figure 11. Structure chimique du cholestérol et des principaux phytostérols.

Les principaux phytostérols identifiés chez le tournesol sont par ordre décroissant de teneurs : le β -sitostérol (24 β -éthylcholest-5-èn-3 β -ol), le Δ^7 -stigmastérol (24 α -éthylcholest-7-èn-3 β -ol), le stigmastérol (24 α -éthylcholesta-5,22-dièn-3 β -ol), le Δ^7 -avénastérol (24-éthylidenecholest-7-èn-3 β -ol), le Δ^5 -avénastérol (24-éthylidencholest-5-èn-3 β -ol), le campesterol (24 β -méthylcholest-5-èn-3 β -ol) et le Δ^7 -campesterol (24-

méthylcholest-7-èn-3 β -ol) (Dutta et Normen, 1998; Verleyen, 2002). Les phytostérols sont appelés stanols lorsqu'ils sont hydrogénés. Les stanols sont présents à l'état de traces dans les plantes, les oléagineux et les huiles végétales et en quantités plus importantes lors de la transformation d'un produit pour un usage commercial (Moreau, *et al.*, 2002).

5.2.2. Biosynthèse des phytostérols

Les phytostérols sont synthétisés dans le cytoplasme à partir du squalène via la voie du mévalonate du métabolisme des isoprénoïdes. À partir de la production de l'isopentylpyrophosphate de l'acétyl-CoA via l'acide mévalonique, on obtient le farnesyl diphosphate qui est ensuite condensé en une molécule de squalène. Les étapes qui conduisent au squalène sont très vraisemblablement communes aux deux règnes (animal et végétal). L'étape limitante de la biosynthèse de ce dernier se situe au niveau de l'intervention de la HMG-CoA réductase. Le squalène, grâce à une époxidase, est transformé en cycloarténol ce qui constitue le précurseur de synthèse des alcools triterpènes, des phytostérols et des brassinostéroïdes (Zhou, *et al.*, 2004). Par l'intermédiaire du cycloeucalénol et de l'obtusifoliol, celui-ci conduit aux phytostérols (Figure 12).

La plupart des enzymes qui participent à ces réactions sont associées à la paroi du réticulum endoplasmique avec une participation du plasma membranaire pour certains stérols comme le stigmasterol (Hartmann, 1998). Les phytostérols sont donc synthétisés dans le cytosol et ils sont ensuite véhiculés vers les membranes. Les stérols sont présents sous différentes formes chez les plantes. La forme libre est la plus fréquemment rencontrée. Ils peuvent cependant former des stéryl-glucosides ou des stéryl-glucosides acétylés (Toivo, *et al.*, 2001; Roche, 2005). L'huile de tournesol contient environ 60% des stérols sous forme libre et le reste est sous forme estérifiée (Figure 13) (Phillips, *et al.*, 2002).

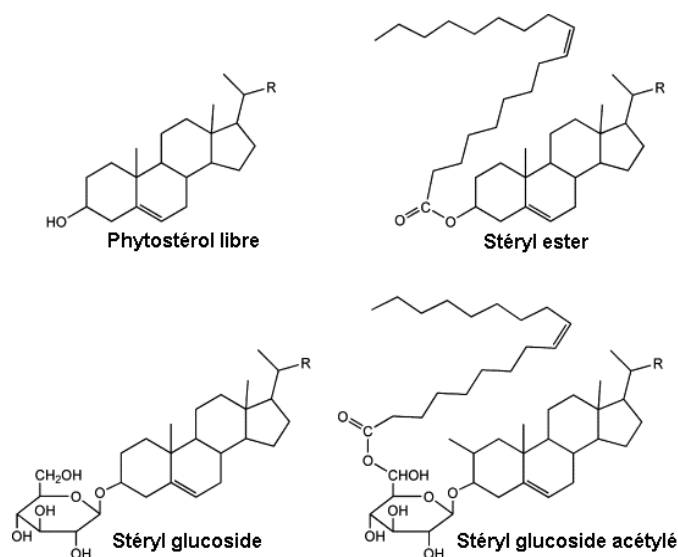


Figure 13. Principales structures conjuguées des phytostérols (Liu *et al.*, 2007).

L'un des facteurs limitants de l'accumulation des phytostérols est la synthèse du mévalonate : celui-ci dépend de l'activité 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase 1 (HMGR1), et lorsque cette enzyme est suractivée, l'accumulation des phytostérols peut être multipliée par 2 ou 3 (Harker, *et al.* 2003; Schaller, 2004 ; Hey, *et al.*, 2006).

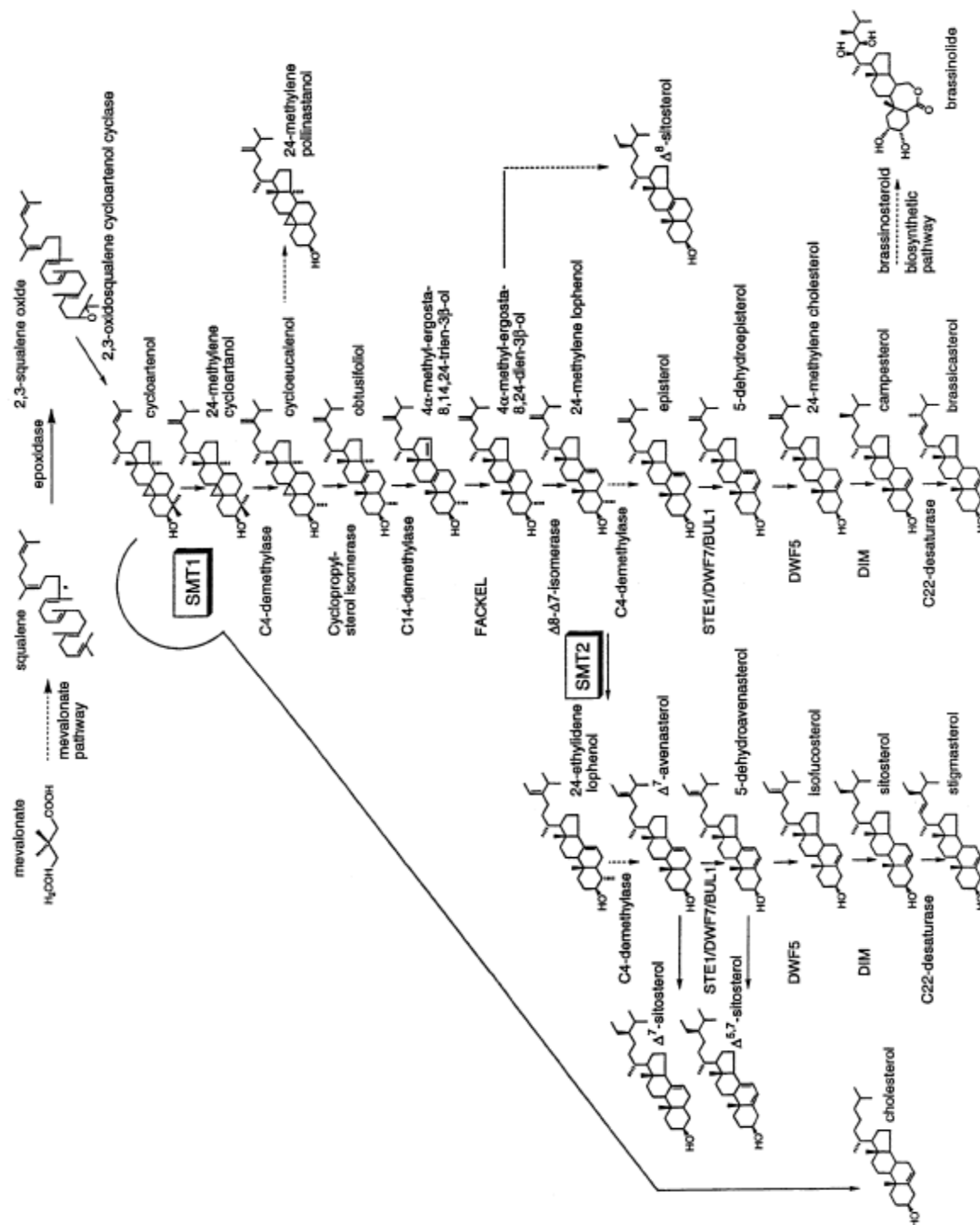


Figure 12. Schéma de la synthèse des différents phytostérols. SMT1, cycloarténol-C24-méthyltransférase; SMT2, 24-méthylène lophénol-C24¹-méthyltransférase; FACKEL, stérol-C14-réductase; STE1/DWF7/BUL1, Δ^7 -stérol-C5(6)-désaturase; DWF5, $\Delta^{5,7}$ -stérol- Δ^7 -réductase; DIM, $\Delta^{24(25)}$ -stérol réductase (Schaller, 2003)

5.2.3. Rôle physiologique des phytostérols dans la plante

a. Localisation des phytostérols

Les phytostérols sont localisés dans les membranes lipidiques cellulaires sous la forme libre (β -OH en C3) (Schaller, 2003). Les stéryl-glucosides et les stéryl-glucosides acétylés sont des molécules conjuguées synthétisées et localisées dans le plasma cellulaire (Schaller, 2003) et qui constitueraient le pôle de réserve des stérols libres (Gondet, *et al.*, 1994; Banas, *et al.*, 2005). Les stérols se trouvent en faibles quantités dans le réticulum endoplasmique, le tonoplaste, les membranes mitochondriales et dans les chloroplastes. Ils ne sont pas présents dans les membranes des thylacoïdes (Hartmann, 1998).

Ainsi, les phytostérols libres ou conjugués sont distribués dans la plupart des cellules végétales, la régulation de la proportion de ces deux formes serait liée à la teneur en formes libres dans le plasma cellulaire.

b. Rôle des phytostérols dans la graine

Les phytostérols, synthétisés dans le cytosol, sont ensuite véhiculés vers les membranes. Ils participent à la composition structurale des membranes. La région lipophile de la molécule est intégrée à l'intérieur de la couche lipidique. Seul le groupement hydroxyle est en contact avec le milieu aqueux. De par leur position au sein de la membrane, les phytostérols participent activement aux contrôles des processus métaboliques qui sont associés aux membranes (Lindsey, *et al.*, 2003). Les phytostérols libres servent à stabiliser les bicouches phospholipidiques dans les membranes cellulaires, à l'identique du cholestérol dans les membranes cellulaires animales (Moreau, *et al.*, 2002). Ils permettent ainsi de rigidifier et de contrôler le niveau de fluidité des membranes cellulaires (Schaller, 2003) en ayant la capacité de restreindre la mobilité des chaînes acyles des graisses (Hartmann, 1998). Cependant leur rôle serait plus actif qu'on ne le pensait initialement : leur implication dans les régulations hormonales est très étudiée, aussi bien en tant que précurseurs des brassinostéroïdes (Diener, *et al.*, 2000; Schaller, 2003), que directement au niveau de l'organisation de la membrane cellulaire, en tant que médiateurs de l'interaction entre les protéines et les lipides membranaires (Lindsey, *et al.*, 2003; Schaller, 2003).

Les phytostérols jouent également un rôle déterminant dans la division et la différenciation cellulaire et plus particulièrement dans la régulation du développement embryonnaire (Clouse, 2000) ainsi que dans la fertilité en facilitant la germination du tube pollinique (Clouse, 2002). Les variations de teneurs en phytostérols pourraient être corrélées avec l'adaptation des plantes à la variation de température (Palta, *et al.*, 1993; Buchanan, 2000). D'autre part, Yoshida et Niki (2003) ont montré un effet antioxydant des phytostérols sur l'huile.

5.2.4. Facteurs de variation de la teneur et de la composition en phytostérols dans les graines

Comme pour les tocophérols, la teneur et composition des phytostérols varie en fonction de l'espèce végétale : soja, colza, tournesol, avoine et selon les variétés (Määtä, *et al.*, 1999; Vlahakis et Hazebroek, 2000) (Tableau 8). La majorité des huiles végétales contiennent de 1 à 5 g de stérols / kg d'huile. L'huile de tournesol contient majoritairement du β -sitostérol devant le campestérol et le stigmastérol. L'huile de tournesol ne contient pratiquement pas de squalène qui participe à la synthèse des graisses et à la formation du cholestérol ce qui lui confère des atouts nutritionnels.

Tableau 8. Teneur et composition en phytostérols (mg.100g⁻¹ d'huile) dans les principales huiles végétales.

Huile	Phytostérols (mg/100g d'huile)				Auteur
	Campestérol	Stigmastérol	β -sitostérol	TOTAL stérols	
Amande douce	5	3	122	143	Instituto de la grasa
Arachide	38	22	169	229	(Verleyen, 2002)
	15	4	68	171	(Phillips, <i>et al.</i> , 2005)
Carthame	49	40	231	444	Instituto de la grasa
	10	34	2	204	(Phillips, <i>et al.</i> , 2005)
Colza	136	-	224	668	(Phillips, <i>et al.</i> , 2005)
	309	-	404	713	(Verleyen, 2002)
	104	3	183	293	(Lechner, <i>et al.</i> , 1999)
Germe de blé	122	traces	303	425	(Verleyen, 2002)
	102	4	304	410	(Ostlund, <i>et al.</i> , 2003)
	37	-	63	%	(Ballesteros, <i>et al.</i> , 1995)
Graine de coton	32	4	357	408	(Verleyen, 2002)
	9	1	75	300	(Phillips, <i>et al.</i> , 2005)
Maïs	24	36	37	n.s.	(Ballesteros, <i>et al.</i> , 1995)
	200	68	646	914	(Verleyen, 2002)
	71	34	291	773	(Phillips, <i>et al.</i> , 2005)
Noix	7	1	140	166	(Crews, <i>et al.</i> , 2005b)
	6	traces	87	108	Instituto de la grasa
	10	1	190	201	(Amaral, 2005)
Noix de coco	3	3	15	73	(Phillips, <i>et al.</i> , 2005)
	6-11,2	11,4-15,6	32,6-50,7	40-120	(Codina.net, 2007)
	8	12	48	69	(Verleyen, 2002)
Olive	2	1	52	150	(Phillips, <i>et al.</i> , 2005)
	5	-	127	193	(Verleyen, 2002)
	2	-	98	n.s.	(Ballesteros, <i>et al.</i> , 1995)
Palme	14	10	43	67	(Verleyen, 2002)
	13	8	34	67	Instituto de la grasa
Sésame	38	9	114	506	(Phillips, <i>et al.</i> , 2005)
	33	22	113	240	(Dachtler, <i>et al.</i> , 2003)
Soja	6	4	40,3	297	(Phillips, <i>et al.</i> , 2005)
	91	82	175	360	(Lechner, <i>et al.</i> , 1999)
	32	35	210	350	(Sánchez-Muniz, <i>et al.</i> , 2004)
Tournesol	34	36	187	350	(Sánchez-Muniz, <i>et al.</i> , 2004)
	12	3	100	352	(Phillips, <i>et al.</i> , 2005)
	31	20	186	350	(Lechner, <i>et al.</i> , 1999)

n.s. non spécifié

a. Facteurs génétiques

Les différences génotypiques ont été observées chez le seigle (Zangenberg, *et al.*, 2004), l'avoine (Määttä, *et al.*, 1999) et l'arachide (Jonjala, *et al.*, 2006) mais les résultats sont contradictoires chez le colza (Beermann, *et al.*, 2003; Hamama, *et al.*, 2003). Il semble que la variabilité génétique soit moins importante pour ces composés que pour les tocophérols. Les premiers résultats obtenus par notre équipe sur le tournesol lors des études préliminaires à ce travail de thèse vont dans ce sens, bien que des différences variétales aient pu être mises en évidence (Ayerdi Gotor, 2004).

b. Facteurs agro-environnementaux

L'effet environnemental affecte significativement la distribution des stérols, cependant l'effet du lieu de culture est beaucoup moins important que sur les tocophérols (Vlahakis et Hazebroek, 2000; Yamada et Toshitaka, 2002; Hamama, *et al.*, 2003; Ayerdi Gotor, 2004; Zangenberg, *et al.*, 2004) voire inexistant sur une culture multilocale d'avoine (Määttä, *et al.*, 1999). Peu d'études relatent des modifications de composition des phytostérols sur la culture du tournesol. D'après Vlahakis et Hazebroek (2000), la teneur totale en phytostérols augmente avec la température durant la maturation de la graine sur du soja. La composition en phytostérols varie significativement, avec une augmentation du pourcentage en campestérol et une faible diminution des teneurs en stigmastérol et en β -sitostérol, lorsque la température augmente. Au contraire, sur du seigle, la teneur totale en phytostérols diminue significativement avec des températures plus élevées (Zangenberg, *et al.*, 2004). Pendant la

maturation des akènes, la cinétique d'accumulation varie selon les différentes formes de phytostérols. Pour le Δ^7 -campestérol et le Δ^7 -avénastérol, l'accumulation se réalise pendant toute la phase de maturation, tandis que pour le campestérol, le stigmastérol et le Δ^7 -stigmastérol, le maximum est atteint avant le 26^{ème} jour après floraison et reste stable ou diminue légèrement, pendant la maturation de l'akène (Mozzon, et al., 1998; Poirier, 2003; Ayerdi Gotor, 2004). Une étude biannuelle portant sur la comparaison de trois hybrides de tournesol (Santiago II, Proléic 204 et Ichraqles) montre que la date de semis influe sur le remplissage de l'akène mais également qu'un apport en eau entraîne une diminution de la teneur en phytostérols (Roche, *et al.*, 2006). La présence de lombrics ou de champignons dans des plantains lancéolés entraîne une augmentation significative de la teneur en phytostérols totaux, en β -sitostérol et en campestérol (Wurst, et al., 2004).

6. Qualité des semences de tournesol

La qualité des semences de tournesol va être déterminée par sa qualité germinative, mais aussi par la composition de sa graine.

6.1. Qualité germinative des semences de tournesol

La qualité germinative des akènes de tournesol est un paramètre de qualité des semences. Au préalable d'une mise sur le marché d'une variété, les entreprises semencières doivent procéder à une détermination du taux de germination qui doit être supérieur à 85% pour que la semence puisse être mise sur le marché (European Community, 2002). Cependant, l'altération des semences est influencée par plusieurs facteurs environnementaux et biologiques qui sont actuellement méconnus. L'effet synergétique d'une température élevée (jusqu'à 50°C) associée à un taux d'humidité relatif proche de la saturation favorise la dégradation des semences (McDonald, 1999). D'autre part, des études ont montré que la présence de moisissures sur des graines réduisait leur viabilité (McDonald, 1999; Merritt, *et al.*, 2003). Ainsi, les conditions de stockage optimales permettent de maintenir la qualité initiale des semences.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'altération de la graine, plusieurs études ont été réalisées dans des conditions accélérées de vieillissement (température, humidité relative, obscurité, oxygène, taux d'endommagement de la graine) afin de déterminer la qualité germinative des graines et l'évolution des teneurs en composés mineurs. Différentes espèces végétales ont été étudiées (Ellis et Roberts, 1980; Zacheo, *et al.*, 1998; Goffman et Mollers, 2000; Zacheo, *et al.*, 2000; Merritt, *et al.*, 2003; Wagner, *et al.*, 2003) et la synthèse de ces études est reportée dans le Tableau 9.

Chez le tournesol, au-dessus de 45°C, les protéines de la graine sont dénaturées et au-delà du troisième jour d'exposition, l'akène n'est plus viable (Corbineau, *et al.*, 2002; Kibinza, *et al.*, 2006). Une augmentation de la teneur en malonyldaldéhyde et en eau oxygénée (H₂O₂) associée à une diminution de la glutathion réductase dans la graine a été observée.

Il existe une relation entre la teneur en acides gras et la germination : une diminution de 15% des acides gras entraîne une perte de 90% du taux de germination (Halder, *et al.*, 1983). Cette diminution du taux de germination serait liée aux composants des membranes cellulaires et plus particulièrement à la peroxydation des lipides (Bewley, 1986). Les antioxydants tels que l' α -tocophérol, la vitamine C et le β -carotène préviennent la formation de ces radicaux libres.

ESPECES	Colza	Amandes	Coquelicot	Acacia	Tournesol	Mais	Tournesol	Soja
	(Goffman et Mollers, 2000)	(Zacheo, et al., 1998; Zacheo, et al., 2000)	(Wagner, et al., 2003)	(Merritt, et al., 2003)	(Corbineau, et al., 2002)	(Tang, et al., 1999)	(Bailly, et al., 2002)	(Marcos-Filho et McDonald, 1998)
FACTEURS ETUDIÉS								
Température (°C)	4, 20, 40	20	40	-196, -18, 5, 23, 50	25, 45	20, 30 40, 50	45	25, 41
Humidité relative (%)	nS	40	nS	5, 11-15, 20-23, 50	nS	100, 120, 140, 160 g/kg	100	100%
Obscurité	Oui	Oui	nS	nS	nS	nS	nS	nS
Oxygène	Oui & Non	Non	nS		nS	nS	nS	nS
Taux d'endommagement (% de graines)	Non	nS	0, 10, 20, 30,40 et 50	nS	nS	Peu endommagés	nS	nS
Durée de l'expérimentation	24 semaines	36 mois	175 jours	18 mois	120 heures	25 jours	5 jours	72 heures
Composantes analysés	Tocophérol (Total et individuels) Plastochromanol-8	Acides gras Tocophérols	Tocophérols A. Gras libres (IA) Degré d'insaturation (II)	Activité antioxydante (inhibition)	Fuite d'électrolytes Teneurs ATP, ADP, AMP Niveau (MDA)	Courbes de survie Vigueur	SD CAT GR MDA H ₂ O ₂	Conductivité électrique RAPD
RÉSULTATS	↑Temp. + O ₂ + durée => ↓50% tocophérol	nS	↓50% γ-tocophérol	Pas de variation avec la viabilité	↑Temp. => ↓ATP, ↓ADP, ↑AMP ↑Temp. => ↓germin. ↑Temp. => ↑MDA => Peroxydation	nS	↓ activité CAT ↓ activité GR ↑ H ₂ O ₂ ↓ Vigueur	↓ Teneur ADN

Tableau 9. Principales études relatant des tests de vieillissement accéléré ; nS : non spécifié.

Par ailleurs, quel que soit le type de vieillissement (accéléré ou naturel), il n'y a pas de différences significatives entre la teneur en tocophérols totaux et le taux de germination (Fielding et Goldsworthy, 1980; Priestley, *et al.*, 1980). Cependant, une étude réalisée sur des graines de Pin montre une perte de la viabilité ainsi qu'une réduction de la teneur en α -tocophérol au cours du temps (Tammela, *et al.*, 2000). Les tocophérols pourraient jouer un rôle important lors de la germination car ils protégeraient l'embryon et les lipides de réserve face aux oxydations dès l'imbibition de la graine quand les mécanismes de germination s'activent et les enzymes reprennent leur activité, mais aussi ils sont nécessaires pour l'activation du système photosynthétique (Kruk, *et al.*, 2005; Krieger-Liszkay et Trebst, 2006).

6.2. La spectrométrie proche infrarouge (SPIR): un outil de diagnostic

6.2.1. Un outil de diagnostic rapide et performant

Depuis une trentaine d'années, l'utilisation de l'analyse dans le proche infrarouge s'est largement répandue dans l'industrie : elle permet des résultats rapides en laboratoire pour le contrôle qualité, une économie substantielle en frais analytique tout en gardant une bonne fiabilité en process et rend possible le contrôle en ligne. Les progrès dans l'instrumentation et en chimiométrie ont permis une croissance soutenue de cette technique.

La spectrométrie est une méthode d'analyse dont le principe repose sur l'absorption de la lumière proche infrarouge (longueurs d'ondes comprises entre le visible et l'infrarouge moyen c'est-à-dire entre 400 et 2500 nm) par la matière organique. La spectrométrie proche infra-rouge (SPIR) permet de doser quantitativement les constituants chimiques constitués d'atomes de carbone, d'oxygène, d'hydrogène, d'azote... reliés entre eux par des liaisons chimiques covalentes. Elle ne dose pas directement un constituant (eau, protéines, matières grasses...) mais le nombre de liaisons chimiques spécifiques du constituant (O-H pour l'eau, N-H pour les protéines, C-H pour les matières grasses,...). Les bandes d'absorption de tous les constituants ou paramètres susceptibles d'être dosés se recouvrent en grande partie dans le proche infrarouge (Figure 14).



Figure 14. Bandes du spectre lumineux.

Il n'est donc pas possible de se contenter d'une mesure d'absorption lumineuse à une seule longueur d'onde qui serait caractéristique du produit à doser, mais au contraire de procéder à une détermination sur une série de plusieurs longueurs d'ondes. La SPIR est une méthode analytique indirecte ; un modèle de prédiction (équation de prédiction ou de calibration) est appliqué au spectre afin de déterminer la concentration d'un composé. Cette équation de prédiction est obtenue après la phase de calibration qui correspond à la mise en corrélation de l'ensemble de données spectrales d'un grand nombre d'échantillons et des valeurs de références respectives du composé que l'on cherche à calibrer (on parle

aussi de méthode comparative). Par le biais des différentes méthodes statistiques (régression en composantes principales, régression linéaire multiple, PLS), on aboutit à une équation de prédiction.

Le grand avantage de cette technique est la facilité d'échantillonnage. C'est une mesure qui peut être non destructive (soja, blé, fruits, foie gras,...). Malgré la lourdeur de la phase d'étalonnage, l'analyse proche infrarouge est une technique qui permet des analyses multi-composants simultanées avec une grande rapidité, une faible quantité de produit et un coût analytique faible.

6.2.2. Développement pour la caractérisation des oléagineux

La spectrométrie proche infrarouge est utilisée pour déterminer différents paramètres sur une grande variété de matrices de graines ou d'huile végétales à partir de la discrimination de certaines bandes d'absorption (Hourant, *et al.*, 2000) : détermination du taux d'humidité, de la teneur en huile, du taux de protéines et de la composition en acides gras par SPIR sur des graines de sésame (Sato, *et al.*, 2003; Sato, *et al.*, 2004) ; du profil d'acides gras sur graines entières de colza (Sato, *et al.*, 1998) ou sur des olives entières (León, *et al.*, 2003).

L'importance du développement d'hybrides de tournesol à haute teneur en acide oléique a impulsé, ces dernières années, de nombreuses études pour évaluer la capacité de la spectrométrie proche infrarouge à prédire la composition en acides gras. La pertinence de la forme de la matrice tournesol a été largement étudiée : akène entier non décortiqué, akène entier décortiqué, akènes broyés ou huile (Sato, *et al.*, 1995; Pérez-Vich, *et al.*, 1998; Velasco, *et al.*, 1999; Velasco, *et al.*, 2004a; Moschner et Biskupek-Korell, 2006; Biskupek-Korel et Moschner, 2007). Les résultats montrent que l'outil SPIR permet de prédire avec un coefficient de détermination supérieur à 98% les teneurs en acide oléique et acide linoléique pour toutes les matrices excepté sur la graine intacte (interférence de la coque noire de la graine). La prédiction des autres acides gras tels que l'acide palmitique et l'acide stéarique est obtenue avec une précision moindre ($R^2 = 80\%$) car la gamme de variabilité des teneurs est plus étroite pour ces deux acides. Une meilleure prédiction des teneurs en acide stéarique a été obtenue par la création d'hybrides mutants enrichis en acide stéarique ; le coefficient de détermination sur une graine entière augmente ($R^2 = 88\%$) (Velasco, *et al.*, 2004a).

L'analyse des composés mineurs par spectrométrie proche infrarouge est un sujet peu exploré dans la littérature. Pour l'analyse des tocophérols, des travaux portant sur la luzerne (González-Martín, *et al.*, 2006) et sur des huiles végétales (Szlyk, *et al.*, 2005) montrent des coefficients de détermination élevés ($R^2 = 99\%$) par rapport à ceux obtenus avec la prédiction des acides gras. L'analyse de la partie stérolique dans l'huile d'olive a été déterminée par spectrométrie de Raman à transformée de Fourier et montre que les bandes des composants comme celles du β -carotène ou de la lutéine peuvent être facilement identifiées (Baeten, *et al.*, 2001).

7. Bilan de la revue bibliographique et présentation des travaux

La France produit 57% du tournesol européen et au niveau national, la région Midi-Pyrénées est le 2^{ème} bassin producteur de tournesol derrière la région Poitou Charente. Bien que la production pour usage industriel soit en progression, l'huile de tournesol est essentiellement destinée à la consommation humaine. L'huile de tournesol bénéficie d'une bonne image, en raison de sa composition équilibrée en acides gras insaturés. Mais sa bonne image provient aussi de sa grande richesse en composés mineurs, notamment en tocophérols (vitamine E), intéressants tout autant pour leur effet santé, que pour leur action anti-rancissement de l'huile. De plus, le tournesol est le seul oléagineux de grande culture dont la graine accumule majoritairement l' α -tocophérol, isomère ayant la plus grande activité vitaminique. L'huile de tournesol présente également un intérêt industriel pour la production d'esters d'acides gras (essentiellement pour les biocarburants). Lors du processus de fabrication, une fraction dite insaponifiable est isolée : on y retrouve les tocophérols et les phytostérols, ce qui en fait un co-produit à fort potentiel de valorisation.

Le développement actuel de la notion d'aliment fonctionnel entraîne une attention croissante concernant les teneurs en composés mineurs à effets santé. L'intérêt pour les tocophérols et les phytostérols s'est considérablement développé ces dernières années. Cependant, peu de travaux ont été publiés à ce jour sur l'amélioration des espèces cultivées pour leur teneur et profil en composés mineurs. Le tournesol jouissant d'une bonne image "santé", il serait intéressant de connaître le potentiel de sélection d'hybrides associant performances agronomiques et teneurs en micronutriments. Ce travail de recherche s'inscrit dans une optique visant le renforcement des débouchés pour la culture du tournesol en Midi-Pyrénées.

Par ailleurs, la capacité germinative des grains peut être altérée par les conditions de stockage. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'altération de la graine, plusieurs études ont été réalisées dans des conditions accélérées de vieillissement sur différentes espèces, afin de déterminer la qualité germinative des graines et de déterminer l'évolution des teneurs en composés mineurs. Sur le tournesol, il serait également intéressant de se demander comment ces deux familles de composés (tocophérols et phytostérols) varient et peuvent affecter la capacité germinative et la vigueur de la plante, ou la capacité de conservation des semences.

Enfin, la méthode par spectrométrie proche infra-rouge est une méthode indirecte qui permet d'analyser facilement et rapidement des échantillons et de déterminer simultanément différents paramètres dans les graines. La littérature montre une gamme diversifiée de calibration pour le tournesol (protéine, humidité, profil d'acides gras, teneur en matière grasse). Cependant, aucune calibration sur les composés mineurs n'a été identifiée dans la littérature.

CHAPITRE II.

Matériel et Méthodes.

Chapitre II.

Matériel et Méthodes

L'étude de la variation des teneurs et des compositions en tocophérols et en phytostérols a été conduite à travers plusieurs volets successifs.

Le premier volet a été consacré à l'évaluation de l'impact de différents facteurs sur la variation des teneurs et compositions en tocophérols et des phytostérols.

- L'étude des cinétiques de remplissage des graines en composés mineurs a été réalisée pendant 2 années, sur des plantes cultivées en champ sur la plate forme expérimentale du CETIOM à Baziège (en 2002) et sur les domaines d'expérimentation de Caussade semences à Caussade (81), d'Euralis à Mondonville (31) et de Syngenta Seeds à St Sauveur (31) (en 2003).
- L'étude de l'effet de la conversion oléique sur les teneurs en tocophérols et phytostérols a été réalisée à travers la collecte de lignées ou d'hybrides classiques et leur conversion oléique issue de quatre années de récolte (2003, 2004, 2005 et 2006). Les paires quasi-isogéniques ont été fournies par les sociétés Monsanto, Ragt/R2n, Soltis et Syngenta Seeds.
- L'étude de l'effet de la température a été réalisée en 2007. Un essai en serre visant à tester l'effet d'un stress thermique lors du remplissage des graines a été mis en place au laboratoire d'Agrophysiologie de l'EI Purpan.
- Enfin, une étude portant sur la variabilité d'hybrides commerciaux a été effectuée à partir de la collecte de quatre hybrides : Allstar RM, Prodisol, Melody et Aurasol sur plusieurs lieux (9) sur trois années (2002, 2003, 2004). Ce matériel, non dédié à l'étude, était issu des essais du réseau CETIOM.

Ces premières études ont montré que la variabilité génétique était suffisante pour aborder dans une deuxième étape, un travail plus approfondi sur le déterminisme génétique des teneurs et compositions en tocophérols et phytostérols.

Ainsi, un deuxième volet a été consacré à l'étude de l'héritabilité des teneurs et des profils des composés mineurs (tocophérols et phytostérols) dans l'akène de tournesol. Un plan de croisement "top cross" de type North Carolina II (Lynch et Walsh, 1998) a été mis en place pour caractériser les aptitudes générales et spécifiques à la combinaison pour ces composés mineurs.

- Tout d'abord, 24 lignées (12 mâles & 12 femelles - lignées A) ont été étudiées au champ en 2004 sur le site expérimental du CETIOM à Encrambade ; 14 lignées ont été retenues, en y incluant les parents de Prodisol et de Melody.
- Un Top Cross (plan de croisement factoriel type NCII : 7 lignées mâles x 7 lignées femelles) a été réalisé en « contre-saison » (octobre à mars 2004 dans l'hémisphère sud) par les sociétés Caussade semences, Maisadour semences, Monsanto Dekalb, Ragt/R2n, Soltis et Syngenta seeds, détenteurs des lignées mâles retenues. Deux témoins (Prodisol et Melody) ont été inclus sur chaque site de production afin de contrôler l'effet lieu. Ainsi, 47 hybrides sur les 49 possibles ont été collectés (2

- croisements ont échoué), avec suffisamment de semences pour faire 2 années d'essais sur 6 lieux par an.
- Les hybrides ont été cultivés sur 6 lieux deux années consécutives (2005, 2006) en y adjoignant 2 hybrides commerciaux (Melody et Prodisol) et 6 lignées publiques (Programme Cartisol) selon un dispositif à 2 répétitions. Les sites choisis étaient représentatifs des zones de culture du tournesol en France. Ce matériel a permis d'estimer des paramètres génétiques (corrélations, héritabilités,...).
 - Trois populations F2 issues des 47 hybrides étudiés ont été choisies, et autofécondées en SSD filière. La production des semences F3 a été réalisée en contre saison (2006/2007) sur environ 180 lignées par croisement à partir des F2 produits sur le site expérimental de Caussade semences à Cayrac (82). En 2007, la génération F3→F4 a été réalisée sur deux lieux en France, l'un au Nord, l'autre au Sud. L'objectif de ce travail est de préparer la recherche de marqueurs et de QTL associés aux teneurs ou profils en tocophérols et phytostérols, en vue d'une utilisation en sélection.

Enfin, ce travail traite de l'étude de la faisabilité d'une prédiction des teneurs en composés mineurs dans les akènes de tournesol par spectrométrie proche infrarouge. Des calibrations ont été réalisées à partir des données collectées sur l'ensemble du matériel végétal issu des différentes études.

La Figure 1 synthétise la répartition de l'ensemble du matériel végétal collecté pour les différentes études.

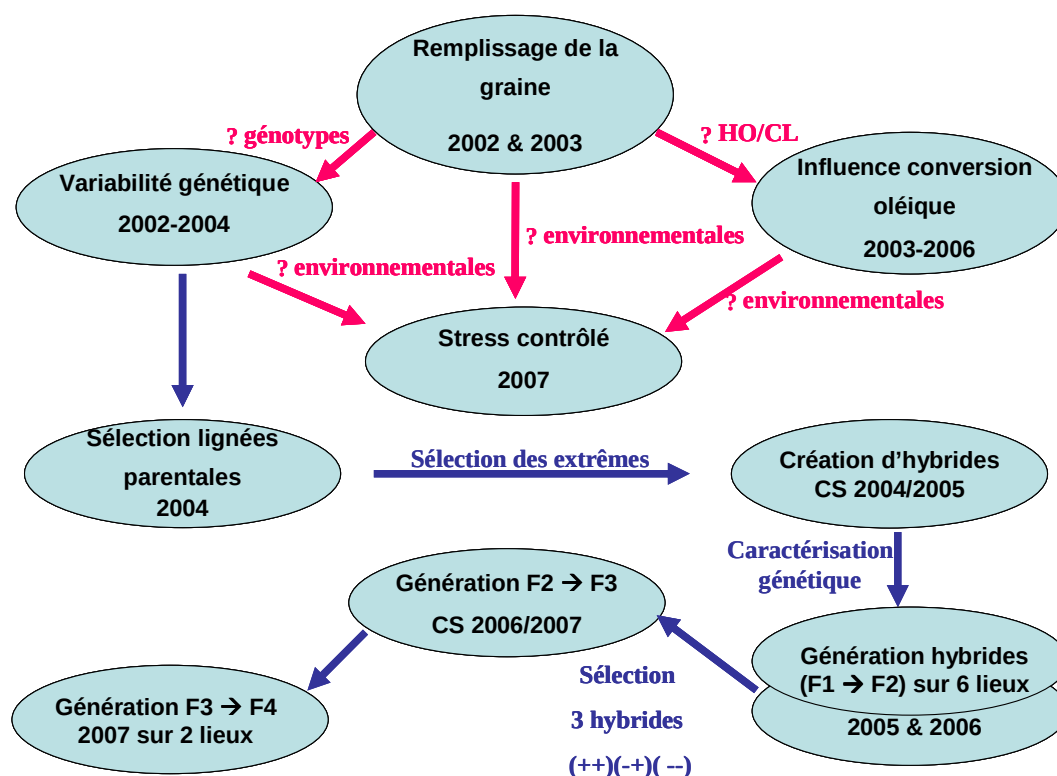


Figure 1. Synthèse de l'ensemble du matériel végétal utilisé et provenant des récoltes des années 2002 à 2007.

Ce chapitre décrit le matériel végétal utilisé dans chaque étude, ainsi que les méthodes analytiques permettant de caractériser les composés mineurs (tocophérols et phytostérols) sur un seul akène ou dans un lot d'akènes ainsi que les traitements statistiques appliqués.

1. Matériel végétal et conduite des essais

1.1. Cinétiques d'accumulation des composés mineurs

Afin d'appréhender le remplissage des akènes en composés mineurs, une étude des cinétiques d'accumulation a été réalisée deux années consécutives sur des plantes cultivées en plein champ, à fin de mieux comprendre l'accumulation ou les pertes qu'arrivent lors de la maturation de la graine en ces molécules. En 2002, un premier essai a été réalisé sur 4 hybrides cultivés à la station expérimentale du CETIOM à Baziège (31). En 2003, cette étude a été étendue à 3 lieux (Mondonville (31), St. Sauveur (31) et Caussade (81)) et comprenait 7 hybrides supplémentaires, afin d'élargir la gamme de précocité et de types (conventionnels et oléiques) (Tableau 1).

Tableau 1. Caractéristiques du matériel végétal (akènes F₂) mis en place en 2002 et 2003.

Année	Nom variété	Type génétique (Hybrides)	Précocité	Obtenteur
2002 & 2003	Allstar RM	conventionnel	précoce	Euralis Semences
	LG 5420M	conventionnel	précoce	Limagrain
	LG 5660	conventionnel	mi-précoce	Limagrain
	Prodisol	conventionnel	précoce	Monsanto Dekalb
2003	Alisson RM	conventionnel	précoce	Euralis Semences
	Alisson RMO	oléique	précoce	Euralis Semences
	Aurasol	oléique	mi-précoce	Monsanto Dekalb
	Melody	conventionnel	mi-tardive	Syngenta Seeds
	Parma	conventionnel	précoce	Maïsador Semences
	Tekny	conventionnel	précoce / mi-précoce	Syngenta Seeds
	Tellia	conventionnel	mi-précoce	RAGT Semences/R2n

Les techniques culturales habituellement utilisées par les entreprises semencières et le CETIOM ont été pratiquées. L'autofécondation a été assurée par empochage des capitules pendant la période de la floraison. Après la floraison, les sacs ont été ouverts, sauf sur le site de St Sauveur (31) où les capitules sont restés empochés jusqu'à la récolte. Les prélèvements effectués à Baziège en 2002 et à Mondonville en 2003 ont été utilisés pour l'étude de la cinétique du remplissage des akènes en tocophérols et phytostérols. La détermination de leurs teneurs et compositions à maturité a été réalisée sur les 4 essais.

Pour les cinétiques, à chaque date de prélèvement, 3 à 5 capitules par parcelle ont été collectés. Pour des raisons d'homogénéité de stade de développement, seuls les trois cercles extérieurs de chaque capitule ont été égrenés. Les akènes des capitules sélectionnés ont été ensuite regroupés par parcelle (Tableau 2), lyophilisés (Lyophilisateur HETO CT 110, Saint Herblain, France) pendant 48 heures puis stockés à – 18°C jusqu'à l'analyse.

Tableau 2. Caractéristiques des prélèvements réalisés en 2002 (4 hybrides) et en 2003 (11 hybrides).

Année	Lieu des essais	Prélèvement intermédiaire (JAF)	Prélèvement final (JAF)
2002	Baziège (31)	20 à 60, tous les 5 jours	60
	Caussade (82)	35	77
2003	Mondonville (31)	20, 30, 40, 53	63
	St. Sauveur (31)	/	65

1.2. Influence de la conversion oléique sur les composés mineurs.

1.2.1. Effet génétique

Pour étudier l'influence de la conversion oléique sur les teneurs en composés mineurs, une collecte de couples de lignées ou d'hybrides, composés par un tournesol dit « classique » (teneur élevée en acide linoléique) et sa lignée (ou hybride) isogénique équivalente convertie par rétrocroisements, dite « oléique » (teneur en acide oléique, > à 75%, introduction de la mutation Pervenets) a été réalisée auprès des partenaires de l'étude (Tableau 3).

Tableau 3. Origine génétique des couples quasi-isogéniques de tournesol oléique vs classique étudiés.

Année	Nombre de couples	Origine génétique des couples Oléique vs. Classique	Obtenteur
2003	7	Lignées parentales isogéniques	Monsanto, RAGT, Soltis Monsanto Dekalb Syngenta Seeds
	4	Hybrides F1 auto fécondés	
	4 x 6	Hybrides F1 auto fécondés cultivés sur 6 lieux	
2004	3	Lignées parentales isogéniques	Monsanto Dekalb, RAGT Syngenta Seeds
	4 x 6	Hybrides F1 auto fécondés cultivés sur 6 lieux	
2005	5	Lignées parentales isogéniques	Monsanto Dekalb, Soltis Syngenta Seeds
	5	Hybrides F1 auto fécondés	
2006	28	Lignées parentales isogéniques, cultivés sur le même lieu	Soltis, Syngenta seeds

Bien que chaque couple ait été cultivé ensemble, l'ensemble des couples n'a pas été produit sur le même lieu (différents obtenteurs) et l'absence de témoins ne permet pas d'estimer la variabilité environnementale. Les akènes ont été collectées par les entreprises semencières, puis récupérés au laboratoire d'Agrophysiologie et stockés dans une chambre froide jusqu'aux analyses.

1.2.2. Effet de la température lors du remplissage de l'akène

Cette partie concerne la mise en place d'un essai dans des conditions contrôlées afin d'étudier l'impact d'un stress thermique sur le remplissage de la graine en composés mineurs. Les deux variétés étudiées sont un hybride F1 à forte teneur en acide linoléique (Alisson RM) et son équivalent converti oléique (Pacific).

Cette étude a été réalisée en serre sur quatre groupes de plantes. Chaque groupe est composé par 12 plantes (6 converties vs 6 classiques). L'autofécondation a été assurée par empochage des capitules. Après la floraison, les sacs ont été ouverts. Pendant toute la durée de l'essai, le groupe 1 (plantes témoins) a été immobilisé en serre. A une période critique du remplissage et pendant un temps déterminé, chaque groupe de plantes (G1, G2 ou G3) a subi un stress en phytotron (VB0714 Vötsch Avantec, Illkirch, France) (Tableau 4).

Tableau 4. Calendrier des stress des différents groupes en fonction de la date de floraison des plantes GH : serre ; PH : phytotron)

	<u>Jour de floraison</u>	10 JAF	17 JAF	23 JAF	30 JAF	40 JAF	47 JAF	Récolte
Témoin Serre	GH	GH	GH	GH	GH	GH	GH	GH
Groupe 1	GH	PH	GH	GH	GH	GH	GH	GH
Groupe 2	GH	GH	GH	PH	GH	GH	GH	GH
Groupe 3	GH	GH	GH	GH	GH	PH	GH	GH

Le groupe devant subir un stress est subdivisé dans 2 phytotrons; une moitié du groupe a subi un stress thermique (25°C la nuit, 35°C le jour), l'autre moitié un traitement contrôle de l'effet de l'éclairement, (18°C la nuit, 25°C le jour). La mesure de l'intensité lumineuse est réalisée en serre et dans les phytotrons à l'aide d'un luxmètre (LI-250A, Eurosep instruments, Saint Chamond, France). Les conditions de culture et les étapes de croissance des plantules et des plantes sont décrites en annexe 1. Les akènes sont récoltés lorsque l'humidité est comprise entre 9 et 12%. Pour des raisons d'homogénéité, seuls les trois cercles extérieurs du capitule ont été égrénés. Les akènes ont été stockés en chambre froide jusqu'aux analyses.

1.3. Etude de la variabilité des teneurs et compositions en tocophérols et phytostérols dans la graine

La part des variabilités environnementale et variétale des composés mineurs a été évaluée en réalisant une collecte de quatre hybrides sur plusieurs lieux (9) et trois années (2002, 2003, 2004). Quatre hybrides commerciaux de tournesol : Allstar RM (Euralis Semences), Melody (Syngenta Seeds), Prodisol (Monsanto Dekalb) et Aurasol (High Oleic, Monsanto Dekalb) ont été collectés sur différentes régions de culture du tournesol en France, via le réseau des essais CETIOM (Tableau 5).

Tableau 5. Hybrides et départements de collecte de 2002 à 2004.

Hybrides	Années de culture		
	2002	2003	2004
	Départements français		
Allstar RM	11-16-17-34-36-37-38-79	11-16-17-26-32-34-36-37-38-58-85-86-89	18-26-31-32-37-39-51-54-84
Aurasol	11-16-17-32-34-36-37-38-79	89	17-18-26-30-31-32-51
Melody	11-16-38	11-16-17-26-32-34-36-38-58-85-86	24-31-38-58-79-84
Prodisol	11-16-17-34-36-37-38-79	11-16-17-26-32-34-36-37-38-58-85-86-89	10-16-18-26-31-32-39-54-84

Selon les protocoles utilisés au CETIOM, chaque essai était composé de 4 blocs avec des parcelles d'environ 30 m² par hybride. Les semis ont été réalisés entre le 1^{er} et le 20 Avril avec une densité de semis de 65.000 grains/ha et une distance entre rangs de 0,25 m. Les principaux traitements réalisés sur la culture sont : l'application de flurochloridone en post-semis et de trifluraline lors du semis; un traitement au métaldehyde (7kg/ha) (lutte contre les limaces); des traitements antifongiques si nécessaire au flusilazole et carbendazime (0.8 L/ ha). Les fertilisations ont été effectuées avant le semis (60 kg P/ ha et 60 kg K/ ha) et lors du semis (50 kg N/ ha avec 1.2 kg B/ ha).

Les données météorologiques ont été prises sur six stations les plus proches possible des essais: Carcassonne (43°13'N, 2°21'E), Montignac (45°47'N, 0°28'E), Auch (43°39'N, 0°35'E), Montaud (45°16'N, 5°34'E), Fours (46°49'N, 3°43'E) et Blagnac (43°38'N, 1°24'E). Quatre paramètres ont été retenus: pluviométrie (mm par jour), température maximale (°C par jour, T_{MAX}), température minimale (°C par jour, T_{MIN}) et la radiation (kW·m²) pour la période entre le premier Avril et le 30 Septembre. Ces données météorologiques ont permis d'estimer l'importance des différences de conditions climatiques en France sur la variabilité des teneurs et compositions en composés mineurs.

1.4. Comparaison de lignées parentales

Une étude comparative de lignées parentales a été réalisée en 2004. Chaque entreprise semencière : Caussade semences, Maisadour semences, Monsanto Dekalb, Ragt/R2n, Soltis et Syngenta Seeds a fourni 4 lignées. Un essai en champ portant sur 24 lignées : 12 mâles (lignées R) et 12 femelles (lignées mâle fertiles A) a été mis en place sur le site expérimental du CETIOM à Villenouvelle (31). Les 24 lignées ont été semées sur 3 blocs, avec une répartition aléatoire dans chaque bloc. L'autofécondation a été assurée par empochage des capitules pendant la période de la floraison (20 capitules par lignée et par bloc) puis les sacs ont été ouverts après la floraison. Pour chaque lignée et chaque bloc, 6 capitules ont été prélevés à 20, 40 et 65 jours après floraison (JAF). Seuls les trois cercles extérieurs du capitule ont été égrénés. Les akènes d'une même lignée et d'un même bloc ont été rassemblés, lyophilisés (HETO CT 110, Saint Herblain, France) pendant 48 heures puis stockés à – 18°C jusqu'à analyse.

1.5. Top Cross ou Plan de croisement North Carolina II

Parmi les 24 lignées parentales cultivées sur le site expérimental du CETIOM à Villenouvelle (31), 6 lignées femelles et 6 lignées mâles ont été choisies en raison de leur plus grande différence dans leurs teneurs en tocophérols et en phytostérols. Le choix du matériel a été réalisé sur l'analyse des 3 blocs à 20 JAF en tenant seulement compte de la teneur en tocophérols. Une lignée supplémentaire mâle et une lignée supplémentaire femelle ont été ajoutées (parents de Prodisol et Melody), en raison des différences de teneurs en tocophérols relevées entre ces deux hybrides au cours des essais précédents.

1.5.1. Création d'hybrides F1 et témoins utilisés

Le plan de croisement a été réalisé sur ces 7 lignées R et 7 lignées B femelles stériles et effectué en contre-saison dans l'hémisphère Sud (octobre 2004 à mars 2005) par les entreprises semencières possédant la lignée R. Sur le site de production, deux témoins (hybrides Prodisol et Melody) ont été inclus afin de contrôler l'effet lieu (Tableau 6).

Tableau 6. Plan de croisement pour la production d'hybrides F1 réalisé en contre saison en 2004/2005. Les cases grisées correspondent aux croisements ayant échoués. (N.B. Les lignées mâles et femelles sont de géotypes différents même si elles portent des lettres identiques).

	Lignées femelles							Semences F1	
	A	B	C	D	E	F	G		
Lignées mâles	A	A X A	B X A	C X A	D X A	E X A	F X A	G X A	Prodisol Melody
	B	A X B	B X B	C X B	D X B	E X B	F X B	G X B	Prodisol Melody
	C	A X C	B X C	C X C	D X C	E X C	F X C	G X C	Prodisol Melody
	D	A X D	B X D	C X D	D X D	E X D	F X D	G X D	Prodisol Melody
	E	A X E	B X E	C X E	D X E	E X E	F X E	G X E	Prodisol Melody
	F	A X F	B X F	C X F	D X F	E X F	F X F	G X F	Prodisol Melody
	G	A X G	B X G	C X G	D X G	E X G	F X G	G X G	Prodisol Melody

Parmi les 47 hybrides récoltés, Melody et Prodisol ont été reconstitués. Au printemps 2005, les hybrides ont été collectés et triés. Ces semences ont été réparties pour les essais multilocaux sur deux ans, un prélèvement a été réalisé pour effectuer les analyses (=étude de graines F1).

1.5.2. Etude des hybrides

Une étude multilocale (6 lieux) et pluriannuelle (2005, 2006) a été menée sur les 47 hybrides en y adjoignant 2 hybrides commerciaux (Melody et Prodisol) et 9 lignées publiques (Programme Cartisol) selon un dispositif à 2 répétitions. Les sites choisis étaient représentatifs des zones de culture du tournesol Nord / Sud en France (Tableau 7).

Tableau 7. Liste des obtenteurs et des sites retenus pour la mise en culture des plantes F1 et la production de graines F2 en 2005 et 2006.

Obtenteur	Lieu de culture	Situation géographique
Caussade semences	Cayrac (82)	44°60'N 1°28'E
Maïsadour semences	Conan (41)	47°48'N 1°15'E
Monsanto Dekalb	Savenes (82)	43°49' N 1°11'E
RAGT/R2N	Villampuy (28)	48°20'N 1°30'E
Soltis	Mondonville (31)	43°40'N 1°17'E
Syngenta seeds	St. Sauveur (31)	43°45'N 1°24'E

Les capitules ont été empochés pendant la floraison puis les sacs ont été ouverts. A maturité, 5 capitules par hybride et par répétition ont été collectés. Les akènes ont été regroupés par hybride et par répétition puis stockés à température ambiante jusqu'à analyse.

1.5.3. Production des lignées recombinantes

a. Génération F2→F3

Trois populations F2 issues des 47 hybrides étudiés ont été sélectionnées. La sélection des croisements F5C x R5A; F5E x R5C ; F5C x R5D sera justifiée dans le chapitre IV. La génération F2→F3 a été réalisée en contre saison (2006/2007) au Chili à partir des graines F2 produites sur le site expérimental de Caussade semences à Cayrac (82). 180 capitules par population F2, avec plus de 100 akènes par capitule pour le semis et l'analyse au laboratoire ont été produits.

b. Génération F3→F4

La génération F3→F4 a été réalisée en 2007. Les 3 populations de lignées recombinantes sélectionnées ont été cultivées chacune sur deux lieux, l'un au Nord, l'autre au Sud (Tableau 8).

Tableau 8. Répartition des populations de lignées recombinantes et des lieux de culture entre les entreprises semencières pour la production des semences F4 en 2007.

Entreprise semencière	Croisement (population de 180 lignées recombinantes)	Lieu de culture
Caussade semences	C x D	Cayrac (82)
Maïsadour semences	C x D	Conan (41)
Monsanto Dekalb	C x A	St. Amand (41)
RAGT/R2N	E x C	Châtellerauld (86)
Soltis	E x C	Mondonville (31)
Syngenta seeds	C x A	St. Sauveur (31)

Sur chaque site, 180 lignes par population ont été semées (40 plantes/ligne) ; de plus, 5 lignées Cartisol et deux hybrides (Melody et Prodisol) ont été également mis en place afin d'évaluer l'effet lieu. Trois capitules ont été empochés par lignée ; les akènes d'un capitule ont été utilisées pour la prochaine multiplication ; et les deux autres pour les analyses.

1.6. Etude de l'effet du stockage sur la teneur en tocophérols et en phytostérols par des tests de vieillissement accélérés et de germination

L'étude des cinétiques des teneurs en composés mineurs au cours du vieillissement accéléré des akènes a été menée sur trois hybrides Alisson RM (Euralis), Alisson RMO (Euralis) (teneurs élevées en tocophérols et phytostérols, R2005) et Melody (teneurs faibles en tocophérols et phytostérols, R2006, Syngenta Seeds). L'étude du transfert des tocophérols entre les cotylédons et le germe a été réalisée sur l'hybride Alisson RM.

1.6.1. Test de vieillissement accéléré

Les hybrides Alisson RM, Alisson RMO et Melody ont subi un vieillissement accéléré dans une étuve (42°C et RH = 100%). La période de stress varie entre 0 et 30 jours d'exposition dans l'étuve : plusieurs prélèvements intermédiaires sont réalisés et plus particulièrement pour la période comprise entre 8 et 12 jours. A chaque prélèvement, les akènes vont subir un test de germination. Les akènes ont été répartis dans différents groupes selon la durée du stress ; chaque groupe contenait 3 répétitions de 20 akènes par hybride.

1.6.2. Test de germination

Dans une première phase, afin de limiter la prolifération des moisissures, les akènes sont lavés dans une solution d'hypochlorite de sodium (2ml/100ml d'eau distillée – 15 min). Les akènes ont ensuite été immergés dans l'eau (2h) pour déclencher la germination, puis ils ont été alignés, par groupe de 20, sur une feuille de papier filtre pliée en accordéon et imbibée d'eau distillée.

L'ensemble est placé dans une chambre de culture (Enceinte climatique 54283 Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) (obscurité, 21°C, RH=100%) pendant 7 jours. Au septième jour après la mise en place de l'essai, chaque plantule¹ est mesurée et classée selon la Figure 2.

Parallèlement à cette expérience, d'autres essais ont été mis en place pour compléter cette étude principale :

- Une étude de l'influence de la lumière sur la teneur en tocophérols et la croissance des plantules a été réalisée. Un test de germination sur des plantes non stressées de 0 à 9 jours a été mis en place dans une chambre de culture (21°C, RH=100%) en présence ou non de lumière. La teneur en tocophérols dans les plantules a été déterminée.

- Une étude de la cinétique de répartition des tocophérols entre le germe et les cotylédons lors de la germination a aussi été réalisée. Des graines de tournesol ont été mises à germer ; une dizaine de graines germées ont été prélevées journalièrement pendant 9 jours. La séparation du germe et des cotylédons a été réalisée sous binoculaire à l'aide d'un scalpel ; chaque partie a été analysée pour sa teneur en tocophérols.

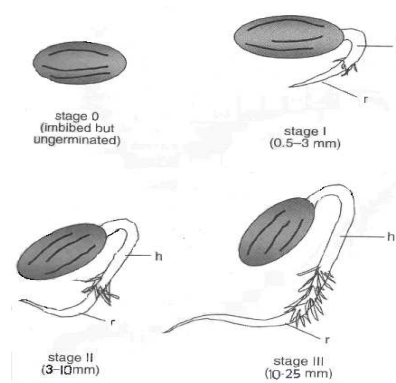


Figure 1. Stades de développement des graines de tournesol de 0 à 7 jours après la mise en germination (Bailly, et al., 2002)

¹ Le mot « plantule » est ici utilisé dans le sens : « Jeune plante germée, se nourrissant encore aux dépens des réserves de la graine ou des cotylédons » (Eveno, 1997).

1.7. Prédiction des composés mineurs par spectrométrie proche infrarouge.

L'objectif de cette partie était de développer une nouvelle méthode rapide pour estimer les teneurs en tocophérols et en phytostérols dans des lots d'akènes broyés. Des jeux d'échantillons ont été utilisés pour réaliser les calibrations et les validations des équations de calibration pour estimer les tocophérols (860/230) et les phytostérols (680/180). Ces échantillons sont issus des différents prélèvements réalisés entre 2002 et 2007.

La mise en place d'équation de calibration sur des akènes broyés restant destructive, une calibration pour estimer la teneur en tocophérols sur un akène entier décortiqué de tournesol a été envisagée. 520 akènes, issus des prélèvements réalisés entre 2004 et 2007, ont été collectés, décortiqués et analysés.

2. Méthodes analytiques

2.1. Détermination des tocophérols et des phytostérols sur un lot d'akènes

Chaque lot d'akènes, réceptionné au Laboratoire d'Agro-Physiologie, a subi le même traitement. Tout d'abord, il a été broyé puis analysé par spectrométrie proche infrarouge (SPIR). Une extraction de l'huile a été réalisée puis les teneurs et compositions des tocophérols ont été déterminées par Chromatographie liquide haute performance (HPLC) tandis que les teneurs et compositions des acides gras et des phytostérols, après dérivatisation, ont été déterminés par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG). Les protocoles de préparation des échantillons et d'analyses sont décrits en détail dans les publications insérées aux Chapitres III et IV de ce document de thèse.

2.1.1. Extraction de l'huile

Deux méthodes ont été utilisées pour l'extraction d'huile. Tout d'abord, la méthode normalisée du Soxhlet NF EN ISO 659 (1998) a été mise en place. Cette méthode s'est avérée longue, fastidieuse et consommatrice de solvant. Au vu du nombre important d'échantillons à traiter au cours de ces travaux, une extraction automatique de l'huile (Accelerator Solvent Extractor) a été développée.

a. Méthode de référence (Soxhlet)

Le protocole de la méthode normalisée du Soxhlet NF EN ISO 659 (1998) est détaillé dans les publications du Chapitre III. L'huile est extraite à l'hexane pendant 4 h, plusieurs extractions sont nécessaires pour extraire la totalité de l'huile

b. Méthode par extraction automatique (ASE)

La méthode par ASE (Accelerated Solvent Extractor) repose sur le même principe que la méthode du Soxhlet. Cette technique d'extraction par solvant fonctionne à des températures et des pressions élevées afin d'accroître l'efficacité de l'extraction. Cette technique présente l'avantage d'être rapide (30 minutes par échantillon) et économe en solvant. La comparaison des différentes techniques d'extraction ainsi que les paramètres déterminant les conditions d'extraction et le nombre de cycles ont été définis par Bruhl & Matthaus (1999). Afin de déterminer les paramètres optimaux d'extraction ASE (Accelerated Solvent Extractor 200 Dionex, Toulouse France), un plan Taguchi a été réalisé en utilisant différentes conditions d'extraction (température, solvant, temps d'extraction, sable) (Tableau 9). Le protocole de la méthode par ASE est détaillé dans la publication du Chapitre IV.

Tableau 9. Conditions d'extraction à l'ASE définies pour déterminer les conditions optimums selon un plan d'expériences Taguchi.

Conditions d'extraction à l'ASE			
Température (°C)	100	Temps d'extraction (min)	5
	110		10
	120		15
Solvant	Hexane	Sable (%)	0
	Hexane 95%, Isopropanol 5%		25
	Ether de pétrole		50

Pour les deux techniques d'extraction, après évaporation du solvant sous vide (Rotavapor, Bioblock Scientific HS 40 HUBER, Heildolph), la quantité d'huile est pesée et exprimée en g d'huile par rapport à 100g de matière sèche. L'huile est stockée dans des piluliers à – 18°C.

2.1.2. Analyse des acides gras

Le protocole est détaillé dans la publication du Chapitre III.3. Il aboutit à la collecte de chromatogrammes dont l'allure est spécifique de la fraction analysée (Figure 3). D'une manière générale, une séparation efficace des 7 acides gras majoritaires est observée. L'ordre d'apparition est croissant en fonction de l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonnée de C16 à C22.

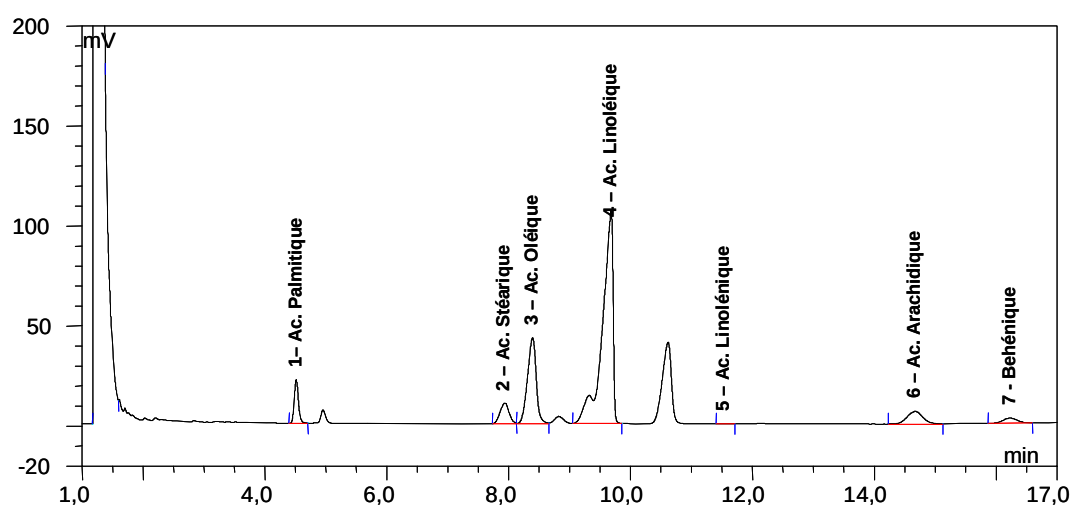


Figure 3. Fractionnement des acides gras par chromatographie en phase gazeuse sur colonne Zébron – FFAP.

La calibration a été réalisée avec différentes concentrations de solutions standards de chaque acide gras. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'acides gras du total présent dans l'échantillon.

2.1.3. Analyse des tocophérols

La détermination de la teneur en tocophérols des huiles brutes a été réalisée selon la norme ISO 9936 (1997). La séparation complète des quatre formes de tocophérol a été obtenue par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en 15 minutes. Chaque échantillon a été dosé deux fois. Le protocole d'analyse des tocophérols est décrit en détail dans les publications insérées aux Chapitres III et IV de ce document de thèse. Les teneurs en tocophérols sont exprimées en mg par kg d'huile (mg.kg^{-1} huile) ou en mg par kg de matière sèche d'akènes (mg.kg^{-1} MS).

2.1.4. Analyse des phytostérols

La détermination de la teneur en phytostérols a été réalisée selon la norme ISO 12228 :1999 (EC, 1995; 1999) sur l'huile extraite. De la même manière que pour les acides gras, les extraits stéroliques doivent être dérivatisés. Le principe de l'analyse des phytostérols est basé sur un isolement de la fraction insaponifiable puis une silylation de cette fraction avant injection directe en chromatographie en phase gazeuse (CPG). Les différents phytostérols ont été quantifiés par une calibration interne à l'aide de la bétuline. Chaque échantillon a été extrait 2 fois et dosé 2 fois. Le protocole d'analyse des phytostérols est décrit en détail dans les publications insérées aux Chapitres III et IV de ce document de thèse. Les teneurs en phytostérols sont exprimées en mg par 100 g d'huile ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ huile) ou en mg par 100 g de matière sèche d'akènes ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ MS).

2.1.5. Répétabilité des analyses

La répétabilité des analyses et l'erreur analytique commise sur l'extraction d'huile, les teneurs en tocophérols par HPLC et les teneurs en phytostérols par CPG ont été déterminées. Deux hybrides commerciaux de tournesol : Melody (M) et Prodisol (P) ayant une teneur en tocophérols respectivement faible et forte ont été mélangés dans différentes proportions. Neuf extractions d'huile par mélange ont été effectuées : 6 par ASE et 3 par soxhlet. Chaque mélange a été caractérisé pour sa teneur en huile, ses teneurs en tocophérols et en phytostérols. Les erreurs standards des moyennes ont été calculées en regroupant par méthode d'extraction les écart-types des répétitions de mesures. La comparaison des méthodes Soxhlet et ASE a montré que ces deux techniques permettent d'extraire la totalité de l'huile et fournissent des teneurs en huile, en tocophérols et en phytostérols identiques (Annexe 2).

En résumé de cette partie, un lot d'akènes réceptionné au laboratoire subira l'ensemble des analyses présenté sur la Figure 4.

2.2. Détermination des tocophérols et des phytostérols dans une plantule.

2.2.1. Extraction à froid de l'huile

Protocole

Les plantules de tournesol séparées en groupes en fonction du jour de prélèvement, longueur du stress et de la longueur de son hypocotyle sont congelées à -18°C (24 heures minimum) et lyophilisées pendant 48 heures minimum. Elles sont broyées avec un moulin (IKA Werke A10, Staufen, Allemagne) deux fois dix secondes pour obtenir une poudre fine et homogène. 0,5g de poudre est pesée au mg près dans un tube en téflon de 20ml préalablement taré. On introduit 2 ml de hexane (qualité HPLC, SDS, France) pour réaliser l'extraction d'huile. L'ensemble est passé au vortex quelques secondes puis placé dans le rotary (Labinco, Hollande) 30 minutes à 50rpm et centrifugés (Centrifugeuse MR23i Jouan, Saint-Herblain, France) pendant 10 minutes à 7000 rpm (20°C). Le surnageant est prélevé et introduit dans un tube à hémolyse, préalablement pesé, l'hexane est évaporée avec de l'azote (Air liquide, France) jusqu'à obtenir une goutte d'huile. Le tube est pesé pour obtenir par différence la quantité d'huile récupérée exprimée en grammes.

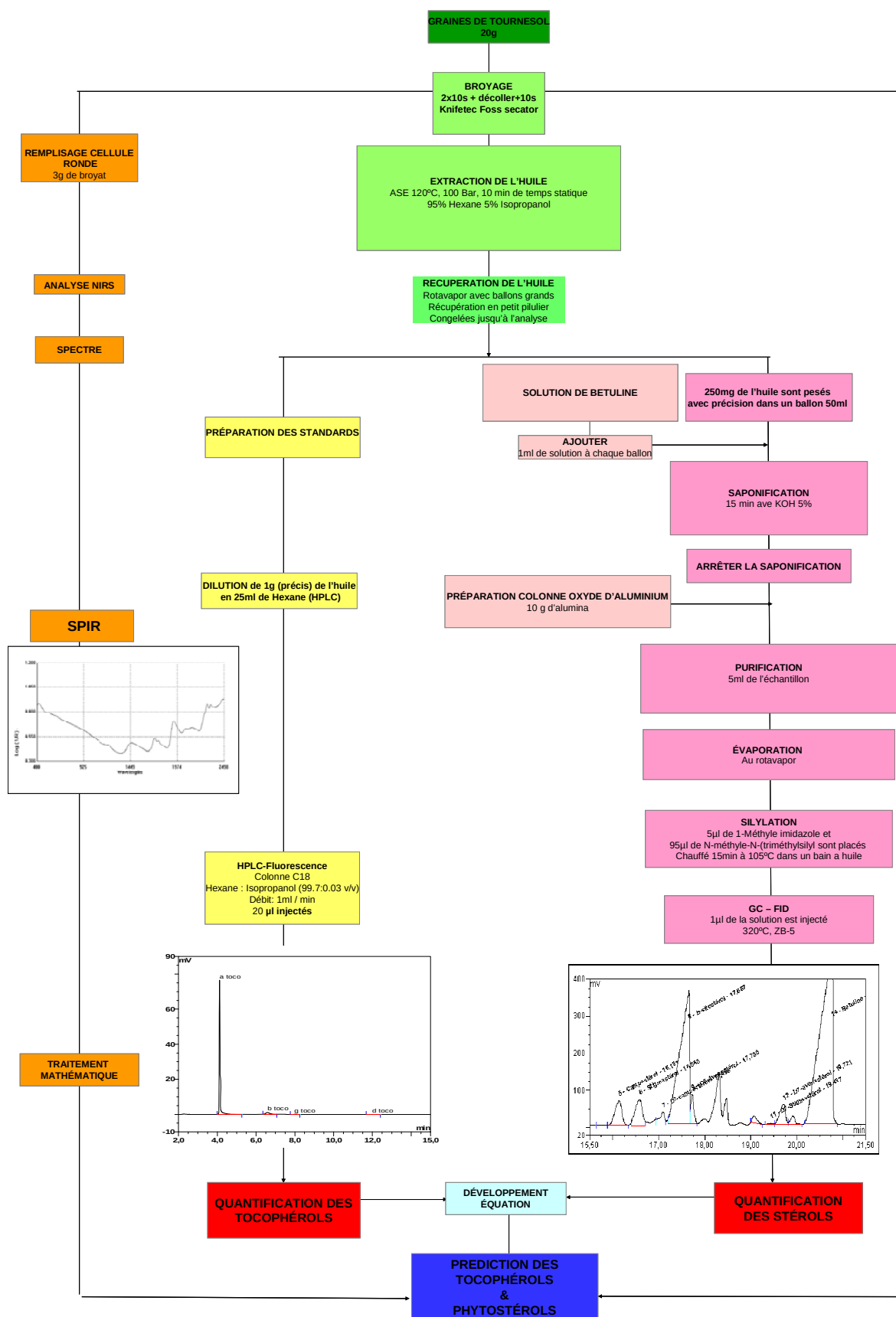


Figure 4. Les différentes étapes d'analyse d'un lot d'akènes de tournesol.

2.2.2. Analyse des tocophérols

Protocole

Le dépôt sur les parois est décollé avec 1ml d'hexane (qualité HPLC, SDS, France). 0,5ml sont prélevés et placés dans un vial pour l'analyse des tocophérols selon la procédure décrite sur graines broyées. Le résultat est exprimé en mg.kg^{-1} d'huile.

2.2.3. Analyse des phytostérols

Protocole

Les 0,4 ml restants sont utilisés pour effectuer l'analyse des phytostérols selon la procédure décrite sur les graines broyées. Le résultat est exprimé en mg.100g^{-1} d'huile.

2.3. Détermination des tocophérols dans un akène de tournesol

2.3.1. Extraction de l'huile

Protocole

L'akène décortiqué de tournesol est broyé à l'aide d'un mortier pendant 10 secondes. Il est ensuite placé dans un tube Eppendorff, un millilitre d'hexane (qualité HPLC, SDS, France) est ajouté. L'extraction d'huile est réalisée en plaçant l'Eppendorff dans le rotary pendant 30 minutes. Le surnageant est prélevé et introduit dans un tube à hémolyse préalablement pesé. L'hexane, contenu dans le surnageant, est évaporé à l'aide d'azote gazeux (Air liquide, France). Le tube à hémolyse ne contenant alors plus que l'huile est pesé pour calculer la teneur en huile exprimée en mg.kg^{-1} d'huile.

2.3.2. Teneur en tocophérols

Protocole

Une fois l'extraction d'huile réalisée, 0,5ml d'hexane (qualité HPLC) sont rajoutés dans le tube à hémolyse. Le mélange est agité rapidement, 0,5ml de ce mélange est prélevé et introduit dans un vial pour l'analyse par HPLC. Le protocole d'analyse par HPLC est identique à celui décrit sur graines broyées.

2.4. Analyse par spectrométrie proche infrarouge

Les spectres correspondant à l'ensemble des lots d'akènes récoltés de 2002 à 2007 ont été collectés avec un appareil de spectrométrie proche infrarouge FOSS NIR system 6500 (Foss Analytical, Nanterre, France). Ce système permet d'enregistrer l'absorption de la lumière de 400 à 2500 nm pour couvrir à la fois le domaine spectral du visible et celui du proche infrarouge. Deux types de cellule ont été retenus : la première cellule, la plus commune, permet d'étudier un broyat de graines; la seconde cellule permet d'étudier une seule graine décortiquée (Figure 5).

Les valeurs de réflectance $[\log(1/R)]$ ont été collectées entre 400 et 2500 nm avec un pas de deux nm. Pour chaque échantillon, l'appareil a effectué 32 enregistrements différents associés à 32 spectres d'une cellule en céramique (blanc). Un spectre moyen final a été obtenu à partir du calcul pour chaque longueur d'onde d'une valeur moyenne : moyenne des enregistrements et de la différence avec la moyenne du blanc. Sur une monograine décortiquée de tournesol, deux répétitions correspondant aux deux faces de la graine ont été réalisées et une moyenne de l'ensemble des enregistrements a donné le spectre moyen final.



Figure 5. Cellules utilisées pour l'analyse par SPIR. 1 : Cellule en quartz pour graines broyées ; 2 : Adaptateur pour une graine de tournesol ; 3 : Plaque en caoutchouc pour fermer la cellule une fois remplie.

3. Traitement des données

3.1. Traitement statistique

Les traitements statistiques ont été réalisés à l'aide de SPSS v11 ou de Statistica v7. Pour les cinétiques d'accumulation, les erreurs standards des moyennes ont été calculées en regroupant les écart-types des répétitions des mesures (s). L'erreur standard d'un point issu de n répétitions est alors notée $SE = \frac{s}{\sqrt{n}}$.

Pour les études de l'effet génétique ou l'effet de l'environnement, les effets ont été testés à l'aide d'analyses de variance adéquates et les moyennes comparées a posteriori par test de Student, Newman et Keuls.

3.2. Traitement du plan de croisement

Le modèle Top Cross (ou North Carolina II) a été le modèle expérimental retenu pour estimer les paramètres génétiques quantitatifs de plante à fleurs (Lynch et Walsh, 1998). Ce modèle implique la totalité des croisements entre deux groupes indépendants d'individus [$i = 1, \dots, N_s$ (mâles) et $j = 1, \dots, N_d$ (femelles)]. Le modèle linéaire du phénotype pour le $k^{\text{ème}}$ descendant du croisement ($i \times j$) a été exprimé par :

$$z_{ijk} = \mu + s_i + d_j + l_{ij} + e_{ijk}.$$

avec :	μ	moyenne phénotypique de la population ;
	s_i et d_j	effets additifs (valeurs de sélection) du $i^{\text{ème}}$ mâle et de la $j^{\text{ème}}$ femelle ;
	l_{ij}	effet non-additif (interaction) dû à la combinaison des gènes des parents i et j ;
	e_{ijk}	déviations entre la valeur phénotypique du descendant k des parents i et j et la valeur prédite par le modèle.

3.2.1. Calcul des variances

Pour le calcul des variances, nous avons posé l'hypothèse que les parents avaient été choisis aléatoirement dans une banque de population élargie. La variance phénotypique totale a été exprimée par :

$$\sigma_z^2 = \sigma_d^2 + \sigma_s^2 + \sigma_l^2 + \sigma_e^2$$

avec :	σ_d^2 et σ_s^2	variance due (d) à l'effet femelle et (s) à l'effet mâle
	σ_l^2	variance d'interaction due à la combinaison des gènes des parents
	σ_e^2	variance environnementale

Tous les termes de cette équation sont indépendants et ont une espérance nulle.

Les effets de ce modèle sont définis par :

$$s_i = \mu_i - \mu \quad ; \quad d_j = \mu_j - \mu \quad ; \quad l_{ij} = \mu_{ij} - \mu - s_i - d_j \quad ; \quad e_{ijk} = z_{ijk} - \mu - s_i - d_j - l_{ij}$$

avec : μ_i et μ_j respectivement, les phénotypes attendus des descendants du père i ou de la mère j ,
 μ_{ij} phénotype attendu du descendant du croisement ($i \times j$).

Le modèle Top Cross (plan de croisement NC II) a la particularité de déterminer les composantes de la variance σ_d^2 et σ_s^2 qui sont, respectivement, équivalentes aux covariances paternelle et maternelle des demi-frères. En utilisant les expressions des covariances entre parents, les composantes observées de la variance peuvent être exprimées selon leurs variances causales génétiques : σ_A^2 , additive, σ_D^2 dominance et d'épistasie de premier ordre AA, AD et DD. La variance des femelles contient en plus les effets maternels qui peuvent être testés par rapport à la variance des lignées mâles.

$$\sigma_d^2 \cong \frac{\sigma_A^2}{4} + \frac{\sigma_{AA}^2}{16} + \sigma_{G_m}^2 + \sigma_{E_c}^2 \quad \text{Équation 1}$$

$$\sigma_s^2 \cong \frac{\sigma_A^2}{4} + \frac{\sigma_{AA}^2}{16} \quad \text{Équation 2}$$

$$\sigma_l^2 \cong \frac{\sigma_D^2}{4} + \frac{\sigma_{AA}^2}{8} + \frac{\sigma_{AD}^2}{8} + \frac{\sigma_{DD}^2}{16} \quad \text{Équation 3}$$

avec : $\sigma_{G_m}^2$ variance due aux effets maternels
 $\sigma_{E_c}^2$ variance due aux effets environnementaux maternels.

Puisque la variance des effets maternels contribue tant aux covariances des frères qu'aux covariances des demi-frères de même origine maternelle. Le Tableau 10 résume les calculs de variances et leur décomposition.

Tableau 10. Description de l'analyse de variance utilisée pour résoudre le modèle North Carolina II.

Facteur	Degrés de liberté	Somme de carrés	E(MS)
Mâles	$N_s - 1$	$nN_s \sum (\bar{z}_{i.} - \bar{z})^2$	$\sigma_e^2 + n\sigma_l^2 + nN_d\sigma_s^2$
Femelles	$N_d - 1$	$nN_d \sum (\bar{z}_{.j} - \bar{z})^2$	$\sigma_e^2 + n\sigma_l^2 + nN_s\sigma_d^2$
Interaction	$(N_s - 1)(N_d - 1)$	$n \sum_{i,j} (z_{ij} - z_{i.} - z_{.j} + \bar{z})^2$	$\sigma_e^2 + n\sigma_l^2$
Erreur	$N_s N_d (n - 1)$	$\sum_{i,j,k} (z_{ijk} - z_{ij})^2$	σ_e^2

3.2.2. Héritabilité

L'héritabilité se calcule en réalisant le rapport entre la variance génétique (part de la variance phénotypique attribuable aux gènes, l'autre part est attribué à l'environnement) et la variance phénotypique (ou variance totale : génétique + environnementale).

- H^2 est plus connue sous le nom d'héritabilité au sens large qui s'exprime par :

$$H^2 = \frac{\text{Variance génotypique } (V_G)}{\text{Variance phénotypique } (V_P)} = \frac{V_G}{V_{Additive} + V_{Dominance} + V_{Environnementale}}$$

- h^2 est l'héritabilité au sens strict. C'est la proportion de variance phénotypique attribuable à la seule variance additive :

$$h^2 = \frac{\text{Variance additive } (V_A)}{\text{Variance phénotypique } (V_P)}$$

Elle représente donc la proportion de variance due aux effets des allèles gènes et par conséquent utilisable en sélection pour créer de nouvelles lignées. On l'utilise pour calculer le progrès génétique.

3.3. Calibration SPIR et procédure de validation

Les calibrations sur lots de graines broyées et sur un akène de tournesol ont été réalisées à l'aide du logiciel WINISI 1.02 (Infrasoft International LLC). Afin de réduire les effets de la diffusion et accroître la contribution de la composition chimique, il a été nécessaire d'effectuer des pré-traitements mathématiques des spectres. Un traitement mathématique des données brutes en dérivée première a été appliqué sur les données spectrales de manière à mieux montrer les pics. Une correction supplémentaire a été appliquée sur les données ce qui a permis à la fois de corriger les dérives de la ligne de base et de mieux séparer les bandes d'absorption tout en réduisant le bruit de fond. Des traitements mathématiques de type SNDV (Standard Normal Variate and Detrending) pour réduire les effets physiques liés à la granulométrie du broyat ont été appliqués sur les spectres avec une dérivée première sur 4 points de mesure suivie d'un lissage également sur 4 points de mesure.

Les modèles développés ont été réalisés en utilisant un algorithme disponible dans le logiciel WINISI (Infrasoft International). Une PLS (Partial Least Squares) modifiée, méthode dérivée de la régression et de l'analyse en composantes principales a été utilisée. Ces modèles sont de la forme :

$Y = \beta_0 + \sum x_i \beta_i$		
avec :	Y	variable à prédire,
	x_i	variable spectrale à une longueur d'onde i
	β_i	coefficients du modèle (à estimer).

Le set d'échantillons d'étalonnage est utilisé pour estimer les coefficients de régression β_i du modèle. Dans les méthodes de régression, la qualité de l'ajustement du modèle a été évaluée à partir de l'erreur type d'étalonnage (Standard error of calibration, SEC) donnée par :

$SEC = [(1/(n - k - 1)) \sum (y_i - Y_i)^2]^{1/2}, \text{ de } i=1 \text{ à } n$		
Avec	n	nombre d'échantillons d'étalonnage,
	k	nombre de variables prédictives incluses dans le modèle,
	y_i	valeur de référence observée (à prédire),
	Y_i	valeur prédite, pour l'échantillon i .

L'équation de calibration ayant le plus fort coefficient de détermination multiple (R^2) et la plus petite erreur standard (SEC) a été retenue et validée avec un jeu de valeurs supplémentaires (set de validation).

L'exactitude de la régression peut être évaluée, sur des échantillons n'ayant pas participé à l'étalonnage, par la racine carrée de l'erreur quadratique (*root mean square error of prediction* ou SEP):

$SEP = [(1/m) \sum (y_i - Y_i)^2]^{1/2}$, de $i=1$ à m		
avec	m	nombre d'échantillons de vérification,
	y_i	valeur de référence observée
	Y_i	valeur prédite, pour l'échantillon i.

Ainsi, la validation de cette équation de calibration pour l'estimation des teneurs en tocophérols totaux et phytostérols totaux dans des akènes de tournesol broyées a été déterminée par les paramètres suivants: l'erreur standard de calibration (SEC), le coefficient de détermination multiple (R^2) en calibration (RSQ), l'erreur standard de validation (SECV), le coefficient de détermination multiple de la validation croisée ($1 - VR$) et l'erreur standard de prédiction (SEP). Le modèle est correctement établi si les deux valeurs SEC et SEP sont voisines l'une de l'autre.

CHAPITRE III.

**Facteurs génotypiques de variabilité des teneurs et compositions en
tocophérols et en phytostérols dans l'akène de tournesol.**

Chapitre III.

Facteurs de variation génotypiques et environnementaux des tocophérols et des phytostérols dans le tournesol.

Les teneurs en tocophérols et en phytostérols des graines d'oléagineux (colza et soja) sont très dépendantes à la fois du facteur génétique et des conditions environnementales de culture de la plante (Verleyen, *et al.*, 2001; Lampi, *et al.*, 2002; Phillips, *et al.*, 2002; Abidi, 2003). Cependant, ces connaissances sont très limitées sur l'espèce tournesol. L'objectif de ce chapitre est de lever une partie des incertitudes sur les différences génotypiques et environnementales pour les teneurs et les compositions en tocophérols et en phytostérols dans l'akène de tournesol.

Ainsi, les expérimentations décrites dans ce chapitre ont été réalisées afin de fournir des éléments permettant de mettre en place une étude de l'héritabilité des composés mineurs. Dans un premier temps, la compréhension du remplissage en tocophérols et en phytostérols pendant le développement de l'akène permettra de déterminer les phases clés d'accumulation de ces composés. Cette approche sera complétée par trois essais : l'un consacré à une étude de l'effet de la conversion oléique sur les teneurs en tocophérols et phytostérols, tandis que le second testera l'effet de températures élevées durant les phases clés du remplissage de la graine. Enfin, une étude multilocale et plurianuelle de la variabilité des teneurs et composition en tocophérols et phytostérols sur des hybrides commerciaux de tournesol. Ces travaux seront présentés sous forme de publication.

1. Accumulation des composés mineurs dans l'akène de tournesol

Comme il a été souligné dans la littérature, les teneurs et les compositions en tocophérols et en phytostérols dans les oléagineux présentent une variation marquée (Abidi, 2001; Verleyen, *et al.*, 2001; Lampi, *et al.*, 2002; Phillips, *et al.*, 2002; Abidi, 2003). Cependant, avant d'aborder l'étude de cette variation, il nous a semblé nécessaire, dans une première phase, d'apporter des connaissances sur le remplissage de l'akène en tocophérols et phytostérols.

En effet, l'accumulation de la matière sèche dans l'akène comporte deux périodes. Pendant la première phase, la matière sèche s'accumule activement dans l'akène, jusqu'à 37–44 jours après floraison (JAF) selon les génotypes (Champolivier et Merrien, 1996; Roche, 2005). L'accumulation des constituants lipidiques débute également lors de cette phase et se poursuit lors d'une seconde phase caractérisée par un plateau au cours duquel l'akène se dessèche. La fraction lipidique commence à s'accumuler dès le 10^{ième} JAF jusqu'à environ 30 JAF, seuil au-delà duquel le pourcentage d'huile se stabilise jusqu'à maturité des akènes (Lagravère, *et al.*, 2004; Roche, 2005). Le génotype module la proportion des acides gras mais l'établissement des proportions d'acides gras s'effectue selon deux phases distinctes : tout d'abord, chez l'hybride classique, une première phase conduit à une augmentation de la fraction oléique (C18:1) qui débute dès la floraison et qui s'étend de 15 à 27

JAF selon les conditions de culture. Une seconde phase conduit à la réduction du pourcentage en C18:1 et à l'accumulation en C18:2. Chez l'hybride oléique, la cinétique de formation de l'acide oléique C18:1 se distingue de celle de l'hybride standard par une hausse continue de C18:1 de 15 JAF jusqu'à 33 à 40 JAF et une phase de stabilisation jusqu'à la maturité. Le taux de C18:2 s'établit de manière inverse à celle du C18:1 aussi bien pour le génotype standard que le génotype oléique. L'acide oléique C18:1 constitue une molécule clé intermédiaire entre les acides gras saturés (C18:0 et C16:0) et insaturés (C18:2) (Lagravère, *et al.*, 2004). Roche *et al.* (2006) ont montré que les quantités d'acides oléique et linoléique accumulées dans les akènes au cours de la maturation étaient significativement affectées par les conditions de culture (température et disponibilité hydrique).

L'objectif de ce volet de travail a été d'identifier la période maximale d'accumulation des tocophérols et des phytostérols dans les akènes de tournesol en maturation. L'évolution du contenu en tocophérols et en phytostérols a été suivie durant 2 campagnes sur des hybrides commerciaux cultivés durant l'été 2002 en plein champ sur la plateforme expérimentale du CETIOM à Baziège et en 2003 sur les domaines d'expérimentation de Caussade semences à Caussade (81), d'Euralis à Mondonville (31) et de Syngenta Seeds à St Sauveur (31).

1.1. Etude des cinétiques d'accumulation des composés mineurs

Les résultats obtenus sur l'étude des cinétiques d'accumulation des tocophérols des phytostérols pendant la maturation des akènes ont fait l'objet de trois publications scientifiques :

AYERDI GOTOR A, CALMON A, BERGER M, LABALETTE F, KLEIN L, 2005. Variability of tocopherols and phytosterols in sunflower hybrids. *NAFAS*, 3(6) : 113-115. (ANNEXE 3)

AYERDI GOTOR A, BERGER M, LABALETTE F, CENTIS S, DAYDE J, CALMON A., 2006. Variabilité des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule. Partie I – Tocophérols. *Oléagineux Corps gras Lipides (O.C.L.)*. 13 (2) : 206-12.

AYERDI GOTOR A, BERGER M, LABALETTE F, CENTIS S, DAYDE J, CALMON A., 2008. Variabilité des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule. Partie II – Phytostérols. *Oléagineux Corps gras Lipides (O.C.L.)*. (en cours de préparation)

Variabilité des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule

Partie I - Tocophérols

Alicia AYERDI GOTOR¹
Monique BERGER¹
Françoise LABALETTE²
Sylvie CENTIS³
Jean DAYDE¹
Anne CALMON¹

¹ Ecole supérieure d'agriculture de Purpan,
Laboratoire d'agro-physiologie
UMR INRA 1054/ESAPurpan,
75 voie du TOEC,
BP 57611,
31076 Toulouse cedex 3, France.
Fax : + 33 (0)5 61 15 30 60
<anne.calmon@esa-purpan.fr>

² Onidol, Organisation nationale
interprofessionnelle des oléagineux,
12 avenue George V,
75008 Paris, France

³ Asedis-so,
39 chemin Virebent,
31200 Toulouse, France

Abstract: The sunflower oil is rich in polyunsaturated fatty acids and in minor components (1 % of the oil fraction) including phytosterols, tocopherols, wax and others components. This study evaluates the content and composition of the tocopherols in four sunflower hybrids during two growing seasons (2002 & 2003) and in seven supplemented hybrids during a multilocal study in 2003. The accumulation of tocopherol in the maturing seeds was studied followed from flowering stage till full maturity. The kinetics of tocopherols was similar to fatty acids: rapid increase prior to 25 Days After Flowering (DAF) and then stabilization after 50 DAF. However, the temperature during the seed development induced changes in the tocopherol content, since the total amount of tocopherols was significantly reduced by high temperatures. On the other hand, the comparison of tocopherol content in the 11 hybrids tested clearly shows the impact of genetic factor concerning the level of tocopherols expressed in the seed. However in this study the genotype-environment interaction was slight. Data provided by this study show that content of tocopherol in the sunflower oil can be promoted though combined action on selection and growth conditions.

Key words: sunflower oil, tocopherols, vitamin E, accumulation, temperature

Introduction

La vitamine E naturelle est un complexe vitaminique liposoluble qui regroupe les tocophérols (4 formes : α , β , γ , δ) et les tocotriénols, composés amphiphiles formés d'une chaîne prényl et d'une tête chromanol [1] (figure 1). Les tocophérols sont prédominants dans ce complexe et toutes les formes naturelles ont la configuration R,R,R [2-4] ; parmi celles-ci, l' α -tocophérol présente l'activité vitaminique la plus élevée. Récemment, de nombreux travaux ont mis en évidence l'effet positif de la vitamine E sur la santé humaine : ainsi, une alimentation supplémentée en vitamine E, seule [5-8] ou en synergie avec les caroténoïdes et la vitamine C [9], diminue le risque de maladies cardiovasculaires et de cancer du côlon. Les tocophérols limitent le développement des lésions artériosclérotiques en empêchant ou en réduisant l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (système de transport du cholestérol et des acides gras) causée par les radicaux libres [6]. Cependant, la vitamine E de synthèse n'est pas équivalente aux formes naturelles car elle présente, pour chacune de ces formes, de 2 à 8 isomères géométriques dont elle est un mélange racémique. Elle ne contient donc qu'une partie de vitamine E équivalente aux molécules naturelles [10], ce qui pose le problème de la restauration en vitamines autorisée dans certains aliments [11]. Aussi, la vitamine E naturelle à dose égale a un potentiel vitaminique plus important que la vitamine E synthétique : le rapport d'équivalence (naturel/synthétique) étant de 1,36:1 [12-14]. La vitamine E est présente dans l'huile de germe de blé, la plupart des graines oléagineuses, les légumes verts, la viande, le jaune d'œuf et les produits laitiers.

Les tocophérols sont synthétisés exclusivement par les plantes ou cyanobactéries, au niveau des membranes chloroplastiques ou proplastiques. La tête chromanol (acide homogentisique - HGA) et la queue hydrophobe (phytyl-diphosphate (phytyl-DP) pour les tocophérols) proviennent de voies métaboliques localisées dans les plastides. L'association des deux parties constitue un précurseur commun aux quatre formes α , β , γ , δ : le 2-méthyl-6-phytylplastoquinol (MPBQ). Celui-ci peut subir une méthylation supplémentaire en R2 (2,3- diméthyl-6-phytylplastoquinol - DMPBQ) et la synthèse des tocophérols est alors divisée en deux voies : ces composés seront à l'origine soit des formes δ (précurseurs MPBQ), soit des formes γ (précurseurs DMPBQ). Ces formes δ ou γ peuvent alors être à nouveau méthylés en position R1 (par la γ -méthyltransférase) pour donner respectivement les formes β ou α . Cette dernière est finalement la forme la plus hautement méthylée [15].

Article reçu le 18 janvier 2006
Accepté le 4 mai 2006

FONDAMENTAL

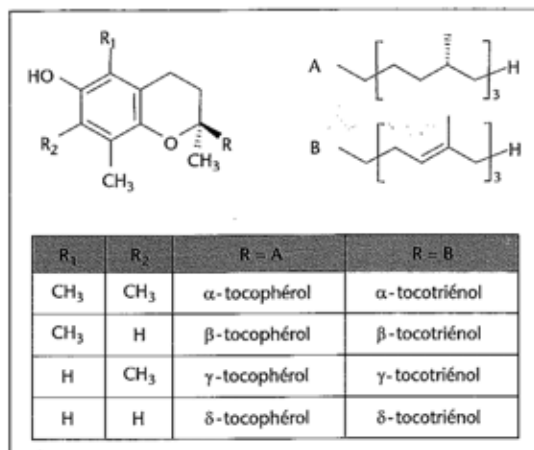


Figure 1. Structure des tocophérols et des tocotriénols (queues hydrophobes : A = Radical phytyle ; B = radical géranyle).

Dans les feuilles, l'α-tocophérol est majoritaire et il a été trouvé en abondance dans l'enveloppe des plastides où il est synthétisé [16], dans les particules lipoprotéiques du stroma des chloroplastes où il est stocké [17] et dans les membranes thylakoïdales [18]. Dans les graines au contraire, on trouve principalement les formes γ et δ. L'activité MPBQ-méthyl transférase, à l'origine de la voie du γ-tocophérol, ainsi que l'activité γ-méthyl transférase, produisant les formes β ou α, jouent un rôle prépondérant sur la composition en tocophérols, mais pas sur la teneur totale [19, 20], celle-ci semble plutôt dépendre de la synthèse des deux sous-parties de la molécule : HGA et phytyl-DP [15].

Le rôle des tocophérols est capital dans les tissus photosynthétiques, où, par leur activité anti-oxydante, ils peuvent bloquer la propagation de la peroxydation des lipides à l'intérieur de la membrane, en particulier lors de stress hydriques, où les tocophérols contribuent à la photoprotection des chloroplastes [19, 21, 22]. Une des principales fonctions des tocophérols de la graine serait d'assurer sa viabilité en préservant de l'oxydation les lipides de réserve [23] ; ainsi, pendant le stockage des graines, la teneur des différents tocophérols diminue progressivement [24, 25]. De même, des lignées mutantes à faible teneur en tocophérols dans la graine présentent une forte altération de leur faculté germinative [23]. Cependant, actuellement, on dispose de peu d'informations sur la biosynthèse et le lieu de stockage des tocophérols dans la graine.

Le tournesol contient entre 400 et 1 200 mg de tocophérols par kg d'huile, et c'est la seule espèce oléagineuse de grande culture à accumuler essentiellement de l'α-tocophérol dont la teneur varie entre 91 et 97 % des tocophérols totaux [26]. Le tournesol est également l'espèce la plus tolérante à la sécheresse et *a fortiori* privilégiée dans le centre-est et le sud de l'Europe (France, Espagne, Hongrie). Sur d'autres espèces (colza, soja) les facteurs génétiques [27-32] et environnementaux (lieux de culture [27, 33], température, stress hydrique) ont une part significative dans la variation des teneurs et compositions des tocophérols. Ainsi les températures élevées [34, 35] ou le déficit hydrique [35] ont une influence négative sur la teneur de l'akène en tocophérols.

Concernant le tournesol, la teneur totale et la composition en tocophérols est influencée par le génotype [27, 36-38] et par les effets environnementaux (lieu de culture) [30]. Toutefois, à notre connaissance aucune étude n'a été entreprise afin d'établir et de compléter les cinétiques de remplissage des akènes en tocophérols à l'aide de plusieurs génotypes et années de culture.

Ainsi l'objectif de cette étude était de mieux comprendre le remplissage des akènes en tocophérols individuels et totaux en suivant des cinétiques d'accumulation des tocophérols au cours de la maturation chez des hybrides commerciaux cultivés dans le sud-ouest de la France pour deux années de culture (2002 et 2003) mais également d'appréhender la variabilité génétique et environnementale en comparant onze hybrides sur trois lieux de culture. Cette étude permettrait d'apporter de nouvelles informations afin de sélectionner des hybrides pour ce critère de qualité de l'huile.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Un essai pluriannuel a été réalisé sur quatre hybrides : en 2002, ces hybrides ont été cultivés à Baziège (31) et en 2003 en répétition sur trois lieux : Mondonville (31), St Sauveur (31) et Caussade (81). De plus, en 2003, l'étude multilocale comprenait sept hybrides supplémentaires (tableau 1).

Les variétés de tournesol ont été cultivées selon les techniques habituellement utilisées par les entreprises semencières et le Cétiom. Sur ces essais, l'autofécondation a été assurée par empochage des capitules pendant la période de la floraison. Après la floraison, les sacs ont été ouverts, sauf sur le site de St Sauveur (31) où les capitules sont restés empochés jusqu'à la récolte. Les prélèvements effectués sur le site de Baziège en 2002 et sur le site de Mondonville en 2003 ont été utilisés pour l'étude de la cinétique du remplissage des akènes en tocophérols et la détermination de leurs teneurs et composition (tableau 2).

Tableau 1. Caractéristiques du matériel végétal (graines F₂) mis en place en 2002 et 2003.

Année	Nom variété	Type génétique (Hybrides)	Précocité	Obtenteur
2002 & 2003	Allstar RM	Classique	Précoce	Euralis Semences
	LGS420	Classique	Précoce	Limagrain
	LGS660	Classique	Mi-précoce	Limagrain
	Prodisol	Classique	Précoce	Monsanto Dekalb
2003	Alisson RM	Classique	Précoce	Euralis Semences
	Alisson RMO	Oléique	Précoce	Euralis Semences
	Aurasol	Oléique	Mi-précoce	Monsanto Dekalb
	Melody	Classique	Mi-tardive	Syngenta Seeds
	Parma	Classique	Précoce	Maisadour Semences
	Tekry	Classique	Précoce / Mi-précoce	Syngenta Seeds
	Tellia	Classique	Mi-précoce	RAGT Semences/R2n

Tableau 2. Caractéristiques des prélèvements mis en place en 2002 sur 4 hybrides et en 2003 sur 11 hybrides au cours de la maturation.

Année	Lieu des essais	Prélèvements intermédiaires jours après floraison (JAF)	Prélèvement final (JAF)
2002	Baziège (31)	20 à 60, tous les 5 jours	60
2003	Caussade (82)	35	77
	Mondonville (31)	20, 30, 40, 53	63
	St Sauveur (31)	/	65

Tableau 3. Descriptif des solutions préparées pour l'étalonnage externe des quatre formes de tocophérols.

Composés	Longueur d'onde	Solution mère (mg / mL de méthanol)	Solutions étalons (µg / mL de méthanol)
α -tocophérol	292	0,1	5, 10, 20, 30 et 50
β -tocophérol	296	0,1	5, 10, 20, 30 et 40
γ -tocophérol	298	0,1	5, 10, 20, 30 et 40
δ -tocophérol	298	0,1	5, 10, 15, 20 et 35

Échantillonnage

Pour chaque date de prélèvement, 3 à 5 capitules par parcelle ont été collectés. Pour des raisons d'homogénéité de stade de développement, seuls les trois cercles extérieurs de chaque capitule ont été égrenés manuellement. Les akènes ont été ensuite regroupés par prélèvement (un par date et par parcelle), lyophilisés (HETO CT 110, Saint Herblain, France) pendant 48 heures puis stockés à -18°C jusqu'à analyse.

Méthodes analytiques

Extraction de l'huile

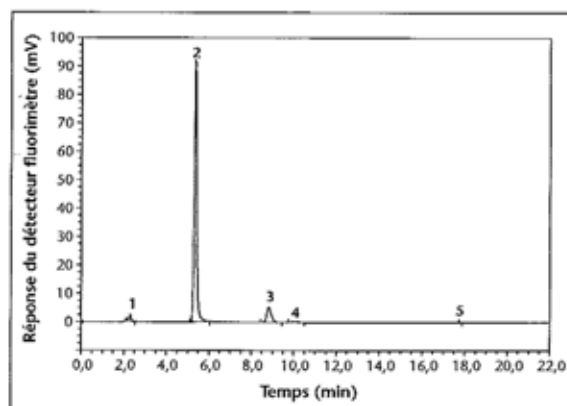
L'huile a été extraite des akènes fraîchement broyés conformément à la norme NF EN ISO 659 [39]. La totalité du prélèvement a été broyée (1095 Knifetec Mill, Foss Tecator, Höganäs Suède), puis deux aliquotes (18 g chacun) ont été placés chacun dans une cartouche de cellulose (Whatman Prolabo/Subra, Toulouse, France). L'huile a été extraite à l'hexane (mélange d'isomères Prolabo/Subra, Toulouse, France) dans un appareil de Soxhlet. Après 4 h d'extraction, l'huile de chaque échantillon a été récupérée sous vide (Rotavapor, Bioblock Scientific HS 40 HUBER, Heildolph) et stockée dans des piluliers à -18°C .

Analyses des tocophérols

La détermination de la teneur en tocophérols des huiles brutes a été réalisée selon la norme ISO 9936 [40]. La séparation complète des quatre formes de tocophérol a été obtenue par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (SpectraPhysics, Thermo Separation Products, USA) équipé d'un passeur d'échantillon AS100. Un aliquote de 20 µL d'un mélange huile/hexane (environ 1 g/25 mL) a été injecté sur une colonne Lichrosorb SI60 (250 cm $\times$ 4 mm $\times$ 5 µm, Cluzeau, France). La phase mobile était un mélange hexane : isopropanol (99,7 : 0,3 v/v) de qualité HPLC (Prolabo, France) de débit 1 mL/min. Les quatre tocophérols ont été élués en 15 min et détectés à l'aide d'un spectromètre à fluorescence (Waters 2475 multi λ), à une longueur d'onde d'excitation de 298 nm et une longueur d'onde d'émission de 344 nm. Le signal a été intégré à l'aide du logiciel PC 1000 de TSP pour OS/2.

Calibration externe

Les quatre formes des tocophérols ont été identifiées et quantifiées par une calibration externe à l'aide de 4 standards de tocophérols (Chromadex, USA). Pour l' α -tocophérol, une solution mère de 0,1 mg/mL a été préparée puis quantifiée précisément par spectrophotométrie UV-Visible (Hitachi U-1100, Les Ulis, France) à 292 nm. À partir de cette solution mère d' α -tocophérol, cinq solutions ont été préparées : 5, 10, 20, 30 et 50 µg/mL et injectées individuellement sur l'HPLC. Les solutions préparées pour la calibration des autres formes de tocophérol sont présentées dans le tableau 3. La préparation des solutions mères et des calibrations ont été répétées à chaque nouvelle série.

Figure 2. Fractionnement des isomères α , β , γ et δ -tocophérols par chromatographie en phase liquide. Pics : 1 : solvant, 2 : α -tocophérol ; 3 : β -tocophérol ; 4 : γ -tocophérol ; 5 : δ -tocophérol. Détection par fluorimétrie : 298 nm (excitation) et 344 nm [émission]).

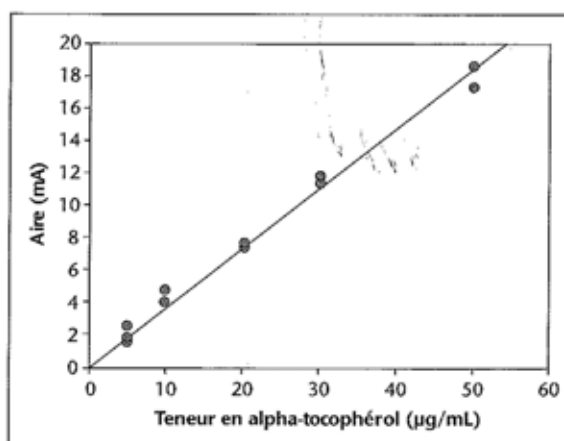
Traitement des données

Les analyses statistiques (corrélations et analyses de la variance (Anova) à deux facteurs) et la comparaison des moyennes ont été réalisées sous Microsoft Excel® pour Windows 97® et sous SPSS 11.5® (SPSS France, Paris).

Résultats

Les teneurs en huile (40-55 %) et le taux d'insaponifiable (0,8-2 %) observés sur l'ensemble des prélèvements sont ceux généralement rencontrés dans l'huile de tournesol [26]. Les chromatogrammes obtenus (figure 2) montrent une séparation efficace des 4 formes de tocophérols, les teneurs en tocotriénols sont inférieures au seuil de détection. L' α -tocophérol est l'isomère majoritaire, il représente entre 90,4 et 98,5 % de la teneur totale, les formes (β et γ) sont minoritaires et la forme (δ) n'est pas détectable. Toutefois, l'huile de tournesol ne contient en général pas de δ -tocophérol ni de tocotriénols détectables [22].

Les droites d'étalonnage pour chaque tocophérol ont toutes été établies avec des coefficients de détermination (R^2) supérieurs à 0,98 (figure 3).

Figure 3. Droite d'étalonnage de l' α -tocophérol (détection : spectromètre à fluorescence).

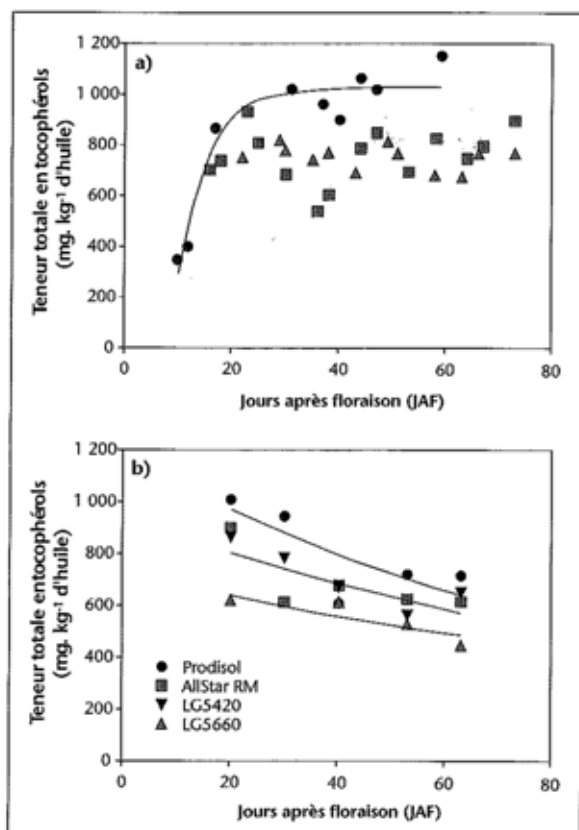


Figure 7. Évolution de la teneur totale en tocophérols (somme des 4 isomères) lors de la maturation des akènes. a. Récolte 2002 – Baziège – France ; b. Récolte 2003 – Mondonville – France.

Les tocophérols totaux

En 2002, on peut observer que la phase d'accumulation active des tocophérols coïncide avec celle des acides gras (figure 7A). Pour la variété Prodisol, des prélèvements ont été réalisés avant 20 JAF et montrent que la teneur en tocophérols augmente rapidement jusqu'au 30^e JAF pour se stabiliser vers une teneur maximale de 1 000 mg.kg⁻¹ d'huile. Pour les variétés Allstar RM et LG5660, l'absence de prélèvement avant le 20^e JAF ne permet pas d'observer cette accumulation. À partir du 25^e JAF la teneur en tocophérols se stabilise à une valeur moindre de 750 mg.kg⁻¹ d'huile.

Pour la récolte 2003, les profils d'accumulation des tocophérols totaux (figure 7b) montrent une relative superposition des profils quelle que soit la variété, cependant ces profils diffèrent des profils précédemment obtenus. Notons qu'avant 20 JAF, aucun prélèvement n'a été effectué, ce qui ne permet pas de rendre compte de l'accumulation des tocophérols totaux. L'absence d'une stabilisation des teneurs en tocophérols peut être justifiée par l'effet des fortes températures pendant cette période induisant une consommation de ceux-ci. Le classement observé en 2002 reste inchangé, la variété Prodisol présente toujours la teneur la plus élevée en tocophérols, avec 750 mg.kg⁻¹ d'huile à maturité.

L'effet de l'environnement, essentiellement de la température, semble être un facteur clé dans la teneur de l'huile en tocophérols. De fortes températures durant le remplissage de l'akène sont susceptibles de limiter l'accumulation des tocophérols, comme il a déjà été observé lors du remplissage de la graine chez le soja [27]. Les températures élevées

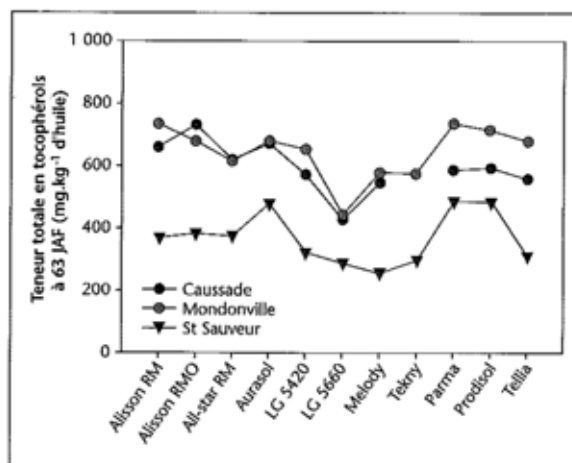


Figure 8. Comparaison de la teneur en tocophérols totaux de 11 hybrides de tournesol sur 3 lieux en 2003 : Caussade (81), Mondonville (31) et St Sauveur (31).

ont une action négative déjà bien connue sur l'appareil végétatif, liée au stress oxydatif dans les chloroplastes : elles entraînent systématiquement une diminution de la teneur totale en tocophérols reflétant leur utilisation pour la préservation des membranes [19]. Les proplastides des cotylédons de l'embryon sembleraient donc avoir le même comportement.

Effets du lieu de culture et du génotype sur la teneur en tocophérols à maturité

La teneur en tocophérols à maturité a été analysée dans l'huile de 11 hybrides cultivés sur trois lieux en 2003 (figure 8). Elle varie entre 261 et 734 mg.kg⁻¹ d'huile, soit entre 89 et 406 mg de tocophérols par kg de matière sèche. La différence très significative entre les essais réalisés à Mondonville (31) et Caussade (82) et ceux réalisés à St Sauveur (31) est probablement liée aux conditions de réalisation de l'essai. En effet, sur le site de St Sauveur les capitules sont restés empochés jusqu'à la récolte. La température moyenne au niveau du capitule a donc été plus élevée, ce qui a amplifié l'effet du stress thermique lors du remplissage des akènes. La teneur en tocophérols apparaît donc ici aussi particulièrement sensible à l'élévation de la température. L'analyse de variance (Anova) montre que les effets génétiques et environnementaux affectent significativement la teneur totale en tocophérols (tableau 4). Bien que significative, l'interaction génotype - lieu ne représente qu'une part minime de la variance totale.

L'effet génotype est également significatif : les variétés Prodisol, Aurasol & Alisson RM montrent un plus fort potentiel de production de tocophé-

Tableau 4. Analyse de variance de 11 hybrides de tournesol cultivés sur trois lieux (Caussade, Mondonville, St Jory) en 2003.

Source de variation	Tocophérols totaux			
	dl	SC	MC	F
Lieu	2	1212324	606162	319,5*
Génotype	9	643992	71555	37,8*
L x G	18	153053	8503	4,5*
Erreur	83	157468	1897	

(dl : degré de liberté ; SC : somme des carrés ; MC : moyenne des carrés ; F : test statistique ; * P < 0,01).

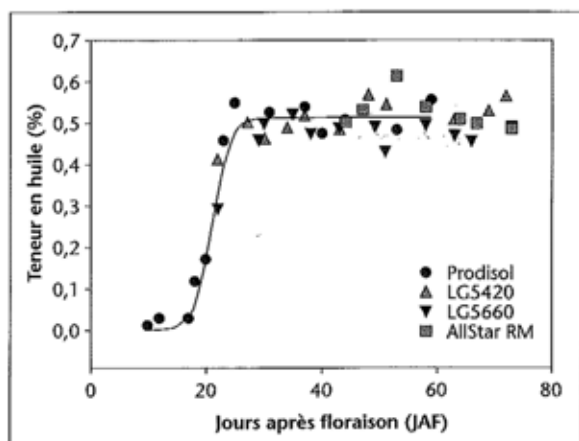


Figure 4. Évolution de la teneur en huile (en % de matière sèche - akènes non décortiqués) pour quatre variétés cultivées en 2002 en un lieu (Bazilège, France).

Les teneurs en tocophérols sont exprimées en mg par kg d'huile (mg.kg^{-1} huile) ou en mg par kg de matière sèche d'akènes (mg.kg^{-1} MS).

Évolution de la teneur en huile au cours de la maturation de la graine

La teneur en huile semble fixée assez tôt chez l'ensemble des variétés étudiées : le plateau est atteint vers le 25^e jour après floraison. Après 35 jours, cette teneur reste relativement stable (figure 4). Les accumulations observées correspondent aux profils établis pour d'autres hybrides de tournesol [41, 42].

Évolution de la teneur en tocophérols au cours de la maturation de l'akène

Les différentes formes de tocophérols

Pour l'ensemble des variétés, dès 25 JAF, l' α -tocophérol représente plus de 90 % des tocophérols totaux. En 2002, cette proportion se stabilise ou augmente encore légèrement jusqu'à maturité (figure 5), tandis que les autres tocophérols (β et γ) diminuent progressivement. Dès 25 JAF, la teneur en γ -tocophérol est très faible (18 mg.kg^{-1} pour Prodisol, 40 mg.kg^{-1} pour AllStar RM et LG5660) par rapport à l' α -tocophérol, et elle ne cesse de décroître jusqu'à maturité (figure 5b). Le γ -tocophérol étant précurseur de la forme α , ce décalage des cinétiques révèle probablement une différence de cinétique d'expression des enzymes qui interviennent séquentiellement dans la synthèse de l' α -tocophérol au niveau des akènes. Le β -tocophérol suit la même cinétique que le γ -tocophérol (à 25 JAF : 98 mg.kg^{-1} pour Prodisol, 20 mg.kg^{-1} pour AllStar RM et LG5660).

En 2002, certaines variétés telles que Prodisol et AllStar-RM montrent une huile qui s'enrichit en α -tocophérol et en tocophérols totaux jusqu'à 75 JAF. Cependant, en 2003, dès 25 JAF la teneur en α -tocophérol tend à décroître et certaines variétés telles que Prodisol et LG5420 perdent jusqu'à plus de 1/3 de leur teneur entre le 25 JAF et 65 JAF (figure 6). Mozzon *et al.* [43] ont montré également, en étudiant une autre variété, que la teneur en α -tocophérol augmente jusqu'à environ 20 JAF puis décroît. Ainsi, la diminution systématique exposée par Prévot [44] ne semble pas de règle, mais plutôt dépendante des conditions environnementales. Il a été montré que la synthèse d' α -tocophérol pouvait être stimulée lors de la réponse à un stress, mais lorsque celui-ci est important, les capacités de régénération deviennent limitantes, et le stress se traduit

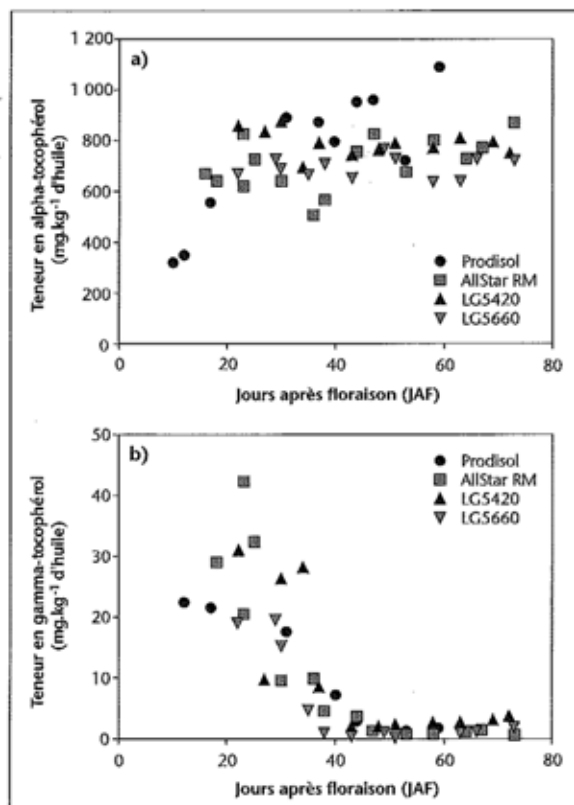


Figure 5. Évolution de la teneur en alpha- (a) et en gamma- (b) tocophérols lors de la maturation des graines de tournesol (récolte 2002 – un lieu (Bazilège, France)).

alors par une perte nette en α -tocophérol [45]. Les conditions rencontrées dans le sud-ouest de la France en 2003, combinant déficit hydrique, températures élevées et fort rayonnement solaire, représentent un stress extrême qui pourrait être à l'origine de la diminution de la teneur en α -tocophérol observée dans cette étude.

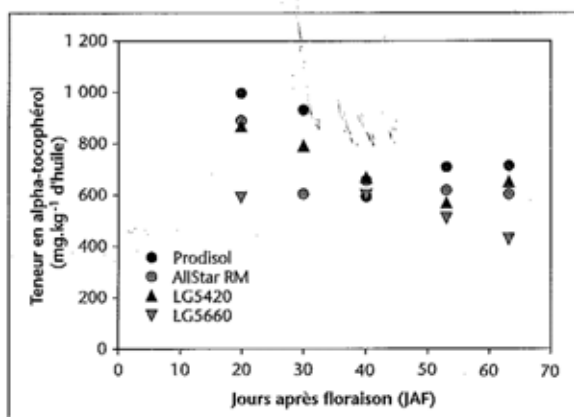


Figure 6. Évolution de la teneur en alpha-tocophérol lors de la maturation des akènes de tournesol (récolte 2003 – un lieu (Mondorville, France)).

rols totaux et d' α -tocophérol que Melody et LG5660. L'étude menée en 2002 corrobore ces tendances, la variété Prodisol présentant une teneur en tocophérols significativement plus élevée que LG5660 (figure 7A). Ces résultats indiquent que les interactions génotype-environnement sont plutôt faibles, étant donné la différence importante de conditions climatiques entre ces deux années.

Discussion

Au cours de ce travail, la teneur et la composition en tocophérols d'hybrides commerciaux ont été analysées. L'étude sur la cinétique de remplissage des akènes en tocophérols montre une augmentation des teneurs jusqu'à 25 JAF puis une stabilisation de ceux-ci. Cependant, au regard des résultats obtenus, la température semble être un facteur clé dans la teneur en tocophérols dans l'huile. Les fortes températures durant le remplissage de l'akène limiteraient l'accumulation des tocophérols afin de préserver du stress oxydatif la plante. Cette étude montre aussi que la variabilité de la teneur en tocophérols dans l'huile de tournesol comprend une composante génétique significative ; ainsi, Prodisol présente en moyenne une teneur en tocophérols totaux de 36 % plus élevée que LG5660. De plus, l'interaction génotype-environnement apparaît plutôt faible dans cette étude. Une stabilité de l'expression des performances variétales, et une variabilité génétique suffisante pourraient rendre possible la sélection de variétés hybrides avec des teneurs en tocophérols élevées, voire de combiner cette sélection avec la production de profils modifiés, comme cela se fait déjà pour les acides gras. Des transformations stables du profil des tocophérols par mutagenèse ont d'ailleurs été récemment obtenues chez le tournesol [36, 37].

Ainsi, les données collectées au cours de ces travaux permettent de montrer que les teneurs en tocophérols pourraient être augmentées par sélection variétale, et peut-être aussi en veillant à la conduite culturale. Le tournesol est une culture bien implantée en France (en 2005 : 650 000 ha) [46] mais subit les évolutions du marché : augmentation de la sole oléique au détriment du tournesol classique. Déjà bien reconnue en alimentation par sa composition en acides gras et en vitamine E ; l'huile de tournesol jouit d'une bonne image diététique, et représente 28 % de la consommation apparente en France [47]. Outre les applications alimentaires, l'huile de tournesol (notamment oléique) présente un intérêt industriel pour la production d'esters d'acides gras (secteur des biocarburants et potentiel de développement dans celui des biolubrifiants) [48, 49]. Une fraction insaponifiable contenant les tocophérols et les phytostérols est isolée lors des transformations industrielles ; c'est un co-produit à fort potentiel de valorisation. Ainsi, plus l'huile sera riche en ces composés, plus la plus-value sera élevée. En conséquence, une sélection pour la qualité, intégrant non seulement le profil en acides gras insaturés mais aussi les tocophérols et d'autres molécules d'intérêt santé (i.e. phytostérols), pourrait présenter un grand intérêt pour cette culture. Cette approche nécessite cependant une étude approfondie combinant des approches génétiques et agronomiques.

Remerciements. Les auteurs remercient Caussade semences, Maïsadou semences, Monsanto Dekalb SAS, R2n-RAGT Semences, Soltis (Euralis/Limagrain), Syngenta Seeds pour les expérimentations réalisées en plein champ et la fourniture du matériel végétal. Nous remercions l'Association inter-professionnelle du développement des semences du Sud-Ouest (Asedis-SO), l'interprofession des oléagineux (Onidol) et la plate-forme Lipo-oléochimie de la Région Midi-Pyrénées pour leurs soutiens financiers et la société Cognis-France pour son soutien technique.

RÉFÉRENCES

1. VLAHAKIS C, HAZEBROEK J. Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils : Effects of genetics, planting location, and temperature. *J Am Oil Chem Soc* 2000 ; 77 : 49-53.

2. BURTON GW, TRABER MG, ACUFF RV, et al. Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *Am J Clin Nutr* 1998 ; 67 : 669-84.
3. IGARASHI O, KIYOSE C. Physiological functions of vitamin E and biotransformation of its stereoisomers. *Anticancer Res* 1999 ; 19 : 3783-5.
4. STONE WL, LECLAIR I, PONDER T, BAGGS G, REIS BB. Infants discriminate between natural and synthetic vitamin E. *Am J Clin Nutr* 2003 ; 77 : 899-906.
5. BEARDSELL D, FRANCIS J, RIDLEY D, ROBARDS K. Health promoting constituents in plant derived edible oils. *J Food Lipids* 2002 ; 9 : 1-34.
6. NIKI E. Antioxidants and atherosclerosis. *Biochem Soc T* 2004 ; 32 : 156-9.
7. LÉGER C. La vitamine E : état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardiovasculaire, biodisponibilité. *OCL* 2000 ; 7 : 257-65.
8. AZZI A, BREYER I, FEHER M, et al. Nonantioxidant functions of alpha-tocopherol in smooth muscle cells. *J Nutr* 2001 ; 131 : 3785-3815.
9. MICHAUD DS, PIETINEN P, TAYLOR PR, et al. Intakes of fruits and vegetables, carotenoids and vitamin A, E, C, in relation to the risk of bladder cancer in the ATBC cohort study. *Br J Cancer* 2002 ; 87 : 960-5.
10. NETSCHER T. Synthesis and production of vitamin E. In : Gunstone FD, ed. *Lipid Synthesis and Manufacture*. Sheffield : Academic Press, 1999 : 250-67.
11. EC. European Parliament and Council Directive No 95/2/EC. In : *Foods Additives other than colours and sweeteners*. 1995 : 1-40.
12. LAMPI AM, KAMAL-ELDIN A, PIIRONEN V. Tocopherols and tocotrienols from oil and cereal grains. *Fun Fo Nutr Series* 2002 ; 2 : 1-38.
13. SCHNEIDER C. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res* 2005 ; 49 : 7-30.
14. LODGE JK. Vitamin E bioavailability in humans. *J Plant Physiol* 2005 ; 162 : 790-6.
15. DELLAPENNA D, POGSON B. Vitamin synthesis in plants : Tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol* 2006 ; 57 : 711-38.
16. SOLL J, SCHULTZ G, JOYARD J, DOUCE R, BLOCK A. Localization and synthesis of Prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from Spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* 1985 ; 238 : 290-9.
17. VIDI P, KANWISCHER M, BAGINSKY S, et al. Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *J Biol Chem* (In press).
18. HAVAUX M, LUTZ C, GRIMM B. Chloroplast membrane photostability in chIP transgenic tobacco plants deficient in tocopherols. *Plant Physiol* 2003 ; 132 : 300-10.
19. MUNNÉ-BOSCH S, ALEGRE L. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit Rev Plant Sci* 2002 ; 21 : 31-57.
20. GRUSAK MA, DELLAPENNA D. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annu Rev Plant Phys* 1999 ; 50 : 133-61.
21. FRANKEL EN. Lipid Oxidation : Mechanisms, Products and Biological Significance. *J Am Oil Chem Soc* 1984 ; 61 : 1908-16.
22. BRAMLEY PM, ELMAFDA I, KAFATOS A, et al. Vitamin E. *J Sci Food Agr* 2000 ; 80 : 913-38.
23. SATTLER SE, GILLILAND LU, MAGALLANES-LUNDBACK M, POLLARD M, DELLAPENNA D. Vitamin E is essential for seed longevity, and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* 2004 ; 16 : 1419-32.
24. DAOOD H, VINKEL M, MARKUS F, HEBISHI EA, BIACS PA. Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors. *Food Chem* 1996 ; 55 : 365-72.
25. LAMPART-SZCZAPKA E, KORCZAK J, NOGALA-KALUCKA M, ZAWIRSKA-WOJTASIAK R. Antioxidant properties of lupin seed products. *Food Chem* 2003 ; 83 : 279-85.

26. MERRIEN A, MORICE J, POLIZET A, MORIN O, SULTANA C. Graines oléagineuses des climats tempérés et leurs huiles. In : Karleskind A, ed. *Manuel des corps gras*. Paris : Tec&Doc, 1992 : 116-64.
27. DOLDE D, VLAHAKIS C, HAZEBOEK J. Tocopherols in breeding lines and effects of planting location, fatty acid composition, and temperature during development. *J Am Oil Chem Soc* 1999 ; 76 : 349-55.
28. KURILICH AC, JUVIK JA. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in Zea mays. *J Agr Food Chem* 1999 ; 47 : 1948-55.
29. GOFFMAN FD, BECKER HC. Genetic variation of tocopherol content in a germplasm collection of Brassica napus L. *Euphytica* 2002 ; 125 : 189-96.
30. VELASCO L, FERNANDEZ-MARTINEZ JM, GARCIA-RUIZ R, DOMINGUEZ J. Genetic and environmental variation for tocopherol content and composition in sunflower commercial hybrids. *J Agr Sci* 2002 ; 139 : 425-9.
31. BERGMAN CJ, XU Z. Genotype and environment effects on tocopherol, tocotrienol, and gamma-oryzanol contents of Southern US rice. *Cereal chem* 2003 ; 80 : 446-9.
32. HAMPSHIRE J. Investigations of vitamin E contents in oat varieties and industrial milling oats. *Deut Lebensm-Rundsch* 2003 ; 99 : 222-31.
33. MARWEDE V, SCHIERHOLT A, MOLLERS C, BECKER HC. Genotype X environment interactions and heritability of tocopherol contents in canola. *Crop Sci* 2004 ; 44 : 728-31.
34. ALMONOR GO, FENNER GP, WILSON RF. Temperature effects on tocopherol composition in soybeans with genetically improved oil quality. *J Am Oil Chem Soc* 1998 ; 75 : 591-6.
35. BRITZ SJ, KREMER DF. Warm temperatures or drought during seed maturation increase free alpha-tocopherol in seeds of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *J Agr Food Chem* 2002 ; 50 : 6058-63.
36. DEMURIN Y, SKORIC D, KARLOVIC D. Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality. *Plant Breed* 1996 ; 115 : 33-6.
37. VELASCO L, PEREZ-VICH B, FERNANDEZ-MARTINEZ JM. Novel variation for the tocopherol profile in a sunflower created by mutagenesis and recombination. *Plant Breed* 2004 ; 123 : 490-2.
38. BAYDAR H, ERBAS S. Influence of seed development and seed position on oil, fatty acids and total tocopherol contents in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Turk J Agric For* 2005 ; 29 : 179-86.
39. AFNOR. Norme Européenne, NF EN ISO 659 ; Norme française V 03-905 Graines oléagineuses. Détermination de la teneur en huile (Méthode de référence). Paris, p. 14+ 3. 1998.
40. ISO. Norme Internationale ISO 9936 : Corps gras d'origine animale et végétale- Détermination des teneurs en tocophérols et en tocotriénols Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance Suisse, p. 11. 1997.
41. LAGRAVERE T, KLEIBER D, SUREL O, ET AL. Comparison of fatty acid metabolism of two oleic and one conventional sunflower hybrids : A new hypothesis. *J Agron Crop Sci* 2004 ; 190 : 223-9.
42. TRIKI S, BEN HAMIDA J, MAZLIAK P. Study of the metabolism of lipid reserves in ripening sunflower seeds : a tracing experiment with 1-C-1-acetate. *OCL* 1997 ; 4 : 451-8.
43. MOZZON M, BOCCI F, FREGA N. A study on the lipidic fraction extracted from high oleic sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) during the ripening process. *J Agr Food Chem* 1998 ; 46 : 4198-202.
44. PREVOT A. L'huile de tournesol aujourd'hui. *Rev Fr corps gras* 1986 ; 1 : 183-95.
45. MUNNÉ-BOSCH S. The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol* 2005 ; 162 : 743-8.
46. CETIOM. (2006).
47. PROLEA. De la production à la consommation. *Recueil de statistiques de oléagineux et protéagineux, huiles et protéines végétales*. Paris : France-Europe Monde, 2005 ; (p. 1-128).
48. BALLERINI D. Les biocarburants : Etat de lieux, perspectives et enjeux du développement. Paris : IFP Publications., 2006.
49. DE CARO D, CECUTTI C. Lubrifiants et environnement. *OCL* 2005 ; 12 : 279-84.

Variabilité des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule. Partie II – Phytostérols

Alicia AYERDI GOTOR¹, Monique BERGER¹, Françoise LABALETTE², Sylvie CENTIS³,
Valérie EYCHENNE⁴, Jean DAYDÉ¹, Anne CALMON¹

¹ Université de Toulouse ; Ecole d'Ingénieurs de Purpan ; Laboratoire d'Agro-Physiologie ; UMR 1054 ; 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France

Tél. + 33 (0)5 61 15 29 67/ Fax : + 33 (0)5 61 15 30 60 - anne.calmon@purpan.fr

² ONIDOL, Organisation nationale interprofessionnelle des oléagineux, 12 avenue George V, 75008 Paris, France.

³ ASEDIS-SO, 39 chemin Virebent, 31200 Toulouse, France.

⁴ COGNIS-France, Usine d'Estarac, 31360 Boussens, France

Article en préparation

ABSTRACT

The sunflower oil is rich in polyunsaturated fatty acids and in minor components (1% of the oil fraction) including phytosterols, tocopherols, wax and others components. This study evaluates the content and composition of the phytosterols in four sunflower hybrids during two growing seasons (2002 & 2003) and in seven more hybrids in a multilocal study in 2003. The phytosterol content in the maturing seeds was followed from flowering stage till full maturity. The kinetics of phytosterols accumulation was similar to that of fatty acids: a rapid increase until 25 Days After Flowering (DAF) and a stabilization after 50 DAF. However, the temperature during the seed development induced changes in the phytosterol content, since the total amount of phytosterols was significantly increased by high temperatures in some hybrids. On the other hand, the comparison of phytosterol content in the 11 hybrids tested in 2003 shows significant differences in phytosterol content between hybrids and little location X hybrid interaction. In this study the environment effect was the major source of variation. This study shows that phytosterol content in sunflower oil can be promoted though combined action on selection and growth conditions.

Mots clés : huile de tournesol, phytostérols, accumulation, température

Keywords : sunflower oil, phytosterols, accumulation, temperature

INTRODUCTION

L'huile de tournesol bénéficie d'une bonne image, en raison de sa composition équilibrée en acides gras insaturés (acides oléique et linoléique) [1]. Sa faible teneur en acide linoléique (0,2%) en fait une huile stable, classée parmi les huiles de friture, ceci d'autant plus qu'il existe maintenant des variétés contenant plus de 85% d'acide oléique, mono-insaturé [2]. Mais sa bonne image provient aussi de sa grande richesse en composés mineurs, notamment en phytostérols et en tocophérols (vitamine E), intéressants pour leur effet santé [3]. De plus, l'huile de tournesol présente un intérêt industriel pour la production d'esters d'acides gras (biocarburants et biolubrifiants) [4-6]. Lors du processus de fabrication et plus particulièrement de désodorisation, une fraction dite « insaponifiable » contenant entre autres les phytostérols est isolée et peut être valorisée en un co-produit à forte valeur ajoutée [7].

Les phytostérols représentent une vaste famille de composés, de structure analogue à celle du cholestérol chez les animaux, et dont la fonction biologique est semblable. Ce sont des alcools stéroïdiens avec un noyau tétracyclique et une chaîne latérale de 17 atomes de carbone (Figure 1). Les principaux phytostérols (60 à 80%) trouvés dans l'huile de tournesol sont par ordre décroissant de teneurs : le β -sitostérol (24 β -éthylcholest-5- $\Rightarrow$ -3 β -ol), le Δ^7 -stigmastérol (24 α -éthylcholest-7- $\Rightarrow$ -3 β -ol), le stigmastérol (24 α -éthylcholesta-5,22-di $\Rightarrow$ -3 β -ol), le Δ^7 -avénastérol (24-éthylidenecholest-7- $\Rightarrow$ -3 β -ol), le Δ^5 -avénastérol (24-éthylidencholest-5- $\Rightarrow$ -3 β -ol), le campestérol (24 β -méthylcholest-5- $\Rightarrow$ -3 β -ol) et le Δ^7 -campestérol (24-méthylcholest-7- $\Rightarrow$ -3 β -ol) [8-10].

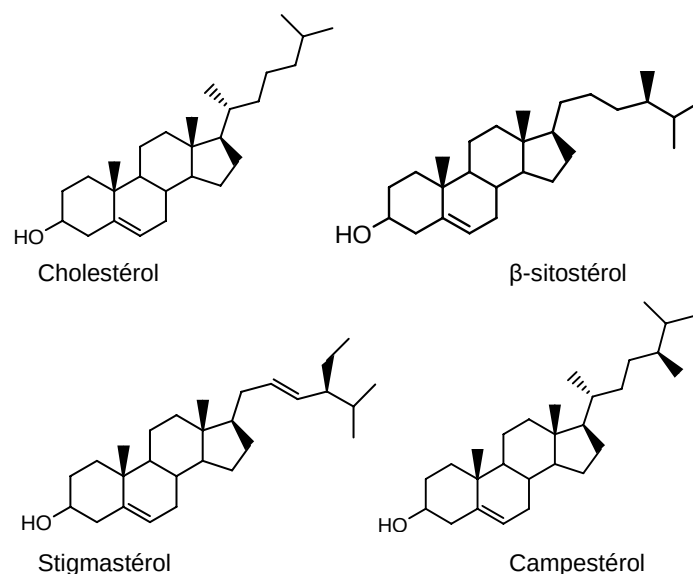


Figure 1. Structure du cholestérol et des principaux phytostérols.

Les phytostérols permettent de rigidifier et de contrôler le niveau de fluidité des membranes cellulaires. Mais leur rôle serait plus actif qu'on ne le pensait initialement : leur implication dans les régulations hormonales est très étudiée, aussi bien en tant que précurseurs des brassinostéroïdes, que directement au niveau de l'organisation de la membrane cellulaire, en tant que médiateurs de l'interaction entre les protéines et les lipides membranaires [11; 12]. Les effets des phytostérols sur la santé font l'objet de nombreux travaux depuis quelques années [13-16]. C'est en raison de leur pouvoir hypocholestérolémiant que les stérols d'origine végétale ont suscité le plus d'intérêt. Par leurs propriétés amphiphiles, ils inhibent l'absorption intestinale du cholestérol en le remplaçant dans les micelles de sels biliaires [9; 16; 17]. Les phytostérols sont aussi étudiés pour leur action anticancéreuse [13], immunomodulatrice et anti inflammatoire [18]. Les phytostérols possèdent également un pouvoir émulsifiant et pénétrant. Cette propriété est utilisée en cosmétique où ils sont souvent employés comme agents anti-dessiccateurs de l'épiderme et du cuir chevelu [7].

Comme pour les tocophérols, la variation de la teneur et composition des phytostérols varie en fonction de l'espèce végétale et selon les variétés [10; 19]. Les différences génotypiques ont été observées chez le seigle [20] et l'avoine [19] mais les résultats sont contradictoires chez le colza [21; 22]. L'effet environnemental affecte significativement la distribution des stérols, cependant l'effet du lieu de culture est beaucoup moins important que sur les tocophérols [20; 22]. Chez le soja, la concentration en phytostérols totaux augmente si la température est élevée durant la maturation de la graine [10]. On observe alors une modification significative de la composition des phytostérols : augmentation du pourcentage en campesterol et diminution des teneurs en stigmasterol et en β-sitostérol [10].

Dans ce contexte, on constate que la teneur et la composition des phytostérols peut être influencée par le génotype et par les effets environnementaux mais les variations sont moins importantes par rapport à celles observées pour les tocophérols sur d'autres espèces. Le tournesol est une espèce oléagineuse de grande culture qui présente un profil stérolique atypique : accumulation majoritaire de β-sitostérol, présence de Δ⁵-avénastérol et absence de brassicastérol [23] ; ce profil est recherché pour des valorisations industrielles. Cependant, les teneurs totales en phytostérols sont inférieures à celles observées pour d'autres espèces oléagineuses (colza, maïs) ; par conséquent il serait intéressant de connaître pour des variétés commerciales de tournesol leur variation et ainsi regarder leur potentiel d'expression en phytostérols.

L'objectif de cette étude s'inscrit dans une démarche similaire à celle entreprise sur l'étude des tocophérols [24], à savoir suivre le remplissage de la graine en phytostérols totaux et individuels au cours de la maturation de l'akène chez des hybrides commerciaux pour deux années de culture (2002 et 2003). Ce travail permettra ainsi d'évaluer les influences génétiques et environnementales sur la teneur et la composition en phytostérols et de rechercher d'éventuelles phases critiques lors du remplissage.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

En 2002, 4 hybrides (AllStar RM, LG 5420M, LG5660, Prodisol) ont été cultivés à Baziège (31). En 2003, onze hybrides : neuf classiques (Alisson RM, AllStar RM, LG 5420M, LG5660, Melody, Parma, Tekny, Tellia, Prodisol) et deux oléiques (Alisson RMO, Aurasol) ont été mis en place sur trois lieux : Mondonville (31), St. Sauveur (31) et Caussade (81). Les variétés, l'itinéraire cultural (autofécondation), les prélèvements et la préparation des akènes ont été décrits précédemment [24]. Comme pour l'étude sur les tocophérols, les prélèvements effectués sur le site de Baziège en 2002 et sur le site de Mondonville en 2003 ont été utilisés pour l'étude de la cinétique des teneurs et compositions en phytostérols au cours du remplissage des akènes.

Analyses

Extraction de l'huile

L'huile des akènes a été extraite à l'hexane pendant 4 h dans un appareil de Soxhlet [24]. Après extraction, l'huile de chaque échantillon a été récupérée et stockée dans des piluliers à - 18°C. Chaque échantillon a été analysé en double répétition.

Analyses des phytostérols

La détermination de la teneur en phytostérols des huiles brutes a été réalisée selon la norme ISO 12228 :1999 [25]. La séparation complète des différents phytostérols a été obtenue par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (GC 8000 – FISIONS Instrument, Italie). Le principe de l'analyse des phytostérols est basé sur un isolement de l'insaponifiable puis une silylation de la fraction insaponifiable avant injection directe en Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).

Saponification

Dans un ballon de 50 ml, on introduit 250 mg d'huile, 1 mg de bétuline / ml d'acétone (bétuline : étalon interne - Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et 5 ml d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (KOH / 0,5 M). Le mélange est porté à ébullition sous reflux pendant 15 minutes. Immédiatement après l'arrêt de la saponification, 5 ml d'éthanol (qualité HPLC – SDS, France) sont ajoutés au mélange chaud.

Extraction des stérols

Pour isoler la fraction insaponifiable, 5 ml de la solution sont versés dans une colonne d'oxyde d'aluminium. Cette colonne en verre (diamètre : 30 mm) est préalablement préparée et remplie de 10 g d'oxyde d'aluminium (neutre, pH = 7,5, 50 – 100 µm, PROLABO/SUBRA-France) hydratés avec de l'éthanol (Qualité HPLC, SDS, France). La substance résultant de la première élution n'est pas récupérée. Une modification de protocole a été effectuée en plaçant dans un entonnoir un filtre Whatmann (papier n°41) sur un deuxième ballon afin de retenir les particules d'alumine contenues dans l'éluat. L'insaponifiable est extrait par 5 ml d'éthanol puis par 30 ml d'éther diéthylique (Qualité HPLC, SDS, France). Les solvants sont évaporés sous vide (Rotavapor, Bioblock Scientific HS 40 HUBER, Heildolph). Le dépôt présent sur les parois est décollé avec 2 ml d'éther diéthylique et récupéré dans un tube à hémolyse. L'éther diéthylique est ensuite évaporé avec un flux continu d'azote (Air Liquide, France).

Identification des stérols

100 µl de réactif silylant (95 µl de N-méthyle-N-(triméthylsilyl)-heptafluorobutyramide (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et 5 µl de 1-méthyle imidazol (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)) sont ajoutés dans les tubes à hémolyse contenant les stérols isolés. Le tube est ensuite chauffé pendant 15 min à 105°C dans un bain d'huile préchauffé.

0,5 µL ont été injectés manuellement avec une micro-seringue (ou 1 µL par le passeur automatique) sur une colonne capillaire en silice fondue SAC-5 (30cm x 0,25mm x 0,25µm, Cluzeau, Puteaux- La Défense, France) l'injecteur est à 320°C, et l'azote (gaz vecteur) à 1 ml/min avec une pression de 130 kPa (Air Liquide, France). Un gradient de température de 240 à 320°C avec une augmentation de 4°C/min est appliqué, la température finale est ensuite laissée constante pendant 10 min. Les différents phytostérols sont quantifiés par un détecteur à ionisation de flamme à 310°C avec un débit d'hydrogène de 30 ml/min et un débit d'air de 300 ml/min. Le signal a été intégré avec un intégrateur (Data Jet Integrator, Thermo Finnigan, Courtaboeuf, France).

Chaque phytostérol est identifié à partir de son temps de rétention, défini à l'aide de mélanges d'étalons standards (β-sitostérol, stigmastérol et campestérol (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France))

Calibration interne – Quantification des phytostérols

Pour quantifier les stérols présents dans l'échantillon, les temps de rétention relatifs (TRR) ont été obtenus en divisant le temps de rétention (TR) du stérol concerné par le TR de la bétuline. Dans cette

méthode, on considère que les facteurs de réponse de tous les stérols et de la bétuline sont égaux. La quantification a été calculée à partir des aires des pics pour les différents phytostérols comparée à l'aire du pic correspondant à l'étalon interne (bétuline).

Traitement des données

Les analyses statistiques (corrélations et analyses de la variance (ANOVA) à deux facteurs) ont été réalisées sous Microsoft Excel pour Windows® 97 et sous SPSS 11.0 pour Windows® (Paris, France).

RESULTATS

Les chromatogrammes obtenus (Figure 2) montrent une séparation efficace des différents phytostérols et de l'étalon interne. Ainsi pour l'intégration des pics, les temps de rétention relatifs (TRR) calculés par rapport à la bétuline sont les suivants : campestérol (0,79) ; stigmastérol (0,81) ; Δ^5 -campestérol (0,83) ; β -sitostérol (0,85) ; Δ^5 -avénastérol (0,86) ; Δ^7 -stigmastérol (0,94) et Δ^7 -avénastérol (0,96). Les teneurs en phytostérols sont exprimées en mg par 100 g d'huile ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ huile) ou en mg par 100 g de matière sèche d'akènes ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ MS).

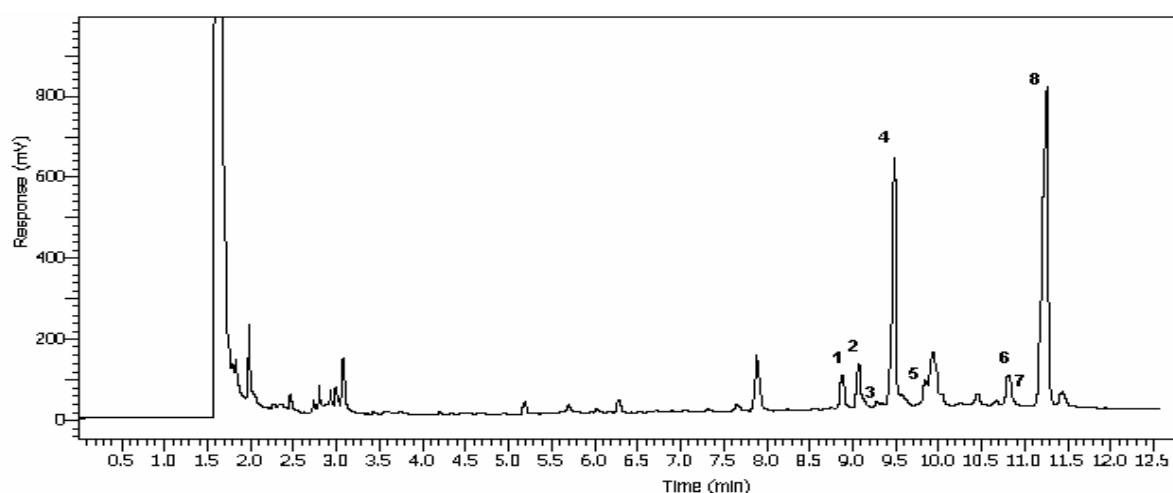


Figure 2. Composition en stérols d'une huile de tournesol obtenue par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire en silice fondue SAC-5 (Cluzeau, Paris) (Pics : 1 : campestérol, 2 : stigmastérol ; 3 : Δ^7 -campestérol ; 4 : β -sitostérol ; 5 : Δ^5 -avénastérol ; 6 : Δ^7 -stigmastérol ; 7 : Δ^7 -avénastérol ; 8 : bétuline)

Les teneurs en phytostérols totaux observées sur l'ensemble des prélèvements (incluant les premiers stades) varient de 231,4 à 800,3 $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ huile et de 65,8 à 285,6 $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ MS. Sept stérols différents peuvent être identifiés et quantifiés. Comparativement aux autres huiles végétales, le tournesol se caractérise par des valeurs moyennes. Cependant, dans l'huile de tournesol, le composé majoritaire de la fraction stérolique est le β -sitostérol (57-68%) suivi du stigmastérol (12%) et du campestérol (10%). Le Δ^5 -avénastérol est également présent et sa teneur varie entre 11 et 35 $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ huile.

Évolution des phytostérols au cours de la maturation de l'akène

Dans les akènes de tournesol nouvellement formées (20 JAF), le taux de phytostérols totaux en fonction de la matière sèche est quasiment à sa valeur finale, il augmente légèrement jusqu'à 40 JAF, puis il décroît en fin de maturité, de manière parallèle à la cinétique d'accumulation de l'huile, comme le montre le profil caractéristique de Prodisol représenté ici (Figure 3). La cinétique d'accumulation de l'huile et des stérols est similaire pour toutes les variétés étudiées. Le β -sitostérol est en quantité majoritaire (environ 60%) ; les autres phytostérols représentent chacun 10% (ou moins) des phytostérols totaux.

L'analyse de la cinétique de remplissage des phytostérols (en mg par 100 g de matière sèche) montre qu'avant 30 JAF, il y a une accumulation de la teneur en phytostérols suivi d'une décroissance (Figure 4). Cette accumulation est proportionnelle à l'accumulation de l'huile qui est maximale à 30 JAF [24]. Par conséquent, contrairement à ce qui a été observé pour les tocophérols, la composition en phytostérols (en mg par 100g d'huile) semble relativement constante dès 20 JAF (Figure 4).

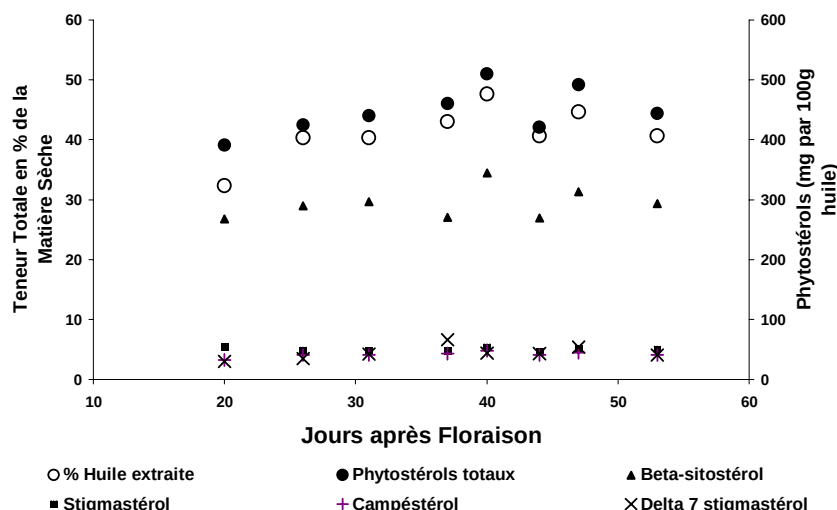


Figure 3. Accumulations comparées de l'huile (cercles vides) et des phytostérols (cercles pleins = phytostérols totaux), de 20 JAF à maturité pour la variété Prodisol sur l'essai réalisé en plein champ à Baziège en 2002. Chaque point = moyenne de 3 répétitions analytiques

Cependant, le β -sitostérol, en proportion la plus importante, semble disparaître au cours de la maturité pour certaines variétés telles que les variétés Limagrain (LG 5420 et LG5660) ce qui entraînerait la décroissance observée à maturation. D'autre part, on note que la teneur en Δ^7 -avénastérol, présent dans de plus faibles quantités, augmente au cours de la maturité et pour l'ensemble des variétés. Les résultats de la récolte 2003 mettent en évidence que les teneurs initiales à 20 JAF sont bien plus élevées qu'en 2002 et comprises entre 450 et 900 $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ d'huile.

Ces teneurs en phytostérols totaux décroissent rapidement au cours de la maturation des graines pour atteindre à la récolte environ un tiers de la teneur initiale. L'ensemble des phytostérols (β -sitostérol, stigmatérol, campestérol,...) présente une accumulation et une décroissance similaire de celle des phytostérols totaux ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ huile).

Aucun prélèvement avant 20 JAF n'avait été effectué au cours de l'essai 2003, cependant la teneur en phytostérols exprimée par rapport à la matière sèche ($\text{mg} / 100\text{g}$ de MS) montre un extremum de teneur entre 25 et 35 JAF puis une diminution reproduisant l'observation de l'essai de la campagne précédente (Figure 5).

L'analyse de variance (Tableau 1) réalisée sur les 4 hybrides : Prodisol, Allstar RM, LG5420 et LG5660 et sur les deux années 2002 et 2003, montre qu'il n'y a pas de différences de génotypes mais qu'un effet année peut être mis en évidence sans être aussi marqué que celui observé sur les teneurs en tocophérols [24].

Tableau 1. Analyse de variance en moyenne de carrés des tocophérols et phytostérols totaux de 4 hybrides (Allstar, Prodisol, LG5420 et LG 5660) cultivés en 2002 et 2003 et 5 dates de prélèvement à 20, 30, 40, 55 et 65 JAF

Facteurs	d.l.	Tocophérols totaux ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ huile)	Phytostérols totaux ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ huile)
JAF	1	62135*	128441***
Génotype	3	114230***	3606
Année	1	278790**	26836*
Génotype x Année	3	9463	717
Erreur	53	9306	5947
d.l. Degré liberté ; Test F : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$			

L'effet des fortes températures observées en 2003 favorise des teneurs plus élevées en phytostérols totaux. Ces résultats corroborent ceux décrits par Vlahakis et Hazebroek [10] chez le tournesol ; cependant seules les teneurs finales en phytostérols ont été étudiées.

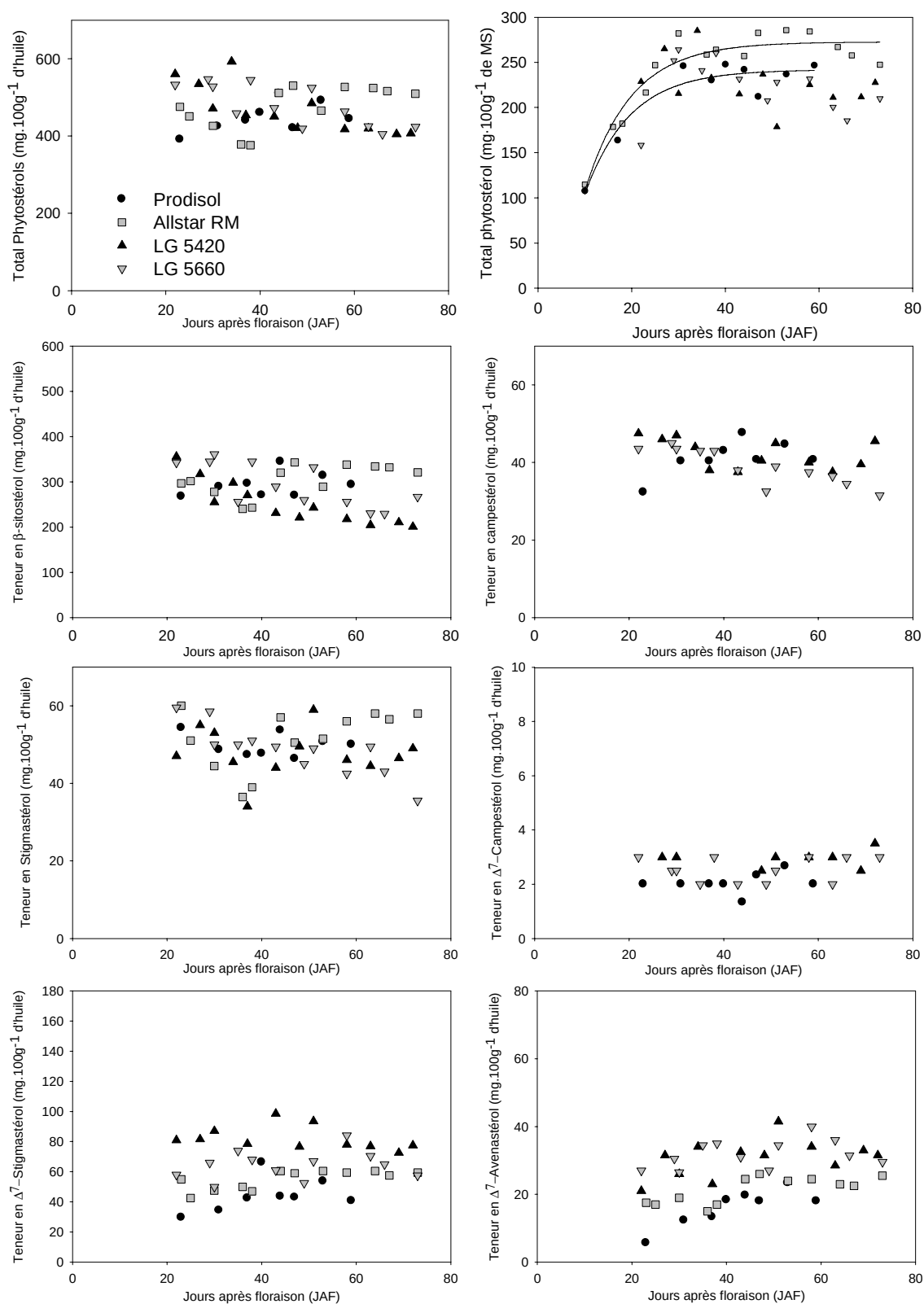


Figure 4. Accumulations des phytostérols totaux et individuels de 20 JAF à maturité sur l'essai réalisé en plein champ à Baziège en 2002.

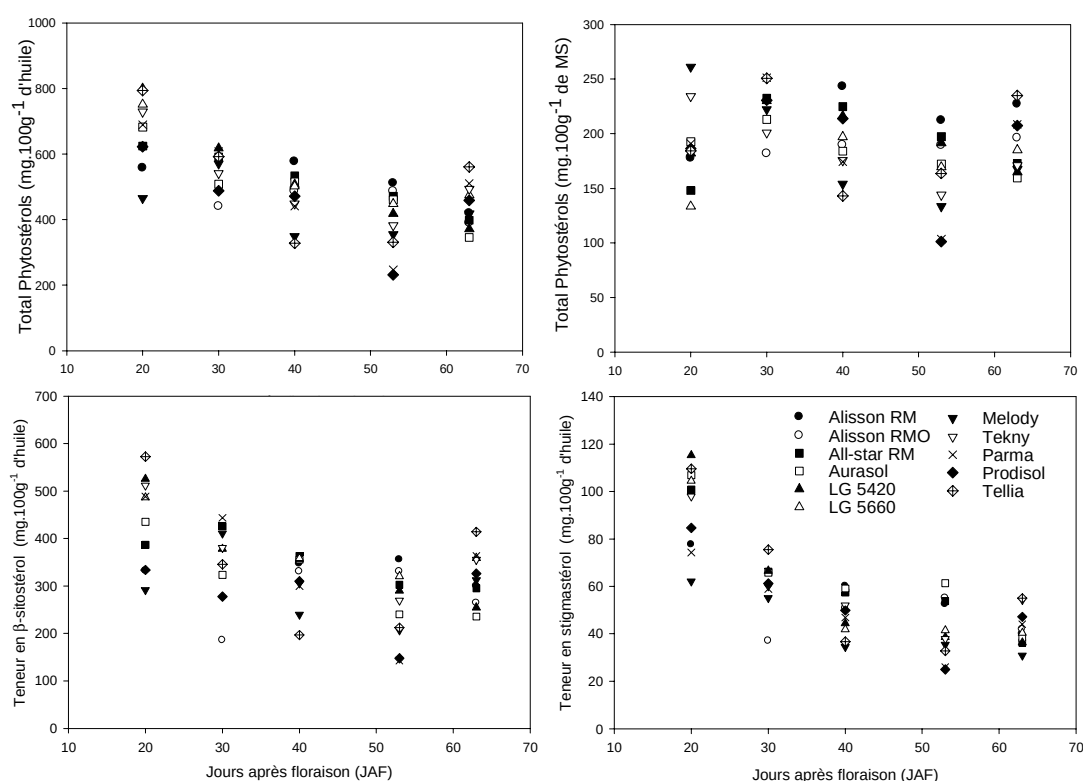


Figure 5. Accumulations des phytostérols totaux ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ d'huile ou $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ Matière sèche) du béta-sitostérol et du stigmastérol de 20 JAF à maturité sur l'essai réalisé en plein champ en 2003. Les teneurs sont exprimées en $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ d'huile.

Effets du lieu de culture et du génotype sur la teneur en phytostérols à maturité

La teneur en phytostérols à maturité a été analysée dans l'huile de 11 hybrides cultivés sur trois lieux en 2003 (Tableau 2). Elle varie entre 328,9 et 595,0 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ d'huile et 142,3 à 268,2 mg de phytostérols 100g de matière sèche ; cependant les teneurs en huile étaient significativement plus basses en 2003 qu'en 2002.

Tableau 2 : Moyennes des teneurs en phytostérols totaux ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ Huile). Les erreurs standards sont respectivement 19, 13 et 43 pour les moyennes des variétés ($n=6$ échantillons par variété), des lieux ($n=20$ échantillons par lieu) et des variétés par lieu ($n=2$ répétitions). La variété Techny n'a été échantillonnée qu'à Mondonville

Variétés	Moyenne variétés	Mondonville	Caussade	Saint Jory
Alisson	442 ^{ab}	419	407	499
Alisson RMO	483 ^{ab}	382	418	595
AllStar	437 ^{ab}	398	378	535
Aurasol	423 ^{ab}	346	334	589
LG5420	403 ^a	371	438	401
LG5660	432 ^{ab}	474	369	454
Melody	443 ^{ab}	401	384	546
Parma	420 ^{ab}	486	329	476
Prodisol	469 ^{ab}	510	355	543
Techny		574		
Tellia	530 ^b	561	462	567
Moyennes lieux		436 ^b	387 ^a	520 ^c

Tous comme les résultats obtenus sur les tocophérols, la différence significative observée entre les essais est probablement liée à leurs conditions de réalisation. Sur le site de Saint Jory, les capitules sont restés empochés jusqu'à la récolte ce qui a engendré un stress thermique supplémentaire. L'effet de l'environnement, essentiellement de la température, semble être également un facteur clé dans la teneur en phytostérols. Ces résultats semblent indiquer que les températures élevées induisent une augmentation de la concentration de l'huile en phytostérols. L'analyse de variance (ANOVA) montre que les effets génétiques et environnementaux affectent les teneurs en phytostérols (Tableau 3) mais ces variations sont bien moindres par rapport à celles observées sur les teneurs en tocophérols [24]. L'interaction génotype $\times$ environnement ne présente qu'une part minime de la variance totale similaire à la variation génotypique.

Tableau 3. Analyse de variance de 11 hybrides de tournesol cultivés sur 3 lieux (Caussade (81), Mondonville (31) et St Jory (31))

	dl	Phytostérols totaux (mg .100g ⁻¹ d'huile)		
		SC	MC	F
Lieu	2	374167	187083	55,5*
Génotype	9	126481	14053	4,2*
L x G	18	217014	12056	3,6*
Erreur	83	280027	3374	
dl. degré de liberté – SC. Somme des carrés – MC. Moyenne des carrés – F. Test statistique *p<0,001				

DISCUSSION - CONCLUSION

Au cours de cette étude, différents hybrides commerciaux ont été analysés pour leur teneur et compositions en phytostérols. L'étude de la cinétique d'accumulation des phytostérols montre qu'ils sont présents dans tous les stades de développement de la graine. La teneur en phytostérols exprimée par rapport à la quantité de matière sèche dans la graine augmente jusqu'à 30 JAF puis décroît. Un décalage est observé, lorsque la teneur en phytostérols est exprimée par rapport à la quantité d'huile (mg.100g⁻¹ huile), dès 20 JAF, la teneur est élevée puis elle décroît. Les cinétiques d'accumulation de l'ensemble des phytostérols présents dans la fraction insaponifiable suivent celle observée pour les phytostérols totaux (mg.100g⁻¹ huile). Les travaux de Harker et al. [26] sur des graines de colza et de tabac montrent des résultats similaires. Cependant, la température affecte significativement les teneurs phytostérols : elles semblent entraîner une augmentation de la teneur en phytostérols comme il a été déjà observé [10].

D'autre part, cette étude montre que la variabilité de la teneur en phytostérols dans l'huile de tournesol est due au génotype et à un effet environnemental amplifié par de fortes températures pendant la maturation de la graine. Cependant, ces effets ne sont pas comparables à ceux observés sur les tocophérols [24]. Un classement des hybrides par rapport à leur teneur en phytostérols dans les akènes à maturité est beaucoup plus difficile à réaliser que pour les tocophérols. La variété Tellia présente un potentiel élevé en phytostérols tandis que la variété Melody se classe significativement parmi les plus faibles.

Au regard des résultats, il s'avère qu'augmenter les teneurs en tocophérols dans des akènes de tournesol sera possible par la sélection variétale tandis que l'enrichissement en phytostérols sera plus limité. Les conditions culturales et la date de prélèvement seront des facteurs clés sur les teneurs en phytostérols. Il serait nécessaire d'établir plus précisément l'effet de la température sur la teneur en phytostérols finale en effectuant un essai avec des conditions environnementales contrôlées, mais aussi trouver plus de variabilité génétique.

REFERENCES

- MERRIEN A, MORICE J, POUZET A, MORIN O, SULTANA C, 1992. Graines oléagineuses des climats tempérés et leurs huiles. In: Karleskind, A. (Ed.) Manuel des corps gras. Tec & Doc, Paris, pp. 116-64.

2. LAGRAVÈRE T, KLEIBER D, DAYDÉ J. Conduites culturales et performances agronomiques du tournesol oléique: réalités et perspectives. OCL: Oléagineux, corps gras, lipides 1996; 5: 477-86.
3. BRAMLEY PM, ELMAFDA I, KAFATOS A, KELLY FJ, MANIOS Y, ROXBOROUGH HE, SCHUCH W, SHEEHY PJA, WAGNER KH. Vitamin E. Journal of the Science of Food and Agriculture 2000; 80: 913-38.
4. BALLERINI D. Les biocarburants: Etat de lieux, perspectives et enjeux du développement. IFP Publications. Paris: 1st, 2006.
5. SCHNEIDER MP. Plant-oil-based lubricants and hydraulic fluids. Journal of the Science of Food and Agriculture 2006; 86: 1769-80.
6. CERVERO JM, COCA J, LUQUE S. Production of biodiesel from vegetable oils. Grasas y Aceites 2008; 59: 76-83.
7. FOLMER BM. Sterol surfactants: from synthesis to applications. Advances in Colloid and Interface Science 2003; 103: 99-119.
8. DUTTA P, NORMEN L. Capillary column gas- liquid chromatographic separation of delta 5-unsaturated and saturated phytosterol. Journal of Chromatography A 1998; 816: 177-84.
9. NORMEN L, DUTTA P, LIA A, ANDERSSON H. Soy sterol esters and beta-sitosterol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel. American Journal of Clinical Nutrition 2000; 71: 908-13.
10. VLAHAKIS C, HAZEBROEK J. Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting location, and temperature. Journal of the American Oil Chemists Society 2000; 77: 49-53.
11. LINDSEY K, PULLEN ML, TOPPING JF. Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signalling. Trends in Plant Science 2003; 8: 521-5.
12. SCHALLER H. The role of sterols in plant growth and development. Progress in Lipid Research 2003; 42: 163-75.
13. AWAD AB, FINK CS. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. Journal of Nutrition 2000; 130: 2127-30.
14. ORZECOWSKI A, OSTASZEWSKI P, JANK M, BERWID SJ. Bioactive substances of plant origin in food - impact on genomics. Reproduction Nutrition Development 2002; 42: 461-77.
15. ST-ONGE MP, JONES PJH. Phytosterols and human lipid metabolism: Efficacy, safety, and novel foods. Lipids 2003; 38: 367-75.
16. TRAUTWEIN EA, DUCHATEAU G, LIN YG, MEL'NIKOV SM, MOLHUIZEN HOF, NTANIOS FY. Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. European Journal of Lipid Science and Technology 2003; 105: 171-85.
17. IKEDA I, TANAKA K, SUGANO M, VAHOUNY GV, GALLO LL. Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. Journal of Lipid Research 1988; 29: 1573-82.
18. BOUIC PJD, CLARK A, LAMPRECHT J, FREESTONE M, POOL EJ, LIEBENBERG RW, KOTZE D, VAN JAARSVELD PP. The effects of B-sitosterol (BSS) and B-sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: Inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. International Journal of Sports Medicine 1999; 20: 258-62.
19. MÄÄTTÄ K, LAMPI AM, PETTERSON J, FOGELFORS BM, PIIRONEN V, KAMAL-ELDIN A. Phytosterol content in seven oat cultivars grown at three locations in Sweden. Journal of the Science of Food and Agriculture 1999; 79: 1021-7.
20. ZANGENBERG M, HANSEN HB, JORGENSEN JR, HELLGREN LI. Cultivar and year-to-year variation of phytosterol content in rye (*Secale cereale* L.). Journal of Agriculture and Food Chemistry 2004; 52: 2593-7.
21. BEERMANN C, GREEN A, MOBIUS M, SCHMITT JJ, BOEHM G. Lipid class separation by HPLC combined with GC FA analysis: Comparison of seed lipid compositions from different *Brassica napus* L. varieties. Journal of the American Oil Chemists Society 2003; 80: 747-53.
22. HAMAMA AA, BHARDWAJ HL, STARNER DE. Genotype and growing location effects on phytosterols in canola oil. Journal of the American Oil Chemists Society 2003; 80: 1121-6.
23. EC, 1995. European Parliament and Council Directive No 95/2/EC. Foods Additives other than colours and sweeteners. pp. 1-40.

24. AYERDI GOTOR A, BERGER M, LABALETTE F, CENTIS S, DAYDÉ J, CALMON A
Etude de la variation des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule : Partie I - Tocophérols. OCL-Oléagineux, Corps Gras, Lipides 2006; 13: 206-12.
25. 1999. Association française de normalisation, 1998. Norme européenne, NF EN ISO 12228 de mai 1999; Norme française T 60-258: Corps gras d'origines animale et végétale -Détermination de la teneur en stérols individuels et totaux - Méthode par chromatographie en phase gazeuse. AFNOR. Paris. 18 pp., NF en ISO. pp. 1-18.
26. HARKER M, HELLYER A, CLAYTON JC. Co-ordinate regulation of sterol biosynthesis enzyme activity during accumulation of sterols in developing rape and tobacco seeds. Planta 2003; 216: 707-15.

1.2. Bilan sur le remplissage en composés mineurs au cours de la maturation des akènes de tournesol.

Les teneurs en huile (40 – 55%) et le taux d'insaponifiable (0,8 – 2%) observés sur l'ensemble des prélèvements sont ceux généralement rencontrés dans l'huile de tournesol (Merrien, *et al.*, 1992). Les accumulations observées sur la fraction lipidique correspondent aux profils établis pour d'autres hybrides de tournesol (Triki, *et al.*, 1997; Lagravère, *et al.*, 2004). La fraction lipidique commence à s'accumuler dès la 10^{ème} JAF et atteint rapidement un plateau vers le 25^{ème} JAF, seuil au-delà duquel le pourcentage se stabilise jusqu'à la maturité de l'akène.

L'étude sur le remplissage en composés mineurs dans des akènes de tournesol a mis en évidence que la phase d'accumulation active des tocophérols et des phytostérols coïncidaient avec celle des acides gras et la matière sèche. L'étude de la cinétique montre une augmentation de la teneur en α -tocophérol jusqu'à 25 JAF puis une stabilisation tandis que les autres tocophérols (β et γ) diminuent progressivement. La teneur en γ -tocophérol est très faible (18 – 40 mg.kg⁻¹ d'huile) par rapport à l' α -tocophérol, et elle ne cesse de décroître jusqu'à maturité. Le β -tocophérol suit la même cinétique que le γ -tocophérol. Le γ -tocophérol étant précurseur de la forme α , ce décalage des cinétiques révèle probablement une différence de cinétique d'expression des enzymes qui interviennent séquentiellement dans la synthèse de l' α -tocophérol au niveau des akènes. Au niveau des phytostérols, la cinétique de remplissage des akènes montre une teneur élevée à 20 JAF puis une décroissance jusqu'à maturité. L'ensemble des phytostérols présents dans la fraction insaponifiable présente une accumulation similaire.

Cependant, au regard des résultats obtenus, la température semble être un facteur clé dans les teneurs en tocophérols et en phytostérols dans l'huile. De fortes températures durant le remplissage de l'akène limiteraient l'accumulation des tocophérols car ils pourraient être utilisés pour protéger les acides gras accumulés de dégradation subies lors du stress oxydatif induit par les températures élevées (Munné-Bosch et Alegre, 2002b) et augmenteraient la teneur en phytostérols (Vlahakis et Hazebroek, 2000; Roche, *et al.*, 2006).

D'autre part, cette étude montre aussi que la variabilité de la teneur en tocophérols dans l'huile de tournesol comprend une composante génétique significative ; des teneurs variant de 261 à 734 mg.kg⁻¹ d'huile ont été observées. Ainsi, Prodisol présente en moyenne une teneur en tocophérols totaux de 36 % plus élevée que LG5660. Cependant, cet effet n'est pas aussi marqué sur la variation des teneurs en phytostérols. Un classement des hybrides par rapport à leur teneur en phytostérols est beaucoup plus difficile. La variété Tellia présente un potentiel élevé en phytostérols tandis que la variété Melody se classe parmi les plus faibles. Dans cette étude, l'interaction génotype-environnement apparaît plutôt faible tant pour les tocophérols que pour les phytostérols.

Ainsi, les données collectées au cours de cette étude montrent une stabilité de l'expression des performances variétales et laissent penser que les teneurs en tocophérols pourraient être augmentées par sélection variétale, tout en veillant à la conduite culturale ; les possibilités d'enrichissement en phytostérols s'avèrent plus limitées. Cette approche nécessite cependant une étude approfondie combinant des approches génétiques et agronomiques.

2. Influence de la conversion oléique sur les teneurs et compositions en composés mineurs.

Un atout de l'huile de tournesol est la grande diversité de composition en acides gras de l'huile de tournesol et en co-produits (composés mineurs). Cette diversité conduit à des utilisations variées aussi bien en nutrition humaine que dans l'utilisation non alimentaire. Pour le secteur alimentaire, le développement de variétés de tournesol différemment enrichies en acides gras tel que l'acide oléique présente un réel intérêt pour l'alimentation humaine, avec de nombreux effets bénéfiques sur la santé (Purdy, 1986; Cole, *et al.*, 1998; Delplanque, 2000; Gertz, *et al.*, 2000; Lacombe et Bervillé, 2001; Benatti, *et al.*, 2004). Dans le secteur non alimentaire, l'huile de tournesol peut être utilisée dans le domaine des lubrifiants (Schneider, 2006) et biosolvants (Bewa et Alfós, 2005) grâce à un profil enrichi en acide oléique. Aussi, depuis quelques années les programmes de sélection orientés vers un profil plus riche en acide oléique se sont développés et la sole d'emblavement en tournesol oléique a augmenté et continue d'augmenter. De plus, l'intérêt croissant pour les composés mineurs (tocophérols et phytostérols) dans l'huile de tournesol amène à s'interroger sur l'influence de la conversion oléique sur le potentiel des hybrides à s'enrichir en composés mineurs. En effet, la littérature relate qu'un profil riche en acide oléique est plus stable qu'un profil enrichi en acide linoléique (Márquez-Ruiz, *et al.*, 1999; Gertz, *et al.*, 2000; Gertz et Kochhar, 2001) et solliciterait dans une moindre mesure les tocophérols. D'autre part, les travaux chez le tournesol de Demurin *et al.* (1996) montrent une corrélation négative entre l'acide oléique et les tocophérols.

L'objectif de cette étude était de fournir des éléments sur l'effet de la conversion oléique sur les teneurs et compositions en tocophérols et en phytostérols dans les akènes de tournesol. Des couples de lignées et d'hybrides classique et leur converti oléique ont été utilisés; ce matériel a été collecté sur différentes campagnes en plein champ entre 2003 et 2006. Dans un second temps, l'effet environnemental et plus particulièrement la réponse à un stress thermique au cours du remplissage des akènes a été évaluée par la mise en place d'un essai en serre dans des conditions contrôlées.

2.1. Etude de la variabilité de la composition en composés mineurs en réponse à la conversion oléique

2.1.1. Analyse de la variabilité

Afin de prendre en compte la variabilité du fond génétique dans l'étude de l'effet de la conversion oléique Pervenets sur les teneurs et compositions en tocophérols et en phytostérols dans l'akène de tournesol, des couples quasi isogéniques de lignées et d'hybrides classique et leur conversion oléique cultivés sur des mêmes lieux de 2003 à 2006, ont été étudiés.

Les résultats obtenus font l'objet de la préparation d'une publication scientifique insérée dans ce document de thèse :

AYERDI GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., DAYDE J., CALMON A., 2008.

Oleic conversion effect on tocopherol and phytosterol contents in sunflower oil.

Journal of the Science of Food and Composition. (en cours de préparation)

ORIGINAL ARTICLE

Oleic conversion effect on tocopherols and phytosterols content in sunflower oil

A. Ayerdi Gotor¹, M. Berger¹, F. Labalette², S. Centis³, J. Daydé¹, A. Calmon¹

¹ Université de Toulouse ; Ecole d'Ingénieurs de Purpan ; Laboratoire d'Agro-Physiologie/UMR 1054 ; 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France

² ONIDOL, 12 avenue George V, 75008 PARIS, France.

³ ASEDIS-SO, 39 chemin Virebent, 31200 TOULOUSE, France.

CORRESPONDING AUTHOR

Anne Calmon, Laboratoire d'Agro-Physiologie, EI Purpan, 31076 TOULOUSE CEDEX 3, France. Tel : + 33 (0)5 61 15 29 67 – Fax : +33(0)5 61 15 30 60 – e-mail : anne.calmon@purpan.fr

Article en cours de préparation

Abstract

In sunflower crop, conventional breeding is widely used for the modification of traits such as fatty acid composition and disease resistance, and mainly for obtaining a commercial oil with high oleic acid content. The growing interest on tocopherols and phytosterols present in sunflower due to their human health benefits requires the study of the influence of breeding programs on these bioactive components. A hundred of isogenic pairs of classic and its oleic version of hybrids and parental lines were cultivated between 2003 and 2006 in different locations in France. The results indicated that sunflower oil was rich in α -tocopherol and β -sitosterol. There was little correlation between traditional and oleic sunflower for the total tocopherol content, and no correlation for the total phytosterols content. There was little or no effect of the oleic conversion for the tocopherol and phytosterols content, nevertheless tocopherol content in oleic sunflower was slightly inferior to the classic genotypes but no significant.

KEYWORDS : Sunflower, Oil, Oleic conversion, Phytosterols, Tocopherols,

1. Introduction

The Mediterranean diet, with a high intake of oleic acid (mainly from olive oil consumption), has a proven benefit on human health. Many studies have demonstrated that a continuous intake of polyunsaturated fatty acids (PUFA) can reduce cardiovascular problems, dyslipidemias, diabetes and some cancers (Benatti et al., 2004, Brouwer et al., 2004, Reaven et al., 1993, Zock and Katan, 1998). Over 90's sunflower and canola breeders became interested on oleic acid and started research programs to develop new varieties with a high content on this fatty acid. Sunflower breeders have produced hybrids with very high oleic acid content (more than 90%). A variety is considered as oleic when its content is over 75% of total fatty acids, but hybrids with a middle oleic acid content (Mid oleic) have also been developed to maintain a optimal proportion of linoleic acid in the final oil composition.

At the same time an increasing interest for some minor components presents in sunflower seeds has appeared. In fact, tocopherols (Vitamin E) and phytosterols are bioactive compounds with health benefits present in the oil fraction. Tocopherols are lipids antioxidants, they are known to have a protective effect against many diseases including cancer, cardiovascular diseases, cell damage and DNA damage by free radicals, Alzheimer disease and oxidation of LDL (Bramley et al., 2000, Morris et al., 2005, Richey, 2005). Phytosterol are the plant hormones and they are already used to reduce cholesterol levels in human blood, added in margarines or in yogurts, this anticholesterolic properties have lengthly been studied (Kritchevsky, 2002, Trautwein et al., 2003, Normen et al., 2000, Richelle et al., 2004) but plant sterols have other interesting properties as anticancer dietary components (Awad and Fink, 2000), anti-inflammatory characteristics (Bouic et al., 1999) and anti-atherosclerosis (Patel and Thompson, 2006).

Sunflower tocopherol content is affected by genotype (Ayerdi Gotor et al., 2006, Velasco et al., 2002) but also by environmental conditions (Nolasco et al., 2004, Izquierdo et al., 2007), its content varies between 300 to 1800 mg/kg of oil, α -tocopherol is the major homologous present with more than 95% of the total tocopherol content. Phytosterol content in sunflower oil also varies among genotypes (Vlahakis and Hazebrook, 2000, Ayerdi Gotor et al., 2006) and environmental conditions (Roche et al., 2006) but less than tocopherols.

The difference on tocopherol content between oleic and classic cultivars has been observed in canola (Goffman and Becker, 2002) in peanut breeding lines (Jonnala et al., 2006) and in sunflower hybrids (Nolasco et al., 2006) but these studies did not compare the original lines with the converted one. We could not find, in the literature, any reference to phytosterols.

Breeding programs are used to modify principally, yield, fatty acid composition or disease resistance. The objective of this research was to evaluate the influence of breeding for high oleic acid content on the tocopherols and phytosterols content of sunflower oil.

2. Material and methods

Sunflower plants

Isoline pairs of sunflower hybrids and parental line classics (low oleic acid content and theirs oleic equivalents -- oleic acid content higher than 75% of total fatty acids) were cultivated between 2003 and 2006. Plants have produced from the different breeder partners of our project (Table 1).

Table 1. Genetic origin of the pairs used each year from different breeders and locations

Year	Number of pairs	Genetic origin of Oleic vs. Classic pairs
2003	7	Isogenic parental lines
	4	Self fecundated hybrids
	4 x 6	Self fecundated hybrids cultivated in 6 places
2004	3	Isogenic parental lines
	4 x 6	Self fecundated hybrids cultivated in 6 places
2005	5	Isogenic parental lines
	5	Self fecundated hybrids
2006	28	Isogenic parental lines, couples were close by cultivated

Chemical analysis of achenes

Solvent extraction of lipids

The analysis of the total oil content was performed by hexane extraction using a soxhlet extractor apparatus. Fifty grams of dry-freeze achenes were ground with a sample mill (KnifeTec 1095; Foss Tecator AB, Sweden) and placed in cellulose cartridges (Whatman $\varnothing$ = 30 mm, h = 100 mm, Prolabo-Subra, France). Cartridges were submitted to hexane (n-hexane, Prolabo-Subra, France) extraction for 4 hours in six soxhlet-ramp (NF EN ISO 659, 1998). Then, the solvent was removed from the extracts under low pressure evaporation with a rotavapor (HS 40 Huber, Bioblock Scientific, Heildolph). Lipid extracts were weighed and conserved at -18°C to minimize oxidative reactions before analysis.

Tocopherol determination

Complete separation of all native tocopherols was achieved using a high-performance liquid chromatography (HPLC) (SpectraPhysics; Thermo Separation Products, USA) and detection was performed with a fluorescence detector (excitation wavelength = 298 nm and emission wavelength = 344 nm; Waters 2475 multi λ , France) (ISO 9936, 1997). A normal-phase LiChrosorb Si60 column (250 cm $\times$ 4 mm $\times$ 5 μ m, CIL Cluzeau, France) was used. The mobile phase was hexane/isopropanol (99.7:0.3 v/v HPLC grade, SDS, France) and the solvent flow was 1 mL/min. One gram precisely weighed (Sartorius Analytical balance Precisa 205 A, Italy) of oil sample was diluted in 25 mL of hexane and 20 μ L were injected into the HPLC. Tocopherols were identified by comparison of retention times with respective standards (Tocopherol Kit; ChromaDex, USA). Standards were prepared in a methanolic solution (0.1 mg/ mL). Standard solutions were checked with an UV spectrophotometer (Hitachi U-1100 photometer). Total tocopherol content was calculated as the sum of α -, β -, γ - and δ -tocopherol contents and they were expressed in mg / kg oil (Ayerdi Gotor, et al.2006a).

Sterol determination

The oil (250 mg) with 1 mL of a freshly prepared solution of betulin (1mg/mL acetone) as internal standard was saponified with a 5ml of an ethanolic solution of KOH 5% (w/v) during 15 minutes. Then the sample was purified in an aluminium oxide column (pH 9-10, Panreac Química, Spain) and the unsaponifiable fraction was recovered after complete evaporation of solvents. The total and the individual sterol content were analyzed by Gas Chromatography following the international norm (NF EN ISO 12228, 1999), after a silylation with trimethylsilyl (TMS) ester derivatives (1-methylimidazole and N-methyl-N-(trimethylsilyl) heptafluorobutyramide reagent 5:95 v/v Sigma, France) during 15 minutes in 105°C oil bath. 1 μ L of the TMS solutions were injected into a silica capillary column (ZB-5, 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m, Phenomenex, France) in the gas chromatography (Fisons GC 8000 series MMFC 800 Multi-function controller, Italy) fitted with a flame ionization detector. Sterols were

identified using the ratio obtained between betulin (Internal standard) and sterol standards (Sigma-Aldrich, France). Sterols were expressed in mg / 100 g oil.

3. Results and discussion

A total of 100 isogenic pairs were cultivated in France in different places between 2003 and 2006. Total tocopherol content varied between 233 to 1016 mg/kg of oil, α tocopherol was the principal homologous with more than 95% of the total tocopherol content. This values were in accordance to the literature (Ayerdi Gotor, et al., 2006, Velasco, et al., 2002, Ayerdi Gotor et al., 2007). Total phytosterol varied between 179 to 467 mg / 100g of oil; total phytosterols corresponds to the sum of 7 sterols: β -sitosterol was the major one (40-50%) followed by campesterol (15-25%) and stigmasterol (15-25%). Vlahakis & Hazebroek reported similar values for phytosterols content and composition in sunflower oil (Vlahakis and Hazebroek, 2000).

Tocopherols

The comparison for the total tocopherol content between classic and its oleic isogenic line shows that there are little differences (Figure 1). In general, excepting in 2003, total tocopherol content was higher in classic hybrids or classic parental lines than their corresponding oleic. In 2003, a very hot summer, values were closer to the median (dotted line).

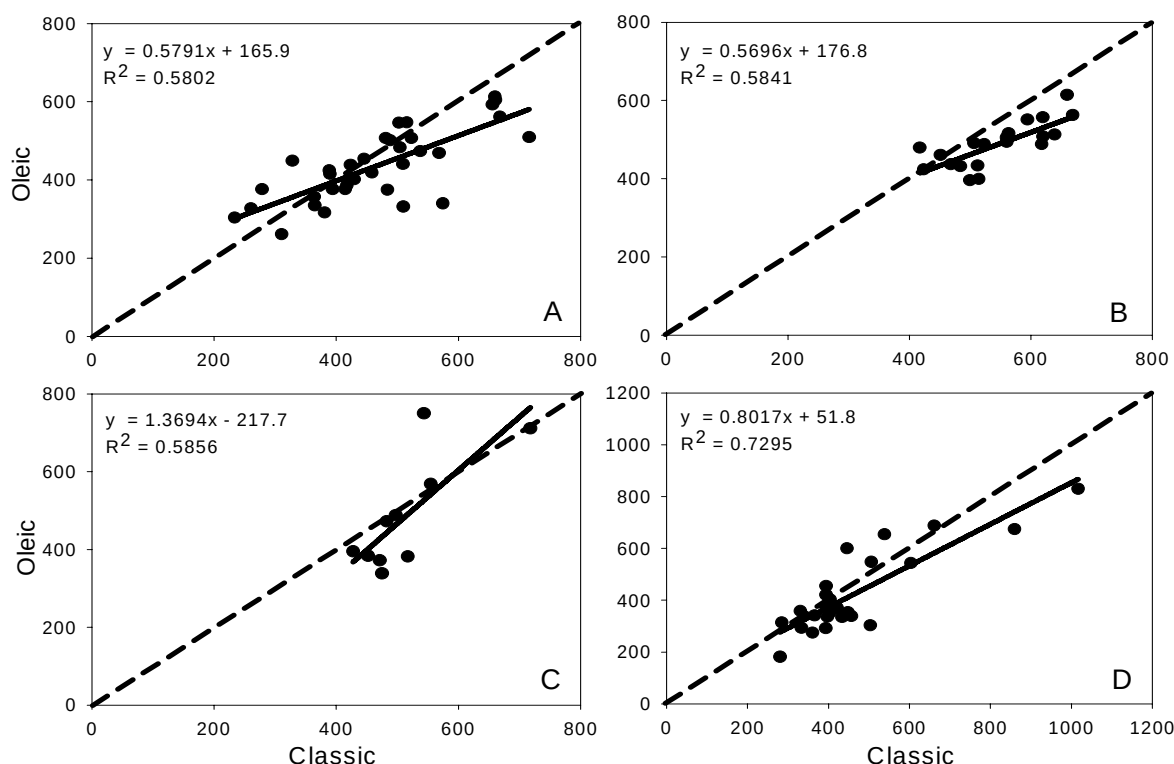


Figure 1. Correlation between classic and oleic sunflower for the total tocopherol content (mg/kg oil) for 4 years: A- 2003; B- 2004; C- 2005; D- 2006

Phytosterol

Figure 2 shows the absence of correlation for the phytosterols content between classic and oleic hybrids and parental lines.

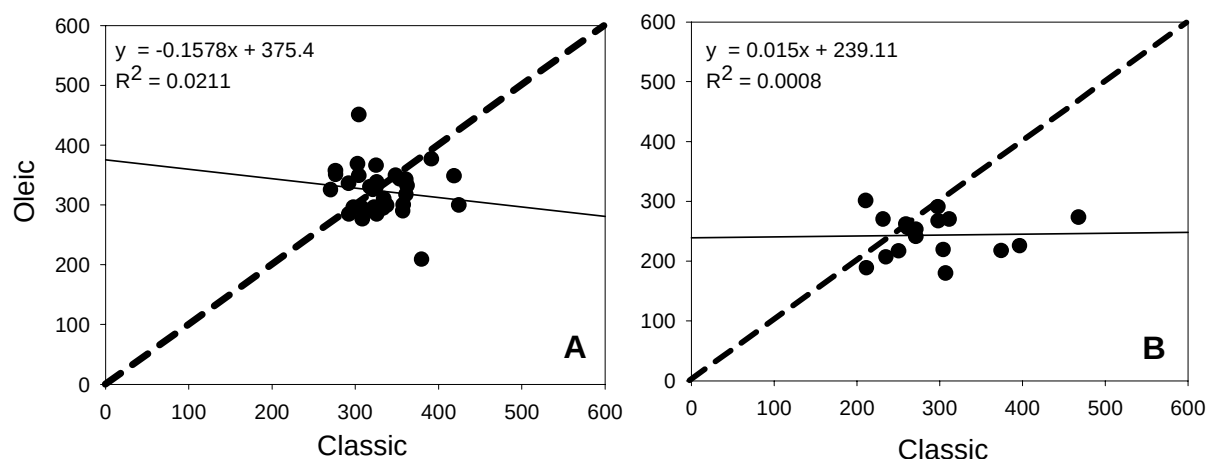


Figure 2 Correlation between classic and oleic sunflower for the total phytosterol content (mg/100g oil) for 2 years: A- 2003; B- 2004.

4. Conclusions

Oleic hybrids and parental lines had slightly lower tocopherol content than classic ones; phytosterols content did not vary inside the couples studied. The tocopherol antioxidant function in oils have been largely studied in literature (Quiles et al., 2002, Evans et al., 2002, Psomiadou and Tsimidou, 2002). They have proved that more the fatty acid had unsaturations more easily it was oxidated and more the oil contained tocopherols more it was resistant to oxidations. But when we observed the quasi isogenic pairs used in this report, there was no difference in tocopherol content even if the fatty acid profile had changed. There is no evidence of any effect on the tocopherol and phytosterol content when the fatty acids composition in sunflower oil was modified by breeding programs. Nevertheless during seed development, regulatory mechanisms of these components (fatty acids, tocopherols and phytosterols) as the enzyme activity, could be altered by environmental factors such as temperature, to protect the plant against oxidations altering the final oil composition.

5. Acknowledgments

The authors thank Caussade Semences, Maïsadour Semences, Monsanto Dekalb, RAGT-R2n, Soltis, Syngenta Seeds for field experiments and sunflower plant material providing. Financial support was provided by ASEDIS-SO, ONIDOL (French Oil seeds organization) and Midi-Pyrenees Region. We also thank Cognis-France for their technical support.

References

- Benatti P., Peluso G., Nicolai R., Calvani M., 2004. Polyunsaturated fatty acids: Biochemical, nutritional and epigenetic properties. *Journal of the American College of Nutrition* 23, 281-302.
- Brouwer I. A., Katan M. B., Zock P. L., 2004. Dietary alpha-linolenic acid is associated with reduced risk of fatal coronary heart disease, but increased prostate cancer risk: a meta-analysis. *Journal of Nutrition* 134, 919-922.
- Reaven P., Parthasarathy S., Grasse B. J., Miller E., Steinberg D., Witztum J. L., 1993. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *Journal of Clinical Investigation* 91, 668-676.

- Zock P. L., Katan M. B., 1998. Linoleic acid intake and cancer risk: a review and meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition* 68, 142-153.
- Bramley P. M., Elmafa I., Kafatos A., Kelly F. J., Manios Y., Roxborough H. E., Schuch W., Sheehy P. J. A., Wagner K. H., 2000. Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 913-938.
- Morris M., Evans D., Tangney C., Bienias J., Wilson R., Aggarwal N., Scherr P., 2005. Relation of the tocopherol forms to incident Alzheimer disease and to cognitive change. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 508-514.
- Richey R. M., 2005. Vitamin E supplementation, cardiovascular events, and cancer. *Jama-Journal of the American Medical Association* 294, 425-425.
- Kritchevsky D. (2002) Phytosterols in human health. In: Mackey K. (ed) *Nutritional toxicology*. Taylor & Francis, New York, pp 173-189
- Trautwein E. A., Duchateau G., Lin Y. G., Mel'nikov S. M., Molhuizen H. O. F., Ntanios F. Y., 2003. Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105, 171-185.
- Normen L., Dutta P., Lia A., Andersson H., 2000. Soy sterol esters and beta-sitostanol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel. *American Journal of Clinical Nutrition* 71, 908-913.
- Richelle M., Enslin M., Hager C., Groux M., Tavazzi L., Godin J. P., Berger A., Metairon S., Quaile S., Piguet-Welsch C., Sagalowicz L., Green H., Fay L. B., 2004. Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of beta-carotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 80, 171-177.
- Awad A. B., Fink C. S., 2000. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. *Journal of Nutrition* 130, 2127-2130.
- Bouic P. J. D., Clark A., Lamprecht J., Freestone M., Pool E. J., Liebenberg R. W., Kotze D., van Jaarsveld P. P., 1999. The effects of B-sitosterol (BSS) and B-sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: Inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. *International Journal of Sports Medicine* 20, 258-262.
- Patel M. D., Thompson P. D., 2006. Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis* 186, 12-19.
- Ayerdi Gotor A., Berger M., Labalette F., Centis S., Daydé J., Calmon A., 2006. Etude de la variation des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule : Partie I - Tocophérols. *OCL-Oléagineux, Corps Gras, Lipides* 13, 206-212.
- Velasco L., Fernández-Martínez J. M., García-Ruiz R., Domínguez J., 2002. Genetic and environmental variation for tocopherol content and composition in sunflower commercial hybrids. *Journal of Agricultural Science* 139, 425-429.
- Nolasco S. M., Aguirrezábal L. A. N., Crapiste G. H., 2004. Tocopherol oil concentration in field-grown sunflower is accounted for by oil weight per seed. *Journal of the American Oil Chemists Society* 81, 1045-1051.
- Izquierdo N. G., Mascioli S., Aguirrezábal L. A. N., Nolasco S. M., 2007. Temperature influence during seed filling on tocopherol concentration in a traditional sunflower hybrid. *Grasas y Aceites* 58, 170-178.
- Vlahakis C., Hazebroek J., 2000. Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting location, and temperature. *Journal of the American Oil Chemists Society* 77, 49-53.
- Ayerdi Gotor A., Berger M., Labalette F., Centis S., Daydé J., Calmon A. (2006) Variability of minor components in sunflower (*Helianthus annuus L.*) oil from a multi-local

- study. In: 17th International Symposium on Plant Lipids, East Lansing, MI, USA. ISPL2006, pp 248-252
- Roche J., Bouniols A., Mouloungui Z., Barranco T., Cerny M., 2006. Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108, 287-297.
- Goffman F. D., Becker H. C., 2002. Genetic variation of tocopherol content in a germplasm collection of *Brassica napus* L. *Euphytica* 125, 189-196.
- Jonnala R. S., Dunford N. T., Dashiell K. E., 2006. Tocopherol, phytosterol and phospholipid compositions of new high oleic peanut cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 601-605.
- Nolasco S. M., Aguirrezábal L. A. N., Lúquez J., Mateo C., 2006. Variability in oil tocopherol concentration and composition of traditional and high oleic sunflower hybrids (*Helianthus annuus* L.) in the Pampean region (Argentina). *Grasas y Aceites* 57, 260-269.
- NF EN ISO 659 (1998) Association française de normalisation, 1998. European Norm, NF EN ISO 659 october 1998; French norm V 03-905: Oilseeds - Determination of oil content (Reference method). AFNOR. Paris. 14 + 3 pp.
- ISO 9936 (1997) International Standard Organization, 1997. ISO 9936: Animal and vegetable fats and oils - Determination of tocopherols and tocotrienols contents - Method using high-performance liquid chromatography. ISO. Genève. 11 pp.
- NF EN ISO (1999) Association française de normalisation, 1999. European norm, NF EN ISO 12228 May 1999; French norm T 60-258: Animal and vegetable fats and oils - Determination of individual and total sterols contents - Gas chromatographic method. AFNOR. Paris. 18 pp.
- Ayerdi Gotor A., Farkas E., Berger M., Labalette F., Centis S., Daydé J., Calmon A., 2007. Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 525-530.
- Quiles J. L., Ramirez-Tortosa M. C. G., J.A., Huertas J. R., Mataix J., 2002. Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. *Food Chemistry* 76, 461-468.
- Evans J. C., Kodali D. R., Addis P. B., 2002. Optimal tocopherol concentrations to inhibit soybean oil oxidation. *Journal of the American Oil Chemists Society* 79, 47-51.
- Psomiadou E., Tsimidou M., 2002. Stability of Olive Oil. 1. Autoxidation Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 716-721.

2.1.2. Bilan de l'étude

Les teneurs en tocophérols totaux varient entre 233 et 1016 mg.kg⁻¹ d'huile, et celles des phytostérols entre 179 et 467 mg.100g⁻¹ d'huile ; ces valeurs sont en accord avec celles observées dans la littérature (Velasco, *et al.*, 2002; Ayerdi Gotor, *et al.*, 2006a; Ayerdi Gotor, *et al.*, 2007).

Cette étude montre que la conversion oléique diminue sensiblement la teneur en tocophérols totaux. De plus, l'effet de l'environnement, et plus particulièrement de la température influence les teneurs en tocophérols, comme il a été observé lors de l'étude précédente; une température plus élevée pendant le remplissage des graines induit une diminution de la teneur en tocophérols. Des travaux portant sur la fonction antioxydante des tocophérols dans les huiles ont largement été développés (Evans, *et al.*, 2002; Psomiadou et Tsimidou, 2002; Quiles, *et al.*, 2002) et ont montré que plus une huile était riche en composés insaturés et pauvre en tocophérols, plus elle était facilement oxydée. Ainsi, un profil riche en acide oléique est plus stable car il est moins insaturé qu'un profil enrichi en acide linoléique (Márquez-Ruiz, *et al.*, 1999; Gertz, *et al.*, 2000; Gertz et Kochhar, 2001) ; les tocophérols seront ainsi moins sollicités. Au regard de ces résultats, la conversion oléique ne favorise pas d'augmentation de la teneur en tocophérols mais plutôt une diminution. Les conclusions exposées par Demurin, *et al.* (1996) montrant une corrélation négative entre la teneur en acide oléique (C18:1) et l'accumulation des tocophérols dans la graine de tournesol vont dans ce sens. Dans cette étude, les teneurs en phytostérols ne semblent pas affectées par la conversion oléique ; la gamme de variabilité des phytostérols dans les couples étudiés n'est peut-être pas suffisante pour observer un effet. Cependant, l'étude précédente sur les cinétiques de remplissage a montré que la variabilité génétique sur les teneurs en phytostérols était inférieure à celle observée sur les tocophérols.

Néanmoins, pendant le développement de l'akène, les mécanismes de régulations de ces composants (acides gras, tocophérols et phytostérols) sont altérés par des facteurs environnementaux tels que la température. La réponse à un stress pour protéger l'akène face aux oxydations conduit à une modification de la composition finale de l'huile.

2.2. Effet d'un stress thermique au cours du remplissage de l'akène sur l'accumulation des composés mineurs – Comparaison d'un hybride et de sa conversion oléique

Les résultats de l'étude des cinétiques d'accumulation des composés mineurs ont montré que les tocophérols, comme les phytostérols, étaient accumulés très tôt (avant 25 JAF) ; leur concentration restant relativement stable pour les tocophérols, ou ayant tendance à décroître pour les phytostérols. De plus, en 2003, une diminution de la teneur en tocophérols et une augmentation de la teneur en phytostérols ont été observées. Ces effets sont très probablement dus aux fortes températures moyennes que les plantes ont subies durant le remplissage des akènes.

Par ailleurs, les comparaisons de couples isogéniques classique/oléique laissent supposer que cette conversion aurait un léger effet, peut être plus marqué en conditions stressantes. En fait, au moins pour le cas des tocophérols, les conditions oxydatives créées par un stress appliqué en phase sensible devraient avoir une répercussion sur les teneurs finales dans l'akène.

Cette étude, réalisée en conditions contrôlées a donc pour objectif de mettre en évidence des phases critiques durant la cinétique de remplissage de l'akène et/ou une différence de réponse selon le type d'huile accumulée dans l'akène. Pour ceci, deux hybrides (Alisson RM, et Alisson RMO, converti high oléique par introgression de la mutation Pervenets) ont été cultivés en serre, en pots, jusqu'à la floraison. Les stress (7 jours consécutifs de températures de type canicule : 25°C nuit et 35°C jour) ont été appliqués en phytotron, sous une photopériode de 14 heures, à des stades spécifiques du remplissage de la graine :

- Stade 1 : entre 10 et 17 JAF, phase précoce du développement de l'akène, correspondant à une croissance rapide de la teneur en huile (Lagravère *et al.*, 2004) ;
- Stade 2 : entre 23 et 30 JAF, phase d'accumulation proprement dite des acides gras, l'acide linoléique est encore en forte accumulation chez les génotypes classiques, tandis que son accumulation est en décroissance chez les oléiques. A ce stade, les composés mineurs semblent avoir atteint un plateau, mais ils ont montré une décroissance en 2003
- Stade 3 : entre 40 et 47 JAF, l'accumulation d'huile est terminée, l'akène arrive à maturité physiologique. Cette phase peut correspondre à une diminution des phytostérols et pourrait être sensible pour les tocophérols puisque les acides gras de réserve sont accumulés.

Etant donné que le passage en phytotron impliquait aussi un stress lié au changement d'éclairement, à chaque traitement, un lot de plantes contrôles a été mis dans un second phytotron, sous photopériode, éclairement, et hygrométrie identiques, mais à une température considérée comme optimale, moyenne de celle observée en serre (18°C nuit et 25°C jour). Un troisième lot témoin est resté dans la serre. Pour le stade 1, un stress "fort" a aussi été étudié (35°C nuit et 45°C jour). Après les 7 jours de stress, les plantes étaient remises en serre, les graines ont été analysées à maturité.

Cependant, pendant la durée de l'essai, des températures anormalement élevées ont pu conduire à une température supérieure à 40°C dans la serre. Cette température était donc bien supérieure à celle du phytotron « témoin ». Ainsi, cette situation a pu provoquer un stress supplémentaire non contrôlé sur les plantes.

2.2.1. Comparaisons des deux hybrides

Les deux génotypes retenus ne diffèrent significativement que pour leurs pourcentages en acide oléique (Tableau 1). La teneur en huile moyenne des deux hybrides est de 34,6%, ce qui est faible mais peu surprenant pour des plantes cultivées en pot. Les teneurs moyennes en phytostérols et tocophérols totaux sont respectivement de 430 mg.100g⁻¹ d'huile et 460 mg.kg⁻¹ d'huile.

Tableau 1. Moyennes ± Erreur standard des témoins (Alisson RM et Alisson RMO) restés en serre pendant l'essai. (S.D : Significativement différent)

Hybride	n	Phytostérols totaux (mg.100 g ⁻¹ d'huile)	Tocophérols totaux (mg.kg ⁻¹ d'huile)	% Acide Oléique	% Protéines	% Huile
Alisson RM	10	426,1 ± 20,2	456,9 ± 19,6	54,9 ± 5,5	27,5 ± 1,4	35,3 ± 1,0
Alisson RMO	9	434,4 ± 22,5	463,2 ± 20,9	85,3 ± 1,3	27,4 ± 0,5	34,0 ± 1,4
Moyenne	19	430,0 ± 14,7	460,0 ± 13,9	S.D.	27,5 ± 0,7	34,6 ± 0,8

Par contre, la comparaison des témoins passés en phytotron (Figure 1) montre quelques écarts, dont un significatif pour la teneur en phytostérols lors du stress précoce "Fort". Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les températures du traitement de contrôle étaient plus faibles que les pics des températures maximales dans la serre, et que ces températures relativement basses, combinées à un éclairage et une hygrométrie différentes aient eu un effet, plus particulièrement sur l'hybride converti. Au contraire, l'hybride classique semble avoir une teneur supérieure en tocophérols.

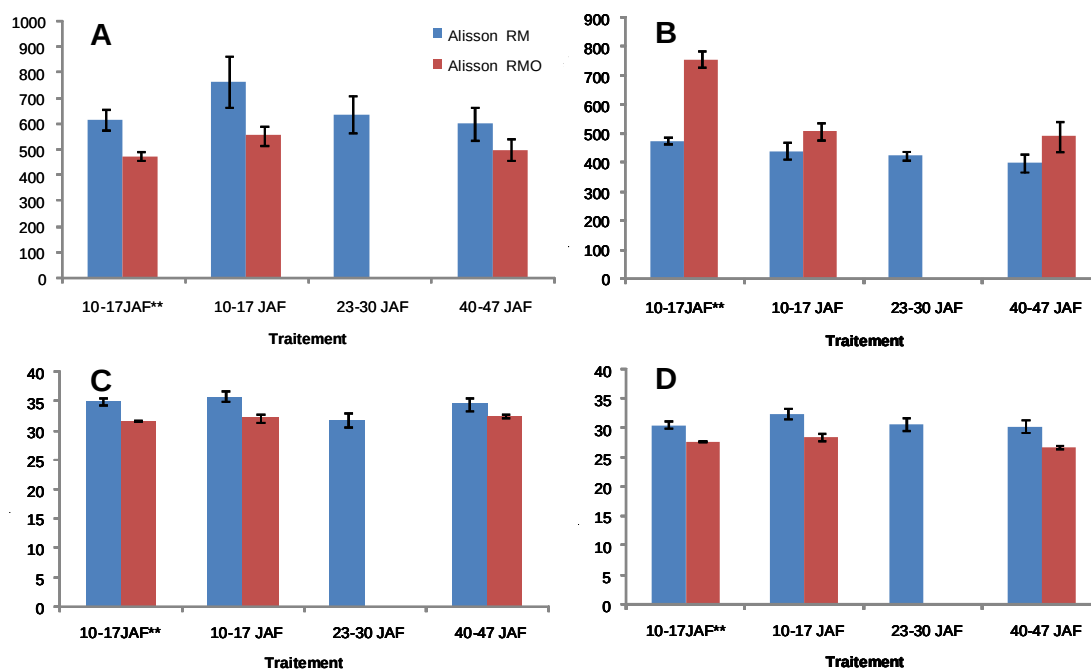


Figure 1. Teneurs en : A : tocophérols, B : phytostérols, C : protéines et D : huile des témoins passés en phytotron à température optimale lors des 4 traitements (10-17JAF : stress "fort" stade1; 10-17JAF : stress stade 1 ; 23-30JAF : stress stade 2 et 40-47JAF : stress stade 3), les effectifs sont 6, 3, 6 et 5 plantes Alisson RM pour chacun de ces traitements, et 4, 6, 0 et 5 pour Alisson RMO (les plantes manquantes sont mortes ou se sont cassées avant d'arriver à maturité)**

L'effet du stress thermique a été étudié en comparant chaque traitement avec les témoins passés au phytotron au même stade (Tableau 2 et Tableau 3). Toutefois, les résultats ne montrent pas d'écarts très importants, ni de cohérence particulière, si ce n'est pour le stress précoce "fort". Pour ce dernier, on retrouve la diminution des teneurs en tocophérols et l'augmentation des teneurs en phytostérols pour l'hybride classique. Par contre, l'hybride oléique présente plutôt la tendance inverse.

Les stress ne semblent pas avoir significativement modifié les teneurs en huile et en acide oléique contrairement à ce qui est énoncé dans la littérature. Il a été montré que la synthèse de l'acide oléique est affecté par les fortes températures en agissant sur la $\Delta 12$ -désaturase qui transforme l'acide oléique en acide linoléique (García-Díaz, *et al.*, 2002; Sobrino, *et al.*, 2003; Roche, *et al.*, 2006).

2.2.2. Bilan de l'étude

En conclusion, cette étude n'a pas mis en évidence un effet du stress thermique appliqué à différents stades de remplissage sur les teneurs en tocophérols et en phytostérols. La principale raison pourrait être le stress subi par les plantes témoins restées en serre; en effet pendant la période de l'essai, des températures anormalement élevées pour cette période de l'année ont été observées. Ainsi, les plantes contrôles en phytotron auraient été protégées d'un stress, tandis que celles des autres séries auraient pu subir deux stress.

Tableau 2. Effet d'un stress thermique sur les teneurs en tocophérols et phytostérol. Comparaison des hybrides classique et oléique (moyenne $\pm$ erreur standard). Les effectifs de chaque traitement ont été reportés pour les phytostérols, ce sont les mêmes pour toutes les variables mesurées.

Hybride	Période	Phytostérols totaux (mg.100g ⁻¹ huile)		Tocophérols totaux (mg.kg ⁻¹ huile)	
		Température optimale	Stress thermique	Température optimale	Stress thermique
		(25°C J et 18°C N)	(35°C J et 25°C N) (45°C J et 35°C N)**	(25°C J et 18°C N)	(35°C J et 25°C N) (45°C J et 35°C N)**
Alisson RM	10-17JAF**	476,4 $\pm$ 11,0 (n=6)	834,7 $\pm$ 84,3 (n=4)	616,2 $\pm$ 39,2	571,1 $\pm$ 28,4
	10-17 JAF	440,6 $\pm$ 28,4 (n=3)	527,8 $\pm$ 15,1 (n=6)	766,8 $\pm$ 99,9	686,9 $\pm$ 50,7
	23-30 JAF	424,0 $\pm$ 16,9 (n=6)	488,1 $\pm$ 23,3 (n=6)	638,1 $\pm$ 72,5	455,0 $\pm$ 31,7
	40-47 JAF	398,6 $\pm$ 32,8 (n=5)	469,6 $\pm$ 12,3 (n=6)	603,2 $\pm$ 63,7	659,2 $\pm$ 62,6
AlissonRMO	10-17JAF**	758,2 $\pm$ 27,4 (n=4)	664,7 $\pm$ 17,8 (n=6)	474,4 $\pm$ 17,2	613,7 $\pm$ 46,1
	10-17 JAF	510,2 $\pm$ 29,1 (n=6)	407,2 $\pm$ 11,4 (n=4)	555,8 $\pm$ 35,7	600,0 $\pm$ 19,9
	23-30 JAF	(n=0)	471,0 $\pm$ 8,1 (n=4)		593,0 $\pm$ 40,9
	40-47 JAF	490,9 $\pm$ 50,2 (n=5)	495,3 $\pm$ 29,2 (n=6)	500,0 $\pm$ 40,9	508,8 $\pm$ 57,6

Tableau 3. Effet d'un stress thermique sur les pourcentages de protéines, d'huile et d'acide oléique. Comparaison des hybrides classique et oléique (moyenne $\pm$ erreur standard). Les effectifs par traitement sont les mêmes que pour le Tableau 2

Hybride	Période	% Protéines		% Huile		% Acide Oléique	
		Temp. optimale	Stress	Temp. optimale	Stress	Temp. Optimale	Stress
		(25/18°C J/N)	(35 /25°C J/ N) (45/35°C J/N)**	(25/18°C J/N)	(35 /25°C J/ N) (45/35°C J/N)**	(25/18°C J/N)	(35 /25°C J/ N) (45/35°C J/N)**
Alisson RM	10-17JAF**	30,6 $\pm$ 0,6	27,2 $\pm$ 2,3	35,0 $\pm$ 1,4	31,3 $\pm$ 1,4	34,8 $\pm$ 3,2	39,1 $\pm$ 1,3
	10-17 JAF	32,5 $\pm$ 0,9	32,9 $\pm$ 0,3	35,8 $\pm$ 2,2	35,2 $\pm$ 1,5	29,5 $\pm$ 2,8	24,5 $\pm$ 0,2
	23-30 JAF	30,7 $\pm$ 1,1	30,4 $\pm$ 0,2	31,8 $\pm$ 3,0	32,7 $\pm$ 2,5	45,1 $\pm$ 4,1	40,2 $\pm$ 0,4
	40-47 JAF	30,3 $\pm$ 1,0	28,7 $\pm$ 0,6	34,5 $\pm$ 1,9	32,0 $\pm$ 0,9	47,5 $\pm$ 3,8	47,8 $\pm$ 5,1
Alisson RMO	10-17JAF**	27,8 $\pm$ 0,1	28,4 $\pm$ 1,1	31,7 $\pm$ 4,7	33,7 $\pm$ 1,4	62,4 $\pm$ 2,9	82,3 $\pm$ 0,5
	10-17 JAF	28,5 $\pm$ 0,6	30,2 $\pm$ 0,4	32,1 $\pm$ 0,9	31,9 $\pm$ 2,2	86,4 $\pm$ 1,3	86,6 $\pm$ 0,4
	23-30 JAF		28,1 $\pm$ 0,7		34,6 $\pm$ 2,4		92,8 $\pm$ 1,5
	40-47 JAF	26,7 $\pm$ 0,3	28,2 $\pm$ 0,7	32,4 $\pm$ 1,6	33,4 $\pm$ 2,0	80,8 $\pm$ 2,3	78,9 $\pm$ 4,1

2.3. Etude d'un vieillissement accéléré d'akènes de tournesol sur la germination et sur les teneurs en composés mineurs

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet protecteur des tocophérols et phytostérols sur la préservation des capacités germinatives de l'akène lors de son vieillissement. En effet, les réactions d'oxydation induites par le vieillissement, pourraient endommager l'embryon et réduire la vigueur des plantules (Bailly, *et al.*, 2002). Pour cet essai, le vieillissement de la semence a été stimulé par un protocole de vieillissement accéléré (Zacheo, *et al.*, 1998; ISTA, 2004).

2.3.1. Effet du vieillissement accéléré sur la vigueur germinative et sur les teneurs en tocophérols et phytostérols

Dans cette étude, trois hybrides : Melody (choisi pour ses faibles teneurs en tocophérol et phytostérol), ainsi que la paire isogénique classique/oléique Alisson RM et Pacific (Alisson RMO) ont subi un vieillissement accéléré dans une étuve (42°C et RH = 100%). Le stress thermique a été appliqué pendant 30 jours et tous les jours, des

akènes ont été prélevés pour subir un test standard de germination. Les résultats montrent qu'Alisson RM et son équivalent quasi isogénique converti oléique, Pacific, perdraient de la vigueur germinative lorsque la durée du vieillissement se prolonge ; au contraire Melody semble moins affecté par le vieillissement accéléré (Figure 2) ; cependant, sa vigueur germinative est inférieure aux autres hybrides, comme le montre sa faible proportion de plantules de grande taille (classe 2 qui correspond aux plantules de > 10mm) observées après 7 jours de germination.

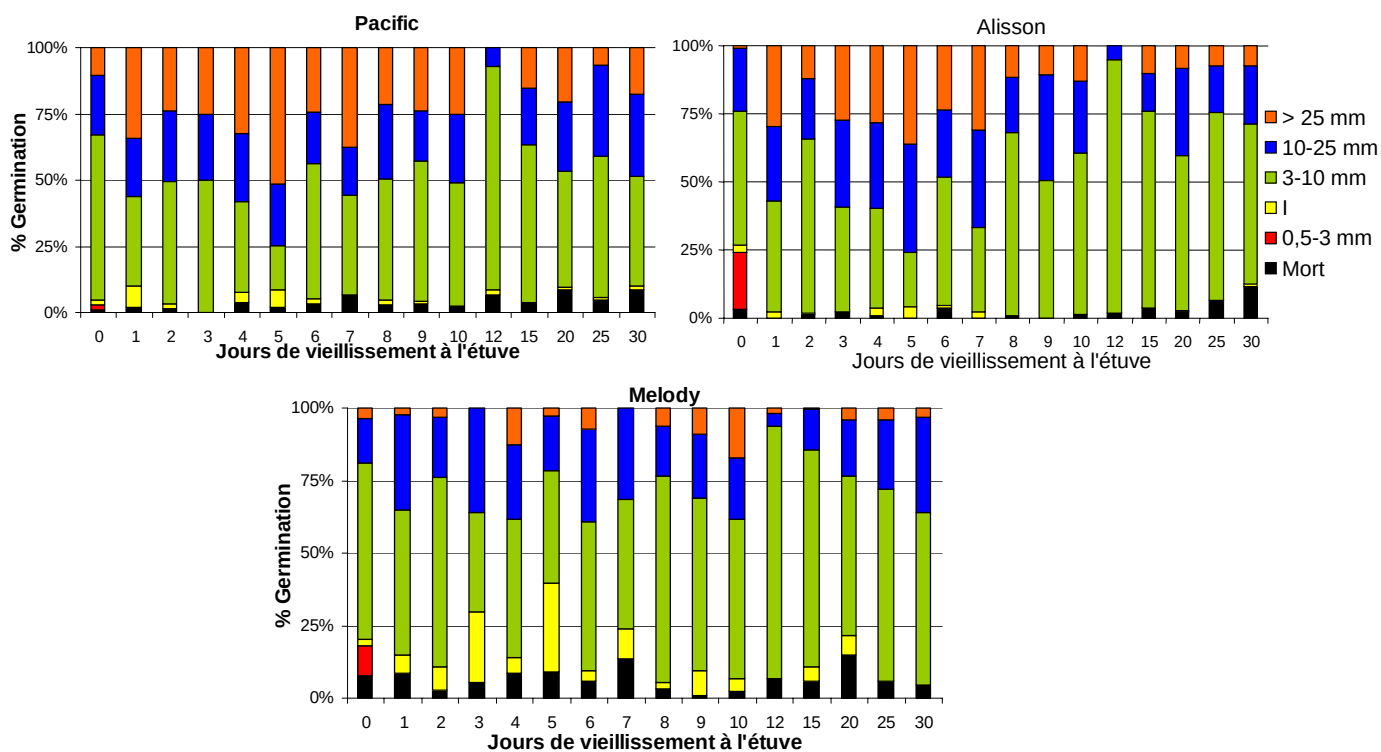


Figure 2. Pourcentage de chaque groupe (couleur en fonction de la longueur de l'hypocotyle) des 3 hybrides pour la moyenne des répétitions au 7^{ème} jour après la mise en germination en fonction des jours passés à l'étuve du totale des plantes qui ont subi cette durée de stress entre 0 et 30 jours (représentés par une barre).

Si on considère la vitesse de croissance des plantules à la germination comme un témoin de la vigueur germinative, la proportion de semences germées en classe 2 doit être la plus élevée possible. On constate qu'elle est effectivement toujours supérieure à la classe 1, mais elle a tendance à diminuer lorsque le nombre de jours à l'étuve augmente : plus la durée du stress augmente plus les hypocotyles sont petits.

Les teneurs en tocophérols et en phytostérols ont été comparées dans les plantules après 7 jours de germination, avant le vieillissement et au cours de celui-ci (Tableau 4). La moyenne générale pour l' α -tocophérol, isomère majoritaire, était de 392,94 mg/kg d'huile suivie par le δ -, le β - et le γ -tocophérol. Les différences entre les hybrides pour la teneur en α -tocophérol sont significatives, Alisson et Pacific ont des valeurs similaires tandis Melody a une teneur légèrement inférieure, ce qui va dans le sens attendu.

Tableau 4. Composition en tocophérols (mg/kg huile) des plantules à 7 jours après mise en germination sans stress initial pour les 3 hybrides.

	Alisson	Melody	Pacific
α - tocophérol	395,47	360,02	380,70
β - tocophérol	10,61	15,48	8,52
γ - tocophérol	9,09	9,89	13,42
δ - tocophérol	29,19	5,89	11,05

Les teneurs en tocophérols mineurs sont aussi significativement différentes (Tableau 5). Si la durée de vieillissement (effet "jour"), n'est pas significative, on constate que l'effet des longueurs d'hypocotyles (Classe 1 vs Classe2) est significatif, et que surtout, l'interaction significative signifie que ces classes n'ont pas la même teneur en α - et β -tocophérol selon leur durée de vieillissement.

Tableau 5. Moyenne des carrés, et résultats des ANOVA pour les teneurs en tocophérols des plantules. Effets de la variété, de la durée du stress, selon la classe de longueur des hypocotyles (indicateur de vigueur).

	α -toco	β -toco	γ -toco	δ -toco	Total toco	Taux germination
Hybride	17210*	741***	301***	7927***	37970***	253
Jour	5293	2*	11	82	6277	350***
Longueur hypocotyles	37370***	45*	863***	8	51436**	46468***
Jour x L.hypocotyles	100463*	24*	22	272 ***	12953***	771***

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Globalement, les plantules les plus grandes ont une plus forte concentration en α - et β -tocophérols (Figure 3), tandis que les plantules de la classe 1, ont une teneur en α -tocophérol moyenne de 367,07 mg/kg huile, significativement inférieure aux plantules de la classe 2 (391,79 mg/kg d'huile).

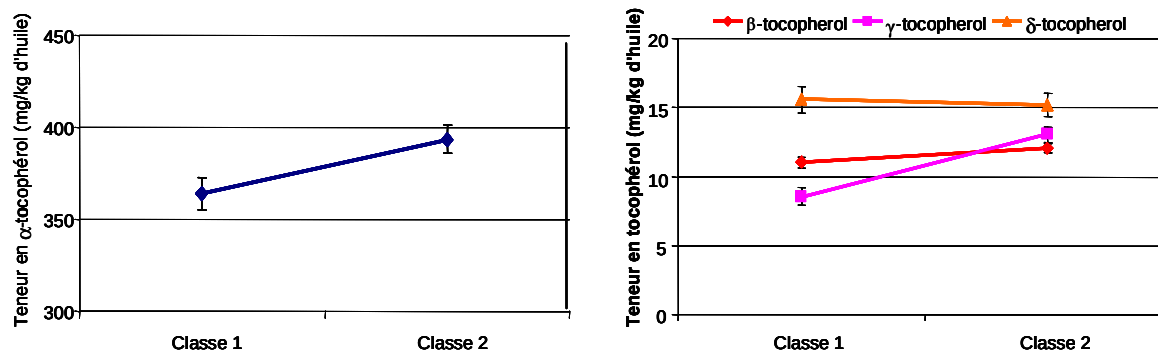


Figure 3. Différences entre classes, moyenne des 3 hybrides et tous les jours de stress pour la teneur en α , β , γ et δ -tocophérol (mg/kg huile)

On constate aussi que les deux classes de plantules ne présentent pas les mêmes teneurs en tocophérols : plus le test de vieillissement est long, plus les grandes plantules ont une teneur en tocophérol élevée tandis que les petites plantules montrent la tendance inverse. De même, pour les plus longues durées de vieillissement, les grandes plantules semblent présenter plus de β - et de γ -tocophérol (Figure 4).

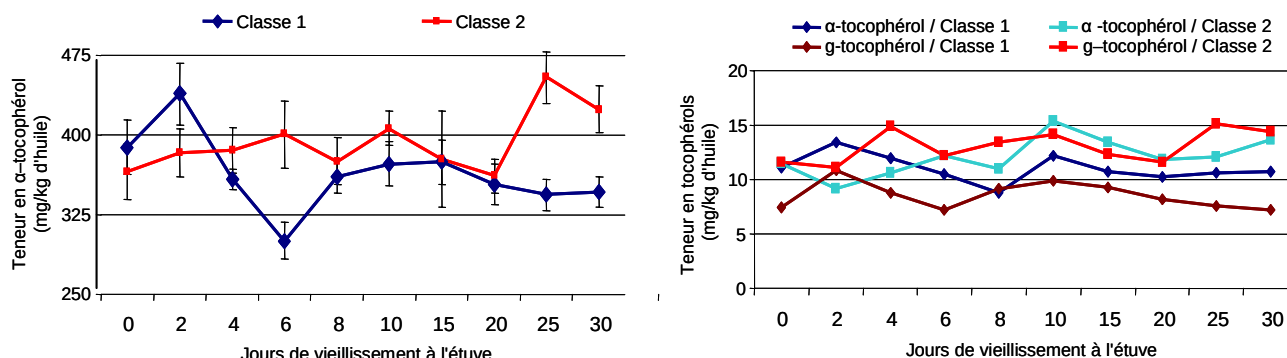


Figure 4. Évolution de la teneur en tocophérols totaux selon la classe de taille des plantules en fonction des jours passés à l'étuve (moyenne des 3 hybrides).

Discussion

Les tocophérols sont essentiels pour maintenir l'intégrité membranaire des cellules ainsi que leur compartimentation, en réduisant le métabolisme énergétique comme la production d'ATP (McDonald, 1998; Munné-Bosch, 2005). Mais aussi ils sont essentiels lors de la protection du système photosynthétique (Kruk, *et al.*, 2005; Krieger-Liszkay et Trebst, 2006), nécessaire pour l'établissement de la photosynthèse et donc à la croissance de la plante. Dans le cas d'un stress, une augmentation de ces composés mineurs protégerait la plante en piégeant les oxygènes (ROS) et les radicaux peroxy lipidiques, ce qui, si le stress dure trop longtemps, conduit à une diminution de la teneur en tocophérols. D'après Bailly, *et al.* (2002), le taux de germination des semences vieilles est lié à l'activité des ROS qui peuvent être produits dans les organes non-photosynthétiques, comme les graines (si l'humidité permet la respiration à travers l'activité mitochondriale). La détérioration des semences est fortement influencée par des facteurs environnementaux comme la température ou l'humidité, et ces deux facteurs peuvent agir de manière synergique, l'humidité accélérant les conséquences de la température élevée (McDonald, 1999; Kibinza, *et al.*, 2006). La teneur en tocophérols dans la graine à maturité est corrélée à la température pendant la croissance de la plante : négativement dans le cas du tournesol et positivement chez le soja (Velasco, *et al.*, 2002; Ayerdi Gotor, *et al.*, 2006a; Ayerdi Gotor, *et al.*, 2006b). Ces résultats sont en concordance avec ceux de Britz et Kremer (2002), qui ont montré que la sécheresse a un effet moindre que la chaleur sur la teneur en tocophérols chez le soja.

Dans cet essai, le taux de graines non germées ou de graines mortes est peu différent entre les hybrides, ce qui peut être expliqué en grande partie par le fait que ce sont des hybrides commerciaux dont un des critères de sélection est justement le taux de germination. Bailly *et al.* (2002) ont montré que les semences âgées ont une vigueur germinative significativement inférieure à celle des jeunes semences. Des résultats similaires ont été trouvés par McDonald (1999). Chez le colza et le soja, le γ -tocophérol est l'isomère majoritaire, cependant, on observe chez ces espèces, une conversion du γ -tocophérol en α -tocophérol grâce à l'activité de la γ -méthyle transférase lors de la germination (McDonald, 1999 ; Zhang *et al.* 2007). Après environ 10 jours de germination, la synthèse d' α -tocophérol est assurée *de novo* dans les chloroplastes de la plantule grâce au démarrage de l'activité photosynthétique. Les tocophérols de la graine seraient donc aussi des tocophérols de réserve. Dans l'étude présentée ici, nous trouvons peu d'influence du stress de vieillissement artificiel sur la vigueur germinative, sauf peut être, une tendance à la diminution pour la variété Melody. Par contre, les plantules contiennent des teneurs différentes en tocophérols selon leur taille après 7 jours de germination, et cette différence est d'autant plus élevée que le vieillissement a été prolongé.

2.3.1. Etude des cinétiques d'accumulation des tocophérols pendant les sept premiers jours de germination

En fait, la faible augmentation de la teneur en tocophérol observée chez les plus grandes plantules au cours de ces tests de vieillissement a suggéré qu'une synthèse pouvait éventuellement avoir lieu dans la plantule. Nous avons donc suivi les variations des tocophérols pendant la germination des plantes témoins d'Alisson RM (non stressées) maintenues à l'abri de la lumière ou exposées à la lumière du jour jusqu'au 9^{ème} jour de germination (Figure 5), afin de déterminer à quel moment la plantule consommait les réserves en tocophérols des cotylédons et à quel moment la nouvelle plantule commençait à synthétiser des nouveaux tocophérols et sous quelle forme. La teneur moyenne en tocophérols dans les plantules était de 439,77 mg/kg huile. La teneur en α -tocophérol était

de 395,47 mg/kg huile, du β -tocophérol de 12,13 mg/kg huile, du γ -tocophérol de 14,75 mg/kg huile, et du δ -tocophérol de 26,73 mg/kg huile.

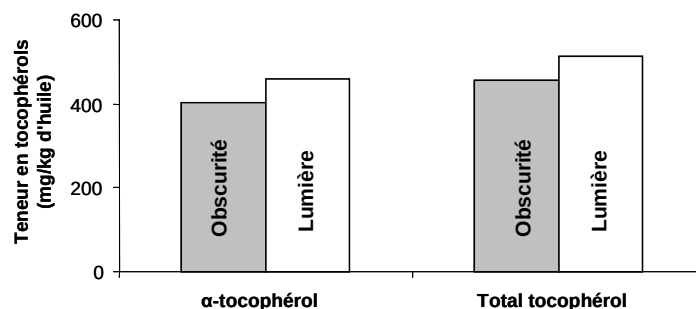


Figure 5. Teneur en tocophérols selon les conditions de croissance en obscurité vs. Lumière, moyenne des 9 jours.

La comparaison de la croissance des plantules entre les plantes selon les conditions de croissance (Figure 6) montre que les plantes qui grandissent à la lumière du jour sont significativement plus grandes : plus de la moitié atteint les 25 mm dès le 6^{ième} jour de germination, alors qu'à l'obscurité, elles sont moins de 25% à atteindre cette taille au 9^{ième} jour.

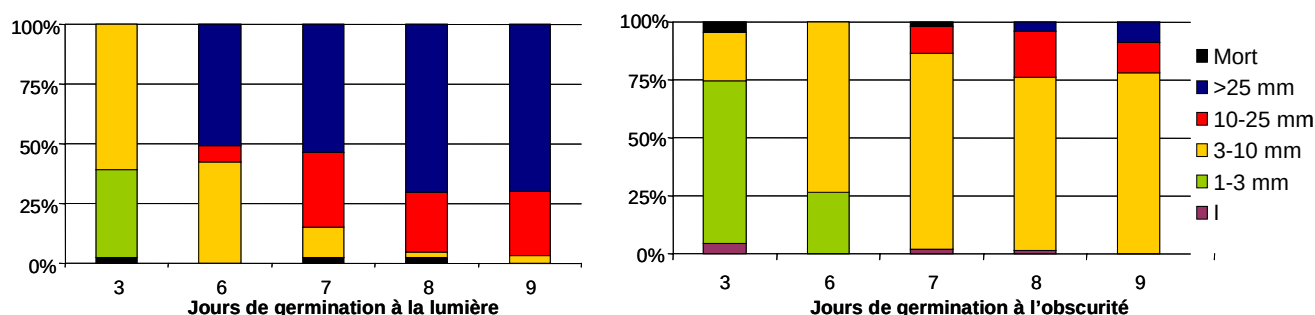


Figure 6. Taux de germination, en longueur des hypocotyles entre 0 et 9 jours en germination, test réalisé en obscurité (droite), ou à la lumière du jour (gauche).

Par contre, la teneur en tocophérols dans les deux conditions de croissance sont similaires de 0 jusqu'au 7 – 8^{ème} jour puis on constate une très forte augmentation de la teneur en α -tocophérol chez les plantes exposées à la lumière qui marque le début d'une synthèse due au démarrage de l'activité photosynthétique (Figure 7).

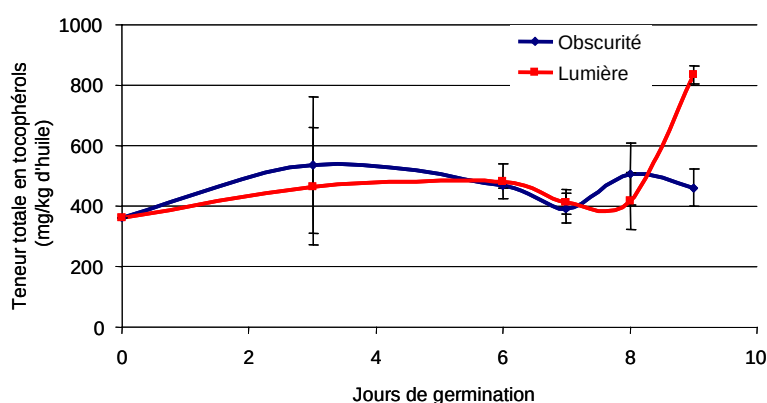


Figure 7. Evolution de la teneur en tocophérol durant les 9 premiers jours de la germination. Effet de la lumière.

Lorsque l'on partage les plantules en deux classes comme précédemment, on constate que la teneur en tocophérols, et plus spécialement la teneur en α -tocophérol, semble supérieure dans les plantes les plus grandes (Figure 8).

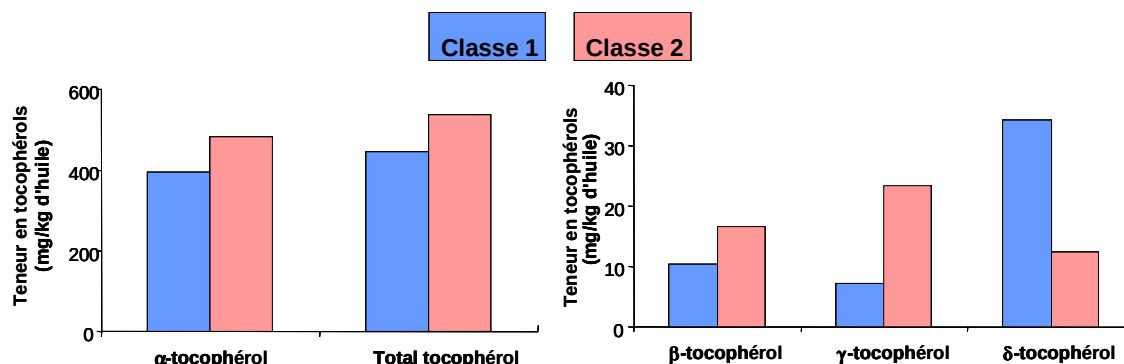


Figure 8. Teneur en tocophérols vs. longueur des hypocotyles, moyenne des plantules des 9 jours

Discussion

La synthèse des membranes et la transformation des réserves sont des étapes importantes du début de la germination des semences. Pour cette raison, la biosynthèse de pièges à radicaux libres comme l' α -tocophérol peut jouer un rôle important pour le maintien de l'intégrité membranaire. D'après Munné-Bosch et Alegre (2002a), les tocophérols se trouvent dans la membrane des plastides, essentiellement les chloroplastes, où ils sont synthétisés. La plupart de la structure des tocophérols est partiellement synthétisée entre l'enveloppe chloroplastique et les thylacoïdes. Ce fait suggère que les tocophérols pourraient jouer un rôle important dans les mécanismes de la photosynthèse. Les résultats présentés ici montrent que les plantules ne commencent la synthèse des tocophérols qu'à partir du 8^{ième} jour lorsque leur développement s'effectue à la lumière.

Dans cette étude, les plantules les plus grandes sont celles qui ont la teneur en tocophérols la plus élevée ; et sont donc protégées face au stress. Des travaux sur des mutants d'*Arabidopsis* déficients en tocophérols montrent que les tocophérols jouent un rôle essentiel sur le contrôle de la peroxydation lipidique pendant le stockage, la germination de la graine et le développement initial des plantules (Sattler, *et al.*, 2004; Sattler, *et al.*, 2006). En effet, ces mutants ne sont pas viables à la germination.

2.3.2. Cinétique de transfert des tocophérols pendant les sept premiers jours de germination

Afin de montrer le passage de la consommation des réserves des cotylédons vers les germes pour la croissance de la plantule, ainsi que le passage à la production des tocophérols, la séparation de ces deux parties a été réalisée tous les jours jusqu'au 9^{ième} jour de mise en germination pour observer le transfert de masse et des tocophérols (Figure 9). On observe effectivement un transfert progressif de masse des cotylédons vers les germes cependant, les changements sont plus spectaculaires pour les teneurs en tocophérols : les cotylédons présentent une diminution plus lente de leur teneur tandis que les germes ont une décroissance rapide jusqu'au 5^{ième} jour, suivie d'une pause jusqu'au 8^{ième} jour où démarre une brusque accumulation correspondant au début de l'activité de neosynthèse. L'augmentation dans les cotylédons observée à ce moment là pourrait être due à un transfert depuis les zones de synthèse, où à une synthèse.

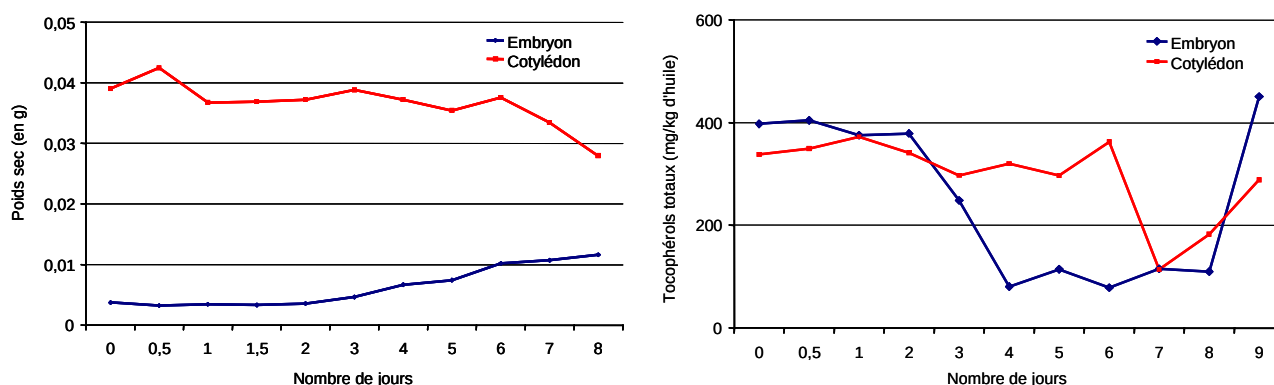


Figure 9. Évolution de la masse et de la teneur en tocophérols des cotylédons et du germe entre 0 et 9 jours de mise en germination

Discussion

La consommation par l'embryon d'une partie des tocophérols stockés dans les cotylédons pourrait être impliquée dans la protection du germe pour la croissance de la plante (Forcella, *et al.*, 2000). Leur rôle serait de préserver l'intégrité membranaire contre les oxydations sous les variations de l'environnement pendant la germination ou le stockage comme suggérait Bailly, *et al.* (2002).

Les résultats obtenus dans cette étude sur du tournesol qui accumule majoritairement de l' α -tocophérol sont en adéquation avec les études menées sur d'autres espèces tels que le colza et le soja dont l'isomère majoritaire est le γ -tocophérol. Des études enzymatiques et moléculaires supplémentaires devraient être mises en place pour établir le lien entre la germination et la teneur en tocophérols chez le tournesol et éclaircir le rôle de ces molécules pendant la germination.

3. Étude multilocale de la variabilité des teneurs et composition en phytostérols et tocophérols sur 4 hybrides commerciaux.

Les travaux précédemment exposés montrent que les variabilités des teneurs et compositions des tocophérols et des phytostérols dans la graine sont tributaires de deux facteurs : d'une part, le potentiel génétique et d'autre part les conditions environnementales contrôlées. L'objectif de cette étude était de montrer que les teneurs et compositions de quatre hybrides dans plusieurs lieux de culture et pour trois années consécutives confirmait les effets génétiques et environnementaux observés dans les études précédentes.

3.1. Présentation et résultats de l'étude

Les résultats obtenus sont présentés sous la forme de deux publications scientifiques :

AYERDI GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., DAYDÉ J., CALMON A., 2006. Variability of minor components in sunflower (*Helianthus annuus*) oil from a three years multi-local study. 17th International Symposium on Plant Lipids. Michigan State University East Lansing (MI, USA). ISPL2006. Benning, C., J. Ohlrogge. Pp 248-252. (ANNEXE 3)

AYERDI GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., DAYDÉ J., CALMON A.,

Variability and relationships between fatty acids, tocopherols and phytosterols content in sunflower cultivars (*Helianthus annuus*) from a three years multi-local study. (En cours de préparation)

Variability and relationships between fatty acids, tocopherols and phytosterols content in sunflower cultivars (*Helianthus annuus*) from a three years multi-local study.

ALICIA AYERDI GOTOR[†], MONIQUE BERGER[†], FRANCOISE LABALETTE[‡], SYLVIE CENTIS[§], JEAN DAYDE[†], AND ANNE CALMON^{*,†}

Université de Toulouse ; Ecole d'Ingénieurs de Purpan ; Laboratoire d'Agro-Physiologie ; 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France; ONIDOL, 12 avenue George V, 75008 PARIS, France and, ASEDIS-SO, 39 chemin Virebent, 31200 TOULOUSE, France.

* To whom correspondence should be addressed. Telephone: +33(0)561153030. Fax: +33(0)561153060. E-Mail: anne.calmon@purpan.fr (A. Calmon)

TITLE RUNNING HEAD: Sunflower seed oil.

CORRESPONDING AUTHOR FOOTNOTE :

[†] Laboratoire d'Agrophysiologie, E.I. Purpan.

[‡] ONIDOL.

[§] ASEDIS-SO.

ABSTRACT.

Sunflower oil is naturally rich in both unsaturated fatty acids and numerous minor components, with high levels of α -tocopherol and phytosterols that could play an important role in plant protection . These micronutriments , tocopherols and phytosterols, also exhibit health benefits for humans including cardiovascular diseases and aging disorders. α -Tocopherol represents more than 95% of total sunflower tocopherol and has the greatest vitaminic activity. Furthermore, this oil contains high amounts of β -sitosterol which is a promising health beneficial phytosterols. The objective of this study was to compare content and composition of fatty acids, tocopherols and phytosterols in sunflower oil between different cultivars and locations in a three year experiment, and to estimate the relationships between these minor components, fatty acids and climatic conditions.

Results revealed that content and composition of these molecules are mainly determinated by plant genotype. Nevertheless, the environmental conditions seemed to strongly influence the tocopherol content. The results suggest possible improvement in sunflower breeding for minor components.

KEYWORDS. Sunflower oil; fatty acids; tocopherols, phytosterols; genotype x environment interaction; temperature.

INTRODUCTION

Sunflower world production represents 20% of the world total production of oil seeds FAO, ¹. France is the fifth major producer with nearly 1,500,000 metric tons of sunflower seeds produced in 2004. Sunflower oil is rich in natural micronutrients and various studies have shown the health beneficial properties of polyunsaturated fatty acids (PUFA), tocopherols and phytosterols. The ingestion of PUFAs can have beneficial effects on human health such as the reduction of fatal coronary heart disease by decreasing the plasma low density lipoproteins (LDL)-cholesterol ^{2,3}. Zock and Katan (1998) in a meta-analysis study didn't find any significant increased risk of cancer (breast, prostate or colon) due to a diet rich in linoleic acid. In contrast, Brouwer's meta-analysis showed high intake of linolenic acid increases the risk of prostate cancer in men ⁴. Vitamin E isomers and specially α -tocopherol is able to reduce the risk of cardiovascular disease and exhibits anti-carcinogenic activities ^{5,6} through prevention of polyunsaturated fatty acids oxidation and free radicals scavenging ⁷. Since it is retained by the liver by means of a specific transfer protein, α -tocopherol is considered to be the most biologically active form ⁸. Sterols inhibit cholesterol absorption in humans by limiting micellar solubility of cholesterol leading a reduction of cholesterol absorption ⁹⁻¹¹. Sterols can also be involved in a reduction of colon cancer risk ^{12,13}.

Since Seiler (1983) ¹⁴, where the factors affecting the variability of fatty acids in sunflower were studied, others studies like Lagravère et al. (2004) have confirmed that genotypes and environmental growing conditions affected fatty acid composition. Similarly, this study aim to evaluate the correlation between fatty acid, tocopherol and phytosterol content and their relationships with environmental conditions (temperature and water availability). Various works on the variation of tocopherols and phytosterols have been implemented for different vegetal species studying genotype and environmental effects, however most of them focus only in one minor component : Almonor et al. ¹⁵ reported that γ -tocopherol content diminished in soybeans with reduced temperatures; Goffman and Becker ¹⁶ found a significant variations between genotypes and locations for the tocopherol content and composition of rapeseed; Määttä, et al. ¹⁷ described a significant difference for the phytosterol content in 7 oat cultivars or for 6 of rye ¹², Vlahakis et Hazebrook ¹⁸ found differences in total phytosterol contents among canola, sunflower and soybean crops and within a crop. Regarding sunflower, genetic and environmental variations of tocopherols have been observed by Demurin et al. ¹⁹ and Velasco et al. ²⁰ but they considered only one year of cultivation. Results concerning simultaneous variations in the content and composition of several families of components are scarce in the literature. Fatty acids and tocopherols have been studied in sunflower by Baydar and Erbas ²¹ however correlations were not studied. In soybean oil, Dolde et al. ²² found a positive correlation between linoleic acid and tocopherol level. A study including the three families (Fatty acids, phytosterols and tocopherols) was conducted by El-Shami et al. ²³ in rapeseed oil, but no correlations between components were treated.

Regarding the composition of sunflower oil in health promoting molecules ^{6,18,20,24,25} and the importance of sunflower production in France, the objective of our study was to investigate the variability of three families of components (PUFA, tocopherols and phytosterols) in sunflower oil from four different commercial varieties grown in different locations in France for three consecutive years. At the same time, climatic

parameters were noticed in order to take into account their effects. To the best of our knowledge, the determination of variability in sunflower tocopherol and phytosterol content in a multilocal study over a three year period has not been previously investigated. A global view for the fatty acids, tocopherols and phytosterols genotypic and environmental variations are needed in order to understand their relationships. That is the aim of our approach on sunflower.

MATERIALS AND METHODS

Sunflower Samples. The study was carried out during three years: 2002, 2003, 2004. Four commercial sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids (Allstar RM (Euralis Semences), Aurasol (High Oleic, Monsanto Dekalb), Melody (Syngenta Seeds) and Prodisol (Monsanto Dekalb)) were grown in clay-chalky deep enough (1 m) soils at different locations all over France as described in **Figure 1** and **Table 1**.

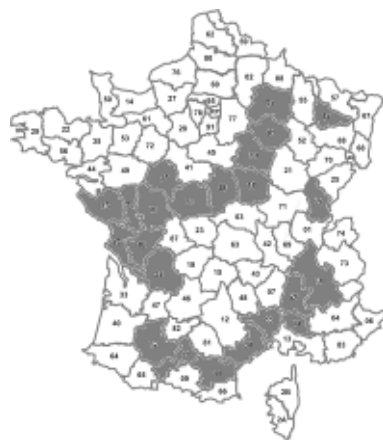


Figure 1. Map of France Showing the Locations (in grey) in which the Study Took Place in the CETIOM (Centre technique interprofessionnel des Oleagineux Metropolitans) in 2002-2004.

Table 1. Relation of Cultivars and Location Planting for Each Year.

Cultivars	Three years multilocal study		
	2002	2003	2004
	Locations in France		
Allstar RM	11-16-17-34-36-37-38-79	11-16-17-26-32-34-36-37-38-58-85-86-89	18-26-31-32-37-39-51-54-84
Aurasol	11-16-17-32-34-36-37-38-79	89	17-18-26-30-31-32-51
Melody	11-16-38	11-16-17-26-32-34-36-38-58-85-86	24-31-38-58-79-84
Prodisol	11-16-17-34-36-37-38-79	11-16-17-26-32-34-36-37-38-58-85-86-89	10-16-18-26-31-32-39-54-84

In each location, four blocs of around 30 m² for each variety were sown between April the 1st and 20th. As recommended (Metropolitan Oleaginous Interprofessional Technical Center- CETIOM , France), the seedling rate was 65,000 seeds/ha with 0.6 m between rows and 0.25 m between plants. Main plot treatments were: two tillages in Autumn and Mars-April; weeding using trifluralin and at pre-seedling and flurochloridone at post-seedling; metaldehyde (7 kg/ ha) to fight against slugs; fungicidal treatment were made

when necessary with a mix of flusilazole and carbendazime (0.8 L/ ha); and two fertilizations applied one before spring tillage 60 kg P/ ha and 60 kg K/ ha and one during the seedling 50 kg N/ ha with 1.2 kg B/ ha. Thus, 97 samples were obtained for further analysis **Table 1**.

Meteorological Dataset. Measurements were taken in six meteorological stations all over the country: Carcassonne (43°13'N, 2°21'E), Montignac (45°47'N, 0°28'E), Auch (43°39'N, 0°35'E), Montaud (45°16'N, 5°34'E), Fours (46°49'N, 3°43'E) and Blagnac (43°38'N, 1°24'E). These places were selected to show the largest variability of weather conditions in France all over the locations of the study and during the three years of study. Four parameters were considered: rainfall (mm per day), maximal temperature (°C per day, T_{MAX}), minimal temperature (°C per day, T_{MIN}) and between the period from April 1st and to September 30th. **Figure 2** sums-up the meteorological dataset for six locations that represented the six main regions where sunflower is cultivated in France and allow us to estimate the difference of the climate in these areas which could influence minor components content and composition.

Sample Preparation. For each sample, 40 g of akenes were freeze-dried (HETO CT 110, Saint Herblain, France) and stored at - 18 °C .

Reagents and Standards. For oil extraction, hexane (mixture of isomers) was obtained from Prolabo-Subra (France) and for analysis, solvents such as hexane, methanol, ethanol, acetone and diethyl ether at HPLC grade from SDS (France). Sodium hydroxide was purchased from Prolabo-Subra (France). All fatty acid standards (palmitic (C16:0), stearic (C18:0), oleic (C18:1), linoleic (C18:2), linolenic (C18:3) and arachidic acid (C22:0) (99 % minimum purity)), all sterol standards (β -sitosterol, stigmasterol and campesterol) and betulin were purchased from Sigma (Paris, France). The four α -, β -, δ - and γ -tocopherol standards (99% minimum purity) were purchased in a Chromadex kit (USA). Boron trifluoride (BF₃) was obtained from Aldrich (France). The trimethyl silyl ether (TMS) derivatives of all sterols were prepared using 1-methyl imidazol and N-methyl-N (trimethylsilyl)- heptafluorobutyramide reagent (Sigma, France).

Oil Extraction. Sunflower dry-freeze grains were ground with a sample mill (KnifeTec 1095; Foss Tecator AB, Sweden) during three periods of 10 s. Around 18 g were carefully weighed in a cellulose cartridge (Whatman $\varnothing$ = 30 mm, h = 100 mm) covered with backcombed cotton (Lohmann & Rauscher). Full cartridges were placed in a six soxhlet ramp for extraction (four hours) with hexane; following the reference method ²⁶. Oil was recovered after a low pressure evaporation of the extraction solvent with a rotavapor (HS 40 Huber, Bioblock Scientific, Heildolph) and frozen (- 20 °C) to minimize oxydative reactions before analysis.

Fatty Acid Analysis. 50 mg of oil was weighed in a glass tube with a refrigerated system. As internal standard, 1 mL of arachidic acid was added and the extracts were saponified by adding 1 mL of 0.5 M methanolic NaOH, and heating to 65 °C for 30 min. Then, 2.5 mL of methanolic BF₃ (12% v/v) were added and the mixture was heated for exactly 3 min at 65 °C, followed by a rapid refrigeration and the addition of 5 mL of ultrapure water and 10 mL of hexane (HPLC grade). After vigorous shaking, and settle the organic phase was recovered and analysed immediately by gas chromatography.

Analyses were carried out with a Fisons 8000 series gas chromatograph (MMFC 800 Multi-function controller, EL 980 electrometer Unit, Italy) with an autosampler.

Splitless injections were used with 0.5 μL sample volumes at an inlet temperature of 200 $^{\circ}\text{C}$. Nitrogen carrier gas pressure was 200 kPa.

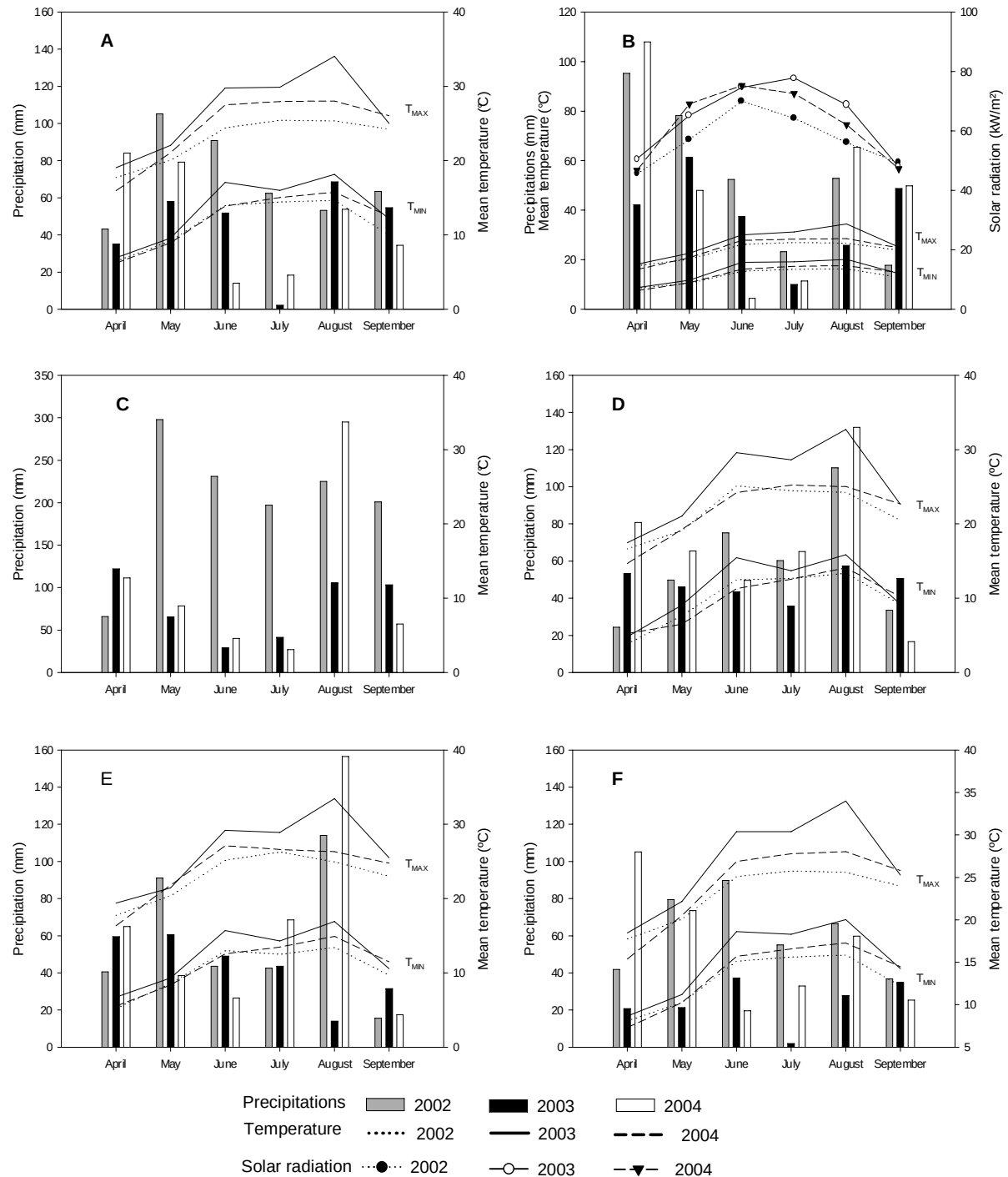


Figure 2. Climatic Conditions: Rain Precipitation (sum of daily rainfall in a month, mm); Temperature: Mean of Maximal (T_{MAX}) and Minimal (T_{MIN}) Daily Temperatures of each month ($^{\circ}\text{C}$) and Sum of Daily Solar Radiation for each month for 6 Locations: A Auch (32); B Carcassonne (11); C Montaud (38); D Fours (38); E Montignac (16) and F Blagnac (31) and for the Three Years of Study.

The fatty acids were separated on Phenomenex fused silica capillary ZB-FFAP column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm, Paris, France). The oven temperature was programmed to begin at 185 °C, hold for 15 min; increase to 200 °C at 5 °C/min and remained constant for 7 min at 200 °C. The flame ionization detector (FID) was operated at 200 °C with hydrogen pressure at 100 kPa and air flow at 60 kPa. The major sunflower oil fatty acids were determined by comparison of retention times of the fatty acids methylated standards. The calibration results were based on the amount of arachidic acid detected in the sample.

Tocopherols Analysis. Following the simplified international norm ²⁷, a methanolic solution of each standard (0.1 mg/ mL) was prepared. Solutions were measured with a UV lamp spectrophotometer (Hitachi U-1100 photometer) as it is shown in **Table 2**. The external calibration was carried out with dilutions of the stock solution with hexane and propan-2-ol (norm modification) to have a range of concentrations between 5 and 40 µg / mL of each form. For each sample, 1g of oil was carefully weighed (Sartorius Analytical balance Precisa 205 A, Italy), and adjusted up to 25 mL with hexane. The mixture was directly injected in a high performance liquid chromatography (HPLC) system (SpectraPhysics, Thermo Separation Products, USA). The complete separation of all native tocopherols was achieved with a normal phase LiChrosorb Si60 column (250 cm × 4 mm × 5µm, CIL Cluzeau, France). The mobile phase was a mixture of hexane/isopropanol (99.7:0.3 v/v) at 1 mL/min flow rate. Detection was performed with a fluorescence detector (excitation wavelength = 298 nm and emission wavelength = 344 nm; Waters 2475 multi λ). The concentrations of the tocopherol homologs were calculated from the peak area.

Table 2. Calculation Parameters Used to Determine the Real Concentration of the Solution with an UV-Spectrophotometer.

Tocopherol	Wave length (nm)	Division factor
α-tocopherol	292	0.0076
β-tocopherol	296	0.0089
δ-tocopherol	298	0.0091
γ-tocopherol	298	0.0087

$$\text{Solution concentration } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{Read absorbance value (nm)}}{\text{Division factor}}$$

Sterols Extraction and CPG Analysis. Sterols analysis procedure is an adaptation of the norm ²⁸. The oil (250 mg) was dissolved in ethanol containing 1 mL of a freshly prepared solution of betulin (1mg/mL acetone) as internal standard. Saponification was achieved by adding 5 mL of 5 % (w/v) ethanolic KOH and heating at the boiling point and kept up for 15 minutes in a refrigeration system. Saponification was stopped with 5 mL of ethanol. The mixture (5 mL) was placed in a glass column fill up with 10 g of aluminum oxide (Neuter, Akt. 1; 50-200µm; pH 7.5; ICN Prolabo/Subra France) dampened with ethanol. After elution a new balloon was placed to recover the unsaponifiable matter washed with 5 mL of ethanol and 30 mL of diethyl ether. Unsaponifiable matter was concentrated in the balloon by evaporation under pressure of solvents and recovered with 2 mL of diethyl oxide. Then the mixture was evaporated to dryness with nitrogen (N₂, Air liquide, France). Before injection, TMS derivatives were prepared by dissolving the samples of the unsaponifiable fraction into 100-µL of 1-

methyl imidazol and N-methyl-N (trimethylsilyl)- heptafluorobutyramide (5:95 v/v) and heating the mixture for 15 minutes to 105 °C in a oil bath. The saponification procedure was duplicated for each oil extract. Analyses were performed by a Fisons gas chromatograph (GC 8000 series MMFC 800 Multi-function controller, Italy) with an autosampler. Splitless injections were made with 1 µL sample volumes. Separations were achieved with a Phenomenex fused silica capillary ZB-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm, Paris, France). Nitrogen carrier gas pressure was 130 kPa. The injector was at 320 °C and the FID was 320°C. The initial temperature of the column was 240°C and this increased to 320°C at 4 °C/min and hold for 10 minutes until it decreased to initial conditions. Identification of sterols was based on the retention time of standards referred to above and with the relative times to betulin given in the norm. The calibration results were based on the integrated areas and adjusted according to the amount of betulin detected in the samples.

Method Validation and Quality Control. Samples have been analysed by the ITERG reference laboratory (Paris, France). At the same time, one control sample was analyzed daily with each analytical series and for each kind of analysis (fatty acids, tocopherols, sterols) to determinate ageing changes in columns.

Statistical Analysis. The data were statistically analyzed using Statistica V7 (StatSoft, Tulsa, USA). A three way ANOVA with three crossed factors (genotype, year) and one imbricated factor (location) with second order interaction was performed to determine the relationships between fatty acids, total tocopherol, total phytosterol contents, hybrids, planting location and year of study. It was also used to calculate bilateral correlation between variables (Pearson correlation coefficients).

RESULTS

Meteorological Dataset. The six meteorological locations showed significant differences for the rainfalls; mean maximal and minimal temperatures ($P < 0.01$) between the 3 years (**Table 3**). Significant differences in temperature were also observed between locations. In 2003, the plants suffered extreme growth and maturation conditions (highest temperatures and lowest rainfall) compared with 2002 (coldest and high precipitations) and 2004 (middle conditions).

Table 3. Mean Values for Each Year for the 6 Locations Except for Solar Radiation that is analyzed only in Carcassonne.

Year	Precipitation (mm)	T _{MAX} (°C)	T _{MIN} (°C)	Solar Radiation (W / m ²)
2002	60.25 a ^a	22.82 a	11.57 a	57.06 a
2003	39.48 b	26.39 b	13.51 b	64.12 b
2004	55.33 a	23.96 a	12.32 c	62.16 b

^a Values in the same column with the same letter are not statistically different at the 5% significance level.

Oil and Fatty Acid Content. The sunflower seeds yielded around 50 % oil by soxhlet extraction (**Table 4**). However in 2003, we can observe significant differences between oil yield : Melody in the 16th location: 0.38 g / g of dried matter (DM) vs. Prodisol in the 26th location: 0.61 g / g DM. Nevertheless, in the ANOVA analysis, neither the effect of year and genotypes, nor their interactions were significant as shown in **Table 7**. Concerning fatty acid (FA) composition (**Table 4**), three cultivars (Allstar RM, Melody and Prodisol) had high linoleic acid content, moderate oleic acid content and traces of linolenic acid content whereas Aurasol presented a high level in oleic acid and moderate linoleic acid content. Palmitic acid was the only major saturated acid (4-

6%) either in high oleic or in high linoleic cultivars. There was a significant difference in fatty acid composition (percentage) both between varieties in a year ($P < 0.001$) and between the years for the four cultivars ($P < 0.001$). The genotype $\times$ year ($G \times Y$) interaction was not significant for fatty acid composition. These results indicated that oleic and linoleic acid contents of sunflower oil are strongly influenced by temperature.

Table 4. Oil and Fatty Acid Amount for Each Sunflower Hybrid and Each Year. The Average Over All the Locations in a Year was given by Mean Value $\pm$ SD.

Cultivars	Year	Oil content (g/g DM)	Fatty acid composition (%)				
			16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
Allstar RM	2002	0.49 $\pm$ 0.05	4.3 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.3	40.2 $\pm$ 3.2	53.7 $\pm$ 3.1	0.01 $\pm$ 0.02
	2003	0.51 $\pm$ 0.04	6.7 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.2	31.8 $\pm$ 1.9	59.3 $\pm$ 1.9	0.04 $\pm$ 0.01
	2004	0.52 $\pm$ 0.04	6.7 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.3	25.6 $\pm$ 3.0	65.8 $\pm$ 2.9	0.07 $\pm$ 0.02
Aurasol	2002	0.50 $\pm$ 0.03	2.0 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.2	81.5 $\pm$ 2.3	15.6 $\pm$ 2.2	0.01 $\pm$ 0.01
	2003	0.45	4.2 $\pm$ 1.1	1.3 $\pm$ 0.9	70.6 $\pm$ 8.4	24.0 $\pm$ 3.1	0.00
	2004	0.52 $\pm$ 0.04	4.4 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.4	70.8 $\pm$ 3.6	23.8 $\pm$ 3.4	0.06 $\pm$ 0.02
Melody	2002	0.48 $\pm$ 0.04	3.4 $\pm$ 0.6	2.9 $\pm$ 0.5	33.0 $\pm$ 4.6	60.8 $\pm$ 4.4	0.00
	2003	0.47 $\pm$ 0.04	6.7 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.2	33.8 $\pm$ 2.2	57.8 $\pm$ 2.1	0.04 $\pm$ 0.01
	2004	0.49 $\pm$ 0.03	6.1 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 0.5	31.9 $\pm$ 4.5	60.2 $\pm$ 4.4	0.03 $\pm$ 0.02
Prodisol	2002	0.49 $\pm$ 0.04	2.6 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.3	43.4 $\pm$ 2.9	52.9 $\pm$ 2.8	0.03 $\pm$ 0.02
	2003	0.52 $\pm$ 0.05	6.1 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.2	34.7 $\pm$ 1.9	56.9 $\pm$ 1.9	0.03 $\pm$ 0.01
	2004	0.50 $\pm$ 0.03	6.1 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.3	29.4 $\pm$ 3.0	62.8 $\pm$ 2.9	0.07 $\pm$ 0.02

Tocopherol Composition and Content. α -tocopherol represented the greatest proportion of total tocopherols, ranging from 88.5 to 97.9 %, whereas β -tocopherol was less expressed (1.6 – 9.1%). We observed only traces of γ -tocopherol and δ -tocopherol. The tocopherol content in the seed oil varied between 303.8 g / kg oil (Allstar in 2003, 85th location) and 1187.9 g / kg oil (Prodisol in 2004, 54th location) (Table 5).

Table 5. Tocopherol Amount for Each Sunflower Hybrid and Each Year. The Average Over All the Locations in a Year was given by Mean Value $\pm$ SD.

Cultivar	Year	Tocopherol content (mg / kg oil)				Total-T ^a
		α -T	β -T	γ -T	δ -T	
Allstar RM	2002	781.5 $\pm$ 51.5	47.0 $\pm$ 6.9	8.9 $\pm$ 2.2	4.6 $\pm$ 1.6	842.0 $\pm$ 57.4
	2003	461.5 $\pm$ 83.1	20.5 $\pm$ 3.8	2.9 $\pm$ 1.0	0.3 $\pm$ 0.3	485.1 $\pm$ 84.9
	2004	644.5 $\pm$ 37.3	19.1 $\pm$ 5.1	2.0 $\pm$ 1.9	0.3 $\pm$ 0.4	665.9 $\pm$ 39.9
Aurasol	2002	909.7 $\pm$ 51.3	66.8 $\pm$ 5.1	8.2 $\pm$ 2.8	4.0 $\pm$ 1.1	988.6 $\pm$ 53.4
	2003	520.3 $\pm$ 14.7	24.4 $\pm$ 5.3	1.0 $\pm$ 0.8	0.00	545.7 $\pm$ 19.9
	2004	713.5 $\pm$ 75.1	23.9 $\pm$ 3.6	1.9 $\pm$ 1.7	0.3 $\pm$ 0.3	739.5 $\pm$ 77.5
Melody	2002	771.1 $\pm$ 13.9	40.3 $\pm$ 6.0	3.2 $\pm$ 0.9	2.1 $\pm$ 0.5	816.6 $\pm$ 19.0
	2003	496.2 $\pm$ 55.4	20.7 $\pm$ 2.5	2.6 $\pm$ 0.9	0.00	519.5 $\pm$ 56.7
	2004	637.0 $\pm$ 66.7	17.4 $\pm$ 3.8	1.3 $\pm$ 0.8	2.6 $\pm$ 4.0	658.2 $\pm$ 70.5
Prodisol	2002	916.1 $\pm$ 61.3	84.5 $\pm$ 9.2	11.4 $\pm$ 2.7	6.6 $\pm$ 1.9	1018.4 $\pm$ 70.4
	2003	559.4 $\pm$ 79.7	39.5 $\pm$ 9.3	3.0 $\pm$ 1.6	0.6 $\pm$ 0.6	602.5 $\pm$ 87.1
	2004	864.2 $\pm$ 113.9	43.4 $\pm$ 8.2	4.1 $\pm$ 2.6	1.6 $\pm$ 0.7	913.4 $\pm$ 121.5

^a Total tocopherol calculated as the sum of all 4 isomers

We observed an important decrease of tocopherol content in 2003 vs. 2002 (around 40%), which was probably caused by the high temperatures during the 2003 summer. ANOVA (**Table 7**) showed that both genetic background and years significantly affect each tocopherol and total tocopherol content in the oil ($P < 0.001$). No statistical significance for α -tocopherol or total tocopherol content between locations has been observed. The correlations between tocopherol isomers were generally positive and highly significant (**Table 8**). The α -tocopherol content is found closely related to the total tocopherol content ($r^2 = 0.99$; $P < 0.05$). Moreover β -tocopherol and total tocopherol content are also positively correlated ($r^2 = 0.83$; $P < 0.05$).

Phytosterol Composition and Content. The most abundant sterol in all cultivars tested was β -sitosterol (around 60%), followed by campesterol stigmasterol, $\Delta 7$ -campesterol and $\Delta 5$ -avenasterol (**Table 6**). $\Delta 7$ -stigmasterol and $\Delta 7$ -avenasterol were also detected and quantified but at very low levels. Total phytosterol content in oils tested ranged between 228.9 mg / 100 g oil (Aurasol in 2004 in the 26th location) and 501.6 mg / 100 g oil (Prodisol in 2002 in the 11th location). The total phytosterol content was significantly greater in 2002 than in 2003 or 2004 but these variations are less important than those observed for tocopherol content.

Table 6. Phytosterol Amount for Each Sunflower Hybrid for Each Year. The Average Over All Locations in a Year was given by Mean Value $\pm$ SD.

Cultivars	Year	Phytosterol (g / 100 g oil)			Total-P ^a
		Campesterol	Stigmasterol	β -Sitosterol	
Allstar RM	2002	37.4 $\pm$ 4.4	41.8 $\pm$ 6.9	231.3 $\pm$ 20.2	440.6 $\pm$ 37.0
	2003	36.9 $\pm$ 3.5	34.1 $\pm$ 4.4	212.2 $\pm$ 19.2	360.0 $\pm$ 36.7
	2004	39.2 $\pm$ 9.4	35.0 $\pm$ 7.8	198.8 $\pm$ 26.5	350.4 $\pm$ 56.5
Aurasol	2002	35.5 $\pm$ 3.4	38.6 $\pm$ 3.7	202.4 $\pm$ 22.4	388.8 $\pm$ 29.9
	2003	41.1 $\pm$ 11.4	42.1 $\pm$ 9.4	236.6 $\pm$ 52.5	404.2 $\pm$ 94.2
	2004	32.3 $\pm$ 7.7	30.0 $\pm$ 8.8	193.4 $\pm$ 34.0	306.8 $\pm$ 54.8
Melody	2002	35.9 $\pm$ 1.6	35.9 $\pm$ 0.2	188.5 $\pm$ 7.7	370.2 $\pm$ 22.52
	2003	36.2 $\pm$ 4.1	30.3 $\pm$ 4.2	198.1 $\pm$ 20.1	338.8 $\pm$ 34.8
	2004	30.8 $\pm$ 3.2	21.5 $\pm$ 3.7	193.2 $\pm$ 24.8	299.1 $\pm$ 34.33
Prodisol	2002	44.9 $\pm$ 2.6	39.5 $\pm$ 1.8	229.5 $\pm$ 10.7	467.7 $\pm$ 22.6
	2003	36.5 $\pm$ 3.9	31.2 $\pm$ 6.6	195.4 $\pm$ 21.8	337.4 $\pm$ 44.3
	2004	45.4 $\pm$ 13.5	34.7 $\pm$ 11.1	227.5 $\pm$ 40.0	358.9 $\pm$ 68.9

^a Total phytosterol calculated as the sum of campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and $\Delta 7$ -campesterol, $\Delta 5$ -avenasterol, $\Delta 7$ -stigmasterol and $\Delta 7$ -avenasterol, data none shown.

ANOVA (**Table 7**) showed that year and temperatures affect total phytosterol content in oil ($P < 0.001$). Genotype affects also campesterol and stigmasterol contents ($P < 0.01$) but not β -sitosterol content. Location (Year) effect was only significant for campesterol content, but not for the total phytosterol content.

Significant and positive correlations between phytosterol components (**Table 8**) were observed between β -sitosterol and total phytosterol content ($r^2 = 0.78$; $P < 0.05$) between campesterol and β -sitosterol ($r^2 = 0.67$; $P < 0.05$) and between campesterol and stigmasterol ($r^2 = 0.69$; $P < 0.05$).

Table 7. Mean Squares of Combined Analysis of Variance for Oil Content (g/g DM) and Stearic (16:0), Palmitic (18:0), Oleic (18:1), Linoleic (18:2) and Linolenic (18:3) Acid Contents (%); for α -, β -, γ -, δ - and Total Tocopherol Contents (mg / kg oil) and for Campesterol, Stigmasterol, β -sitosterol and Total Phytosterol Contents (g / kg oil). The Factors were Cultivars (n = 4, namely Allstar RM, Aurasol, Melody and Prodisol), Years (n = 3, 2002 to 2004) and Locations (Locations in France).

Compound	Genotype (G)	Year (Y)	G $\times$ A	Location (Year)
Fatty acids	16:0	0,000932***	0,003857***	0,000072
	18:0	0,000123	0,000063	0,000060
	18:1	0,244696***	0,044974***	0,003497
	18:2	0,21016***	0,02594	0,0029
Tocopherols	α-T	103654***	342795***	11653*
	β-T	3499***	6580***	221***
	γ-T	17***	172***	11***
	Total-T	149043***	448121***	14148*
Phytosterols	Camp.	134**	0	71*
	Stig.	188**	287**	57
	β-Sit.	1765	6	1088
	Total-P	8260*	30079***	3262
Oil yield		0,0021	0,0026	0,0003
D.I.^a		3	2	6

^a. Degree of freedom

*, **, *** significatif for P = 0,05, P = 0.01 et P = 0,001

Relationships Between Fatty Acid and Tocopherol and Phytosterol Composition.

The total tocopherol content was slightly but significantly correlated with oleic acid ($r^2 = + 0.40$, $P < 0.01$) and negatively correlated with linoleic acid ($r^2 = - 0.36$, $P < 0.01$) (**Table 8**). Total tocopherol content (as well as α -tocopherol and β -tocopherol contents) was negatively correlated with palmitic acid ($r^2 = - 0.70$; $P < 0.01$). Generally, the individual phytosterols and total phytosterol content were not significantly correlated with fatty acid content. This was the case for β -sitosterol, the main sterol in sunflower oil, which did not correlate with any fatty acid. Finally, total tocopherols and total phytosterols were positively correlated ($r^2 = 0.47$, $P < 0.01$).

Relationships Between Component Composition and Meteorological Conditions.

Correlation between minor components and the meteorological parameters were made to have a first sight of the influence of temperature and rainfall during seed growth. The cumulated temperatures in August showed a negative correlation with the total tocopherol content ($r^2 = - 0.69$; $P < 0.05$). This negative correlation was also observed for each tocopherol isomer ($r^2 = - 0.60$; $P < 0.05$) and for the total phytosterol content ($r^2 = - 0.38$; $P < 0.05$). The same tendency was also found for the cumulated temperatures in June, July and September. On the contrary, there was positive correlation between the sum of precipitations in August and the total tocopherol and total phytosterol contents (**Figure 3**). Campesterol and stigmasterol contents were positively correlated to the sum of precipitation in June ($r^2 = + 0.70$; $P < 0.05$).

Table 8. Significant Pearson Correlation Coefficients Between Individual and Total Tocopherols, Individual and Total Phytosterol and Individual and Total Fatty Acids Contents in Oil from Four Hybrids Grown in Different Locations During 2002, 2003 and 2004 Summers.

COMPONENT	CORRELATION COEFFICIENT	COMPONENT	CORRELATION COEFFICIENT
Tocopherols –Tocopherols		Tocopherol - Phytosterol	
α -tocopherol – β -tocopherol	+ 0.78 **	α -tocopherol – Campesterol	+ 0.26 *
α -tocopherol – γ -tocopherol	+ 0.56 **	α -tocopherol – β -sitosterol	+ 0.27 **
α -tocopherol – δ -tocopherol	+ 0.66 **	α -tocopherol – Total phytosterol	+ 0.44 **
α -tocopherol – Total tocopherol	+ 0.99 **	β -tocopherol – Campesterol	+ 0.30 **
β -tocopherol – γ -tocopherol	+ 0.78 **	β -tocopherol – Stigmasterol	+ 0.43 **
β -tocopherol – δ -tocopherol	+ 0.75 **	β -tocopherol – β -sitosterol	+ 0.25 *
β -tocopherol – Total tocopherol	+ 0.83 **	β -tocopherol – Total phytosterol	+ 0.57 **
γ -tocopherol – δ -tocopherol	+ 0.79 **	γ -tocopherol – Campesterol	+ 0.32 **
γ -tocopherol – Total tocopherol	+ 0.61 **	γ -tocopherol – Stigmasterol	+ 0.49 **
δ -tocopherol – Total tocopherol	+ 0.70 **	γ -tocopherol – β -sitosterol	+ 0.30 **
Phytosterol-Phytosterol		γ -tocopherol – Total phytosterol	+ 0.63 **
Campesterol – Stigmasterol	+ 0.69 **	δ -tocopherol – Stigmasterol	+ 0.33 **
Campesterol – β -sitosterol	+ 0.67 **	δ -tocopherol – Total phytosterol	+ 0.51 **
Campesterol – Total phytosterol	+ 0.68 **	Total tocopherol – Campesterol	+0.27**
Stigmasterol – β -sitosterol	+ 0.23 *	Total tocopherol – β -sitosterol	+ 0.27 **
Stigmasterol – Total phytosterol	+ 0.54 **	Total tocopherol – Total phytosterol	+ 0.47 **
β -sitosterol – Total phytosterol	+ 0.78 **	Tocopherols - Fatty acids	
Fatty acids – Fatty acids		α -tocopherol - Palmitic	- 0.68 **
Palmitic – Oleic	- 0.70 **	α -tocopherol - Stearic	- 0.22 *
Palmitic - Linoleic	+ 0.66 **	α -tocopherol - Oleic	+ 0.40 **
Palmitic - Linolenic	+ 0.36 **	α -tocopherol - Linoleic	- 0.35 **
Stearic - Oleic	- 0.52 **	β -tocopherol – Palmitic	- 0.71 **
Stearic - Linoleic	+ 0.51 **	β -tocopherol – Oleic	+ 0.36 **
Oleic - Linoleic	- 0.99 **	β -tocopherol – Linoleic	- 0.31 **
Oleic - Linolenic	- 0.28 **	γ -tocopherol – Palmitic	- 0.63 **
Linoleic - Linolenic	+ 0.27 **	γ -tocopherol – Oleic	+ 0.28 **
Phytosterols – Fatty acids		γ -tocopherol – Linoleic	- 0.24 *
Campesterol - Stearic	+ 0.20 *	γ -tocopherol – Linolenic	- 0.24 *
Campesterol - Linolenic	- 0.22 *	δ -tocopherol – Palmitic	- 0.57 **
Stigmasterol - Palmitic	- 0.26 *	δ -tocopherol – Oleic	+ 0.24 *
Total Phytosterol - Palmitic	- 0.33 **	Total tocopherol - Palmitic	- 0.70 **
		Total tocopherol - Stearic	- 0.21 *
		Total tocopherol – Oleic	+ 0.40 **
		Total tocopherol - Linoleic	- 0.36 **

^a Correlation coefficient significant at P = 0.05 (*) and P = 0.01 (**) level, respectively

DISCUSSION

Sunflower oil yield is generally influenced by temperature during the seed development, thus high temperature during the seed maturation may have negatively affected the oil synthesis^{21,29}. The variations between the ratio oleic to linoleic acid can be explained by influence of temperature during seed development and maturation as yet reported^{21,30}, as high temperatures increase the synthesis of oleic acid.

α -Tocopherol was the dominant isomer detected in this study, similar to the values obtained by Dolde et al.²² and Velasco et al.²⁰ who found that α -tocopherol is the major isomer and detected only traces of δ -tocopherol in the sunflower materials analyzed. Our tocopherol total content was similar to the values reported by Nolasco et al.³¹ (500 to 1200 g / kg oil). However, the maximum value was lower than that found by Velasco et al.²⁰ (562-1872 mg·kg⁻¹ oil). Despite this Velasco et al.²⁰ also found similar correlation between tocopherols homologues to that found here.

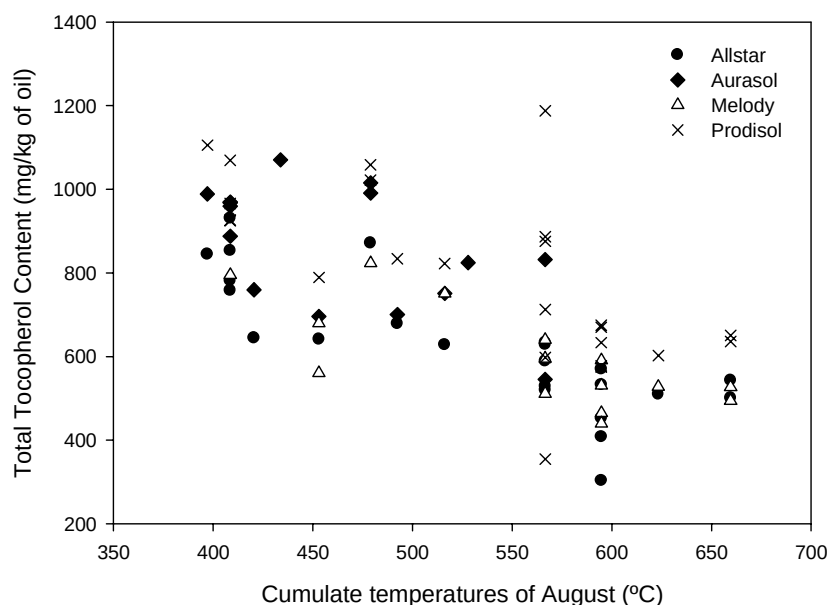


Figure 3. Correlation between cumulative temperature of August and total tocopherol content.

This study clearly shown that the variation of total tocopherol content depended on genotype and year. The year effect was mainly influenced by the meteorological conditions such as the temperature. Results obtained show that tocopherol content in sunflower oil is highly correlated to temperature. This is in agreement with those obtained by Almonor et al.¹⁵ on soybeans oil and Ayerdi Gotor et al.²⁹ on sunflower oil. Both studies showed a reduction in total tocopherol content when plants encountered high temperature during grain filling. However in soybean oil, Britz and Kremer³² reported that total tocopherol content remained constant with differences in the growth temperatures. The reduction in tocopherol content during a hot year could be explained by the role of these molecules in the plant. Tocopherols, particularly α -tocopherol protect the plants against stress by scavenging singlet oxygen and lipid peroxyl radicals leading to decreased detected amounts of tocopherols³³. Previous studies concerning tocopherol variation in sunflower¹⁹ and in other vegetal species^{16,34,35} show that genotype and environment individually as well as their interaction affect the content and composition in seeds.

The range of phytosterol content found is close to this reported by Vlahakis and Hazebroek (210 to 454 g / 100g oil)¹⁸. As mentioned previously the climate differed between the years; 2002 was cold and wet while 2003 was excessively warm and dry. The data presented indicate that low temperatures with precipitation correlate with an increase in the total phytosterol content. These results are in agreement with those found by Zangenberg et al.¹² in rye (*Secale cereale* L.) grains. On the contrary Vlahakis and Hazebroek¹⁸ show that the total phytosterol levels in greenhouse grown soybean seed increases under higher temperatures in controlled conditions. However, Hamama et al.³⁶ did not show significant differences concerning phytosterols content between different genotypes of canola (*Brassica napus* L.), indicating environment may affect the various species in a different manner.

The positive correlation observed between campesterol, stigmasterol and β -sitosterol indicate that the amount of different phytosterols could be simultaneously increased. In the literature, little is known concerning correlations between phytosterols contents. In canola oil, the same order of slight positive correlations between phytosterol components were observed³⁶. In contrast Hamama et al.³⁶ found negative

correlations between both campesterol and β -sitosterol content and campesterol and $\Delta 5$ -avenasterol content. In this study, the only significant positive correlation observed was between brassicasterol and total phytosterol contents ($r^2 = + 0.40$, $P < 1\%$).

Similar to the results of our study Baydar and Erbas²¹ reported significant correlations between tocopherols and oleic acid content ($r^2 = + 0.79$) and tocopherols and linoleic acid content ($r^2 = - 0.82$).

β -sitosterol was not found in the second component of the PCA, this could be explained to the different pathways of biosynthesis of β -sitosterol and the others phytosterols³⁷. Indeed Schaller³⁸ identified in *Arabidopsis* the $\Delta 24$ -isomerase-reductase who produce β -sitosterol and campesterol, and in higher plants a $\Delta 22$ -desaturase implicated in the transformation of β -sitosterol in stigmasterol and campesterol in brassicasterol¹⁸. Such enzymes were species, genotype and growth temperature dependent^{15,39}, explaining the absence of correlation between β -sitosterol and stigmasterol and the high correlation between campesterol and stigmasterol observed herein.

The correlation between total tocopherols and total phytosterols found here for sunflower oil are in agreement with earlier results obtained on 12 cultivars from the same planting location ($r^2 = + 0.69$, $P < 0.05$)¹⁸.

The relationships between fatty acids, tocopherols and phytosterols and the influence of the climatic conditions during plant growth found in this study were not comparable with data obtained by El-Shami et al.²³ in rapeseed oil because their correlations were obtained with values issued from only one genotype and one year study without reflecting environmental influence.

This study indicates that genotype and the growing conditions have a greater influence on tocopherol composition and content than on phytosterol ones. Moreover, the contents of tocopherol, oleic acid percentage and phytosterol contents are positively correlated. Thus, it would be possible to increase tocopherol and phytosterol content including high oleic acid content simultaneously through a breeding program.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Caussade semences, Maïsadour semences, Monsanto Dekalb, RAGT-R2n, Soltis, Syngenta Seeds for field experiments and sunflower plant material providing. Financial support was provided by ASEDIS-SO, ONIDOL (French Oil seeds organization) and Midi-Pyrenees Region. We also thank Cognis-France for their technical support.

LITERATURE CITED

- 1 Fao. (2005). "FAOSTAT." Food and Agriculture Organization.
- 2 Ruiz-Gutiérrez V, Muriana FJG, Guerrero A, Cert AM, and Villar J, Role of dietary oleic acid from two different sources on fatty acid composition of erythrocyte membrane and blood pressure in healthy subjects. *J. Nutr. Biochem.* **8**: 689-695 (1997).
- 3 Zock PL, and Katan MB, Linoleic acid intake and cancer risk: a review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**: 142-153 (1998).
- 4 Brouwer IA, Katan MB, and Zock PL, Dietary alpha-linolenic acid is associated with reduced risk of fatal coronary heart disease, but increased prostate cancer risk: a meta-analysis. *J. Nutr.* **134**: 919-922 (2004).
- 5 Beardsell D, Francis J, Ridley D, and Robards K, Health promoting constituents in plant derived edible oils. *J. Food Lipids* **9**: 1-34 (2002).

- 6 Bramley PM, Elmafda I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y, Roxborough HE, Schuch W, Sheehy PJA, and Wagner KH, Vitamin E. *J. Sci. Food Agr.* **80**: 913-938 (2000).
- 7 Niki E, and Noguchi N, Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Accounts Chem. Res.* **37**: 45-51 (2004).
- 8 Packer L, Weber SU, and Rimbach G, Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J. Nutr.* **131**: 369S-373S (2001).
- 9 Kritchevsky D, "Phytosterols in human health." *Nutritional toxicology*, ed. by Mackey K, ed., Taylor & Francis, New York, 173-189. (2002)
- 10 von Bergmann K, Sudhop T, and Lütjohann D, Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *J. Am. Cardiol.* **96**: 10D-14D (2005).
- 11 Thompson GR, and Grundy SM, History and development of plant sterol and stanol esters for cholesterol-lowering purposes. **96**: 3D-9D (2005).
- 12 Zangenberg M, Hansen HB, Jorgensen JR, and Hellgren LI, Cultivar and year-to-year variation of phytosterol content in rye (*Secale cereale* L.). *J. Agr. Food Chem.* **52**: 2593-2597 (2004).
- 13 Wu K, Willett WC, Chan JM, Fuchs CS, Colditz GA, Rimm EB, and Giovannucci EL, A Prospective Study on Supplemental Vitamin E Intake and Risk of Colon, Cancer in Woman and Men. *Cancer Epidem. Biomar.* **11**: 1298 - 1304 (2002).
- 14 Seiler GJ, Effect of genotype, flowering date, and environment on oil content and oil quality of wild sunflower seed. *Crop Sci.* **23**: 1063-1068 (1983).
- 15 Almonor GO, Fenner GP, and Wilson RF, Temperature effects on tocopherol composition in soybeans with genetically improved oil quality. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**: 591-596 (1998).
- 16 Goffman FD, and Becker HC, Genetic variation of tocopherol content in a germplasm collection of *Brassica napus* L. *Euphytica* **125**: 189-196 (2002).
- 17 Määttä K, Lampi AM, Petterson J, Fogelfors BM, Piironen V, and Kamal-Eldin A, Phytosterol content in seven oat cultivars grown at three locations in Sweden. *J. Sci. Food Agr.* **79**: 1021-1027 (1999).
- 18 Vlahakis C, and Hazebroek J, Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting location, and temperature. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **77**: 49-53 (2000).
- 19 Demurin Y, Skoric D, and Karlovic D, Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality. *Plant breed.* **115**: 33-36 (1996).
- 20 Velasco L, Fernández-Martínez JM, García-Ruiz R, and Domínguez J, Genetic and environmental variation for tocopherol content and composition in sunflower commercial hybrids. *J. Agr. Sci.* **139**: 425-429 (2002).
- 21 Baydar H, and Erbas S, Influence of seed development and seed composition on oil, fatty acids and total tocopherol contents in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Turk. J. Agric. For.* **29**: 179-186 (2005).
- 22 Dolde D, Vlahakis C, and Hazebroek J, Tocopherols in breeding lines and effects of planting location, fatty acid composition, and temperature during development. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76**: 349-355 (1999).
- 23 El-Shami SM, Hassamein MMM, and El-Mallah MH, Studies on changes in lipid profiles of new varieties of rape during seed maturation. *Grasas Aceites* **52**: 94-103 (2001).
- 24 Lagravere T, Kleiber D, Surel O, Calmon A, Berville A, and Dayde J, Comparison of fatty acid metabolism of two oleic and one conventional sunflower hybrids: A new hypothesis. *J. Agron. Crop Sci.* **190**: 223-229 (2004).

- 25 Holliday R, and Phillips K, Health Benefits of the Sunflower. *Am. Ass. Cereal Chem.* **46**: 205-208 (2001).
- 26 (1998). "Association française de normalisation, 1998. European Norm, NF EN ISO 659 october 1998; French norm V 03-905: Oilseeds - Determination of oil content (Reference method). AFNOR. Paris. 14 + 3 pp."
- 27 (1997). "International Standard Organization, 1997. ISO 9936: Animal and vegetable fats and oils - Determination of tocopherols and tocotrienols contents - Method using high-performance liquid chromatography. ISO. Genève. 11 pp."
- 28 (1999). "Association française de normalisation, 1999. European norm, NF EN ISO 12228 May 1999; French norm T 60-258: Animal and vegetable fats and oils - Determination of individual and total sterols contents - Gas chromatographic method. AFNOR. Paris. 18 pp."
- 29 Ayerdi Gotor A, Berger M, Labalette F, Centis S, Daydé J, and Calmon A, Etude de la variation des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule : Partie I - Tocophérols. *OCL* **13**: 206-212 (2006).
- 30 Lagravère T, Kleiber D, and Daydé J, Conduites culturales et performances agronomiques du tournesol oléique: réalités et perspectives. *OCL-Ol. Corps Gras Lipides* **5**: 477-486 (1996).
- 31 Nolasco SM, Aguirrezábal LAN, and Crapiste GH, Tocopherol oil concentration in field-grown sunflower is accounted for by oil weight per seed. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **81**: 1045-1051 (2004).
- 32 Britz SJ, and Kremer DF, Warm temperatures or drought during seed maturation increase free alpha-tocopherol in seeds of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *J. Agr. Food Chem.* **50**: 6058-6063 (2002).
- 33 Munné-Bosch S, The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.* **162**: 743-748 (2005).
- 34 Peterson DM, and Qureshi AA, Genotype and environment effects on tocols of barley and oats. *Cereal Chem.* **70**: 157-162 (1993).
- 35 Marwede V, Schierholt A, Mollers C, and Becker HC, Genotype X environment interactions and heritability of tocopherol contents in canola. *Crop Sci.* **44**: 728-731 (2004).
- 36 Hamama AA, Bhardwaj HL, and Starner DE, Genotype and growing location effects on phytosterols in canola oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80**: 1121-1126 (2003).
- 37 Schaller H, The role of sterols in plant growth and development. *Prog. Lipid Res.* **42**: 163-175 (2003).
- 38 Schaller H, New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiol. Bioch.* **42**: 465-476 (2004).
- 39 Garcés R, Sarmiento C, and Mancha M, Temperature regulation of oleate desaturase in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Planta* **186**: 461-465 (1992).

3.2. Bilan de cette étude

Parmi les facteurs environnementaux, il ressort que la température apparaît comme un facteur dominant dans le remplissage des réserves de l'akène. Le rendement en huile diminue en réponse à une hausse des températures (Baydar et Erbas, 2005; Ayerdi Gotor, *et al.*, 2006a; Roche, *et al.*, 2006). De même, les variations du ratio des acides oléique / linoléique montrent que l'augmentation de température favorise l'enrichissement en acide oléique de l'akène (Lagravère, 1999; Baydar et Erbas, 2005; Roche, *et al.*, 2006).

Cette étude montre que la variation de la teneur totale en tocophérols dépend significativement du génotype mais aussi de l'année de culture. Tout d'abord, les hybrides analysés présentent des différences significatives de teneurs en tocophérols (500 à 1200 mg / kg d'huile) similaires à celles observées par Nolasco *et al.* (2004). Cependant, ces teneurs sont inférieures à celles obtenues par Velasco *et al.* (2002) sur des mutants (1800 mg/kg d'huile). D'autre part l'effet année, observé dans cette étude, peut être expliqué principalement par les différences de température et de pluviométrie pendant la croissance et maturation de l'akène. Ces résultats sont en accord avec les travaux d'Almonor *et al.* (1998) sur le soja ; la température affecte négativement la teneur en tocophérols car la biosynthèse de ces molécules est affectée par des conditions stressantes qui réduisent l'activité des γ -TMTs (Shintani et DellaPenna, 1998; Collakova et DellaPenna, 2003b; Collakova et DellaPenna, 2003a; Kanwischer, *et al.*, 2005). Ainsi, la température est un facteur clé sur la variabilité de la teneur totale en tocophérols dans l'akène. En favorisant les oxydations lipidiques, elle entraîne la formation de radicaux lipidiques issus des chaînes d'acides gras polyinsaturés. Les tocophérols limitent la propagation de l'oxydation. Ils sont capables de donner un électron pour former un radical tocophéroxyl recyclable. Mais ce dernier peut à son tour donner un second électron pour générer un tocophérol quinone résultant de l'ouverture du noyau chromanol (Satler 2004). En conclusion, la teneur en tocophérols dans des akènes de tournesol est affectée significativement par le génotype, par l'environnement mais également par l'interaction génotype $\times$ lieu (Demurin, *et al.*, 1996) ; ce qui a été aussi observé sur d'autres espèces végétales (Peterson et Qureshi, 1993; Goffman et Becker, 2002; Marwede, *et al.*, 2004).

La variation des teneurs en phytostérols dans l'huile de tournesol est également dépendante du génotype et de l'environnement mais dans une moindre mesure par rapport aux tocophérols. Les teneurs observées sur les 4 hybrides (210 - 454 mg / 100g d'huile) de notre étude sont similaires à celles mentionnées par Vlahakis et Hazebroek (2000). L'effet de l'environnement et plus particulièrement de la température intervient également sur le remplissage en phytostérols car il semblerait qu'ils ont un rôle dans l'adaptation des plantes aux fortes températures (Palta, *et al.*, 1993; Buchanan, 2000). Les résultats montrent que lorsque les températures, au cours du remplissage, sont relativement basses (année 2002), la teneur en phytostérols est la plus faible. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par Vlahakis et Hazebroek (2000) sur du soja cultivés en conditions contrôlées. Cependant, cette observation n'est pas systématique pour toutes les espèces végétales. En effet, des travaux menés sur du seigle (*Secale cereale* L.) montrent que la température est corrélée négativement à la teneur en phytostérols (Zangenberg, *et al.*, 2004).

Les corrélations entre les teneurs en tocophérols, en phytostérols et en acides gras montrent que la teneur totale en tocophérols est corrélée positivement avec l'acide oléique ($r^2 = + 0.40$) et négativement avec l'acide palmitique ($r^2 = - 0.70$) et l'acide linoléique ($r^2 = - 0.36$). Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les phytostérols et les acides gras. Une corrélation positive a été trouvée entre les teneurs totales en tocophérols et en phytostérols ($r^2 = 0.47$). Les corrélations publiées sont en général plus élevées. Baydar et Erbas (2005) montrent des corrélations positives entre les tocophérols et l'acide oléique ($r^2 = + 0.79$) et entre les tocophérols et l'acide linoléique ($r^2 = - 0.82$) ; tandis que Vlahakis et Hazebroek (2000) trouve une corrélation positive entre les tocophérols et phytostérols totaux dans l'huile de tournesol de $r^2 = + 0.69$ ($P < 0.05$).

L'analyse en composantes principales (ACP) des phytostérols montre que les variations de teneurs en β -sitostérol ne sont pas représentées sur le même axe que les autres phytostérols. En effet, le β -sitostérol, composé majoritaire, est obtenu par une voie de synthèse relativement indépendante des autres phytostérols (Schaller, 2003).

4. Conclusion

Au travers de différentes expérimentations, l'objectif de ce chapitre était de fournir des éléments qui permettraient de justifier la mise en place d'une étude de l'héritabilité des composés mineurs dans l'huile de tournesol.

Dans un premier temps, l'étude du remplissage en tocophérols et phytostérols des akènes de tournesol a mis en évidence la coïncidence de la phase d'accumulation active de ces composés mineurs avec celle des acides gras. Cependant, la température apparaît comme un facteur déterminant sur les teneurs finales en tocophérols et en phytostérols dans l'huile. En effet, de fortes températures durant le remplissage de l'akène limiteraient l'accumulation des tocophérols afin de préserver la semence du stress oxydatif, de manière similaire aux mécanismes mis en jeu au niveau de la feuille (Munné-Bosch et Alegre, 2002a). Au contraire, la teneur en phytostérols augmenterait sous des températures élevées ; ce phénomène ayant déjà été observé en conditions contrôlées (Vlahakis et Hazebroek, 2000). Dans un second temps, la conversion oléique a semblé induire une diminution sensible de la teneur en tocophérols totaux sans toutefois avoir d'influence sur la teneur en phytostérols. L'étude de cet ensemble de couples a aussi montré sous les conditions climatiques exceptionnelles de l'été 2003, un comportement vis-à-vis des températures tout à fait cohérent avec les observations précédentes sur les cinétiques. L'étude des cinétiques d'accumulation des tocophérols dans des plantules issues de semences ayant subi un vieillissement accéléré montre que les plantules les plus développées présentent une teneur plus élevée en α -tocophérol. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse du rôle protecteur central que les tocophérols jouent dans la préservation de la vigueur de la semence (Sattler, *et al.*, 2004; Sattler, *et al.*, 2006). Et pour finir, l'étude multilocale et pluriannuelle réalisée sur 4 hybrides commerciaux montre que la teneur en tocophérols dans des graines de tournesol est affectée significativement par le génotype, par l'environnement mais on constate également une interaction génotype $\times$ lieu. La variation des teneurs en phytostérols dans l'huile de tournesol est également dépendante du génotype et de l'environnement mais dans une moindre mesure par rapport aux tocophérols, ce qui a déjà été constaté par d'autres auteurs (Vlahakis et Hazebroek, 2000).

CHAPITRE IV.

Etude de l'héritabilité des tocophérols et des phytostérols dans l'akène de tournesol.

Chapitre IV.

Étude de l'héritabilité des composés mineurs

Les comparaisons de variétés hybrides de tournesol, comme de lignées parentales homozygotes, montrent que le génotype entre pour une part significative dans la variabilité de la teneur de l'huile en phytostérols et en tocophérols. Les paramètres génétiques de la teneur en tocophérols ont déjà été abordés chez quelques oléagineux : ainsi sur hybrides F1 de colza issus de deux croisements diallèles, Goffman et Becker (2001b; 2001a) ont montré que les teneurs en tocophérols de la graine étaient majoritairement sous contrôle génétique additif mais Marwede, et al. (2004), sur trois populations d'haploïdes doublés, trouvent une héritabilité plutôt faible et une forte interaction génotype x environnement. Par ailleurs, dans des ségregations F2 et F3 de soja issues de croisements entre mutants extrêmes, Wang *et al.* (2007) ont déterminé une forte héritabilité de la teneur en α -tocophérol ($h^2 = 0,6$ en F2 0,7 en F3). Il faut cependant noter qu'il s'agit ici plus d'un travail sur la composition en tocophérols que sur la teneur totale. Concernant les phytostérols, les premières études génétiques sur les teneurs des oléagineux (soja, colza et tournesol) indiquaient une variabilité essentiellement sous l'influence de facteurs environnementaux, et donc peu de possibilités de sélection (Vlahakis et Hazebroek, 2000). Mais récemment sur le soja, une étude de 510 génotypes a montré une importante variabilité (Yamaya, *et al.*, 2007) et sur le colza, une forte héritabilité des teneurs en phytostérols totaux a été évaluée entre 0,7 et 0,97 sur trois populations d'haploïdes doublés (Amar, 2007; Amar, *et al.*, 2008). Il y a donc une possibilité de variabilité finalement plus importante qu'on le pensait initialement chez ces espèces, et il est permis d'espérer qu'il en est de même chez le tournesol.

Au cours des chapitres qui précèdent, la teneur en tocophérols de l'huile de tournesol semble incontestablement sous influence génotypique. Par contre, la teneur en phytostérols montre une plus faible variation bien que des différences significatives entre hybrides ont été mises en évidence (cf. Chapitre III - §1 et §3). Le présent chapitre est donc consacré à l'estimation des paramètres génétiques (aptitudes à la combinaison, variances génétiques additives et de dominance, héritabilité) par l'étude de croisements systématiques entre lignées homozygotes. Ces lignées ont été croisées selon un plan North Carolina II (Lynch et Walsh, 1998) ou Top Cross, c'est-à-dire un plan factoriel où sont réalisés tous les croisements possibles entre « n » femelles et « p » mâles. L'analyse de ce plan permet de comparer les familles de demi frères, et donc les aptitudes à la combinaison de leur parent commun (Aptitudes Générales à la Combinaison (AGC), représentatives des contributions génétiques additives), puis en testant les écarts aux aptitudes générales des deux parents, il permet de tester des effets propres aux hybrides (Aptitudes Spécifiques à la Combinaison (ASC), représentatives des effets de dominance chez les hétérozygotes). En modèle aléatoire, le plan d'analyse NCII permet la décomposition de ces variances en leur composantes génétiques additives (σ^2_A) et de dominance (σ^2_D). La variance due à l'environnement (σ^2_E) est estimée lors des essais multilocus sur plusieurs années. On peut alors calculer l'héritabilité au sens large H^2 ou au sens étroit h^2 .

Dans un premier temps, nous étudierons les résultats d'un essai préliminaire sur 24 lignées (12 lignées R et 12 lignées A) homozygotes, afin de justifier le choix des lignées parentales, puis dans un second temps, l'étude du plan de croisement sur deux années, en six lieux par année permettra de calculer les moyennes des hybrides, puis les paramètres génétiques. Cette seconde partie fait l'objet d'une publication scientifique.

1. Sélection des lignées parentales selon leur teneur en tocophérols et phytostérols.

Les études précédentes ont essentiellement porté sur des hybrides. Il s'agit ici de comparer des lignées R et A autofécondées. Ces lignées parentales sont directement issues des programmes de sélection des partenaires de l'étude, elles sont homozygotes, d'une vigueur plus faible que les hybrides commerciaux et les lignées R sont polyflores. L'objectif était de comparer les valeurs d'un ensemble diversifié de lignées élites, oléiques ou non, pour leurs teneurs en tocophérols et phytostérols. Les lignées ont été cultivées selon un plan expérimental en 3 blocs randomisés, avec des parcelles de 3 lignes de 6 mètres par génotype. Pour les analyses à maturité, 5 capitules ont été autofécondés sous poche. Les akènes récoltés sur les 5 capitules ont été regroupés pour constituer l'échantillon de laboratoire. Les teneurs en acide oléique ont été déterminées par spectrométrie proche infrarouge. Les teneurs en tocophérols et en phytostérols ont été déterminées par analyse, comme il a été décrit précédemment. Certaines de ces lignées ont eu des difficultés de levée et/ou des stérilités qui ont conduit à une récolte d'akènes insuffisante : les échantillons ont été éliminés.

Les moyennes obtenues sont présentées dans le Tableau 1. Les lignées femelles montrent une forte variabilité de teneur en huile (de 40,2 à 53,5% d'huile, les lignées mâles ont un écart à peine inférieur, de 42,4 à 52,3%), trois lignées femelles et deux lignées mâles sont des lignées converties « high » oléique. Les données présentées dans le Tableau 1 sont triées par teneur décroissante en tocophérols totaux qui ont constitué le principal facteur de choix : les valeurs mesurées vont de 496 à 1096 mg.kg⁻¹ d'huile avec des dispersions à peu près équivalentes pour les lignées mâles et femelles, cet intervalle de variation est tout à fait comparable à ce que nous avons observé sur les hybrides. Il n'y a donc pas de phénomène d'hétérosis pour ce caractère. Il en est de même pour les phytostérols, avec un intervalle de variation compris entre 200 et 450 mg.100 g⁻¹ d'huile.

Les 6 lignées femelles retenues sont : A1, A2 et A3, de teneur en tocophérols élevée, les lignées A1 et A3 étant respectivement à forte (370 mg.100g⁻¹) et à faible (242,6 mg.100g⁻¹) teneur en phytostérols ; A6 et A8, de teneur intermédiaire en tocophérols, à faible teneur en phytostérols, et enfin A10, de faible teneur en tocophérols et en phytostérols. Les deux dernières femelles étant « high » oléiques. Les 6 lignées mâles ont été retenues selon une répartition à peu près équivalente. Les écarts des teneurs en phytostérols sont aussi importants et significatifs que pour les lignées femelles, par exemple entre R7 (260,6 mg.100g⁻¹) et R11 (380,3 mg.100g⁻¹). Cependant, une majorité de lignées mâles est à forte teneur en phytostérols totaux, contrairement aux lignées femelles.

Les résultats de l'étude multilocale (cf. Chap III §3) ont mis en évidence une différence importante entre les hybrides Melody et Prodisol. Or deux des parents de ces lignées étaient retenus pour le plan de croisement, nous avons donc décidé d'ajouter les deux autres parents, portant à 7x7 le plan NCII initialement prévu à 6x6. Les témoins tout au long de l'expérimentation étant les hybrides commerciaux Melody et Prodisol, ainsi que 7 lignées Cartisol utilisées lors des croisements réalisés en contre saison.

Tableau 1 : Moyennes $\pm$ Erreurs standards des lignées femelles (A1 à A12) et mâles (R1 à R12) pour les principaux critères de qualité de l'akène. Les lignées marquées d'une étoile ont été retenues pour le plan de croisement. Pour chaque caractère, les moyennes marquées d'une même lettre minuscule ne sont pas différentes au seuil $\alpha=5\%$ (Test de Newman et Keuls)

Lignée	n	%Huile	% Ac. Oléique C18 :1	Total Tocophérols (mg.kg ⁻¹ huile)	Total Phytostérols (mg.100g ⁻¹ huile)
A1*	3	44.4 $\pm$ 1.5 abcd	25.8 $\pm$ 1.5 a	961.2 $\pm$ 40.3 ghi	369.9 $\pm$ 20.4 cdef
A2*	3	43.3 $\pm$ 1.5 abc	30.7 $\pm$ 1.5 ab	879.0 $\pm$ 40.3 defgh	294.0 $\pm$ 20.4 abcde
A3*	3	44.6 $\pm$ 1.5 abcd	43.5 $\pm$ 1.5 cd	877.6 $\pm$ 40.3 defgh	242.6 $\pm$ 20.4 ab
A4	3	49.5 $\pm$ 1.5 bcde	28.1 $\pm$ 1.5 a	840.8 $\pm$ 40.3 cdefgh	314.1 $\pm$ 20.4 abcde
A5	2	43.3 $\pm$ 1.8 abc	45.1 $\pm$ 1.8 d	787.5 $\pm$ 49.3 cdefgh	278.7 $\pm$ 24.9 abcde
A6*	3	48.5 $\pm$ 1.5 abcde	32.5 $\pm$ 1.5 ab	729.5 $\pm$ 40.3 bcdef	242.5 $\pm$ 20.4 ab
A7	3	40.2 $\pm$ 1.5 a	87.3 $\pm$ 1.5 h	720.3 $\pm$ 40.3 bcde	288.7 $\pm$ 20.4 abcde
A8*	2	42.4 $\pm$ 1.8 ab	92.2 $\pm$ 1.8 hi	716.4 $\pm$ 49.3 bcde	263.2 $\pm$ 24.9 abcd
A9	1	53.5 $\pm$ 2.6 e	30.7 $\pm$ 2.5 ab	669.1 $\pm$ 69.7 abcd	451.1 $\pm$ 35.3 f
A10*	3	45.5 $\pm$ 1.5 abcde	79.3 $\pm$ 1.5 g	653.4 $\pm$ 40.3 abc	276.6 $\pm$ 20.4 abcde
A11	3	52.7 $\pm$ 1.5 de	45.1 $\pm$ 1.5 d	650.6 $\pm$ 40.3 abc	209.6 $\pm$ 20.4 a
A12	2	43.6 $\pm$ 1.8 abc	51.2 $\pm$ 1.8 e	496.4 $\pm$ 49.3 a	301.4 $\pm$ 24.9 abcde
R1*	3	50.5 $\pm$ 1.5 bcde	28.0 $\pm$ 1.5 a	1096.4 $\pm$ 40.3 i	337.5 $\pm$ 20.4 bcde
R2	3	48.3 $\pm$ 1.5 abcde	27.7 $\pm$ 1.5 a	1000.0 $\pm$ 40.3 hi	309.2 $\pm$ 20.4 abcde
R3	2	43.6 $\pm$ 1.8 abc	32.6 $\pm$ 1.8 ab	944.9 $\pm$ 49.3 fghi	381.8 $\pm$ 24.9 ef
R4	3	48.0 $\pm$ 1.5 abcde	39.4 $\pm$ 1.5 cd	936.8 $\pm$ 40.3 efghi	297.8 $\pm$ 20.4 abcde
R5*	3	45.6 $\pm$ 1.5 abcde	69.4 $\pm$ 1.5 f	932.1 $\pm$ 40.3 efghi	332.7 $\pm$ 20.4 bcde
R6*	2	47.0 $\pm$ 1.8 abcde	92.3 $\pm$ 1.8 hi	874.7 $\pm$ 49.3 defgh	326.3 $\pm$ 24.9 abcde
R7*	3	49.3 $\pm$ 1.5 bcde	33.1 $\pm$ 1.5 ab	799.2 $\pm$ 40.3 cdefgh	260.6 $\pm$ 20.4 abc
R8	3	42.4 $\pm$ 1.5 ab	37.7 $\pm$ 1.5 bc	780.4 $\pm$ 40.3 bcdefgh	304.3 $\pm$ 20.4 abcde
R9*	3	51.9 $\pm$ 1.5 cde	42.0 $\pm$ 1.5 cd	761.1 $\pm$ 40.3 bcdefg	271.6 $\pm$ 20.4 abcde
R10	2	52.3 $\pm$ 1.8 de	32.5 $\pm$ 1.8 ab	632.7 $\pm$ 49.3 abc	233.6 $\pm$ 24.9 ab
R11*	3	49.7 $\pm$ 1.5 bcde	25.5 $\pm$ 1.5 a	569.1 $\pm$ 40.3 ab	380.3 $\pm$ 20.4 def
R12	2	43.7 $\pm$ 1.8 abc	43.7 $\pm$ 1.8 cd	497.2 $\pm$ 49.3 a	228.2 $\pm$ 24.9 ab

Chaque sélectionneur impliqué dans le programme a réalisé les croisements avec sa ou ses lignées R isogéniques, les lignées B mâles stériles isogéniques aux lignées A retenues ont été distribuées à l'ensemble des participants. Les témoins ont été semés sur chaque lieu de croisement. L'objectif était de produire 49 hybrides F1 en quantité suffisante pour réaliser deux années d'essais, avec 6 lieux d'essai par an.

2. Potentiel de sélection du tournesol pour les teneurs de l'huile en tocophérols et phytostérols - Estimation des paramètres génétiques

Les 7 lignées femelles et les 7 lignées mâles croisés en contre saison en 2004/2005 ont produit 47 hybrides F1 qui ont été semés en 6 lieux durant 2 années consécutives en France afin de récupérer des akènes F2. Les dosages des tocophérols et des phytostérols sur ces graines ont permis, dans un premier temps, de calculer les variances environnementales, génotypiques, de tester les interactions génotype-environnement et d'estimer les moyennes des hybrides.

Ensuite, dans un second temps, les moyennes des hybrides ont été utilisées pour calculer les paramètres génétiques selon le plan factoriel NCII. Les aptitudes générales et spécifiques à la combinaison des lignées ont été estimées en utilisant un modèle fixe. Nous avons aussi considéré les lignées parentales comme représentatives des lignées élitaires actuelles, et utilisé un modèle aléatoire afin d'estimer les variances paternelles et maternelles, ce qui permettait d'extraire leurs composantes génétiques additive et de dominance et d'évaluer l'héritabilité. Il est à noter que les méthodes de choix des lignées décrites ci-dessus ont probablement conduit à une légère surestimation des variances génétiques et donc des héritabilités.

Cette partie fait l'objet de deux publications scientifiques insérées dans ce document de thèse.

AYERDI GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., DAYDÉ J., CALMON A., 2008. Estimation of breeding viability for tocopherols and phytosterols in sunflower seeds. 17th International Sunflower Conference, Córdoba (Spain) JUNTA DE ANDALUCÍA vol. 2: 555-559. (ANNEXE 3)

AYERDI GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., DAYDÉ J., CALMON A., 2008. Estimation of breeding potential for tocopherols and phytosterols in sunflower. En cours de préparation.

Estimation of breeding potential for tocopherols and phytosterols in sunflower

Alicia Ayerdi Gotor¹, Monique Berger¹, Françoise Labalette², Sylvie Centis³,
Jean Daydé¹, Anne Calmon¹

¹ Université de Toulouse ; Ecole d'Ingénieurs de Purpan ; Laboratoire d'Agro-Physiologie ;
75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France

² ONIDOL, 12 Av. Georges V Paris 75008, France

³ ASEDIS-SO, 39 chemin Virebent, Toulouse 31200, France

ABSTRACT

Sunflower (*Helianthus annuus L.*) oil is a good source of tocopherols and phytosterols, interesting bioactive molecules with beneficial health effects, nevertheless higher level are desirable. A NCII mating design of 7 females and 7 males was displayed to evaluate the breeding potential for these traits. The 47 F1 hybrids obtained were then grown for two consecutive years (2005 and 2006) on six locations each year. General combining abilities (GCA) for total tocopherol content were higher than GCA for the total phytosterol content. In both female and male parental lines, there was a positive correlation between the parental lines values and their GCA for total tocopherol content in F2 grains. Analysis of variances showed that for total tocopherol content genetic component was mainly additive. The narrow sense heritability found ($h^2 = 0.62$) was quite high, which allows early generation breeding and the expectation of a significant genetic gain for this parameter. This was not the case for total phytosterol content, which displayed larger year effects on GCA, the genetic variance component was mainly due to dominance and heritabilities values were lower ($h^2 = 0.14$). This indicates that dominance and environmental effects could change the predicted hybrid performance. These results indicate the existence of genetic variance for total tocopherol content, but phytosterol content variability is lower than that of tocopherols and subjected to year interactions.

Key words: Breeding – GCA–NCII– Phytosterols – Tocopherols – Sunflower

INTRODUCTION

Several studies have shown that tocopherols and phytosterols can have many positive health effects: they prevent cancer (Bramley, *et al.*, 2000; Calpe-Berdiel, *et al.*, 2005; Tucker et Townsend, 2005), reduce blood cholesterol level (von Bergmann, *et al.*, 2005; Patel et Thompson, 2006) and they are effective antioxidants (Niki et Noguchi, 2004; Kang, *et al.*, 2006). An increasing interest for such molecules had promoted the research of natural sources of these substances. Tocopherols are generally found in vegetable green parts but they are also present in almost all grains. Tocopherols are lipid antioxidants, vitamin E-active substances, with four isomers (α -, β -, γ -, and δ -tocopherol) with species dependent proportions. Naturally, sunflower oil has more than 95% of α -tocopherol (Ayerdi Gotor, *et al.*, 2006a), the most Vitamin E bioactive tocopherol homologue. In literature, we can found references to sunflower tocopherol mutants with high content on β -, δ -, or γ -tocopherol (Velasco, *et al.*, 2004a; Velasco, *et al.*, 2004b; Demurin, *et al.*, 2007). The total content can vary between 300 to 1873mg·kg⁻¹ of oil (Demurin, *et al.*, 1996; Velasco, *et al.*, 2002; Nolasco, *et al.*, 2006). Sterols are considered as the precursors of plant hormones (brassinosteroids), so they are quite ubiquitous the

plants where they play the same role as the cholesterol in animals. Phytosterol content in sunflower oil can vary from 200 to 700 mg·100g⁻¹ of oil (Vlahakis and Hazebroek, 2000; Ayerdi Gotor, *et al.*, 2007) and β -sitosterol is the major form (40-60% of the total) followed by campesterol and stigmasterol.

Genotype as well as environment influence the total tocopherol content in sunflower oil. Temperature is one of the most influent environmental factors (Velasco, *et al.*, 2002; Ayerdi Gotor, *et al.*, 2006b; Nolasco, *et al.*, 2006). Phytosterols content is less influenced by genotype or by environmental factors (Ayerdi Gotor, *et al.*, 2006b; Roche, *et al.*, 2006).

In spite of the growing importance of tocopherols and phytosterols as micronutrients and as natural oil stabilizers, few studies have focused on breeding plans for these minor components in oilcrops, especially on sunflower. It has been shown in rapeseed that genetic progress is possible for the oil tocopherol content (Goffman et Becker, 2001b; Goffman et Becker, 2001a; Marwede, *et al.*, 2004; Wang, *et al.*, 2007). In these studies, tocopherol content and composition inheritances were highly associated with additive gene action.

Heritability, general (GCA) and specific combining ability (SCA) are genetic parameters that can help breeders to find the best selection strategy for developing their hybrids. Breeding for tocopherol and phytosterol contents can increase the market value of sunflower oil by the mean of health promoting effects associated with these nutriment. The objective of the present study is to determine the feasibility of breeding for increasing the tocopherol and phytosterol content in sunflower oil.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Seven male (restorers) and seven female (cytoplasmic male sterile) parental lines of sunflower, *Helianthus annuus L.*, were selected for their high and low tocopherol and phytosterol contents. The F1 hybrid seeds were produced in a 7 X 7 North Carolina II (NCII) factorial design. Crosses were made in Chile during winter 2005. Two crosses had not enough seeds to be included in the trials. Another one had just enough seeds to be included in the first year of experiments. The fourteen parental lines were provided by six sunflower breeders: Caussade semences, Maïsadour semences, Monsanto Dekalb, RAGT-R2n, Soltis and Syngenta seeds.

Field trials

Parental lines were cultivated together in Villenouvelle (France) in a three blocs design to analyse in the same growing conditions all the parents for their contents in tocopherols and phytosterols. The progenies (from grains F1) were cultivated in 2005 and in 2006 in six different places over France (Table 1), with two blocs in each place. F1 Hybrids plots were randomized in the blocs to limit the effect of interactions between plants. Just before flowering, the buds were covered with microperforated bags to ensure auto-pollinated grains; the bags were taken away at the end of flowering. F2 akenes were collected at maturity; the samples (for analysis) were made with 5 plants of the same plot.

Table 1: F2 hybrids growing places in 2005 and 2006.

Breeder	Place (French department)	Geographical localization
Caussade semences	Cayrac (81)	44°60'N 1°28'E
Maïsadour semences	Conan (41)	47°48'N 1°15'E
Monsanto Dekalb	Savenès (82)	43°49' N 1°11'E
RAGT-R2n	Villampuy (28)	48°20'N 1°30'E
Soltis	Mondonville (31)	43°40'N 1°17'E
Syngenta seeds	Saint sauveur (31)	43°45'N 1°24'E

The progenies (from grains F2) of 3 of the 46 hybrids were cultivated in 2006/2007 winter in Chile to produce F3 grains. The 3 hybrid F3 plants were cultivated in 2 different places (North and South) in France to produce F4 progenies that will be used for a future molecular marquage.

Chemical analysis

Oil extraction

Grains were ground with a sample mill (KnifeTec 1095; Foss Tecator AB, Sweden) for 2 periods of 10 s. Around 15g of ground seeds were placed in a 33ml cartridge with Fointainebleau sand for and extraction in an accelerated solvent extractor apparatus (ASE-200, Dionex, France) with the following extraction conditions: 120°C, 10 min of static extraction, 95% Hexane (n-hexane Prolabo-Subra, France) and 5% Propanol-2 (HPLC grade, SDS, France) under a pressure of 100 bar. Oil was recovered after solvent evaporation under low pressure with a rotavapor (HS 40 Huber, Bioblock Scientific, Heildolph, Germany). Lipid extracts were weighed and conserved at – 18°C to minimize oxidative reactions before analysis.

Tocopherols determination

Complete separation of all native tocopherols was achieved using a high-performance liquid chromatography (HPLC) (SpectraPhysics; TSP, USA) (ISO 9936, 1997). A normal-phase LiChrosorb Si60 column was used. The mobile phase was hexane/isopropanol (99.7:0.3 v/v) and the solvent flow was 1 ml/min. One gram of oil sample was diluted in 25 mL of hexane and 20 µL were injected. Tocopherols were identified by comparison of retention times with their respective standards (Tocopherol Kit; ChromaDex, USA). Total tocopherol content was calculated as the sum of α -, β -, γ - and δ -tocopherol contents and expressed in mg·kg⁻¹oil.

Phytosterols determination

The analyses of sterol required a saponification with KOH 0.5M during 15 min and a purification on an aluminium oxide basic column (Panreac, Barcelona, Spain). The total and the individual sterol content were analyzed by gas chromatography, after a silylation with trimethylsilyl (TMS) ester derivatives (5:95 v/v 1-N-imidazole and N-methyl-N trimethyl-silyl heptafluorobutiramide, Sigma-Aldrich, France) during 15min in an 105°C oil bath. 1µl of the TMS solutions were injected on a silica capillary column (ZB-5, Phenomenex, France) in a gas chromatography (Clarus 600, Perkin Elmer, USA) fitted with a flame ionization detector. Sterols were identified by their retention time relative to betulin internal standard (Sigma-Aldrich, France). They were quantified using the ratio obtained

between betulin and sterol standards (Sigma-Aldrich, France). Sterols were expressed in $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ oil (NF EN ISO 12228, 1999).

Statistical analysis

A mixed model analysis was conducted to examine genetic and environment components of variance. Data were analysed and mean squared to genetic expectations according to the North Carolina Design II model reported by Lynch et Walsh (1998). This model used a set of males and an independent set of females crossed in all possible combinations. These crosses result in a set of full-sib families and half-sib families. The half-sib families are further subdivided into paternal and maternal half-sib families. The ANOVA from this design results in variance component estimates that are directly equated with genetic covariances that represent estimates of additive and dominance genetic variance.

Restricted maximum likelihood method, in Statistica, was used to estimate variance components of the random terms in the model and their standard errors for total tocopherol and phytosterol contents. Heritabilities were calculated using formulas reported by Lynch et Walsh (1998).

RESULTS

Quantification of tocopherols and phytosterols in F2 seeds

The major tocopherol isomer found in the oil was α -tocopherol (> 95% of the total) followed by β -tocopherol. γ - and δ - tocopherol isomers were found as traces. These values are in accordance with the literature (Velasco, *et al.*, 2002; Ayerdi Gotor, *et al.*, 2006a; Nolasco, *et al.*, 2006; Ayerdi Gotor, *et al.*, 2007). The major sterol was β -sitosterol which represented between 40 and 60% of the total phytosterol content, followed by campesterol and stigmasterol (Phillips, *et al.*, 2005; Roche, *et al.*, 2006; Ayerdi Gotor, *et al.*, 2007).

Total tocopherol content in the parental lines varied between 548.0 to $1096.4\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ oil. Total phytosterol content varied between 260.7 to $455.7\text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ oil. Mean values of F2 seeds of the 6 growing places for the two years 2005 and 2006 are in Table 2.

Table 2. Mean values, standard deviation (SD) and range of tocopherol and phytosterol contents for the 6 locations in 2005 and 2006 of the F1 hybrids.

Minor component	2005			2006		
	Mean	SD	Range	Mean	SD	Range
α -tocopherol ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ oil)	452.3	52.6	346.9-570.2	516.5	65.0	390.4-679.6
Total tocopherol ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ oil)	469.8	55.8	354.8-590.0	469.8	76.8	427.7-733.9
β -sitosterol ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ oil)	215.7	14.3	176.4-241.7	227.5	23.4	183.6-317.1
Total phytosterol ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ oil)	315.7	20.6	254.7-366.4	319.6	27.6	262.2-398.8

Analysis of the North Carolina II design

An ANOVA was firstly made to estimate environmental factors that could affect tocopherol and phytosterol contents. All factors were considered as random excepted for the year effect. ANOVA (Table 3) showed that total tocopherol content was affected significantly by genotype but also by the year and by the growth location. Total phytosterol content was affected significantly by genotype but also by the year and the Location(Year).

Table 3: ANOVA of the 47 hybrids cultivated in 6 different places in 2005 and 2006 for the total tocopherol (mg/kg oil) and phytosterol (mg/100g oil) content.

	df ^a	Mean square of total tocopherol	Mean square of total phytosterol
Hybrid	46	72174**	6548**
Year	1	1960084**	39517**
Hybrid x Year	46	5853*	2790
Location (Year)	10	994812**	17199**
Hyb. x Location (Year)	460	4338	2436
Error	449	4033	2327

^a degrees of freedom. Fischer significance test * = $p < 0,05$ et ** = $p < 0,001$

Hybrids means were then used to compute the general combining abilities (GCA) (Table 4) and specific combining abilities (SCA) (Table 5): for each inbred line, GCA was calculated as the difference between the general mean and the mean of its maternal or paternal half sibs offspring and SCA was the difference between a given hybrid and the sum of its parental GCA. The correlations between lines values and their GCA are significant and positive for tocopherol content in both male and female sets. There is no correlation between the total phytosterol line values and GCAs.

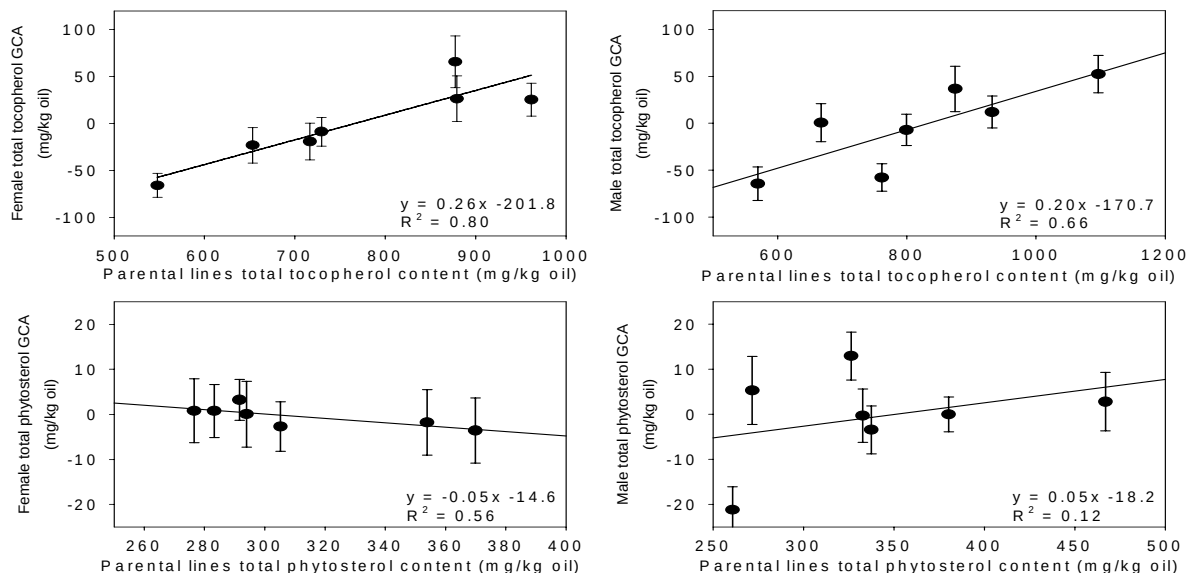


Figure 1: Correlations between parental line values and general combining ability (GCA) in 2005 and 2006. A - B: total tocopherol contents (mg/kg⁻¹oil), female and male lines respectively; C - D: total phytosterol contents (mg/100g⁻¹oil), female and male lines, respectively.

Table 4: Mean values and standard deviation of female, male made with 2005 and 2006 mean of 6 places (result of ANOVA). The GCA calculated for the females and males for the total tocopherol and phytosterol content. * indicates statistical significance. N : number of samples.

Phytochemical content, statistical significance, number of samples								
CODE	Mean Total-P	SD Total-P	GCA	Mean Total-T	SD Total-T	GCA	N	
General Mean	324,74	1,67		523,89	4,45		1016	
FEMALE	A	321,15	7,24	-3,59	549,27	17,49	25,38	14
	B	324,80	7,31	0,06	550,18	24,38	26,29	12
	C	322,04	5,52	-2,70	457,87	12,82	-66,02 *	14
	D	327,96	4,54	3,22	515,01	15,37	-8,87	14
	E	322,95	7,25	-1,78	589,48	27,52	65,59 *	11
	F	325,54	7,10	0,81	500,58	18,87	-23,31	14
	G	325,52	5,89	0,78	504,63	19,66	-19,26	14
MALE	A	321,29	5,34	-3,45	576,25	19,83	52,37 *	14
	B	324,74	3,89	0,00	459,49	17,83	-64,39 *	12
	C	330,02	7,54	5,28	466,12	14,57	-57,77 *	14
	D	337,68	5,32	12,94 *	560,51	24,10	36,62	14
	E	327,53	6,50	2,79	524,49	20,28	0,61	12
	F	303,54	5,13	-21,19 *	516,84	16,77	-7,04	13
	G	324,44	5,95	-0,30	535,89	17,00	12,00	14

Table 5: Mean values and standard deviation of hybrids (female x male) made with 2005 and 2006 mean of 6 places (results of ANOVA).and the SCA calculated for the total tocopherol and phytosterol content. * indicates statistical significance. N : number of samples.

Indicates statistical significance: N = number of samples.								
FEMALE x MÂLE	CODE	Mean Total-P	SD Total-P	SCA	Mean Total-T	SD Total-T	SCA	N
	AA	350,19	19,54	32,49	600,95	59,98	-0,69	2
	AB	315,89	0,20	-5,25 *	471,23	29,79	-13,65	2
	AC	312,47	15,49	-13,95	493,93	55,90	2,43	2
	AD	335,52	10,51	1,43	573,04	47,89	-12,86	2
	AE	290,35	15,91	-33,59 *	562,42	21,28	12,54	2
	AF	296,62	4,82	-3,33	558,75	41,86	16,52	2
	AG	347,00	19,73	26,15	584,59	42,80	23,32	2
	BA	312,06	10,42	-9,30	588,97	61,05	-13,57	2
	BB	334,71	14,48	9,91	507,67	76,20	21,89	2
	BC	351,57	34,81	21,49	430,10	36,88	-62,30	2
	BD	338,29	3,60	0,55	620,16	35,92	33,36	2
	BF	303,69	10,46	0,08	581,45	24,46	38,32	2
	BG	308,50	1,59	-16,00 *	572,71	48,17	10,53	2
	CA	320,58	15,74	1,99	518,89	35,94	8,66	2
	CB	329,23	6,38	7,18	412,76	6,05	19,28 *	2
	CC	299,17	6,35	-28,16	447,58	29,49	47,49	2
	CD	336,57	5,12	1,59	445,32	9,76	-49,16	2
	CE	336,60	10,19	11,76	474,29	49,15	15,82	2
	CF	298,84	25,25	-2,01	451,25	36,53	0,43	2
	CG	333,32	3,26	11,58	454,97	50,61	-14,89	2
	DA	332,08	10,95	7,57	587,35	37,68	19,97	2
	DB	313,06	16,45	-14,89	470,06	47,37	19,44	2
	DC	341,67	0,47	8,43	467,48	38,12	10,23	2
	DD	328,26	8,83	-12,63	547,77	42,87	-3,86	2
	DE	339,16	12,78	8,41	516,83	37,39	1,21	2
	DF	304,99	1,72	-1,77	489,03	21,33	-18,94	2
	DG	336,47	9,51	8,82	526,59	35,75	-0,42	2
	EA	309,17	2,71	-10,33	652,12	74,85	10,27	2
	EC	350,53	14,83	22,30	512,31	40,40	-19,40	2
	ED	321,22	9,33	-14,67	665,22	83,08	39,12	2
	EE	344,22	2,16	18,47	610,96	36,32	20,87	2
	EF	277,85		-23,91	508,04		-74,39	1
	EG	312,18	6,04	-10,47	547,52	71,11	-53,97	2
	FA	306,30	16,98	-15,79	502,86	53,74	-50,09	2
	FB	330,18	1,26	4,64	415,49	36,00	-20,69	2
	FC	303,84	0,47	-26,98	483,18	56,33	40,38	2
	FD	365,82	31,91	27,34	541,17	87,46	3,97	2
	FE	315,34	4,89	-13,00	543,44	48,28	42,25	2
	FF	316,80	19,18	12,45	504,79	59,07	11,25	2
	FG	340,54	1,48	15,30	513,13	18,98	0,55	2
	GA	318,64	5,16	-3,43	582,65	43,44	25,65	2
	GB	325,34	10,57	-0,18	479,76	60,13	39,52	2
	GC	350,87	7,83	20,07	428,23	37,77	-18,63	2
	GD	338,05	9,21	-0,41	530,86	58,63	-10,39	2
	GE	339,52	8,10	11,21	439,03	9,08	-66,21	2
	GF	313,17	15,53	8,85	520,19	55,81	22,61	2
GG	293,04	17,66	-32,17	551,71	40,31	35,08	2	

GCAs for the total tocopherol contents are greater than for total phytosterol content. Significant GCA values for total tocopherol content were found for both females and males. On the contrary, for total phytosterol content significant GCAs were found only for 2 males. The occurrence of many significant GCA values means that additive genetic effects are of main genetic variance components. This denotes the presence of positive and negative alleles in the lines. However, since the parents were not randomly selected, but rather selected for extreme values of tocopherol contents, the relative amount of GCA variance may have been overestimated.

SCA range was larger in 2006 than in 2005 for total tocopherol content (data not shown). On the contrary, SCA range had less year effect for total phytosterol content. Negative SCA for phytosterol and tocopherol content were of higher amplitude in 2006. Four hybrids had SCA values significantly different, three for the total phytosterol content and one for the total tocopherol content.

The variance components were calculated using a random model in which the parental lines are expected to be a random set of sunflower lines. In such conditions, the males and female lines gives 'sire' and 'dam' variance, called here σ^2_{male} and σ^2_{female} and their interaction terms which can be partitioned into their genetic (additive and dominance) components. Both female and male genetic variance (mainly additive) were highly significant for total tocopherol. The presence of dominance effects was also corroborated by the significant female x male interaction variance. Female and male variances were not significant for the total phytosterol content. The only genetic component was interaction between male and female lines. This denotes that phytosterols content was more determined by alleles interactions in these sets of parents. Due to the calculation with the hybrids year means, the environmental interactions are mainly year effects.

Table 6: Variance components ($\pm$ standard errors) calculated with the restricted maximum likelihood method all random factors except year for the total tocopherol and phytosterol content.

Source of variation	Total tocopherol (mg·kg ⁻¹ oil)	Total phytosterols (mg·100g ⁻¹ oil)
σ^2_{female}	1519,9 $\pm$ 996,1***	0
σ^2_{male}	1619,2 $\pm$ 1026,3***	69,3 $\pm$ 64,8
$\sigma^2_{\text{year} \times \text{female}}$	80,6 $\pm$ 112,5	0,2 $\pm$ 20,7
$\sigma^2_{\text{year} \times \text{male}}$	1,9 $\pm$ 65,9	0
$\sigma^2_{\text{female} \times \text{male}} = \sigma^2_{\text{I}}$	700,2 $\pm$ 263,9**	148,9 $\pm$ 74,3*
$\sigma^2_{\text{environment}}$	666,3 $\pm$ 163,4***	272,2 $\pm$ 66,6**
σ^2 = variance composante ; Significance : * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001		

Analysis of genetic variance and heritability

The genetic variance and the heritability estimated for the total tocopherol and phytosterol content are shown in Table 7. The values of additive (A) variance were the highest for the variance of tocopherols compared to the dominance (D) or the environmental (E1 or E2). On the contrary the most important variance for the phytosterol content was the dominance. The values of the narrow sense heritability are relatively high for the tocopherols, similar to those found in the literature for soybean F2 grains (Wang, et al., 2007) and for canola (Marwede, et al., 2004).

Table 7: Genetic analysis of parameters for total tocopherols and phytosterols content in F2 seeds.

Parameters		Total tocopherols	Total phytosterols
Additive genetic variance	A _{female}	6076	0
	A _{male}	6476	276
Dominance genetic variance	D	3196	596
Environmental variance	E(1)*	666	272
	E(2)	4000	2300
Narrow sense heritability	$h^2(1)$	0,62	0,14
	$h^2(2)$	0,47	0,05
Broad sense heritability	$H^2(2)$	0,70	0,24

* Environmental variances were calculated: (1)- from the maximum likelihood (2)- from the ANOVA

F4 distribution

The distribution frequencies of the oil total tocopherol and phytosterol contents for the 180 F4 seeds issued from the CD cross are shown in Figure 2 A and B. The total tocopherol content ranked between 296.7 and 911.1mg/kg oil while the parental lines values were for the female C of 521.0 mg/kg oil and the male D value was of 865.0 mg/kg oil. The total phytosterol content of the F4 lines ranged from 226.71 to 579.96 mg/100g oil while its parental lines had the values of 307 for the female and 328 mg/100g oil for the male D. Most of the F4 grains showed a lower tocopherol content to the mean of the two parental lines. On the contrary the phytosterol content in the F4 lines was higher than the mean of the parental lines.

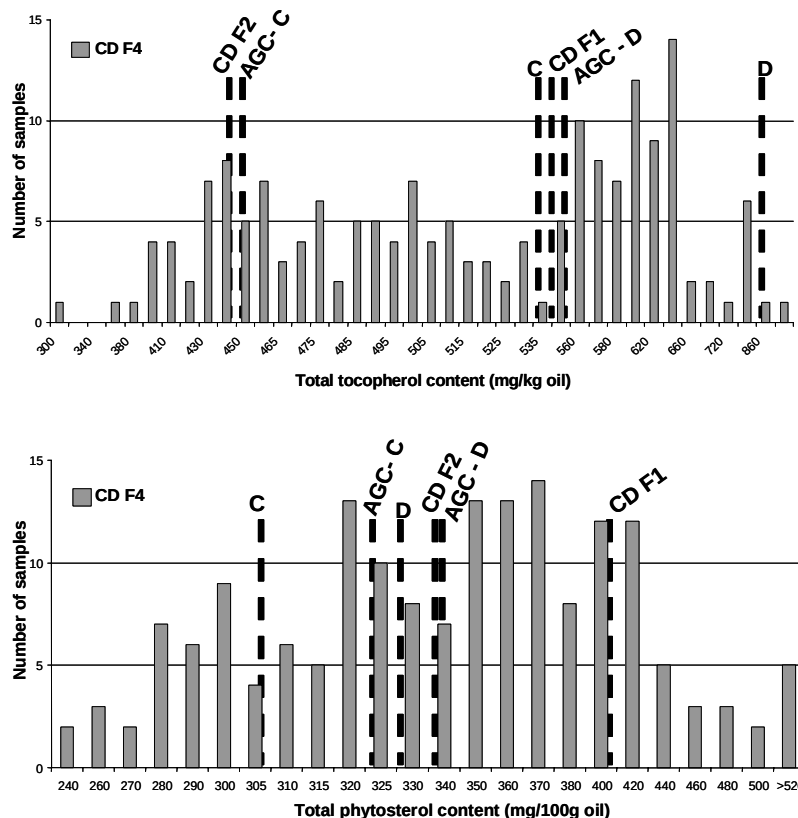


Figure 2. Frequency distribution of: A- total tocopherol content (mg/kg oil); B- total phytosterol content (mg/100g oil) in 180 F4 grains of the CD hybrid. In dotted lines are signalled the values of the parental lines C and D, the value of the CD F1 hybrid and the values of the offspring C or D at the F2 generation.

CONCLUSION

Tocopherol and phytosterol content are minor components of sunflower oil now related to oil quality due to their positive health effects on human health. Thus, breeders are now trying to include minor components in their selection indexes to improve oil quality as it could be an important step to add value to this crop. This quantitative genetic approach was designed to understand how phytosterol and tocopherol contents in sunflower oil are determined, and to find the better strategy (improved inbred lines or hybrid effect, early or late breeding) to improve these traits. The North Carolina II design used was an appropriate method to provide such information.

Some other studies in the literature have shown the high level of genetic determinism of total tocopherol content (Goffman et Becker, 2001a; Marwede, *et al.*, 2004) but there is no data on sunflower nowadays. Moreover, analysis of phytosterol determinism is just beginning, with the publication of the first results on canola (Amar, *et al.*, 2008) who found quasi mendelian heritabilities (h^2 around 0.9) in canola double haploid lines.

The results presented in this study showed that the additive component, female and male, of the genetic variance played the main role in the inheritance of tocopherol content, followed by the dominance component. On the contrary for the phytosterol content the dominance component was the main constituent of the genetic variance. The environmental variance was relatively higher for the total phytosterol content than for the tocopherol content.

For phytosterol content there was a larger year effect on GCA, so genetic gain was less important. The SCA values observed indicate that total tocopherol and phytosterol content could be affected by dominance effects, this could change the predicted hybrid performance. Both families of minor components are subjected to hybrid - year interactions.

These results open the possibilities to breeders to improve sunflower oil added value, by the mean of increased contents of interesting molecules for human health. This appeared here more easy to do with tocopherols for which the narrow sense heritability was relatively high (0,62). It would be necessary to find parents with a higher variability for the total phytosterol content to really determine the possibilities of breeding for this trait.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Caussade Semences, Maïsadour Semences, Monsanto Dekalb, RAGT-R2n, Soltis, Syngenta Seeds for field experiments and sunflower plant material providing. Financial support was provided by ASEDIS-SO, ONIDOL (French Oil seeds organization) and Midi-Pyrenees Region. We also thank Cognis-France for their technical support.

REFERENCES

- AFNOR (1999). Association Française de NORmalisation, European norm, NF EN ISO 12228 May 1999; French norm T 60-258: Animal and vegetable fats and oils - Determination of individual and total sterols contents - Gas chromatographic method. AFNOR. Paris. 18 pp.
- Amar, S. (2007). Genetic variation and inheritance of phytosterol content in *Brassica napus* L. PhD Thesis. Faculty of Agriculture, Georg-August-Universität Göttingen, Germany. pp 77.
- Amar, S., W. Ecke, H. C. Becker et C. Möllers (2008). "QTL for phytosterol and sinapate ester content in *Brassica napus* L. collocate with the two erucic acid genes". Theoretical and Applied Genetics **116**:1051-1061
- Ayerdi Gotor, A., M. Berger, F. Labalette, S. Centis, J. Daydé and A. Calmon (2006a). "Etude de la variation des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule : Partie I - Tocophérols". OCL : Oleagineux, Corps Gras Lipides **13**(2): 206-212.
- Ayerdi Gotor, A., M. Berger, F. Labalette, S. Centis, J. Daydé and A. Calmon (2006b). Variability of minor components in sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil from a multi-local study. 17th International Symposium on Plant Lipids, East Lansing, MI, USA, ISPL2006.
- Ayerdi Gotor, A., E. Farkas, M. Berger, F. Labalette, S. Centis, J. Daydé and A. Calmon (2007). "Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry". European Journal of Lipid Science and Technology **109**(5): 525-530.
- Bramley, P. M., I. Elmafda, A. Kafatos, F. J. Kelly, Y. Manios, H. E. Roxborough, W. Schuch, P. J. A. Sheehy and K. H. Wagner (2000). "Vitamin E". Journal of the Science of Food and Agriculture **80**(7): 913-938.
- Calpe-Berdiel, L., J. C. Escola-Gil, V. Ribas, A. Navarro-Sastre, J. Garces-Garces and F. Blanco-Vaca (2005). "Changes in intestinal and liver global gene expression in response to a phytosterol-enriched diet". Atherosclerosis **181**(1): 75-85.
- Demurin, Y., D. Skoric and D. Karlovic (1996). "Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality". Plant Breeding **115**: 33-36.
- Demurin, Y. N., S. G. Efimenko and T. M. Peretyagina (2007). "Expressivity of tocopherol mutations in sunflower". Helia **29**(45): 55-62.
- Goffman, F. D. and H. C. Becker (2001a). "Diallel analysis for tocopherol contents in seeds of rapeseed". Crop Science **41**(4): 1072-1079.
- Goffman, F. D. and H. C. Becker (2001b). "Genetic analysis of tocopherol content and composition in winter rapeseed". Plant Breeding **120**(2): 182-184.
- ISO (1997). International Standard Organization. ISO 9936: Animal and vegetable fats and oils - Determination of tocopherols and tocotrienols contents - Method using high-performance liquid chromatography. ISO. Genève. 11 pp.
- Kang, J. H., N. Cook, J. Manson, J. E. Buring and F. Grodstein (2006). "A randomized trial of vitamin E supplementation and cognitive function in women". Archives of Internal Medicine **166**(22): 2462-2468.
- Lynch, M. and B. Walsh (1998). Genetic and analysis of quantitative traits. Sunderland (MA), Sinauer Associates, Inc.
- Marwede, V., A. Schierholt, C. Möllers and H. C. Becker (2004). "Genotype X environment interactions and heritability of tocopherol contents in canola." Crop Science **44**(3): 728-731.
- Niki, E. and N. Noguchi (2004). "Dynamics of antioxidant action of vitamin E". Accounts of Chemical Research **37**(1): 45-51.
- Nolasco, S. M., L. A. N. Aguirrezábal, J. Lúquez and C. Mateo (2006). "Variability in oil tocopherol concentration and composition of traditional and high oleic sunflower hybrids (*Helianthus annuus* L.) in the Pampean region (Argentina)". Grasas y Aceites **57**(3): 260-269.
- Patel, M. D. and P. D. Thompson (2006). "Phytosterols and vascular disease". Atherosclerosis **186**(1): 12-19.
- Phillips, K. M., D. M. Ruggio and M. Ashraf-Khorassani (2005). "Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States". Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(24): 9436-9445.

- Roche, J., A. Bouniols, Z. Mouloungui, T. Barranco and M. Cerny (2006). "Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components". European Journal of Lipid Science and Technology **108**(4): 287-297.
- Tucker, J. M. and D. M. Townsend (2005). "Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease". Biomedicine & Pharmacotherapy **59**(7): 380-387.
- Velasco, L., J. M. Fernández-Martínez, R. García-Ruiz and J. Domínguez (2002). "Genetic and environmental variation for tocopherol content and composition in sunflower commercial hybrids". Journal of Agricultural Science **139**: 425-429.
- Velasco, L., B. Pérez-Vich and J. M. Fernández-Martínez (2004a). "Novel variation for the tocopherol profile in a sunflower created by mutagenesis and recombination". Plant Breeding **123**(5): 490-492.
- Velasco, L., B. Pérez-Virch and J. M. Fernández-Martínez (2004b). "Development of sunflower germplasm with high delta-tocopherol content". Helia **27**(40): 99-106.
- Vlahakis, C. and J. Hazebroek (2000). "Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting location, and temperature". Journal of the American Oil Chemists Society **77**(1): 49-53.
- von Bergmann, K., T. Sudhop and D. Lütjohann (2005). "Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights". The American Journal of Cardiology **96**(1A): 10D-14D.
- Wang, S., K. Kanamaru, W. Li, J. Abe, T. Yamada and K. Kitamura (2007). "Simultaneous accumulation of high contents of α -tocopherol and lutein is possible in seeds of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)". Breeding science **57**: 297-304.

3. Conclusion

L'étude des descendance en ségrégation produites jusqu'à maintenant a permis de déterminer l'importance du génotype sur la teneur finale en tocophérols par un effet d'additivité des lignées femelles et mâles, et par l'effet de la dominance (interaction entre allèles) pour la teneur totale en phytostérols. Les facteurs environnementaux ont une influence importante sur les teneurs en stérols.

Les valeurs d'héritabilité au sens strict de $h^2 = 0,62$ et $0,14$ et de l'héritabilité au sens large de $H^2 = 0,70$ et $0,24$ pour les teneurs totales en tocophérols et en phytostérols respectivement confirment la possibilité de sélection pour les tocophérols, mais restent assez faibles pour les phytostérols. Une des causes possibles expliquant ces faibles valeurs pour les phytostérols pourrait être la faible variabilité dans les lignées parentales choisies au départ pour la construction du plan de croisement.

La distribution des teneurs en tocophérols et en phytostérols de la ségrégation F4 pour l'hybride CD des 180 lignes montre l'apparition de 2 populations normales pour la teneur en tocophérols ce qui suggère deux régions de gènes impliqués et une seule population pour la teneur en phytostérols. Les analyses des 5 familles d'hybrides F4 récoltées restantes aideront à la compréhension du déterminisme génétique des composés mineurs ainsi que confirmeront les résultats obtenus jusqu'à présent. L'analyse par marquage moléculaire sur la ségrégation F5 pourrait permettre de connaître les régions de gènes impliquées dans la synthèse des tocophérols et des phytostérols.

Une autre solution pour le phénotypage en masse des lignées en cours de sélection, pourrait être l'utilisation d'un outil chimiométrique. En effet, le tri des lignées à autoféconder pour les mâles, ou à convertir dans le cas des lignées femelles, doit être fait rapidement sur un nombre de lots souvent important. La spectrométrie proche infrarouge pourrait être un outil précieux. En effet, il permet une analyse rapide, non destructive et facile à mettre en œuvre en travail de routine. La difficulté majeure est de paramétrer l'appareil avec les calibrations adéquates.

Le chapitre suivant étudie la possibilité d'une telle prédiction de la teneur en tocophérols et phytostérols totaux dans l'huile ou par MS d'akène.

CHAPITRE V.

Prédiction par spectrométrie proche infrarouge des teneurs en tocophérols et en phytostérols dans l'akène de tournesol.

Chapitre V.

Prédiction par spectrométrie proche infrarouge des teneurs en tocophérols et en phytostérols dans les akènes de tournesol.

Afin de renforcer le potentiel de sélection d'hybrides associant performances agronomiques et compositions, les programmes de sélection sur le tournesol ne sont pas basés uniquement sur le profil d'acides gras mais peuvent inclure également d'autres caractéristiques de sélection telles que la composition en tocophérols et en phytostérols. À l'heure actuelle, la teneur en tocophérols est déterminée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) tandis que la teneur en phytostérols est déterminée par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Ces deux méthodes sont longues et coûteuses, utilisent des produits dangereux (hexane) et requièrent du personnel qualifié. Ainsi, ces méthodes normalisées ne répondent pas aux besoins des programmes de sélection dont la principale requête est de disposer d'un outil analytique rapide, fiable et facile à mettre en œuvre pour sélectionner des lignées et des hybrides en grande quantité. La méthode par spectrométrie proche infrarouge (SPIR) s'avère répondre à cette demande (Sato, *et al.*, 1995; Pérez-Vich, *et al.*, 1998; Moschner et Biskupek-Korell, 2006).

La spectrométrie proche infrarouge (SPIR) est largement utilisée aujourd'hui car c'est un outil simple, facile à mettre en œuvre et qui permet d'accélérer le volume d'échantillons à analyser. Cette technique peut être utilisée en laboratoire ou comme système embarqué. C'est une méthode de mesure indirecte qui permet d'analyser des échantillons avec peu de préparation. De plus, elle permet de déterminer simultanément différents paramètres dans une matrice. Chez le tournesol, un nombre important de calibrations SPIR sur différentes matrices : huile, akènes intacts ou broyés ont été développées et permettent de mesurer simultanément plusieurs paramètres tels que la teneur en eau, en huile, en protéines et la composition en acides gras (Sato, *et al.*, 1995; Pérez-Vich, *et al.*, 1998; Moschner et Biskupek-Korell, 2006). Les seuls travaux traitant de l'application de la spectrométrie proche infrarouge pour prédire la teneur en tocophérols ont été réalisés sur des échantillons frais ou déshydratés de luzerne (González-Martín, *et al.*, 2006). Cette étude montre que l'alpha-tocophérol, dont la teneur est comprise entre 3 et 5 mg /100g dans des échantillons frais et 0,5 à 4 mg /100g dans les échantillons déshydratés peut être prédit avec un coefficient de détermination de $R^2 = 0,88$.

Dans cette dernière partie, une étude sur la faisabilité d'une caractérisation par spectrométrie proche infrarouge des composés mineurs a été développée. Les calibrations mises en œuvre ont été réalisées à partir des données collectées sur l'ensemble des essais réalisés au cours des différentes études. Deux matrices d'étude ont été utilisées ; un échantillon d'akènes broyés de tournesol et un akène isolé décortiqué de tournesol.

L'ensemble de ce travail s'inscrit dans une démarche de discrimination de l'enrichissement de la matière première en composés mineurs, et de sélection précoce de matériel génétique au cours du processus de création variétale.

1. Prédiction des teneurs en composés mineurs sur une matrice d'akènes broyés de tournesol

1.1. Résultats

Les résultats obtenus, sur une matrice d'akènes broyés, ont fait l'objet de deux communications orales et d'une publication scientifique.

- Une première publication traite de la faisabilité d'une prédiction par spectrométrie proche infrarouge des teneurs en tocophérols et en phytostérols dans des akènes broyés de tournesol. Les valeurs de références sont exprimées par rapport à la quantité d'huile ; cette publication est insérée dans ce document de thèse :

AYERDI GOTOR A., FARKAS E., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., DAYDÉ J., CALMON A., 2007. Determination of minor components (tocopherols and phytosterols) composition of sunflower seeds by near-infrared spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109: 525-530.

-Une deuxième publication propose une amélioration de la calibration des phytostérols en utilisant des valeurs de référence exprimées par rapport à la matière sèche. Cette publication est également insérée dans ce document de thèse :

AYERDI GOTOR A., BERGER M., LABALETTE F., CENTIS S., DAYDÉ J., CALMON A., 2008. Near Infrared Spectrometry (NIRS) prediction of minor components in sunflower seeds, Proceeding of 17th International Sunflower Conference, Cordoba (Spain). JUNTA DE ANDALUCIA vol.2: 763-769.

Alicia Ayerdi Gotor^a
 Eric Farkas^a
 Monique Berger^a
 Françoise Labalette^b
 Sylvie Centis^c
 Jean Daydé^a
 Anne Calmon^a

^a E.I. Purpan,
 Laboratoire d'Agrophysiologie,
 Toulouse, France

^b ONIDOL,
 Paris, France

^c ASEDIS-SO,
 Toulouse, France

Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry

The objective of this work was to develop a near-infrared reflectance spectrometry (NIRS) calibration estimating the tocopherol and phytosterol contents in sunflower seeds. Approximately 1000 samples of grinded sunflower kernels were scanned by NIRS at 2-nm intervals from 400 to 2500 nm. For each sample, standard measurements of tocopherol and phytosterol contents were performed. The total tocopherol content was obtained by high-performance liquid chromatography coupled with a fluorescence detector, while the total phytosterol content was assessed by gas chromatography. For tocopherol, the calibration data set ranged from 175 to 1005 mg/kg oil (mean value around 510 ± 140 mg/kg oil), whereas for the phytosterol content, the calibration data set ranged from 180 to 470 mg/100 g oil (mean value of 320 ± 50 mg/100 g oil). The NIRS calibration showed a relatively good correlation ($R^2 = 0.64$) between predicted by NIRS and real values for the total tocopherol content but a poor correlation for the total phytosterol content ($R^2 = 0.27$). These results indicate that NIRS could be useful to classify samples with high and low tocopherol content. In contrast, the estimation of phytosterol contents by NIRS needs further investigation. Moreover, in this study, calibration was obtained by a modified partial least-squares method; the use of other mathematical treatments can be suitable, particularly for total phytosterol content estimation.

Keywords: Near-infrared spectrometry, tocopherols, phytosterols, minor components, sunflower seeds.

1 Introduction

Sunflower is an important oilseed crop around the world. The most common sunflower oil use concerns the edible oil industry (e.g. salad oil, margarine, etc.). Recently, the high-oleic type of sunflower has been considered as a suitable material for non-food applications such as lubricants and biocarburants [1, 2]. In addition, classic or oleic sunflower seeds are rich in micronutrients such as tocopherols and phytosterols exhibiting different health benefits (against cardiovascular diseases, ageing disorders, etc.). Tocopherols (vitamin E) are fat-soluble compounds exhibiting antioxidant properties leading to protection against chronic diseases [3, 4]. The sunflower tocopherol complex is known to contain predominantly α -tocopherol, which represents the vitamin for humans. Furthermore, tocopherols exhibit the highest antioxidant activity *in vivo* by quenching active oxygen and peroxide radicals [5]. On the other hand, phytosterols (plant sterols) have a chemical structure similar to human cholesterol [6]. Phytosterols

have been proven to reduce blood cholesterol [7, 8]. Moreover phytosterols, especially β -sitosterol, exhibit other beneficial properties such as anti-inflammatory and antitumor activity [9].

Thus, sunflower breeding programs are based not only on the fatty acid profile of hybrids but also start to include other selection characteristics like minor components (tocopherols and phytosterols). To include such new characteristics, breeders need analytical input. Nowadays, the tocopherol content is mainly determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) whereas the phytosterol content is determined by gas chromatography (GC). These two analytical methods are long, expensive, use hazardous chemicals and require high qualification. Therefore, these methods are poorly adapted to industrial uses, which require a rapid and low-cost method for vegetal material screening. Near-infrared reflectance spectrometry (NIRS) is a powerful analytical tool and has been widely used for the simple and rapid analysis of various food and agricultural products. The further advantage of NIRS is the simultaneous determination of different parameters in oilseeds and cereals. In sunflower, a large number of NIRS calibrations for different matrices (i.e. intact, husked or milled seeds and oil) for

Correspondence: Anne Calmon, E.I. Purpan, Laboratoire d'Agro-Physiologie, 75 voie du TOEC, BP 57611, 31076 Toulouse, France. Phone: +33 5 61153030, Fax: +33 5 61153060, e-mail: anne.calmon@purpan.fr



several parameters such as oil, water, protein and fatty acid composition have been carried out successfully [10, 11]. Indeed, NIRS is the most common tool used in seed breeding programs. This simple analytical tool allows breeders to accelerate selection programs. However, no studies and results have been reported for the possibility to predict by NIRS the tocopherol and phytosterol contents in sunflower seeds.

Taking into account the increasing interest of breeding programs in minor components of sunflower oil as breeding characteristics, the aim of this study was to develop a NIRS calibration to discriminate tocopherol and phytosterol contents in milled sunflower seeds, in order to make a rapid selection between high or low minor component contents.

2 Material and methods

2.1 Samples

A collection of approximately 1000 sunflower seed samples recovered from several cultivars (breeding lines and hybrids) over three growing years (2003, 2004 and 2005) and from different planting locations (all over France and Chile – 50 locations) were used to establish the calibration. For each sample used in the NIRS procedure, at least two replicates of tocopherol and phytosterol determination were performed by classical methods (HPLC and GC, respectively). The mean of these two replicates was considered as reference value.

2.2 NIRS analysis

In this work, 40 g of sunflower seeds per sample were ground in a Knifetec Mill (1975; Foss Tecato, Höganäs, Sweden) three times for 10 s. No sample material adhered to the walls of the mill because it was mixed at the intervals. A FOSS NIR System 6500 (Foss Analytical, Denmark) was used to collect spectra from the milled sunflower seed samples (around 30 g) using a small round cup with a quartz window. The reflectance values as $[\log(1/R)]$ of each sample were measured from 400 to 2500 nm at 2-nm intervals. For each sample, 32 measurements were carried out and compared with the 32 measurements of a ceramic reference. For tocopherol prediction, an 860-spectra database was used for the calibration set, and for phytosterol prediction, a 660-spectra database was used. For the validation set, around 230 samples for the tocopherol analysis and around 180 samples for the phytosterol content were used.

2.3 Chemicals

For analysis, hexane, methanol, ethanol, acetone and diethyl ether were of HPLC grade from SDS (France). The trimethylsilyl (TMS) ether derivatives of all sterols were prepared using 1-methyl imidazol and *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)-heptafluorobutyramide reagent (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). All sterol standards: β -sitosterol, stigmasterol, campesterol and betulin were purchased from Sigma (Paris, France). The four α -, β -, δ - and γ -tocopherol standards (99% minimum purity) were purchased in a Chromadex kit (USA).

2.4 Solvent extraction of lipids

The analysis of the total oil content was performed by hexane (*n*-hexane; Prolabo/Subra, Toulouse, France) extraction using a Soxhlet extractor apparatus. Of sunflower seeds, 50 g was ground and introduced into cartridges (Whatman; Prolabo/Subra). The ground samples were submitted to hexane extraction for 4 h [12]. Then, the solvent was removed from the extracts under low-pressure evaporation (Rotavapor HS40 Huber, Bioblock Scientific, Heidolph, Germany). Lipid extracts were weighed and conserved at -18°C .

2.5 Tocopherol determination

The complete separation of all native tocopherols was achieved using a HPLC system (SpectraPhysics, Thermo Separation Products, USA) with a normal-phase LiChrosorb Si60 column, $250\text{ cm} \times 4\text{ mm} \times 5\text{ }\mu\text{m}$ (CIL, Cluzeau, France) [13, 14]. The mobile phase was a mixture of hexane/isopropanol (99.7 : 0.3 vol/vol) at 1 mL/min flow rate. Of oil sample, 1 g was diluted in 25 mL hexane and injected directly into the HPLC system. Detection was performed with a fluorescence detector (excitation wavelength = 298 nm and emission wavelength = 344 nm; Waters: 2475 multi λ). Tocopherols were identified by comparison of retention times with the respective standards. The total tocopherol content was calculated as the sum of α -, β -, γ - and δ -tocopherol contents.

2.6 Sterol determination

The total and individual sterol contents were analyzed by GC after saponification and preparation with TMS ether derivatives [15]. Of the TMS solutions, 1 μL was injected into a fused-silica capillary (ZB-5) column (Phenomenex, Paris, France) in a Fisons gas chromatograph (GC 8000 series MMFC 800 Multi-function controller; Fisons, Italy) fitted with a flame ionization detector. Sterols were iden-

tified using the ratio obtained between betulin (internal standard; Sigma-Aldrich, France) and sterol standards.

2.7 NIRS calibration and validation procedures

Prediction equations were calculated with a modified partial least-squares regression (MPLS) model after four outliers elimination passes (WINISI 1.02; Infrasoft International LLC). The MPLS method regresses the response values to mathematical factors. These factors are extracted in decreasing order of relevance measured by covariance with the response variable. To prevent overfitting in calibration, the number of factors is optimized by cross-validation in the calibration sample. Previous mathematical treatment was applied on each spectrum: a standard normal variate and detrend (SNV/detrend) scatter correction, a first-derivative transformation, a gap as well as a smoothing of four data points. The equation with the highest coefficient of determination (R^2) and the lowest standard error (SE) in the calibration was used to predict the tocopherol and the phytosterol values of the validation set.

The validation of this NIRS method, for the estimation of tocopherols and phytosterols, is determined by the following parameters: the standard error of calibration (SEC), the multiple coefficient of determination in calibration (RSQ), the standard error of cross-validation (SECV), the multiple coefficient of determination of cross-validation (1-VR) and the standard error of prediction (SEP).

3 Results and discussion

3.1 Determination of reference values

In this study, the oil content in the sunflower data set used ranged between 45 and 55% in dry matter. The tocopherol content determination in sunflower oil by HPLC

showed that α -tocopherol was the major tocopherol representing more than 95% of the total tocopherol content, which corresponded to the sum of the four isomers α -, β -, γ - and traces of δ -tocopherol. The total tocopherol content observed in this study ranged from 190 to 1188 mg/kg oil; this range differential is higher than the one observed in oil content. The range of the total tocopherol content obtained in this study was in agreement with data provided by others [16].

The most abundant sterol observed in all cultivars was β -sitosterol (around 60%), followed by campesterol and stigmasterol. Other phytosterols like Δ^7 -campesterol, Δ^5 -avenasterol, Δ^7 -stigmasterol and Δ^7 -avenasterol were detected at very low levels. These seven sterols represented the total phytosterol content in the tested sunflower oil. The total phytosterol content in this study ranged between 125 and 765 mg/kg oil. A similar range for the total phytosterol content was proposed by Vlahakis and Hazebroek [17].

The calibration data set presented large variations for the α - and total tocopherol content, as shown in Tab. 1, whereas these variations were less important for β -sitosterol and the total phytosterol content in the sunflower oil sample tested. Such discrepancies could be explained by at least two reasons: (i) lower genotype variability concerning phytosterols and (ii) less influence of environmental factors on phytosterol expression [13, 17]. Moreover, a normal distribution of tocopherol and phytosterol content values was observed (Fig. 1).

3.2 NIR spectra

An NIR spectrum of ground sunflower seeds is presented in Fig. 2. The absorption maximum at 1970 nm is due to water and the maxima around 1700–1800 and 2300–2400 nm are due to oil and its composition (i.e. fatty acids). The region close to 2180 nm is related to the protein content.

Tab. 1. Calibration data sets for the α -tocopherol and total tocopherol, β -sitosterol and total phytosterol content; Statistics of calibration and cross-calibration. RSQ, coefficient of linear regression; SECV, standard error of cross validation; 1-VR, coefficient of determination in cross validation (R^2); SEC, standard error of calibration.

	Calibration sets				Calibration		Cross-validation	
	NS [§]	Range	Mean	SD	SEC	RSQ	SECV	1-VR
Tocopherols								
α -T	855	153.1–957.7	488.7	136.2	70.33	0.742	82.28	0.653
Total T	860	176.9–1003.7	510.7	138.3	74.64	0.714	83.79	0.641
Phytosterols								
β -Sitosterol	681	123.1–345.48	214.8	33.3	26.42	0.375	27.66	0.313
Total P	660	179.8–471.3	320.1	48.1	39.51	0.329	41.34	0.269

[§] Number of samples.

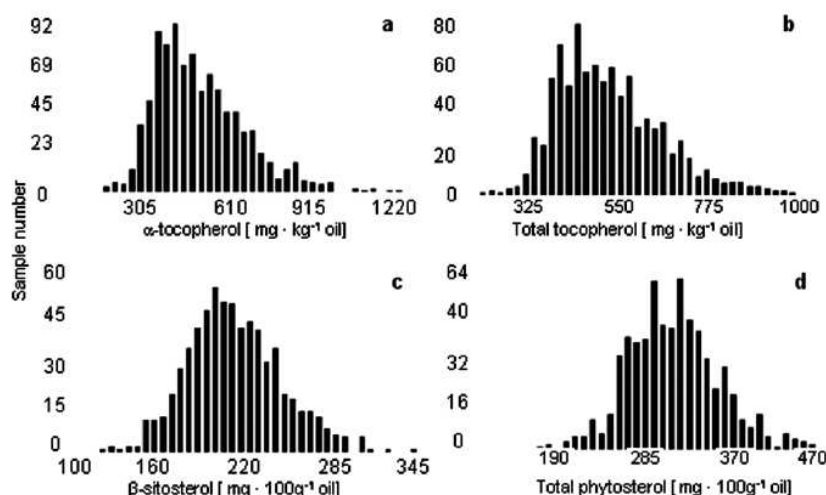


Fig. 1. Population distribution used for the calibration equations.

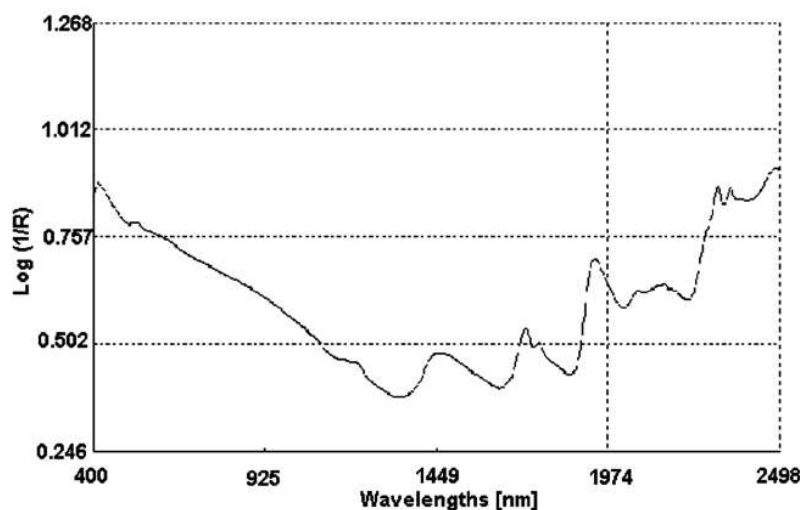


Fig. 2. Near-infrared spectrum of sunflower ground seed from 400 to 2500 nm expressed as $\log [1/\text{Reflectance}]$.

3.3 NIRS calibration

The reference values of all samples were used to make mathematical treatments in order to obtain the prediction equation with a modified PLS. The equations were used to calculate predicted values. The predictive values are given in Tab. 1 and the calibration graphics are shown in Fig. 3.

The correlations between the predicted values and the reference values show that α -tocopherol ($R^2 = 0.65$) and total tocopherols ($R^2 = 0.64$) were better correlated than β -sitosterol ($R^2 = 0.31$) or total phytosterols ($R^2 = 0.27$). For tocopherol, the repartition of samples was homogeneous and followed a normal distribution; on the contrary, for the total phytosterol content all samples were localized around the mean value.

The ratio SD/SECV for all minor components ranged from 1.2 to 1.7. However, these values are quite different from 3, considered as the minimal value for this ratio in good NIRS calibration for agricultural raw materials in the literature [11]. Nevertheless, considering that the total tocopherol content or sterol content in sunflower seeds is less than 1% of the composition, these results are promising for a possible improvement of the procedure.

The validation of the prediction equations is made with independent samples, calculating with these equations their content in tocopherols and phytosterols. The correlation between the reference values and those predicted by NIR are compared in Fig. 4. The R^2 and SEP are similar to 1-VR and SECV obtained in the cross-validation (Tab. 1).

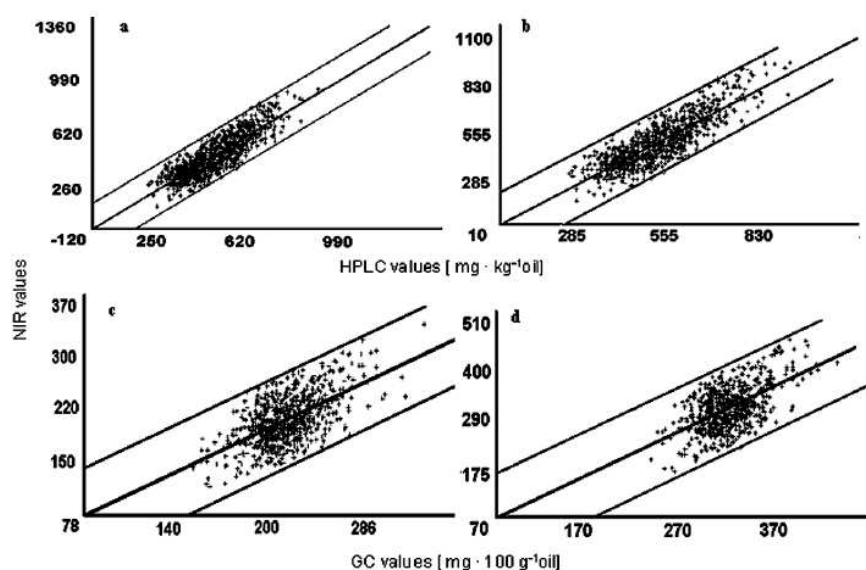


Fig. 3. Reference vs. predicted values of: (a) α -tocopherol (mg/kg oil); (b) total tocopherols (mg/kg oil) (sum of the four isomers, α , β , γ , δ); (c) β -sitosterol (mg/100 g oil); and (d) total phytosterols (mg/100 g oil) (sum of campesterol, stigmasterol, Δ^7 -campesterol, β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol, Δ^7 -stigmasterol and Δ^7 -avenasterol) for the calibration set.

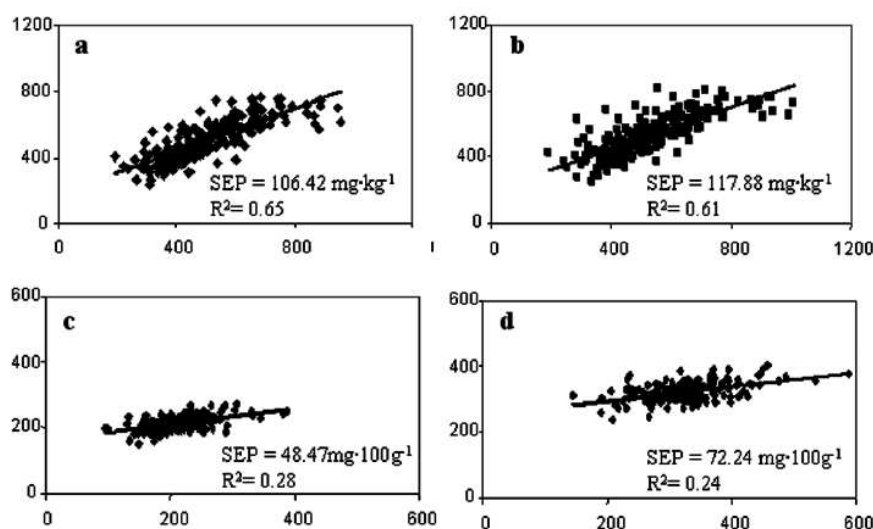


Fig. 4. Scatter plots of NIRS estimations vs. reference values of (a) α -tocopherol (mg/kg oil) in a set of 249 independent samples for validation; (b) total tocopherols (mg/kg oil) (231 validation samples); (c) β -sitosterol (mg/100 g oil) (183 validation samples); and (d) total phytosterols (mg/100 g oil) (184 validation samples).

In order to improve these results two ways could be explored: i. the introduction of selected samples to enlarge tocopherol and phytosterol content variability (to establish a larger calibration dataset), ii. the use of other

more appropriate mathematical treatments such as wavelets (signal pretreatment), random forest or support vector machine (SVM).

In conclusion, a selection for the tocopherol content based on NIRS information could be adequate for plant breeding or allotment, whereas it seems more difficult to determinate the phytosterol content by this method. Further investigations will be undertaken to improve the two prediction models, based on the above propositions.

Acknowledgments

The authors thank Caussade semences, Maïsadour semences, Monsanto Dekalb, RAGT-R2N, Soltis, and Syngenta Seeds for field experiments and for providing sunflower plant material. Financial support was provided by ASEDIS-SO, ONIDOL (French Oil seeds organization) and Midi-Pyrénées Region. We also thank Cognis-France for their technical support.

References

- [1] D. De Caro, C. Cecutti: Lubrifiants et environnement. *OCL*. 2005, **12**, 279–284.
- [2] D. Ballerini: Les biocarburants: Etat de lieux, perspectives et enjeux du développement. 1st Edn. *E. Technip*, IFP Publications, Paris (France) 2006.
- [3] D. Beardsell, J. Francis, D. Ridley, K. Robards: Health promoting constituents in plant derived edible oils. *J Food Lipids*. 2002, **9**, 1–34.
- [4] P. M. Bramley, I. Elmadafa, A. Kafatos, F. J. Kelly, Y. Manios, H. E. Roxborough, W. Schuch, P. J. A. Sheehy, K. H. Wagner: Vitamin E. *J Sci Food Agric*. 2000, **80**, 913–938.
- [5] D. Hofius, U. Sonnewald: Vitamin E biosynthesis: Biochemistry meets cell biology. *Trends Plant Sci*. 2003, **8**, 6–8.
- [6] P. Dutta, L. Normen: Capillary column gas-liquid chromatographic separation of delta 5-unsaturated and saturated phytosterol. *J Chromatogr A*. 1998, **816**, 177–184.
- [7] L. Normen, P. Dutta, A. Lia, H. Andersson: Soy sterol esters and beta-sitosterol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel. *Am J Clin Nutr*. 2000, **71**, 908–913.
- [8] E. A. Trautwein, G. Duchateau, Y. G. Lin, S. M. Mel'nikov, H. O. F. Molhuizen, F. Y. Ntanos: Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2003, **105**, 171–185.
- [9] H. Tapiero, D. M. Townsend, K. D. Tew: Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacol*. 2003, **57**, 321–325.
- [10] B. Pérez-Vich, L. Velasco, J. Fernández-Martínez: Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by near-infrared reflectance spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc*. 1998, **75**, 547–555.
- [11] C. Moschner, B. Biskupek-Korell: Estimating the content of free fatty acids in high-oleic sunflower by near-infrared spectroscopy. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2006, **108**, 606–613.
- [12] Association Française de Normalisation: European Norm, NF EN ISO 659 October 1998; French norm V 03-905: *Oil-seeds - Determination of Oil Content (Reference Method)*. AFNOR, Paris (France) 1998.
- [13] A. Ayerdi Gotor, M. Berger, F. Labalette, S. Centis, J. Daydé, A. Calmon: Etude de la variation des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule: Partie I – Tocophérols. *OCL*. 2006, **13**, 206–212.
- [14] International Standard Organization: ISO 9936: *Animal and Vegetable Fats and Oils - Determination of Tocopherols and Tocotrienols Contents - Method Using High-performance Liquid Chromatography*. ISO, Genève (Switzerland) 1997.
- [15] Association Française de Normalisation: European norm, NF EN ISO 12228 May 1999; French norm T 60-258: *Animal and Vegetable Fats and Oils - Determination of Individual and Total Sterols Contents - Gas Chromatographic Method*. AFNOR, Paris (France) 1999.
- [16] S. M. Nolasco, L. A. N. Aguirrezábal, G. H. Crapiste: Tocopherol oil concentration in field-grown sunflower is accounted for by oil weight per seed. *J Am Oil Chem Soc*. 2004, **81**, 1045–1051.
- [17] C. Vlahakis, J. Hazebroek: Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting location, and temperature. *J Am Oil Chem Soc*. 2000, **77**, 49–53.

[Received: October 26, 2006; accepted: February 21, 2007]

Near infrared spectrometry (NIRS) prediction of minor components in sunflower seeds

Alicia Ayerdi Gotor¹, Monique Berger¹, Françoise Labalette², Sylvie Centis³, Jean Daydé¹, Anne Calmon¹

¹E.I. Purpan, Laboratoire d'Agro-Physiologie, 75 voie du TOEC, BP 57611, 31076 Toulouse, France, E-mail: alaygo@hotmail.com; monique.berger@purpan.fr jean.dayde@purpan.fr anne.calmon@purpan.fr

²ONIDOL, 12 Av. Georges V Paris 75008, France, E-mail: f.labalette@prolea.com

³ASEDIS-SO, 39 chemin Virebent, Toulouse 31200, France, E-mail: sylvie.centis.aubay@gmis.fr

ABSTRACT

Minor components such as tocopherol and phytosterol present in sunflower seed are becoming interesting to consumers for their health properties, and to the food industry and sunflower breeders to obtain an added value to their products. The near infrared spectrometry (NIRS) technique could be a rapid and accurate method to determine the content of these useful molecules. The total tocopherol content reference values used to make calibration by NIRS varied from 62.8 to 451.9 mg/kg of dry matter (DM) and total phytosterol content values ranged from 53.9 to 189.0 mg/100g DM. The calibration equations obtained by NIRS showed a relatively good correlation coefficient between reference values and predicted values $R^2 = 0.58$ for the tocopherol content and of 0.61 for the phytosterol content. These encouraging results showed that NIRS could be employed to estimate minor components such as tocopherols and phytosterol rapidly in sunflower seeds. Nevertheless, further investigations are required to improve calibration equations to permit an accurate selection with this method.

Key words: minor components – near-infrared spectrometry – oil – phytosterols – tocopherols – sunflower seeds

INTRODUCTION

Sunflower contains minor components with interesting properties for human health. Tocopherols and specially α -tocopherol (the main homologue present in sunflower oil) are good antioxidants, and they protect against some cancers and reduce cardiovascular disease problems (Bramley et al., 2000; Niki, 2004). Furthermore, sunflower contains phytosterols which reduce cholesterol levels in blood (Patel and Thompson, 2006). The concept of “food-medicine” or healthy foods is starting to be introduced to consumer philosophy. The food industry is looking for these compounds in current food products and seed producers are becoming interested in this added value for their seeds. Unfortunately, the available methods of analysis of these compounds takes a long time and are expensive, requiring a specialised person to perform it. Therefore, it has become necessary to develop new techniques for the analyses. Near infrared spectrometry (NIRS) is nowadays used by food industry and breeders to determine multiple parameters such as moisture, proteins and oil content or fatty acid composition in a large variety of matrices (Pérez-Vich et al. 1998; Velasco and Becker, 1998; Biskupek-Korel and Moschner, 2007). Few studies have focused their interest on the analysis of minor component by NIRS (González-Martín et al., 2006; Ayerdi Gotor et al., 2007). The objective of this work was to improve the values in our previous work (Ayerdi Gotor et al., 2007) especially in the prediction of total phytosterol content in sunflower seeds.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

From a collection of nearly 2000 sunflower mature seeds from 4 growing seasons between 2003 and 2006 in different places all over France and Chile, 600 samples were selected as having the greatest variability for the parameters investigated, and the highest analytical accuracy and repeatability. These samples were used to elaborate the NIRS calibration. Each sample used for NIR spectrometry analysis had at least two replicates of tocopherols and phytosterols determined by classical methods (HPLC and GC respectively). The mean of these two replicates was considered as being the reference value.

NIRS analysis

In this work, 40 g of sunflower seeds per sample were ground in a Knifetec Mill (1975, Foss Tecator, Höganäs, Sweden) three times for 10 s. No sample material adhered to the walls of the mill because it was mixed at certain intervals. A FOSS NIR System 6500 (Foss Analytical, Denmark) was used to collect spectra from the milled sunflower seed samples (around 30 g) using a small round cup with a quartz window. The reflectance values as $[\log (1/R)]$ of each sample were measured from 400 to 2500 nm at 2 nm intervals. For each sample, a screening of 32 measures was carried out and compared with the 32 measures of a ceramic reference. For tocopherol prediction, an 860 spectra database was used for the calibration set, and for the phytosterol prediction, a 660 spectra database was used. For the validation set, around 200 samples for the tocopherols analysis and about 260 for the phytosterol content were used

Chemicals

For analysis, hexane, methanol, ethanol, acetone and diethyl ether had an HPLC grade from SDS (France). The trimethyl silyl ether (TMS) derivatives of all sterols were prepared using 1-methyl imidazol and N-methyl-N(trimethylsilyl)-heptafluorobutyramide reagent (Sigma, France). All sterol standards: β -sitosterol, stigmasterol and campesterol and betulin were purchased from Sigma (Paris, France). The four α -, β -, δ - and γ -tocopherol standards (99% minimum purity) were purchased in a Chromadex kit (USA).

Solvent extraction of lipids

The analysis of the total oil content was performed by hexane (n-hexane, Prolabo/Subra, Toulouse, France) extraction using a soxhlet extractor apparatus for a 4 extraction of 15g of the ground seeds (NF EN ISO 659, 1998) or with an accelerated solvent extractor apparatus (ASE 200, Dionex, France) with an isopropanol/hexane mixture (5:95 v/v) during 20min. Then, the solvent was removed from the extracts under low pressure evaporation (Rotavapor, Bioblock Scientific HS 40 HUBER, Heildorff, Germany). Lipid extracts were weighed and conserved at -18°C .

Tocopherol determination

The complete separation of all native tocopherols was achieved using a high-performance liquid chromatography (HPLC) (SpectraPhysics, Thermo Separation Products, USA) with a normal phase LiChrosorb Si60 column - 250cm, 4mm, 5 μm (CIL Cluzeau, France) (ISO 9936, 1997, Ayerdi Gotor *et al.*, 2006). The mobile phase was a mixture of hexane/isopropanol (99.7:0.3 v/v) at 1mL/min flow rate. One gram of oil sample was diluted in 25 mL of hexane and injected directly into the HPLC. Detection was performed with a fluorescence detector (excitation wavelength = 298 nm and emission wavelength = 344 nm; Waters 2475 multi λ). Tocopherols were identified by comparison of retention times with respective standards. Total tocopherol content was calculated as the sum of α -, β -, γ - and δ -tocopherol contents.

Sterol determination

The total and individual sterol content was analyzed by gas chromatography (GC) after saponification and a preparation with trimethylsilyl (TMS) ether derivatives (NF EN ISO 12228, 1999). 1 μL of the TMS solutions were injected into a fused silica capillary (ZB-5) column (Phenomenex, Paris, France) in a Fisons gas chromatograph (GC 8000 series MMFC 800 Multi-function controller, Italy) fitted with a flame ionization detector. Sterols were identified using the ratio obtained between betulin (Internal standard, Sigma-Aldrich, France) and sterol standards.

NIRS calibration and validation procedures

Prediction equations were calculated with a modified partial least-squares regression (MPLS) model after 4 outlier elimination passes (WINISI 1.02 - Infrasoft International LLC). With the MPLS regression method, factors are extracted in decreasing order of reliance measured by covariance with the response variable. To prevent overfitting in calibration, the number of factors is optimized by cross-validation in calibration sample. Previous mathematical treatment was applied on each spectrum as described in Ayerdi Gotor, *et al.* (2007). The equation with the highest coefficient of determination (R^2) and the lowest standard error (SE) in the calibration was used to predict the tocopherol and the phytosterol values of the validation set.

The validation of this NIRS method, for the estimation of tocopherols and phytosterols, was determined by the following parameters: the standard error of calibration (SEC), the multiple coefficient of determination in calibration (RSQ), the standard error of cross-validation (SECV), the multiple coefficient of determination of cross-validation (1-VR) and the standard error of prediction (SEP).

RESULTS

Reference values were calculated for tocopherol and phytosterol content expressed as a function of oil weight but in order to improve NIRS's calibration, data were converted with the oil yield (g/g of dry matter) into other units referring to dry matter (seeds at maturity stage). Data set used for the calibrations and the statistical parameters employed to make calibrations and cross-calibration are shown in Table 1.

Total tocopherol content represented the sum of the four homologues α , β , γ and δ -tocopherol present in the sunflower oil. Total phytosterol content represented the sum of seven sterols: Campesterol, Stigmasterol, $\Delta 7$ - campesterol, β -sitosterol, $\Delta 5$ -avenasterol, $\Delta 7$ -stigmasterol and $\Delta 7$ -avenasterol.

Table 1. Data set samples used to make calibration equations and statistical results. The standard error of calibration (SEC), the multiple coefficient of determination in calibration (RSQ), the standard error of cross-validation (SECV), the multiple coefficient of determination of cross-validation (1-VR) and the standard error of prediction (SEP).

	Calibration sets				Calibration		Cross-validation	
	SN ¹	Range	Mean	SD ¹	SEC	RSQ	SECV	1- VR
Oil (g/gDM ¹)	513	16.4 – 54.4	36.38	8.57	2.41	0.92	2.57	0.91
Total tocopherol (mg/Kg DM)	511	62.8 – 451.9	191.90	70.14	41.93	0.64	45.73	0.58
Total phytosterol (mg/100gDM)	489	53.9 – 189.0	117.81	26.89	15.72	0.66	17.19	0.61

¹DM: Dry matter ; SN: Sample number ; SD: Standard deviation.

The high correlation level of oil content (g/g DM) between the reference and predicted values confirmed that the change in units would not affect the estimation of minor components by NIRS, because it was higher than 0.9 (Fig. 1 A). The calibration for the total phytosterol content (mg/100g DM) (Fig. 1 B) showed that samples were uniformly distributed. The correlation between reference and predicted values for the calibration set of phytosterol was 1-VR = 0.61, better results than those obtained in the previous work (1-VR = 0.27) (Ayerdi Gotor et al., 2007). For the total tocopherol content (mg/kg DM) the results found were not better than those in the previous work.

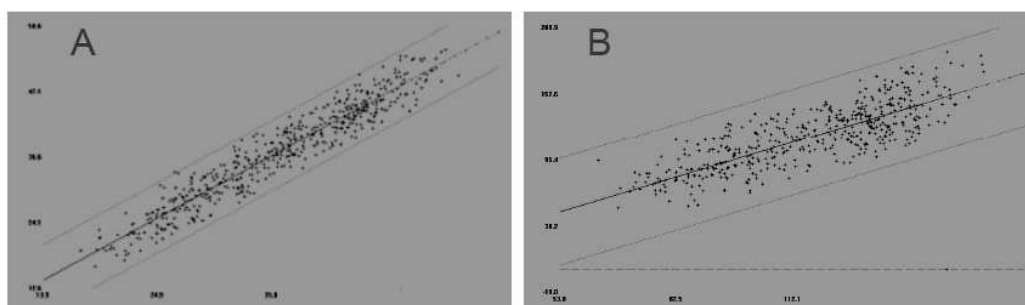


Fig. 1. Reference values vs. predicted values of: A- Oil (g/gDM); B- Total phytosterol content (mg/100 g DM) for the calibration group of samples.

The comparison of the two total phytosterol populations of reference values and predicted values, Figure 2, showed that the reference values were a normal population, contrary to the predicted values that showed clearly two different populations, a fact that could explain the problems experienced for obtaining an accurate equation for this parameter with the modified partial least-square mathematical treatment.

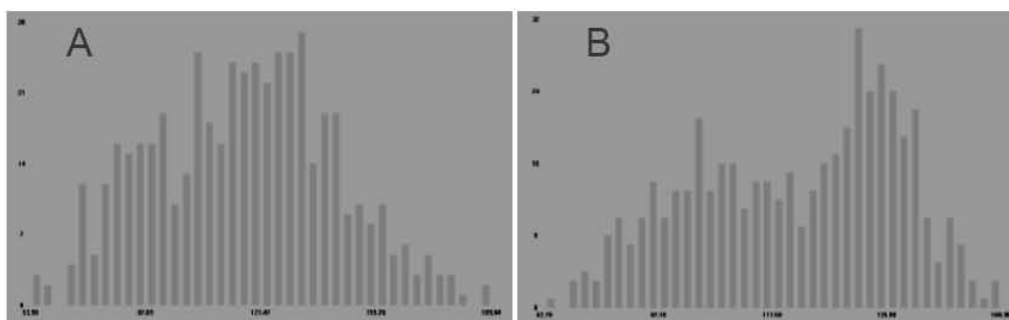


Fig. 2. Distribution of Total phytosterol population (mg/100g DM) and the sample number from each group of: A– Reference values used as calibration set; B– Predicted values for the calibration set.

The ratio SD/SECV for oil content was 3:3, for the total tocopherol content 4:1 and for the total phytosterol content 1:6. Values over 3 are considered as being good for a NIRS calibration for agricultural raw materials in the literature (Moschner and Biskupek-Korell, 2006). But, taking into account that tocopherols and sterols in sunflower represented less than 1% of the total dry matter, these values are promising.

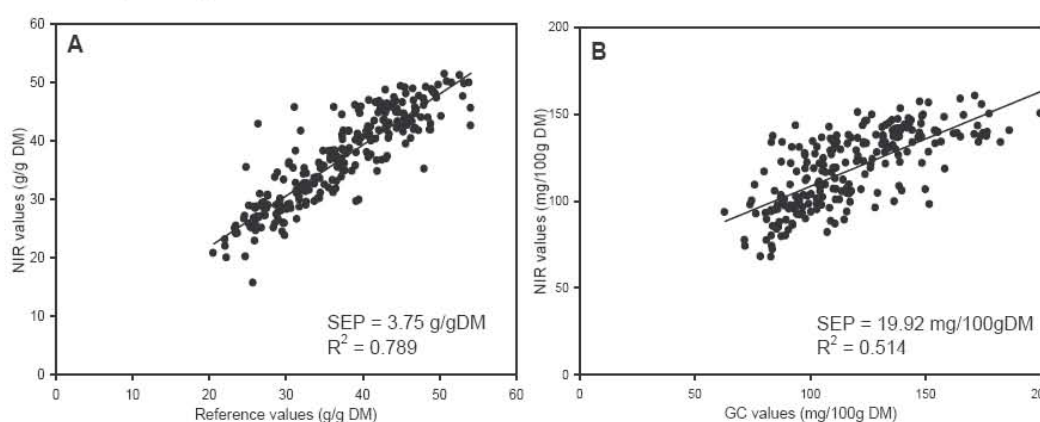


Fig. 3. Scatter plots of reference values vs NIR predicted values for: A– Oil (g/g DM); B– Total phytosterol content (mg/100g DM).

The validation of the prediction equations was made with 260 independent samples. The comparison of the reference values with the predicted values was performed with these equations (Figure 3). The SEP values are similar to the SECV values obtained in the cross-validation (Table 1), R^2 values were lower than the 1-VR values of cross-validation. The lower R^2 values for the oil content could be explained by the fact that inside the selected samples there were some parental lines with poor oil extraction results that could affect the validation, but that they were necessary to the calibration of tocopherols and phytosterol.

DISCUSSION

The analysis of minor components by near infrared spectrometry is starting to be used because of its potential: multi-parameter analysis, rapidity and low cost. But the establishment of this methodology requires accurate measurements to obtain reference values and powerful mathematical treatments to calculate prediction equations.

The selection of total tocopherol and phytosterol content based on NIR spectra for plant breeding or food industry allotment could be possible by this method. But better results could be obtained with a selection of a better mathematical treatment to generate equations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Caussade Semences, Maïsadour Semences, Monsanto Dekalb SAS, RAGT-R2n, Soltis, Syngenta Seeds for field experiments and for providing sunflower plant material. Financial support was provided by ASEDIS-SO, ONIDOL (French oilseeds organization) and Midi-Pyrenees Region. We also thank Cognis-France for their technical support.

REFERENCES

- Association Française de Normalisation. 1998. European Norm, NF EN ISO 659 October 1998; French norm V 03-905: Oilseeds - Determination of oil content (Reference method). AFNOR. Paris. 14 + 3 pp.
- Association Française de Normalisation. 1999. European norm, NF EN ISO 12228 May 1999; French norm T 60-258: Animal and vegetable fats and oils - Determination of individual and total sterols contents - Gas chromatographic method. AFNOR. Paris. 18 pp.
- Ayerdi Gotor, A., M. Berger, F. Labalette, S. Centis, J. Daydé, and A. Calmon. 2006. Etude de la variation des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule : Partie I - Tocophérols. OCL 13:206-212.
- Ayerdi Gotor, A., E. Farkas, M. Berger, F. Labalette, S. Centis, J., Daydé, and A. Calmon. 2007. Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 109:525-530.
- Biskupek-Korel, B., and C.R. Moschner. 2007. Near-infrared spectroscopy (NIRS) for quality assurance in breeding, cultivation and marketing of high-oleic sunflower. Helia 29:63-72.
- Bramley, P.M., I. Elmafa, A. Kafatos, F.J. Kelly, Y. Manios, H.E. Roxborough, W. Schuch, P.J.A. Sheehy, and K.H. Wagner. 2000. Vitamin E. J. Sci. Food Agr. 80:913-938.
- González-Martín, I., J. Hernández-Hierro, M. Bustamante-Rangel, and N. Barros-Ferreiro. 2006. Near-infrared spectroscopy (NIRS) reflectance technology for the determination of tocopherols in alfalfa. Anal. Bioanal. Chem. 386:1553-1558.
- International Standard Organization. 1997. ISO 9936: Animal and vegetable fats and oils - Determination of tocopherols and tocotrienols contents - Method using high-performance liquid chromatography. ISO. Genève. 11 pp.
- Moschner, C., and B. Biskupek-Korell. 2006. Estimating the content of free fatty acids in high-oleic sunflower by near-infrared spectroscopy. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 108:606-613.
- Niki, E. 2004. Antioxidants and atherosclerosis. Biochem. Soc. Trans. 32:156-159.
- Patel, M.D., and P.D. Thompson. 2006. Phytosterols and vascular disease. Atherosclerosis 186:12-19.
- Pérez-Vich, B., L. Velasco, and J. Fernández-Martínez. 1998. Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by near-infrared reflectance spectroscopy. J. Am. Oil Chem. Soc. 75: 547-555.
- Velasco, L., and H.C. Becker. 1998. Estimating the fatty acid composition of the oil in intact-seed rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared reflectance spectroscopy. Euphytica 101:221-230.

1.2. Synthèse et conclusion

Les résultats de cette étude ont montré qu'il était important d'avoir une bonne dispersion de la variabilité des échantillons de référence. Une répartition normale a été observée lors de l'étude des populations d'échantillons utilisées dans ces travaux tant pour les tocophérols que pour les phytostérols. En ramenant les gammes de variabilité des teneurs des échantillons à la même unité pour les deux composés mineurs ; les teneurs en tocophérols sont comprises entre 176,9 et 1003,7 mg.kg⁻¹ d'huile tandis que les teneurs en phytostérols totaux sont entre 1798 et 4713 mg.kg⁻¹ d'huile et pour le β -sitostérol entre 1231 et 3455 mg.kg⁻¹ d'huile.

Les corrélations entre les valeurs prédites et les valeurs de référence ont montré que l' α -tocophérol ($R^2 = 0,65$) et les tocophérols totaux ($R^2 = 0,64$) étaient mieux corrélés que le β -sitostérol ($R^2 = 0,31$) ou les phytostérols totaux ($R^2 = 0,27$) lorsque ces teneurs étaient exprimées par rapport à l'huile (mg tocophérols.kg⁻¹ d'huile ou mg phytostérols.100g⁻¹ d'huile). Cependant, les corrélations ont été améliorées pour les phytostérols totaux ($R^2 = 0,61$) en exprimant les valeurs de référence par rapport à la matière sèche ; tandis qu'un coefficient de détermination similaire est observé pour les tocophérols totaux ($R^2 = 0,58$).

D'après la littérature, le ratio SD/SECV qui représente l'écart type de prédiction doit être supérieur à 3 pour permettre une validation des équations de prédiction pour des composants présents dans des produits alimentaires frais (Baeten, *et al.*, 2001; Szlyk, *et al.*, 2005). Les ratios déterminés pour prédire les teneurs en tocophérols totaux sont de 3,3 par rapport à l'huile et 4,1 par rapport à la matière sèche. Pour les phytostérols, ces ratios, respectivement 1,2 et 1,6 sont plus faibles. Ces résultats démontrent l'efficacité d'estimer par spectrométrie proche infrarouge les teneurs en tocophérols totaux. Cependant, la prédiction des phytostérols doit être encore améliorée. Soulignons que la teneur en ces composés mineurs est faible dans la matrice (moins de 1%). Malgré cette faible teneur les résultats obtenus laissent envisager la possibilité d'améliorer les équations de calibrations pour ces composés mineurs.

Cette étude montre que la détermination des tocophérols et des phytostérols dans une variété de tournesol peut être discriminée rapidement par l'outil proche infrarouge. Cependant, cette prédiction peut être améliorée et les pistes suivantes peuvent être proposées.

- Tout d'abord, le développement des calibrations a été réalisé avec le logiciel WinISI II (Infrasoft International LLC). L'utilisation de traitements mathématiques plus sophistiqués comme les ondelettes (prétraitement du signal) (Besse et Farkas, 2003), les forêts aléatoires ou les machines de support de vecteurs (SVM) (Breiman, 2001; Besse, *et al.*, 2005) permettraient d'améliorer ces résultats.

- Ensuite, la gamme des longueurs d'onde du système 6500 NIRS n'a pas été limitée. Des travaux ont montré qu'en limitant la gamme de longueur d'onde à 1100-2500 nm cela permettait d'obtenir de meilleures calibrations pour l'estimation des acides gras (Sato, *et al.*, 1995; Pérez-Vich, *et al.*, 1998; Moschner et Biskupek-Korell, 2006). Par ailleurs, Fassio et Cozzolino (2004) pour l'estimation des teneurs en huile, en humidité et en protéines sur des akènes de tournesol ont montré que la limitation des longueurs d'onde n'induisait pas de meilleurs résultats. Un travail sur l'approfondissement du traitement des données permettrait d'affiner les équations de prédiction.

- Enfin, ces travaux montrent également qu'il est important d'inclure de nouveaux échantillons dans le jeu de calibration. Afin de finaliser ces calibrations, l'extension du jeu de données avec l'enrichissement en échantillons plus diversifiés tels que différentes variétés avec des modifications de profil de compositions et différentes origines (environnement) contribuerait à augmenter l'efficacité et la robustesse d'évaluer les composés mineurs par spectrométrie proche infrarouge.

2. Prédiction de la teneur en tocophérols sur un akène décortiqué de tournesol.

D'après la littérature et les résultats précédents, la spectrométrie proche infrarouge permet de déterminer simultanément et rapidement différents paramètres dans différentes matrices. Cependant, la détermination sur une matrice d'akènes broyés ne répond pas complètement aux besoins des programmes de sélection du tournesol ; un akène broyé ne peut plus être utilisé dans un programme de rétrocroisement. Mais, la présence de la coque noire de l'akène limite la transmission du rayonnement infrarouge et engendre une réponse spectrale atténuée (Sato et al., 1995 ; Peres-Vich et al., 1998).

Une étude, réalisée au Laboratoire d'Agrophysiologie, a permis de développer une calibration des acides gras sur un akène entier décortiqué de tournesol (Ayerdi Gotor, *et al.*, 2008). Les corrélations des validations croisées ont montré que l'acide linoléique ($R^2 = 0,970$) et l'acide oléique ($R^2 = 0,969$) étaient mieux corrélés que l'acide palmitique ($R^2 = 0,782$) et l'acide stéarique ($R^2 = 0,329$). Au vu de ces résultats encourageants, une détermination de la teneur en tocophérols par spectrométrie proche infrarouge sur akène entier décortiqué a été envisagée.

Les valeurs de référence sont issues de 520 akènes analysés pour leur teneur en tocophérols. Les teneurs en tocophérols ont été réalisées sur un akène décortiqué de tournesol (extraction de l'huile puis analyse par chromatographie liquide haute performance) ; les teneurs varient entre 101 mg.kg^{-1} et 1772 mg.kg^{-1} . La comparaison du spectre obtenu sur un akène entier décortiqué de tournesol (Figure 1) par rapport à celui obtenu sur un lot d'akènes broyés (Ayerdi *et al.*, 2007) a mis clairement en évidence une forte atténuation du signal.

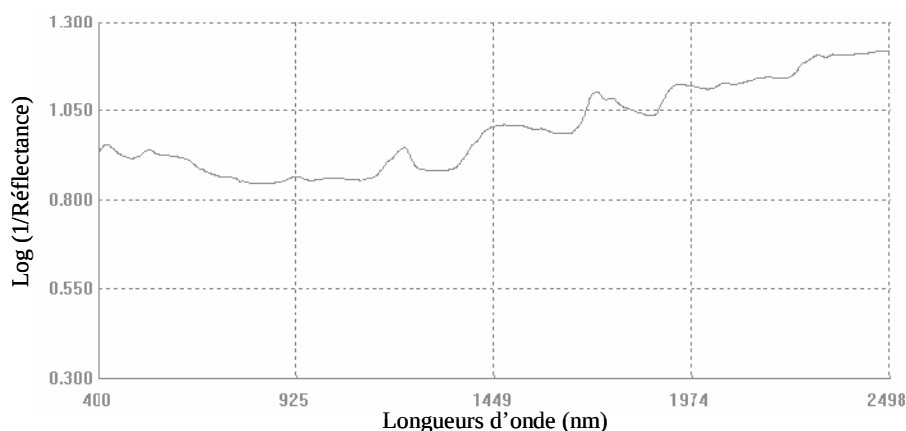


Figure 1 Spectre infrarouge entre 400 et 2500 nm d'un akène entier décortiqué de tournesol exprimé en $\text{Log}(1/\text{Réflexance})$.

Alors que les valeurs de référence des teneurs en tocophérols sont comprises entre 101 et 1772 mg.kg⁻¹ d'huile, le logiciel de calibration WinISII (Infrasoft International LLC) élimine les valeurs extrêmes et ne conserve que pour réaliser la calibration des teneurs comprises entre 380 et 480 mg.kg⁻¹. En conséquence, le développement d'une équation de calibration avec le logiciel WinISII n'a pas permis d'établir de corrélation entre les valeurs de référence et les valeurs prédites ($R^2 = 0,011$) sur un akène entier décortiqué de tournesol (Figure 2).

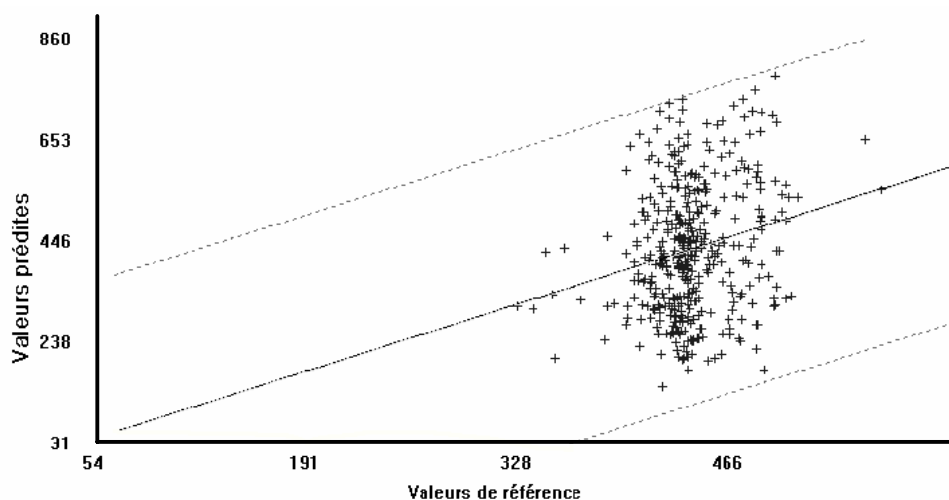


Figure 2 Corrélation pour les tocophérols entre les valeurs de référence et les valeurs prédites (mg.kg⁻¹ d'huile) pour la calibration d'un akène entier décortiqué de tournesol.

La principale difficulté pour le développement de cette calibration réside dans le dosage des tocophérols. Compte tenu que l'extraction a été réalisée sur un akène entier décortiqué de tournesol, la quantité d'huile extraite est par conséquent très faible (environ 10 mg). La principale source d'erreur sur la mesure de la teneur en tocophérols est liée à l'étape d'évaporation complète du solvant. En effet, si cette évaporation est incomplète, la teneur en tocophérols sera sous estimée.

De plus, dans cette étude, la mesure est effectuée uniquement sur l'amande. L'estimation de la quantité de tocophérols dans la coque pourrait être prise en compte. Ainsi, d'après Roche (2005), il n'est pas impossible que la coque contienne une quantité non négligeable de phytostérols et plus particulièrement de diméthylstérols. Un travail complémentaire sur la précision de l'analyse de référence de la teneur en tocophérols totaux dans un akène entier décortiqué de tournesol doit être mené.

3. Bilan de l'étude sur la faisabilité d'une mesure des composés mineurs par spectrométrie proche infrarouge.

Les résultats de ces travaux montrent qu'une prédiction des teneurs en tocophérols totaux et des phytostérols totaux est possible sans pour autant pouvoir se substituer à la méthode chimique de référence. A l'heure actuelle, il est nécessaire de compléter le jeu de données et d'affiner par des traitements mathématiques complémentaires les équations de prédiction des composés mineurs dans la graine de tournesol.

La précision des équations de calibration dépend de la matrice de l'échantillon et des méthodes de référence. Les travaux de Pérez-Vich et al. (1998), sur l'évaluation du profil d'acides gras, ont montré une diminution des

valeurs de prédiction en fonction de la matrice utilisée : huile, graines entières ou broyées de tournesol ; la meilleure prédiction étant celle réalisée sur graines broyées. Dans cette étude, l'analyse d'un lot d'akènes broyés et un monoakène de tournesol confirme l'importance de la nature de la matrice.

Cependant, cette étude est aussi très probablement à la limite actuelle de la capacité de la spectroscopie proche infrarouge pour doser des constituants présents en faibles quantités. Les composés mineurs du tournesol tels que les tocophérols et les phytostérols font partis de ces constituants dont la teneur est inférieure à 3% de la matière sèche et il est difficile qu'ils soient prédits en toute sécurité. Malgré tout, la spectroscopie proche infrarouge donne la possibilité d'obtenir un classement par groupe des teneurs en tocophérols et en phytostérols utilisable en sélection si l'héritabilité du caractère est bonne, ce qui est le cas pour la teneur en tocophérols.

En conclusion, si la mesure est relativement aisée et rapide, cette méthode a l'avantage de pouvoir travailler directement sur une matrice solide sans passer par des extractions chimiques préalables. Mais, il n'en reste pas moins nécessaire de mettre en œuvre des outils mathématiques plus puissants, tout en augmentant le nombre d'échantillons dans la banque de données avec une plus grande variabilité pour fiabiliser les modèles de prédiction et ainsi pouvoir les utiliser en routine. Bien que l'analyse par spectrométrie proche infrarouge ne puisse jamais égaler en précision la méthode chimique de référence, cette méthode n'en est encore qu'à ses débuts. Elle pourra être plus répétable dans le temps : répétabilité de l'opérateur, maîtrise des conditions environnantes (température et humidité) et base de calibration représentative de la variabilité des échantillons. Les progrès dans la maîtrise et le développement de nouvelles méthodes chimiométriques permettront d'améliorer les équations de calibration.

CONCLUSION

CONCLUSION

Auparavant, les productions agricoles étaient destinées à nourrir le monde entier en produisant les plus grandes quantités possibles. Actuellement, on assiste à une nouvelle agriculture qui doit être en adéquation avec les directives environnementales mais également tournée vers les exigences nutritionnelles des consommateurs.

Dans ce contexte, le tournesol présente de nombreux atouts agronomiques (économe en eau et en intrants) et par la qualité de composition de son huile peut répondre aux différentes demandes des secteurs alimentaire (huiles, margarines) et non alimentaire (biocarburants, lubrifiants, solvants...). L'huile de tournesol présente une grande diversité de composition en acides gras et en composés mineurs. Cependant, sa composition est liée à sa fabrication. En effet, pour transformer des graines de tournesol en huile, une succession d'étapes de trituration des graines et de raffinage de l'huile brute doit être mise en place. Le raffinage agit sur la quantité des acides gras, sur la teneur en vitamines (tocophérols) et en minéraux ainsi que sur la couleur et la saveur. Pour protéger l'huile de l'oxydation, après le raffinage, des antioxydants (en général de synthèse : vitamine E ou additif) sont ajoutés si la teneur en vitamine E est insuffisante. Contrairement aux huiles raffinées, les huiles pressées à froid, plus foncées et de saveur plus prononcée, contiennent plusieurs substances telles que des acides gras libres, des tocophérols, des phytostérols qui limiteront naturellement l'oxydation.

Ainsi, le secteur de l'alimentaire constitue la principale voie de valorisation de la culture du tournesol ; cependant, la demande sociétale a évolué. Depuis quelques années, de nombreuses études montrent qu'il est nécessaire de réduire la consommation des graisses saturées d'origine animale par des huiles d'origine végétale. La filière « huile » a développé de nouvelles formulations (mélange d'huiles, prise en compte des composés mineurs : tocophérols, phytostérols,...) permettant d'améliorer les propriétés nutritionnelles des huiles végétales.

D'autre part, la mise en place de directives environnementales a conduit au développement et à la concentration de sites industriels de trituration, de raffinage et de transformation d'huile, avec des capacités de traitement très élevées, supérieures pour la plupart à 400.000 tonnes de graines par an. Ces unités produisent de l'huile (alimentaire ou base biocarburant), des tourteaux en grandes quantités et des effluents à valoriser. Parmi ces déchets, le distillat de désodorisation est valorisable : les phytostérols sont extraits et purifiés pour être ensuite réincorporés dans des formulations non alimentaires. A l'heure actuelle, ce sont pourtant des stérols de pin qui sont ajoutés dans des margarines et autres compléments alimentaires. Cependant, l'envolée des prix des matières premières

induit une augmentation des prix des co-produits tels que les tocophérols issus de voie chimique mais également la demande et la production croissante d'huiles végétales impliquent la valorisation avec une valeur ajoutée des co-produits.

Ainsi, l'intérêt pour les tocophérols et les phytostérols s'est considérablement développé ces dernières années car ils peuvent apporter une valeur ajoutée à l'huile de tournesol. Un atout de l'huile de tournesol est la présence majoritaire d' α -tocophérol à plus de 95% de la teneur totale contrairement aux autres graines de grandes cultures oléagineuses. L' α -tocophérol est l'isomère avec le plus fort pouvoir vitaminique parmi tous les isomères (Azzi, 2007). Le tournesol n'a donc pas besoin d'une amélioration génétique comme pour les autres espèces tel que le soja, le colza ou le maïs qui ont du δ ou du γ -tocophérol comme isomère majoritaire (Chen, *et al.*, 2006; Hunter et Cahoon, 2007).

L'objectif de ce travail est d'apporter des éléments de compréhension sur la variabilité des teneurs et compositions en tocophérols et en phytostérols dans l'huile de tournesol afin d'estimer si une sélection pour ces critères pouvait être intégrée dans des programmes de sélection afin d'améliorer la qualité finale notamment en augmentant la teneur finale en α -tocophérol et en phytostérols de l'huile, et par conséquence, la valeur ajoutée de l'huile.

Facteurs de variation génotypiques et environnementaux des tocophérols et des phytostérols dans le tournesol

Dans cette partie, la variabilité des teneurs et compositions a été approchée sous plusieurs angles : dans un premier temps, il s'agissait de caractériser les phases d'accumulation de ces composés afin de mieux cerner d'éventuelles phases critiques au cours de la maturation ; l'aspect génétique étant abordé à travers la comparaison variétale. Dès cette étape, le cas particulier des conversions oléiques a été pris en compte, certains auteurs ayant signalé un effet significatif mais contradictoire chez d'autres espèces. Ces changements pourraient être liés à l'adaptation des ressources antioxydantes de la plante afin de mieux se protéger face à la nouvelle composition de son huile.

L'étude du remplissage en tocophérols et phytostérols des graines de tournesol a mis en évidence la coïncidence de la phase d'accumulation active des tocophérols avec celle des acides gras qui finirait vers 25 jours après l'anthèse et celle de la matière sèche avec celle des phytostérols, qui sont stockées dans les membranes cellulaires qui finirait quelques jours en avance vers 20 JAF.

Cependant la température, apparaît comme un des facteurs environnementaux le plus déterminant sur les teneurs finales en tocophérols et en phytostérols dans l'huile. En effet, de fortes températures durant le remplissage de l'akène limiteraient l'accumulation des tocophérols en induisant leur consommation précoce afin de préserver la semence du stress oxydatif. Au contraire, la teneur en

phytostérols de la graine de tournesol augmenterait sous des températures élevées ; ce phénomène a déjà été observé sur soja en conditions contrôlées (Vlahakis et Hazebroek, 2000), mais aussi chez le tournesol, en effet les fortes températures accompagnées d'un déficit en eau augmenterait de façon significative la teneur totale en phytostérols (Roche, *et al.*, 2006). Les résultats de cette étude montrent que la conversion oléique a semblé induire une diminution sensible de la teneur en tocophérols totaux sans toutefois avoir d'influence sur la teneur en phytostérols. L'étude de cet ensemble de couples a aussi montré sous les conditions climatiques exceptionnelles de l'été 2003, un comportement vis-à-vis des températures tout à fait cohérent avec les observations précédentes sur les cinétiques de remplissage de la graine.

Une seconde phase de cette étude a été consacrée à la relation entre les composés mineurs et la faculté et vigueur germinative des semences. En effet, un des problèmes majeur des semenciers est de maintenir la faculté germinative minimale des semences commercialisables avec un taux supérieur à 85%, taux requis par la directive de l'UE (Commission Européenne, 2002). De par leur fort pouvoir antioxydant, le rôle des tocophérols dans la graine pourrait être sa protection lors de sa conservation ou face au stress oxydatif de la future germination. L'hypothèse établie au départ était que plus une graine posséderait de tocophérols mieux elle serait protégée et par conséquent le taux de germination augmenterait. L'étude des teneurs en tocophérols dans des plantules issues de semences ayant subi un vieillissement accéléré montre que les plantules les plus développées présentent une teneur plus élevée en α -tocophérol. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse du rôle protecteur central que les tocophérols jouent dans la préservation de la vigueur des semences (Sattler, *et al.*, 2004; Sattler, *et al.*, 2006).

Enfin, pour clore cette approche agro-physiologique, l'étude multilocale et pluriannuelle réalisée sur 4 hybrides commerciaux montre que la teneur en tocophérols dans des graines de tournesol est affectée significativement par le génotype, par l'environnement mais présente aussi une interaction génotype $\times$ lieu. La variation des teneurs en phytostérols dans l'huile de tournesol est également dépendante du génotype et de l'environnement mais dans une moindre mesure par rapport aux tocophérols. Ces différences trouvées entre les différents génotypes sont en accord avec les données trouvées dans la littérature pour les tocophérols (Dolde, *et al.*, 1999; Velasco, *et al.*, 2002; Baydar et Erbas, 2005) mais aussi pour la variation des phytostérols chez le tournesol (Vlahakis et Hazebroek, 2000; Roche, *et al.*, 2006).

Au vu de ces résultats, l'existence d'une différence significative et répétable entre les génotypes justifiait la mise en place d'un plan de croisement afin d'évaluer les composantes génétiques et le potentiel de sélection pour ces caractères.

Étude de l'héritabilité des composés mineurs

L'étude des hybrides issus d'un plan de croisement 7 lignées ♀ x 7 lignées ♂ testé sur deux années en six lieux répartis sur les zones Nord et Sud de la France a permis d'établir les AGC et ASC des lignées. Cette approche a permis de déterminer l'importance du génotype sur la teneur finale en tocophérols par un effet d'additivité des lignées femelles et mâles, et par l'effet de la dominance (interaction entre allèles) pour la teneur totale en phytostérols. Les facteurs environnementaux ont une influence importante sur les teneurs en stérols.

Les valeurs d'héritabilité au sens strict de $h^2 = 0,62$ et $0,14$ et de l'héritabilité au sens large de $H^2 = 0,70$ et $0,24$ pour les teneurs totales en tocophérols et en phytostérols respectivement confirment la possibilité de sélection pour les tocophérols par sélection précoce des lignées en cours de fixation, mais restent assez faibles pour les phytostérols. La faible variabilité des lignées parentales choisies au départ pour la construction du plan de croisement peut être mise en cause. Ce travail devrait se poursuivre par l'analyse des familles de lignées recombinantes actuellement en F4.

Le travail de sélection exige des méthodes rapides pour analyser les caractères d'intérêt, la dernière partie de ce travail étudie la possibilité d'utiliser de la spectrométrie proche infrarouge pour caractériser les composés mineurs des lots d'akènes ou d'akènes isolés.

Prédiction par spectrométrie proche infrarouge des teneurs en tocophérols et en phytostérols dans l'akène de tournesol.

La spectrométrie proche infrarouge est une méthode indirecte qui permet d'analyser avec peu de préparation des échantillons. Le principal avantage de cette technique est la facilité et la rapidité d'échantillonnage. Ainsi, la spectrométrie proche infrarouge permet de déterminer simultanément différents paramètres dans différentes matrices. Sur des graines de tournesol broyées, une gamme diversifiée de calibration existe (protéine, humidité, profil d'acides gras, teneur en matière grasse). Le matériel végétal (lignées, hybrides) collecté au travers des différentes expérimentations a permis d'établir entre les méthodes de référence et les spectres IR des équations de calibrations qui permettent de discriminer rapidement les teneurs en tocophérols et en phytostérols dans les graines de tournesol.

Ainsi, une prédiction des teneurs en tocophérols et des phytostérols totaux est possible sans pour autant pouvoir se substituer à la méthode chimique de référence. A l'heure actuelle, il est nécessaire de compléter le jeu de données et d'affiner par des traitements mathématiques complémentaires les équations de prédiction des composés mineurs dans l'akène de tournesol.

ÉTUDE	HYPOTHÈSES	CONCLUSION	
		TOCOPHÉROLS	PHYTOSTÉROLS
Remplissage de la graine	• Connaître les points clés de l'accumulation pour mieux maîtriser la culture. • Effet du génotype sur la teneur et composition • Effet du lieu de culture sur la teneur et composition	- Accumulation avant 25 JAF, comme l'huile. Après stabilisation jusqu'à maturité. - Dépendant du génotype - Effet environnemental : température.	- Accumulation avant 20 JAF, comme la matière sèche. Après stabilisation ou une légère diminution jusqu'à maturité. - Dépendant du génotype, mais moins que les tocophérols - Effet environnemental : température.
Effet de la conversion oléique	• La modification de composition de l'huile induit-elle une adaptation du système de protection de la plante, → variation des teneurs en composés mineurs.	- Pas de différences significatives entre le type classique et sa conversion oléique. - Différences entre génotypes - Différences environnementales	- Pas de différences significatives entre le type classique et sa conversion oléique. - Différences génotypiques
Effet d'un stress contrôlé pendant la maturation	• Adaptation de la plante face au stress → modification de la composition en composés mineurs. → détermination de sa sensibilité au stress • Influence des composés mineurs face au stress	- Pas de différences significatives entre le type classique et sa conversion oléique. - Pas de différences entre les périodes de stress et les témoins	- Pas de différences significatives entre le type classique et sa conversion oléique. - Pas de différences entre les périodes de stress et les témoins
Vieillessement accélérée et test de germination	• La perte de germination est-elle liée à la teneur en composés mineurs ?	- Pas de différences significatives entre le type classique et sa conversion oléique. - Déclanchement de la synthèse de tocophérols après 8 jours de mise à germer avec lumière	
Etude multilocale et pluriannuelle	• Les effets des génotypes, des lieux de culture et des années sur les variations des composés mineurs	- Différences entre génotypes - Différences environnementales : effet de la température	- Différences entre génotypes moins importantes que pour les tocophérols. - Différences environnementales
Héritabilité des caractères	• Une sélection pour ces caractères mineurs est-elle envisageable ?	- Différences entre génotypes - Différences environnementales - Possibilité d'amélioration génétique car $h^2=0.62$	- Différences entre génotypes - Différences environnementales - Pas de possibilité d'amélioration génétique car $h^2=0.14$. Problème de sélection des lignées parentales, avec d'autres la sélection pourrait être possible.
Détermination par SPIR	• Peut-on quantifier les composés mineurs par spectrométrie proche infrarouge ?	- Différences entre génotypes - Possibilité d'utilisation, mais besoin d'améliorer la calibration	- Différences entre génotypes - Possibilité d'utilisation, mais besoin d'améliorer la calibration - Besoin d'améliorer la méthode de détermination de référence

Tableau 1. Bilan des différentes études.

L'étude réalisée sur la détermination de la teneur en tocophérols d'une monograine décortiquée de tournesol n'a pas permis d'obtenir des résultats significatifs. D'une part, l'importance du choix de la matrice en spectrométrie proche infrarouge est un facteur important tout comme le choix et la précision de la méthode de référence.

Au vu de ces résultats, la spectrométrie proche infra rouge se présente comme un outil permettant de discriminer les composés mineurs, cependant l'enrichissement de la base de données ainsi que l'amélioration des équations de calibration doivent être réalisées.

Perspectives.

A partir de l'ensemble des résultats collectés au cours de ce travail de thèse, différents axes de recherche peuvent être soulevés.

Tout d'abord, la recherche de lignées ou d'hybrides ayant une plus large gamme de teneur en phytostérols doit être menée de façon à mieux estimer l'effet génétique. Le travail portant sur l'étude de 3 descendances en ségrégations doit être poursuivi. Les familles de lignées recombinantes actuellement en F4 doivent être analysées. A partir des résultats, le marquage moléculaire au stade F5 (Lignées Isogéniques Recombinantes) des 3 populations choisies permettra d'établir une cartographie QTL des zones chromosomiques impliquées dans la teneur finale en tocophérols et en phytostérols chez le tournesol. Une telle approche, outre un possible intérêt pratique en sélection, permettrait une avancée dans la compréhension de mécanismes régulateurs de ces teneurs en composés mineurs, et de leur rôle capital dans le maintien des capacités germinatives. Cette approche pourrait être complétée par une étude plus physiologique (en conditions contrôlées) et moléculaire, orientée vers le suivi de l'expression de gènes clefs des voies de biosynthèse.

Enfin, plusieurs axes de recherche peuvent être énoncés concernant l'utilisation de l'outil proche infrarouge pour discriminer les teneurs en tocophérols et en phytostérols dans des graines de tournesol. Tout d'abord, l'amélioration des résultats analytiques concernant les phytostérols en employant la spectrométrie de masse pourrait déceler la conversion de certains stérols ou la présence de formes conjuguées. Cette amélioration permettrait aussi une diminution de l'écart-type de validation croisée (SECV) qui améliorerait d'autant la qualité de prédiction. Puis, la mise en place d'une méthode de dosage précise des tocophérols dans une graine décortiquée de tournesol permettrait de compléter la gamme des calibrations (acide oléique, acide linoléique) de façon à faciliter la discrimination de lignées et d'hybrides. Enfin, l'ensemble de ce travail doit s'inscrire dans une amélioration des équations de prédiction par spectrométrie proche infrarouge en utilisant d'autres méthodes mathématiques de traitement de données.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abidi, S. L. (2001). "Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils". Journal of Chromatography A **935** (1-2): 173-201.
- Abidi, S. L. (2003). "Tocol-derived minor constituents in selected plant seed oils". Journal of the American Oil Chemists Society **80** (4): 327-333.
- Adcox, C., L. Boyd, L. Oehrl, J. Allen and G. Fenner (2001). "Comparative effects of phytosterol oxides and cholesterol oxides in cultured macrophage-derived cell lines". Journal of Agricultural and Food Chemistry **49** (4): 2090-2095.
- Agreste (2008). Les cours des céréales et des oléoprotéagineux repartent à la hausse en décembre. Montreuil sous bois, Ministère de l'agriculture et de la pêche: 1-3.
- Ajjawi, I. and D. Shintani (2004). "Engineered plants with elevated vitamin E: a nutraceutical success story". Trends in Biotechnology **22** (3): 104-107.
- Almonor, G. O., G. P. Fenner and R. F. Wilson (1998). "Temperature effects on tocopherol composition in soybeans with genetically improved oil quality". Journal of the American Oil Chemists Society **75** (5): 591-596.
- Alpaslan, M., S. Tepe and O. Simsek (2001). "Effect of refining processes on the total and individual tocopherol content in sunflower oil". International Journal of Food Science and Technology **36** (7): 737-739.
- Amar, S. (2007). Genetic variation and inheritance of phytosterol content in *Brassica napus* L. PhD Thesis. Faculty of Agriculture, Georg-August-Universität Göttingen, Germany. pp 77.
- Amar, S., W. Ecke, H. C. Becker et C. Möllers (2008). "QTL for phytosterol and sinapate ester content in *Brassica napus* L. collocate with the two erucic acid genes". Theoretical and Applied Genetics **116**: 1051-1061.
- Amaral, J. S., Casal, S., Oliveira, B.P.P., Seabra, R.M. (2005). "Development and evaluation of a normal phase liquid chromatographic method for the determination of tocopherols and tocotrienols in walnuts". Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies **28** (5): 785-795.
- AMSOL (2002). Semences oléagineuses : les promesses de la sélection génétique Paris, Industrie des semences de plantes oléoprotéagineuses: 1-2.
- Awad, A. B. and C. S. Fink (2000). "Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action". Journal of Nutrition **130** (9): 2127-2130.
- Ayerdi Gotor, A. (2004). Communication personnelle -Étude de la variabilité de la fraction insaponifiable (tocophérols et phytostérols) dans l'huile de tournesol. Toulouse, DEA Sciences des Agroressources - INP Toulouse: 49.
- Ayerdi Gotor, A., E. Farkas, M. Berger, F. Labalette, S. Centis, J. Daydé and A. Calmon (2007). "Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry". European Journal of Lipid Science and Technology **109** (5): 525-530.
- Ayerdi Gotor, A., M. Berger, F. Labalette, S. Centis, J. Daydé and A. Calmon (2006a). "Etude de la variation des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule : Partie I - Tocophérols." OCL : Oléagineux, Corps Gras, Lipides **13** (2): 206-212.
- Ayerdi Gotor, A., M. Berger, F. Labalette, S. Centis, J. Daydé and A. Calmon (2006b). Variability of minor components in sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil from a multi-local study. 17th International Symposium on Plant Lipids, East Lansing, MI, USA, ISPL2006, Benning, C., J. Ohlrogge. PP 248-252.
- Ayerdi Gotor, A., P. Moreau, A. Gaillard and A. Calmon (2008). Caractérisation par infra-rouge des teneurs en acides gras de la graine entière décortiquée de tournesol. 17th International Sunflower Conference, Córdoba (Spain) JUNTA DE ANDALUCIA vol.2: 757-761.
- Azzi, A. (2007). "Molecular mechanism of alpha-tocopherol action". Free Radical Biology and Medicine **43** (1): 16-21.
- Azzi, A., I. Breyer, M. Feher, M. Pastori, R. Ricciarelli, S. Spycher, M. Staffieri, A. Stocker, S. Zimmer and J. Zingg (2000). "Specific cellular responses to alpha-tocopherol". Journal of Nutrition **7**: 1649-1652.
- Azzi, A., I. Breyer, M. Feher, R. Ricciarelli, A. Stocker, S. Zimmer and J. Zingg (2001). "Nonantioxidant functions of alpha-tocopherol in smooth muscle cells". Journal of Nutrition **131** (2): 378S-381S.

B

- Baeten, V., P. Dardenne and R. Aparicio (2001). "Interpretation of fourier transform Raman spectra of the unsaponifiable matter in a selection of edible oils". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** (11): 5098-5107.
- Bailly, C., R. Bogatek-Leszczynska, D. Côme and F. Corbineau (2002). "Changes in activities of antioxydant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedling from seeds of different vigour". *Seed Science Research* **12**: 47-55.
- Ballesteros, E., M. Gallego and M. Valcarcel (1995). "Simultaneous determination of sterols in edible oils by use of a continuous separation module coupled to a gas chromatograph". *Analytica Chimica Acta* **308**: 253-260.
- Banas, A., A. S. Carlsson, B. Huang, M. Lenman, W. Banas, M. Lee, A. Noiriël, P. Benveniste, H. Schaller, P. Bouvier-Nave and S. Stymne (2005). "Cellular sterol ester synthesis in plants is performed by an enzyme (phospholipid : sterol acyltransferase) different from the yeast and mammalian acyl-CoA : sterol acyltransferases". *Journal of Biological Chemistry* **280** (41): 34626-34634.
- Bandarra, N. M., R. M. Campos, I. Batista, M. L. Nunes and J. M. Empis (1999). "Antioxidant synergy of alpha-tocopherol and phospholipids". *Journal of the American Oil Chemists Society* **76** (8): 905-913.
- Baydar, H. and S. Erbas (2005). "Influence of seed development and seed composition on oil, fatty acids and total tocopherol contents in sunflower (*Helianthus annuus* L.)". *Turkish Journal of Agriculture* **29**: 179-186.
- Beardsell, D., J. Francis, D. Ridley and K. Robards (2002). "Health promoting constituents in plant derived edible oils". *Journal of Food Lipids* **9** (1): 1-34.
- Beermann, C., A. Green, M. Mobius, J. J. Schmitt and G. Boehm (2003). "Lipid class separation by HPLC combined with GC FA analysis: Comparison of seed lipid compositions from different *Brassica napus* L. varieties". *Journal of the American Oil Chemists Society* **80** (8): 747-753.
- Benatti, P., G. Peluso, R. Nicolai and M. Calvani (2004). "Polyunsaturated fatty acids: Biochemical, nutritional and epigenetic properties". *Journal of the American College of Nutrition* **23** (4): 281-302.
- Bergman, C. J. and Z. Xu (2003). "Genotype and environment effects on tocopherol, tocotrienol, and gamma-oryzanol contents of Southern US rice". *Cereal Chemistry* **80** (4): 446-449.
- Besse, P. and E. Farkas (2003). Discrimination par forêt aléatoire de chromatogrammes décomposés en ondelettes., XXXVèmes journées de la Société Française de Statistique, Journées statistiques Lyon.
- Bewley, J. D. (1986). Membrane changes in seeds as related to germination and the perturbations resulting from deterioration in storage. *Physiology of seed deterioration*. Crop Science Society of America. Madison, WI USA, CSSA. **11**: 27-45.
- Biskupek-Korel, B. and C. R. Moschner (2007). "Near-infrared spectroscopy (NIRS) for quality assurance in breeding, cultivation and marketing of high-oleic sunflower". *Helia* **29** (45): 63-72.
- Bonjean, A. (1993). *Le tournesol*, Les éditions de l'environnement. Eurolles. Paris. p.242.
- Booth, V. H. (1963). "a-tocopherol, its co-occurrence with chlorophyll in chloroplasts". *Phytochemistry* **2**: 421-427.
- Borlescu, C., M. Giurginca and I. Demetrescu (2007). "Evaluation of stability of some natural and synthesis antioxidants in dermato-cosmetics with anti-ageing effect". *Revista de Chimie* **58** (1): 28-32.
- Bouic, P. J. D., A. Clark, J. Lamprecht, M. Freestone, E. J. Pool, R. W. Liebenberg, D. Kotze and P. P. van Jaarsveld (1999). "The effects of β -sitosterol (BSS) and β -sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: Inhibition of post marathon immune suppression and inflammation". *International Journal of Sports Medicine* **20** (4): 258-262.
- Bradford, P. G. and A. B. Awad (2007). "Phytosterols as anticancer compounds". *Molecular Nutrition & Food Research* **51** (2): 161-170.
- Bramley, P. M., I. Elmafda, A. Kafatos, F. J. Kelly, Y. Manios, H. E. Roxborough, W. Schuch, P. J. A. Sheehy and K. H. Wagner (2000). "Vitamin E". *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80** (7): 913-938.
- Breiman, L. (2001). "Random Forests." *Machine Learning* **45**(1): 5-32.
- Brevedan, M. I. V., A. A. Carelli and G. H. Crapeste (2000). "Changes in composition and quality of sunflower oils during extraction and degumming". *Grasas Y Aceites* **51** (6): 417-423.
- Brigelius-Flohe, R. (2006). "Bioactivity of vitamin E". *Nutrition Research Reviews* **19** (2): 174-186.
- Brigelius-Flohe, R. and M. G. Traber (1999). "Vitamin E: function and metabolism". *Faseb Journal* **13** (10): 1145-1155.
- Britz, S. J. and D. F. Kremer (2002). "Warm temperatures or drought during seed maturation increase free alpha-tocopherol in seeds of soybean (*Glycine max* L. Merr.)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** (21): 6058-6063.

- Brouwer, I. A., M. B. Katan and P. L. Zock (2004). "Dietary alpha-linolenic acid is associated with reduced risk of fatal coronary heart disease, but increased prostate cancer risk: a meta-analysis". Journal of Nutrition **134**: 919-922.
- Brufau, G., M. A. Canela and M. Rafecas (2008). "Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties". Nutrition Research **28** (4): 217-225.
- Bruhl, L. and B. Matthaus (1999). "Extraction of oilseeds by SFE - a comparison with other methods for the determination of the oil content". Fresenius Journal of Analytical Chemistry **364** (7): 631-634.
- Buchanan, B. G., W; Jones, RL (2000). Membrane structure and membranous organelles. Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland, US: 850-907.
- Burton, G. W., M. G. Traber, R. V. Acuff, D. N. Walters, H. Kayden, L. Hughes and K. U. Ingold (1998). "Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E". American Journal of Clinical Nutrition **67** (4): 669-684.

C

- Cabrini, L., V. Barzanti, M. Cipollone, D. Fiorentini, G. Grossi, B. Tolomelli, L. Zamboni and L. Landi (2001). "Antioxidants and Total Peroxyl Radical-Trapping Ability of Olive and Seed Oils". Journal of Agricultural and Food Chemistry **49** (12): 6026 - 6032.
- Calpe-Berdiel, L., J. C. Escola-Gil, V. Ribas, A. Navarro-Sastre, J. Garces-Garces and F. Blanco-Vaca (2005). "Changes in intestinal and liver global gene expression in response to a phytosterol-enriched diet". Atherosclerosis **181** (1): 75-85.
- Cervero, J. M., J. Coca and S. Luque (2008). "Production of biodiesel from vegetable oils". Grasas y Aceites **59** (1): 76-83.
- CETIOM (2006). Rapport d'activité 2006 : Valoriser les productions oléagineuses, maîtriser leur qualité et garantir leur sécurité. www.cetiom.fr Retrieved juin 2007.
- CETIOM, ONIDOL and SOFIPROTEOL (2000). Les techniques culturales - Le contexte économique. Paris, PROLEA.
- Champolivier, L. and A. Merrien (1996). "Évolution de la teneur en huile et de sa composition en acides gras chez deux variétés de tournesol (oléique ou non) sous l'effet de températures différences pensant la maturation des graines". OCL: Oléagineux, corps gras, lipides **3**(2): 140-144.
- Chen, S. Y., H. J. Li and G. S. Liu (2006). "Progress of vitamin E metabolic engineering in plants". Transgenic Research **15** (6): 655-665.
- Chênevert, R. and G. Courchesne (2002). "Synthesis of (S)-alpha-tocotrienol via an enzymatic desymmetrization of an achiral chroman derivative". Tetrahedron letters **43**: 7971-7973.
- Choe, E. and D. B. Min (2006). "Mechanisms and factors for edible oil oxidation". Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **5** (4): 169-186.
- Choe, E. and D. B. Min (2007). "Chemistry of deep-fat frying oils". Journal of Food Science **72** (5): R77-R86.
- Clouse, S. (2000). "Plant development: A role for sterols in embryogenesis". Current Biology **10** (16): R601-R604.
- Codina.net. (2007). "Les huiles." www.codina.net. Retrieved 20 Feb, 2007.
- Cole, G., S. Coughlan, N. Frey, J. Hazebrook and C. Jennings (1998). "New sunflower and soybean cultivars for novel vegetable oil types". Fett-Lipid **100** (4-5): 177-181.
- Collakova, E. and D. DellaPenna (2003a). "Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in Arabidopsis". Plant Physiology **131** (2): 632-642.
- Collakova, E. and D. DellaPenna (2003b). "The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress". Plant Physiology **133** (2): 930-940.
- Connor, D. J. and A. J. Hall (1997). Sunflower physiology. Sunflower technology and production. Agronomy Monograph. A. A. Schneiter and A. A. Seiler. Madison (USA). **35**: 113-182.
- Corbineau, F., C. Gay-Mathieu, D. Vinel and D. Come (2002). "Decrease in sunflower (*Helianthus annuus*) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition". Physiologia Plantarum **116** (4): 489-496.
- Crews, C., P. Hough, J. Godward, P. Brereton, M. Lees, S. Guet and W. Winkelmann (2005a). "Study of the main constituents of some authentic hazelnut oils". Journal of Agricultural and Food Chemistry **53** (12): 4843-4852.
- Crews, C., P. Hough, J. Godward, P. Brereton, M. Lees, S. Guet and W. Winkelmann (2005b). "Study of the main constituents of some authentic walnut oils". Journal of Agricultural and Food Chemistry **53** (12): 4853-4860.

D

- Dachtler, M., F. H. M. van de Put, F. von Stijn, C. M. Beindorff and J. Fritsche (2003). "On-line LC-NMR-MS characterization of sesame oil extracts and assessment of their antioxidant activity". European Journal of Lipid Science and Technology **105** (9): 488-496.
- Daood, H., M. Vinkel, F. Markus, E. A. Hebshi and P. A. Biacs (1996). "Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors". Food Chemistry **55** (4): 365-372.
- De Greyt, W., V. Petrauskaite, M. J. Kellens and A. D. Huyghebaert (1998). "Analysis of tocopherols by gas-liquid and high-performance liquid chromatography : a comparative study". Feet/Lipid **100** (11): 503-507.
- De la Puerta, R., R. Maestro-Duran and V. Ruiz-Gutierrez (1997). "Pharmacological activity of the fraction isolated from virgin olive oil containing the sterols and triterpenic alcohols". Grasas y Aceites **48** (2): 93-95.
- DellaPenna, D. and B. Pogson (2006). "Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids". The Annual Review of Plant Biology **57**: 711-738.
- Delplanque, B. (2000). "The nutritional value of sunflower oils: linoleic sunflower seeds and seeds with high oleic content". OCL-Oleagineux Corps Gras Lipides **7** (6): 467-472.
- Demurin, Y. N., S. G. Efimenko and T. M. Peretyagina (2007). "Expressivity of tocopherol mutations in sunflower". Helia **29** (45): 55-62.
- Demurin, Y., D. Skoric and D. Karlovic (1996). "Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality". Plant Breeding **115**: 33-36.
- Di Mascio, P., M. E. Murphy and H. Sies (1991). "Antioxidants defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols". American Journal of Clinical Nutrition **53**: 194S-200S.
- Diener, A. C., H. X. Li, W. X. Zhou, W. J. Whoriskey, W. D. Nes and G. R. Fink (2000). "Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants". Plant Cell **12** (6): 853-870.
- Dolde, D., C. Vlahakis and J. Hazebroek (1999). "Tocopherols in breeding lines and effects of planting location, fatty acid composition, and temperature during development". Journal of the American Oil Chemists Society **76** (3): 349-355.
- Dörmann, P (2007). "Functional diversity of tocopherols in plants". Planta **225** (2): 269-276.
- Dutta, P. and L. Normen (1998). "Capillary column gas- liquid chromatographic separation of delta 5-unsaturated and saturated phytosterol". Journal of Chromatography A **816**: 177-184.

E

- Egesel, C. O., J. C. Wong, R. J. Lambert and T. R. Rocheford (2003). "Combining ability of maize inbreds for carotenoids and tocopherols". Crop Science **43** (3): 818-823.
- Ellis, R. H. and E. H. Roberts (1980). "The influence of temperature and moisture on seed viability period in barley (*Hordeum distichum* L.)". Annals of Botany **45**: 31-37.
- El-Madfa, I. and K. H. Wagner (2003). "Non-nutritive bioactive food constituents of plants: Tocopherols (vitamin E)". International Journal for Vitamin and Nutrition Research **73** (2): 89-94.
- El-Shami, S. M., M. M. M. Hassamein and M. H. El-Mallah (2001). "Studies on changes in lipid profiles of new varieties of rape during seed maturation". Grasas y Aceites **52** (2): 94-103.
- Erasmus, U. (1993). Fats that heal, fats that kill: the complete guide to fats, oils, cholesterol and human health, Alive books.
- European Community (1995). European Parliament and Council Directive No 95/2/EC. Foods Additives other than colours and sweeteners.: 1-40.
- European Community (2002). Commercialisation des semences des plantes oléagineuses et à fibres. . Directive 2002/57/CE du Conseil du 13 Juin 2002. **2002/57/CE**: pp. 22.
- European Community (2007). Crops statistics Eurostat database, from the European Community Home page: <http://epp.eurostat.ec.europa.eu>.
- Evans, H. M. and K.S. Bishop (1922). "On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction". Science **56**:650-651.
- Evans, J. C., D. R. Kodali and P. B. Addis (2002). "Optimal tocopherol concentrations to inhibit soybean oil oxidation". Journal of the American Oil Chemists Society **79** (1): 47-51.

F

- FAO (2007). FAOSTAT Database from the Food and Agriculture Organization Home page: www.fao.org. **2007**.
- Fassio, A. and D. Cozzolino (2004). "Non-destructive prediction of chemical composition in sunflower seeds by near infrared spectroscopy". Industrial Crops and Products **20**: 321-329.

- FDA. (2007, 10 Août 2007). "Food and drugs. Food labeling. Specific requirements for health claims. Health claims: plant sterol/stanol esters and risk of coronary heart disease." Retrieved 14 Août 2007, 2007.
- Fernandes, P. and J. M. S. Cabral (2007). "Phytosterols: Applications and recovery methods". Bioresource Technology **98** (12): 2335-2350.
- Ferrari, R. A., E. Schute, W. Esteves, L. Bruhl and K. D. Mukherjee (1996). "Minor constituents of vegetable oils during industrial processing". Journal of the American Oil Chemists Society **73**: 587-592.
- Field, F. J., N. T. P. Kam and S. N. Mathur (1990). "Regulation of cholesterol metabolism in the intestine". Gastroenterology **99**: 539-551.
- Fielding, J. L. and A. Goldsworthy (1980). "Tocopherol levels and ageing in wheat grains". Annals of Botany **46**: 453-456.
- Folmer, B. M. (2003). "Sterol surfactants: from synthesis to applications". Advances in Colloid and Interface Science **103** (2): 99-119.
- Frankel, E. N. (1984). "Lipid Oxidation: Mechanisms, Products and Biological Significance". Journal of the American Oil Chemists Society **61** (12): 1908-1916.
- Fy, F. (2004). "Conséquences de l'élargissement de l'Union européenne dans le secteur oléagineux: La réforme de la PAC". OCL: Oléagineux, Corps gras, Lipides **11** (4-5): 331-335.

G

- Garcés, R., C. Sarmiento and M. Mancha (1992). "Temperature regulation of oleate desaturase in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds". Planta **186**: 461-465.
- García-Díaz, M. T., J. M. Martínez-Rivas and M. Mancha (2002). "Temperature and oxygen regulation of oleate desaturation in developing sunflower (*Helianthus annuus*) seeds". Physiologia Plantarum **114**: 13-20.
- García-Moreno, M. J., E. M. Vera-Ruiz, J. M. Fernández-Martínez, L. Velasco and B. Pérez-Vich (2006). "Genetic and molecular analysis of high gamma-tocopherol content in sunflower". Crop Science **46** (5): 2015-2021.
- Gertz, C. and S. P. Kochhar (2001). "A new method to determine oxidative stability of vegetable fats and oils at simulated frying temperature". OCL: Oléagineux, Corps Gras, Lipides **8** (1): 82-88.
- Gertz, C., S. Klostermann and S. P. Kochhar (2000). "Testing and comparing oxidative stability of vegetable oils and fats at frying temperature". European Journal of Lipid Science and Technology **102** (8-9): 543-551.
- Gnis. (2008). "La stérilité mâle cytoplasmique." Centre de ressources sur les semences et les espèces végétales: www.gnis-pedagogie.org/pages/classbio/champ2/18.htm. Retrieved Mars 2008.
- Goffman, F. D. and C. Möllers (2000). "Changes in tocopherol and plastochromanol-8 contents in seeds and oil of oilseed rape (*Brassica napus* L.) during storage as influenced by temperature and air oxygen". Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(5): 1605-1609.
- Goffman, F. D. and H. C. Becker (2001a). "Diallel analysis for tocopherol contents in seeds of rapeseed". Crop Science **41** (4): 1072-1079.
- Goffman, F. D. and H. C. Becker (2001b). "Genetic analysis of tocopherol content and composition in winter rapeseed". Plant Breeding **120** (2): 182-184.
- Goffman, F. D. and H. C. Becker (2002). "Genetic variation of tocopherol content in a germplasm collection of *Brassica napus* L.". Euphytica **125** (2): 189-196.
- Gomez-Fernandez, J. C., J. Villalain, F. J. Aranda, A. Ortiz, V. Micol, A. Coutinho, M. N. Bernerán-Santos and M. J. E. Prieto (2002). "Localization of Tocopherol in Membranes". New York Academy of Sciences: 109-120.
- Gondet, L., R. Bronner and P. Benveniste (1994). "Regulation of sterol content in membranes by subcellular compartmentation of sterol-esters accumulating in a sterol-overproducing tobacco mutant". Plant Physiology **105**: 509-518.
- González Pérez, S. and J. M. Vereijken (2008). "Review Sunflower proteins: over view of their physicochemical, structural and functional properties". Journal of the Science of Food and Agriculture **In press**.
- González-Martín, I., J. Hernández-Hierro, M. Bustamante-Rangel and N. Barros-Ferreiro (2006). "Near-infrared spectroscopy (NIRS) reflectance technology for the determination of tocopherols in alfalfa". Analytical and Bioanalytical Chemistry **386** (5): 1553-1558.
- Granados, M. L., M. D. Z. Poves, D. M. Alonso, R. Mariscal, F. C. Galisteo, R. Moreno-Tost, J. Santamaria and J. L. G. Fierro (2007). "Biodiesel from sunflower oil by using activated calcium oxide". Applied Catalysis B-Environmental **73** (3-4): 317-326.

Grusak, M. A. and D. DellaPenna (1999). "Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health". Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **50**: 133-161.

H

- Halder, S., S. Kole and K. Gupta (1983). "On the mechanism of sunflower seed deterioration under two different types of accelerated ageing". Seed Science and Technology **21**: 331-339.
- Hamama, A. A., H. L. Bhardwaj and D. E. Starner (2003). "Genotype and growing location effects on phytosterols in canola oil". Journal of the American Oil Chemists Society **80** (11): 1121-1126.
- Hampshire, J. (2003). "Investigations of vitamin E contents in oat varieties and industrial milling oats". Deutsche Lebensmittel-Rundschau **99** (6): 222-231.
- Hartmann, M. A. (1998). "Plant sterols and the membrane environment." Trends in plant science **3** (5): 170-175.
- Hass, C. G., S. Tang, S. W. Leonard, M. G. Traber, J. F. Miller and S. J. Knapp (2006). "Three non-allelic epistatically interacting methyltransferase mutations produce novel tocopherol (vitamin E) profiles in sunflower". Theoretical and Applied Genetics **113**: 767-782.
- Hey, S. J., S. J. Powers, M. H. Beale, N. D. Hawkins, J. L. Ward and N. G. Halford (2006). "Enhanced seed phytosterol accumulation through expression of a modified HMG-CoA". Plant Biotechnology Journal **4** (2): 219-229.
- Hofius, D. and U. Sonnewald (2003). "Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology". Trends in Plant Science **8** (1): 6-8.
- Holmberg, K. (2001). "Natural surfactants". Current Opinion in Colloid and Interface Science **6** (2): 148-159.
- Hoppe, P. P. and G. Krennrich (2000). "Bioavailability and potency of natural-source and all-racemic alpha-tocopherol in the human: a dispute". European Journal of Nutrition **39** (5): 183-193.
- Horn, R., B. Kusterer, E. Lazarescu, M. Prufe and W. Friedt (2003). "Molecular mapping of the Rf1 gene restoring pollen fertility in PET1-based F-1 hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.)". Theoretical and Applied Genetics **106** (4): 599-606.
- Hourant, P., V. Baeten, M. T. Morales, M. Meurens and R. Aparicio (2000). "Oil and fat classification by selected bands of near-infrared spectroscopy". Applied Spectroscopy **54** (8): 1168-1174.
- Hovenkamp, E., I. Demonty, J. Plat, D. Lutjohann, R. P. Mensink and E. A. Trautwein (2008). "Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge". Progress in Lipid Research **47** (1): 37-49.
- Huber, G. W., P. O'Connor and A. Corma (2007). "Processing biomass in conventional oil refineries: Production of high quality diesel by hydrotreating vegetable oils in heavy vacuum oil mixtures". Applied Catalysis a-General **329**: 120-129.
- I. Normal Distribution of Seed Survival". Crop Science **39**: 1394-1400.

I

- Igarashi, O. and C. Kiyose (1999). "Physiological functions of vitamin E and biodiscrimination of its stereoisomers". Anticancer Research **19** (5A): 3783-3785.
- Ikeda, I., K. Tanaka, M. Sugano, G. V. Vahouny and L. L. Gallo (1988). "Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols". Journal of Lipid Research **29** (12): 1573-1582.
- Irons, S.M. and O.C. Burnside (1982). "Competitive and allelopathic effects of sunflower (*Helianthus annuus*)". Weed Science **30**: 372-377.
- ISO (1997). International Standard Organization. ISO 9936: Animal and vegetable fats and oils - Determination of tocopherols and tocotrienols contents - Method using high-performance liquid chromatography. ISO. Genève. 11 pp.
- ISTA (2004). International seed testing association. International rules for seed testing. Bassersdorf, ISTA.
- Izquierdo, N. G., S. Mascioli, L. A. N. Aguirrezábal and S. M. Nolasco (2007). "Temperature influence during seed filling on tocopherol concentration in a traditional sunflower hybrid". Grasas y Aceites **58** (2): 170-178.

J-K

- Jonnala, R. S., N. T. Dunford and K. E. Dashiell (2006). "Tocopherol, phytosterol and phospholipid compositions of new high oleic peanut cultivars". Journal of Food Composition and Analysis **19** (6-7): 601-605.

- Kang, J. H., N. Cook, J. Manson, J. E. Buring and F. Grodstein (2006). "A randomized trial of vitamin E supplementation and cognitive function in women". Archives of Internal Medicine **166** (22): 2462-2468.
- Kanwischer, M., S. Porfirova, E. Bergmuller and P. Dormann (2005). "Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of arabidopsis affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress". Plant Physiology **137** (2): 713-723.
- Karunanandaa, B., Q. G. Qi, M. Hao, S. R. Baszis, P. K. Jensen, Y. H. H. Wong, J. Jiang, M. Venkatramesh, K. J. Gruys, F. Moshiri, D. Post-Beittermiller, J. D. Weiss and H. E. Valentin (2005). "Metabolically engineered oilseed crops with enhanced seed tocopherol". Metabolic Engineering **7** (5-6): 384-400.
- Khallouki, F., B. Spiegelhalter, H. Bartson and R. H. Owen (2005). "Secondary metabolites of the argan tree (Morocco) may have disease prevention properties". African Journal of Biotechnology **4** (5): 381-388.
- Kibinza, S., D. Vinel, D. Côme, C. Bailly and F. Corbineau (2006). "Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen specie scavenging". Physiologia Plantarum. **128** (3):496-506
- Kleingartner, L. (2004). "Global sunflower market trends". Sunflower magazine www.sunflowernsa.com/magazine/. Retrieved 20 Feb, 2008.
- Kleingartner, L. and K. Warner (2001). "A Look at a New Sunflower Oil". American Association of Cereal Chemists **46** (9): 399-404.
- Korhonen, M., L. Hellen, J. Hirvonen and J. Yliruusi (2001). "Rheological properties of creams with four different surfactant combinations - effect of storage time and conditions". International Journal of Pharmaceutics **221** (1-2): 187-196.
- Krieger-Liszkay, A. and A. Trebst (2006). "Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre". Journal of Experimental Botany **57** (8): 1677-1684.
- Kriese, U., E. Schumann, W. E. Weber, M. Beyer, L. Bruhl and B. Matthaus (2004). "Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 Cannabis sativa L. genotypes". Euphytica **137** (3): 339-351.
- Kruk, J., H. Holländer-Czytko, W. Oettmeier and A. Trebst (2005). "Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II". Journal of Plant Physiology **162**: 749-757.
- Krzyaniak, M. S. and E. Kerjama (2001). "Determination of gamma linolenic acid in Oenothera Biennis L." Herba Polonica **37** (2): 57-62.
- Kurilich, A. C. and J. A. Juvik (1999). "Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in Zea mays". Journal of Agricultural and Food Chemistry **47** (5): 1948-1955.

L

- Lacombe, S. and A. Bervillé (2001). "A dominant mutation for high oleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed oil is genetically linked to a single oleate-desaturase RFLP locus". Molecular Breeding **8** (2): 129-137.
- Lacombe, S., S. Leger, F. Kaan and A. Berville (2002). "Genetic, molecular and expression features of the Pervenets mutant leading to high oleic acid content of seed oil in sunflower". OCL-Oleagineux Corps Gras Lipides **9** (1): 17-23.
- Lagravère, T. (1999). Déterminisme Agro-Physiologique de l'Expression de la très Haute Teneur en Acide Oléique dans l'Huile de Tournesol (*Helianthus annuus* L.). Thèse n°1600. Institut National Polytechnique. Toulouse. p 162.
- Lagravère, T., D. Kleiber, O. Surel, A. Calmon, A. Bervillé and J. Daydé (2004). "Comparison of fatty acid metabolism of two oleic and one conventional sunflower hybrids: A new hypothesis". Journal of Agronomy and Crop Science **190** (4): 223-229.
- Lampart-Szczapa, E., J. Korczak, M. Nogala-Kalucka and R. Zawirska-Wojtasiak (2003). "Antioxidant properties of lupin seed products". Food Chemistry **83** (2): 279-285.
- Lampi, A. M. and A. Kamal-Eldin (1998). "Effect of alpha- and gamma-tocopherols on thermal polymerization of purified high-oleic sunflower triacylglycerols". Journal of the American Oil Chemists Society **75** (12): 1699-1703.
- Lampi, A. M. and V. Piironen (1999). "Dissimilarity of the oxidations of rapeseed and butter oil triacylglycerols and their mixtures in the absence of tocopherols". Journal of the Science of Food and Agriculture **79**: 300-306.
- Lampi, A. M., A. Kamal-Eldin and V. Piironen (2002). "Tocopherols and tocotrienols from oil and cereal grains." Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects **2**: 1-38.

- Langer, O., O. Palme, V. Wray, H. Tokuda and S. Lang (2006). "Production and modification of bioactive biosurfactants". Process Biochemistry **41** (10): 2138-2145.
- Law, M. (2000). "Plant sterol and stanol margarines and health." British Medical Journal **320**(7238): 861-864.
- Leather, G.R. (1983). "Sunflower (*Helianthus annuus*) are allelopathic to weeds". Weed Science **31**: 37-42.
- Lechner, M., B. Reiter and E. Lorbeer (1999). "Determination of free and esterified sterols in potential new oil seed crops by coupled on-line liquid chromatography-gas-chromatography". Feet/Lipid **101** (5): 171-177.
- Leclercq, P. (1969). "Une stérilité cytoplasmique chez le tournesol". Annales de l'Amélioration des plantes **19**: 99-106.
- Lentz, D. L., M. D. Pohl, J. L. Alvarado, S. Tarighat and R. Bye (2008). "Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a pre-Columbian domesticated in Mexico". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105** (17): 6232-6237.
- León, L., L. Rallo and A. Garrido (2003). "Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) analysis of intact olive fruit: an useful tool in olive breeding programs." Grasas y Aceites **54** (1): 41-47.
- Lindsey, K., M. L. Pullen and J. F. Topping (2003). "Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signalling". Trends in Plant Science **8** (11): 521-525.
- Liu, W.-H., B. Ding, X.-M. Ruan, H.-T. Xu, J. Yang and S.-M. Liu (2007). "Analysis of free and conjugated phytosterols in tobacco by an improved method using gas chromatography-flame ionization detection." Journal of Chromatography A **1163**: 304-311.
- Lodge, J. K. (2005). "Vitamin E bioavailability in humans". Journal of Plant Physiology **162** (7): 790-796.
- Lutjohann, D. (2004). "Sterol autoxidation: from phytosterols to oxyphytosterols". British Journal of Nutrition **91** (1): 3-4.
- Lynch, M. and B. Walsh (1998). Genetic and analysis of quantitative traits. Sunderland (MA), Sinauer Associates, Inc. p.980.

M

- Määttä, K., A. M. Lampi, J. Pettersson, B. M. Fogelfors, V. Piironen and A. Kamal-Eldin (1999). "Phytosterol content in seven oat cultivars grown at three locations in Sweden". Journal of the Science of Food and Agriculture **79** (7): 1021-1027.
- Macias, F.A., R.M. Varela, A. Torres and J.M.G. Molinillo (2000). "Potential allelopathic activity of natural plant heliannanes: a proposal of absolute configuration and nomenclature". Journal of Chemistry and Ecology **26**: 2173-2186.
- Marcos-Filho, J. and M. B. McDonald (1998). "Sensitivity of RAPD analysis, germination and vigour tests to detect the intensity of deterioration of naturally and artificially aged soybean seeds". Seed Science Research **26** (1): 141-157.
- Márquez-Ruiz, G., R. Garcés, M. León-Camacho and M. Mancha (1999). "Thermostability of triacylglycerols from mutant sunflower seeds". Journal of the American Oil chemists Society **76** (10): 1169-1174.
- Marwede, V., A. Schierholt, C. Möllers and H. C. Becker (2004). "Genotype X environment interactions and heritability of tocopherol contents in canola". Crop Science **44** (3): 728-731.
- McCord, K. L., W. R. Fehr, T. Wang, G. A. Welke, S. R. Cianzio and S. R. Schnebly (2004). "Tocopherol content of soybean lines with reduced linolenate in the seed oil". Crop Science **44** (3): 772-776.
- McDonald, M. (1999). "Seed deterioration: physiology, repair and assessment". Seed Science Research **27** (1): 177-237.
- McDonald, M. B. (1998). "Seed quality assessment". Seed Science Research **8** (2): 265-275.
- Merrien, A., J. Morice, A. Pouzet, O. Morin and C. Sultana (1992). Graines oléagineuses des climats tempérés et leurs huiles. Manuel des Corps Gras, A. Karleskind. Paris, Tec&Doc. **1**: 116-164.
- Merritt, D. J., T. Senaratna, D. H. Touchell, K. W. Dixon and K. Sivasithamparam (2003). "Seed ageing of four Western Australian species in relation to storage environment and seed antioxidant activity". Seed Science Research **13** (2): 155-165.
- Moreau, R. A., B. D. Whitaker and K. B. Hicks (2002). "Phytosterols, phytosterols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses". Progress in Lipid Research **41** (6): 457-500.
- Morris, M., D. Evans, C. Tangney, J. Bienias, R. Wilson, N. Aggarwal and P. Scherr (2005). "Relation of the tocopherol forms to incident Alzheimer disease and to cognitive change". American Journal of Clinical Nutrition **81** (2): 508-514.

- Moschner, C. and B. Biskupek-Korell (2006). "Estimating the content of free fatty acids in high-oleic sunflower by near-infrared spectroscopy". European Journal of Lipid Science and Technology **108** (7): 606-613.
- Mozzon, M., F. Bocci and N. Frega (1998). "A study on the lipidic fraction extracted from high oleic sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) during the ripening process". Journal of Agricultural and Food Chemistry **46** (10): 4198-4202.
- Mozzon, M., F. Bocci and N. Frega (1998). "A study on the lipidic fraction extracted from high oleic sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) during the ripening process". Journal of Agricultural and Food Chemistry **46** (10): 4198-4202.
- Munné-Bosch, S. (2005). "The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance". Journal of Plant Physiology **162** (7): 743-748.
- Munné-Bosch, S. and L. Alegre (2002a). "The fonction of tocopherols and tocotrienols in plants". Critical Reviews in Plant Sciences **21** (1): 31-57.
- Munné-Bosch, S. and L. Alegre (2002b). "Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts". Planta **214** (4): 608-615.
- Murkovic, M. and W. Pfannhauser (2000). "Stability of pumpkin seed oil". European Journal of Lipid Science and Technology **102** (10): 607-611.

N

- Nagao, A. and M. Yamazaki (1983). "Lipid of sunflower seeds produced in Japan". Journal of the American Oil Chemists Society **60** (9): 1654-1958.
- Neff, W. E., K. Warner and F. Eller (2003). "Effect of gamma-tocopherol on formation of nonvolatile lipid degradation products during frying of potato chips in triolein". Journal of the American Oil Chemists Society **80** (8): 801-806.
- Netscher, T. (1999). Synthesis and production of vitamin E. Lipid Synthesis and Manufacture, F.D. Gunstone, Sheffield Academic Press: 250-267.
- NF EN ISO 12228 (1999). Association Française de Normalisation, European norm, NF EN ISO 12228 May 1999; French norm T 60-258: Animal and vegetable fats and oils - Determination of individual and total sterols contents - Gas chromatographic method. AFNOR. Paris. 18 pp.
- NF EN ISO 659 (1998). Association française de normalisation, 1998. Norme européenne, NF EN ISO 659 d'octobre 1998; Norme française V 03-905: Graines oléagineuses. Détermination de la teneur en huile (Méthode de référence). AFNOR. Paris 14 + 3 pp.
- Nik, W. B. W., F. N. Ani, H. H. Masjuki and S. G. E. Giap (2005). "Rheology of bio-edible oils according to several rheological models and its potential as hydraulic fluid". Industrial Crops and Products **22** (3): 249-255.
- Niki, E. (2004). "Antioxidants and atherosclerosis". Biochemical Society Transactions **32**: 156-159.
- Niki, E. and N. Noguchi (2004). "Dynamics of antioxidant action of vitamin E". Accounts of Chemical Research **37** (1): 45-51.
- Nolasco, S. M., L. A. N. Aguirrezábal and G. H. Crapeste (2004). "Tocopherol oil concentration in field-grown sunflower is accounted for by oil weight per seed". Journal of American Oil Chemists Society **81** (11): 1045-1051.
- Normen, L., P. Dutta, A. Lia and H. Andersson (2000). "Soy sterol esters and beta-sitosterol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel". American Journal of Clinical Nutrition **71** (4): 908-913.
- NSA. (2008). "Types of fats and their profile". National sunflower association www.sunflowernsa.com. Retrieved 20 Feb.

O

- Orzechowski, A., P. Ostaszewski, M. Jank and S. J. Berwid (2002). "Bioactive substances of plant origin in food - impact on genomics". Reproduction Nutrition Development **42** (5): 461-477.
- Ostlund, R. E., S. B. Racette and W. F. Stenson (2003). "Inhibition of cholesterol absorption by phytosterol-replete wheat germ compared with phytosterol-depleted wheat germ". American Journal of Clinical Nutrition **77** (6): 1385-1389.

P

- Palta, J. P., B. D. Whitaker and L. S. Weiss (1993). "Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of *Solanum* species". Plant Physiology **103**: 793-803.
- Parant, B. (2001). "Colza and sunflower oils: a major source of supply for the surfactants of the future." OCL: Oléagineux, Corps Gras, Lipides **8** (2): 152-154.

- Patel, M. D. and P. D. Thompson (2006). "Phytosterols and vascular disease." Atherosclerosis **186**(1): 12-19.
- Pérez-Vich, B., J. M. Fernández-Martínez, M. Grondona, S. J. Knapp and S. T. Berry (2002a). "Stearoyl-ACP and oleoyl-PC desaturase genes cosegregate with quantitative trait loci underlying high stearic and high oleic acid mutant phenotypes in sunflower". Theoretical and Applied Genetics **104** (2-3): 338-349.
- Pérez-Vich, B., L. Velasco and J. Fernández-Martínez (1998). "Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by near-infrared reflectance spectroscopy". Journal of the American Oil Chemists Society **75** (5): 547-555.
- Pérez-Vich, B., R. Garcés and J. M. Fernandez-Martinez (2000). "Epistatic interaction among loci controlling the palmitic and stearic acid levels in seed oil sunflower". Theoretical and Applied Genetics **100**: 105-111.
- Pérez-Vich, B., R. Garcés and J. M. Fernández-Martínez (2002b). "Inheritance of medium stearic acid content in the seed oil of a sunflower mutant CAS-4". Crop Science **42** (6): 1806-1811.
- Peterson, D. M. and A. A. Qureshi (1993). "Genotype and environment effects on tocols of barley and oats". Cereal Chemistry **70** (2): 157-162.
- Phillips, K. M., D. M. Ruggio and M. Ashraf-Khorassani (2005). "Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States". Journal of Agricultural and Food Chemistry **53** (24): 9436-9445.
- Phillips, K. M., D. M. Ruggio, J. I. Toivo, M. A. Swank and A. H. Simpkins (2002). "Free and esterified sterol composition of edible oils and fats". Journal of Food Composition and Analysis **15**: 123-142.
- Prasad, K. N. and J. Edwards-Prasad (1982). "Effects of tocopherol (Vitamin E) acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in melanoma cells in culture". Cancer Research **42**: 550-555.
- Priestley, D. A., M. B. McBride and C. Leopold (1980). "Tocopherol and organic free radical levels in soybean seeds during natural and accelerated aging". Plant Physiology **66**: 715-719.
- PROLEA, FOP, CETIOM, ONIDOL and SOFIPROTEOL (2006). *Tournesol les techniques culturales, le contexte économique*. Paris, CETIOM eds.
- Psomiadou, E. and M. Tsimidou (2002). "Stability of Olive Oil. 1. Autoxidation Studies". Journal of Agricultural & Food Chemistry **50**: 716-721.
- Purdy, R. H. (1986). "High oleic sunflower: physical and chemical characteristics". Journal of the American Oil Chemists Society **63** (8): 1062-1066.
- Putnam, D. H., E. S. Oplinger, D. R. Hicks, B. R. Durgan, D. M. Noetzel, R. A. Meronuck, J. D. Doll and E. E. Schulte. (1990, 2000). "Sunflower". Alternative Field Crop Manual Purdue University. Retrieved Feb 2007, 2007.

Q

- Quiles, J. L., M. C. G. Ramirez-Tortosa, J.A., J. R. Huertas and J. Mataix (2002). "Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying". Food Chemistry **76** (4): 461-468.

R

- Rahate, A. R. and J. M. Nagarkar (2007). "Emulsification of vegetable oils using a blend of nonionic Surfactants for cosmetic applications". Journal of Dispersion Science and Technology **28** (7): 1077-1080.
- Ramaraj, B. (2007). "Crosslinked poly(vinyl alcohol) and starch composite films: Study of their physicochemical, thermal, and swelling properties". Journal of Applied Polymer Science **103** (2): 1127-1132.
- Riccioni, G., M. Barbara, T. Bucciarelli, C. di Ilio and N. D'Orazio (2007a). "Antioxidant vitamin supplementation in asthma". Annals of Clinical and Laboratory Science **37** (1): 96-101.
- Riccioni, G., M. Barbara, T. Bucciarelli, C. di Ilio, N. D'Orazio (2007a). "Antioxidant vitamin supplementation in asthma". Annals of Clinical and Laboratory Science **37** (1): 96-101.
- Riccioni, G., T. Bucciarelli, B. Mancini, C. Di Ilio, V. Capra and N. D'Orazio (2007b). "The role of the antioxidant vitamin supplementation in the prevention of cardiovascular diseases". Expert Opinion on Investigational Drugs **16** (1): 25-32.
- Roche, J. (2005). « Composition de la graine de tournesol (*Helianthus annuus* L.) sous l'effet conjugué des contraintes agri-environnementales et des potentiels variétaux. » Thèse n°2225 Sciences des Procédés Spécialité : Sciences des Agroressources. Institut National Polytechnique de Toulouse. Toulouse. p 305.

- Roche, J., A. Bouniols, Z. Mouloungui, T. Barranco and M. Cerny (2006). "Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components". European Journal of Lipid Science and Technology **108** (4): 287-297.
- Rocheford, T. R., J. C. Wong, C. O. Egesel and R. J. Lambert (2002). "Enhancement of vitamin E levels in corn". Journal of the American College of Nutrition **21** (3): 191S-198S.
- Romero, A., S. Bastida and F. J. Sanchez-Muniz (2006). "Cyclic fatty acid monomer formation in domestic frying of frozen foods in sunflower oil and high oleic acid sunflower oil without oil replenishment". Food and Chemical Toxicology **44** (10): 1674-1681.
- Rossi, M. (1988). "Textured sunflower portein for use as meat extender". Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology **21** (5): 267-270.
- Rouilly, A., A. Meriaux, C. Geneau, F. Silvestre and L. Rigal (2006). "Film extrusion of sunflower protein isolate". Polymer Engineering and Science **46** (11): 1635-1640.

S

- Sánchez-Muniz, F., A. Canales, J. Librelotto and M. Nus (2004). "Phytosterols, a double-edged weapon?" Grasas y Aceites **55** (3): 321-327.
- Sánchez-Pérez, A., M. M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel and J. Hernández-Méndez (2000). "Automated analysis of vitamin E isomers in vegetable oils by continuous membrane extraction and liquid chromatography-electrochemical detection". Journal of Chromatography A **881**: 229-241.
- Sato, T., A. Maw and M. Katsuta (2003). "NIR reflectance spectroscopic analysis of the FA composition in sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds". Journal of American Oil Chemists Society **80** (12): 1157-1161.
- Sato, T., A. Maw and M. Katsuta (2004). "Nondestructive near-infrared reflectance spectroscopic analyses of the major constituents of Sesame(*Sesamum indicum* L.) whole seeds with different coat color". Plant Production and Science **7** (3): 363-366.
- Sato, T., I. Uezono, T. Morishita and T. Tetsuka (1998). "Nondestructive estimation of fatty acid composition in seeds of *Brassica napus* L. by near-infrared spectroscopy". Journal of the American Oil Chemists Society **75** (12): 1877-1881.
- Sato, T., Y. Takahata, T. Noda, T. Yanagisawa, T. Morishita and S. Sakai (1995). "Nondestructive determination of fatty acid composition of husked Sunflower (*Helianthus annua* L.) seeds by near-infrared spectroscopy". Journal of American Oil Chemists Society **72** (10): 1177-1183.
- Sattler, S. E., L. U. Gilliland, M. Magallanes-Lundback, M. Pollard and D. DellaPenna (2004). "Vitamin E is essential for seed longevity, and for preventing lipid peroxidation during germination". Plant Cell **16** (6): 1419-1432.
- Schaller, H. (2003). "The role of sterols in plant growth and development". Progress in Lipid Research **42** (3): 163-175.
- Schaller, H. (2004). "New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants". Plant Physiology and Biochemistry **42** (6): 465-476.
- Schneider, C. (2005). "Chemistry and biology of vitamin E". Molecular Nutrition & Food Research **49** (1): 7-30.
- Schneider, M. P. (2006). "Plant-oil-based lubricants and hydraulic fluids". Journal of the Science of Food and Agriculture **86** (12): 1769-1780.
- Sheabutter. (2007). "Huile vierge de macadamia." www.huile.com/p.ficheMacadamia.fr.php. Retrieved 20 Feb, 20007.
- Shintani, D. and D. DellaPenna (1998). "Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering". Science **282** (5396): 2098-2100.
- Soll, J., G. Schultz, J. Joyard, R. Douce and A. Block (1985). "Localization and synthesis of Prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from Spinach chloroplasts". Archive of Biochemistry and Biophysics **238** (1): 290 - 299.
- Stevenson, D. G., F. J. Eller, L. Wang, J. L. Jane, T. Wang and E. Inglett (2007). "Oil and tocopherol content and composition of pumpkin seed oil in 12 cultivars". Journal of Agricultural and Food Chemistry **55** (10): 4005-4013.
- Stone, W. L., I. LeClair, T. Ponder, G. Baggs and B. B. Reis (2003). "Infants discriminate between natural and synthetic vitamin E". American Journal of Clinical Nutrition **77** (4): 899-906.
- St-Onge, M. P. and P. J. H. Jones (2003). "Phytosterols and human lipid metabolism: Efficacy, safety, and novel foods". Lipids **38** (4): 367-375.
- Sudhop, T., Y. Sahin, B. Lindenthal, C. Hahn, C. Lüers, H. K. Berthold and K. Von Bergmann (2002). "Comparison of the hepatic clearances of campesterol, sitosterol, and cholesterol in healthy subjects suggests that efflux transporters controlling intestinal sterol absorption also regulate biliary secretion". Gut **51**: 860-863.

Szlyk, E., A. Szydlowska-Czerniak and A. Kowalczyk-Marzec (2005). "NIR spectroscopy and partial least-squares regression for determination of natural alpha-tocopherol in vegetable oils". Journal of Agricultural and Food Chemistry **53** (18): 6980-6987.

T

- Tammela, P., A. Hopia, R. Hiltunen, H. Vuorela and M. Nygren (2000). "Aging in *Pinus sylvestris* L. seeds: changes in viability and lipids". Biochemical Society Transactions **2**: 878-879 Part 876.
- Tang, S., C. G. Hass and S. J. Knapp (2006). "Ty3/gypsy-like retrotransposon knockout of a 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinone methyltransferase in non-lethal, uncovers a cryptic paralogous mutation, and produces novel tocopherol (vitamin E) profiles in sunflower". Theoretical and Applied Genetics **113**: 783-799.
- Tang, S., D. M. Tekrony, D. B. Egli, P. L. Cornelius and M. Rucker (1999). "Survival Characteristics of Corn Seed during Storage
- Tapiero, H., D. M. Townsend and K. D. Tew (2003). "Phytosterols in the prevention of human pathologies." Biomedicine and Pharmacologie **57**: 321-325.
- Tasan, M., Demirci, M. (2005). "Total and individual tocopherol contents of sunflower oil at different steps of refining". European Food Research and Technology **220** (3-4): 251-254.
- Thanh, T. T., M. F. Vergnes, J. Kaloustian, T. F. El-Moselhy, M. J. Amiot-Carlin and H. Portugal (2006). "Effect of storage and heating on phytosterol concentrations in vegetable oils determined by GC/MS". Journal of the Science of Food and Agriculture **86** (2): 220-225.
- Toivo, J., K. Phillips, A. M. Lampi and V. Piironen (2001). "Determination of Sterols in Foods : Recovery of Free, Esterified, and Glycosidic Sterols". Journal of Food Composition and Analysis **14**: 631-643.
- Trautwein, E. A., G. Duchateau, Y. G. Lin, S. M. Mel'nikov, H. O. F. Molhuizen and F. Y. Ntanos (2003). "Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols". European Journal of Lipid Science and Technology **105** (3-4): 171-185.
- Triki, S., J. Ben Hamida and P. Mazliak (1997). "Study of the metabolism of lipid reserves in ripening sunflower seeds: a tracing experiment with 1-C-14 acetate". OCL: Oléagineux, Corps Gras, Lipides **4** (6): 451-458.
- Tucker, J. M. and D. M. Townsend (2005). "Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease". Biomedicine & Pharmacotherapy **59** (7): 380-387.

U-V

- USDA. (2004). "Nutrient Database for standard reference - Sunflower kernel composition." Nutrient Data laboratory <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>. Retrieved 18 Feb 2008.
- USDA. (2008). "World crop production summary." www.fas.usda.gov. Retrieved April, 2008.
- Valentin, H. E. and Q. G. Qi (2005). "Biotechnological production and application of vitamin E: current state and prospects". Applied Microbiology and Biotechnology **68** (4): 436-444.
- Van Eenennaam, A. L., G. F. Li, M. Venkatramesh, C. Levering, X. S. Gong, A. C. Jamieson, E. J. Rebar, C. K. Shewmaker and C. C. Case (2004). "Elevation of seed alpha-tocopherol levels using plant-based transcription factors targeted to an endogenous locus". Metabolic Engineering **6** (2): 101-108.
- Van Eenennaam, A. L., K. Lincoln, T. P. Durrett, H. E. Valentin, C. K. Shewmaker, G. M. Thorne, J. Jiang, S. R. Baszis, C. K. Levering, E. D. Aasen, M. Hao, J. C. Stein, S. R. Norris and R. L. Last (2003). "Engineering vitamin E content: From Arabidopsis mutant to soy oil". Plant Cell **15** (12): 3007-3019.
- Van Eenennaam, A. L., K. Lincoln, T. P. Durrett, H. E. Valentin, C. K. Shewmaker, G. M. Thorne, J. Jiang, S. R. Baszis, C. K. Levering, E. D. Aasen, M. Hao, J. C. Stein, S. R. Norris and R. L. Last (2003). "Engineering vitamin E content: From Arabidopsis mutant to soy oil". Plant Cell **15** (12): 3007-3019.
- Vandamme, E. J. (1992). "Production of Vitamins Coenzymes and Related Biochemicals by Biotechnological Processes". Journal of Chemical Technology and Biotechnology **53**: 313-327.
- Vear, F. (1992). Le tournesol. Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection. A. Gallais and Bannerot. Paris, Institut National de la Recherche Agronomique: 146-160.
- Vear, F. and D. Tourvieille de Labrouhe (1988). "Heredity of resistance to Sclerotinia sclerotiorum in sunflowers. II. Study of capitulum resistance to natural and artificial ascospore infections". Agronomy for Sustainable Development **8** (6): 503.
- Vear, F., D. Tourvieille de Labrouhe and J. F. Miller (2003). "Inheritance of the wide-range downy mildew resistance in the sunflower line RHA 419." Helia **26** (39): 19-24.

- Vear, F., H. Bony, G. Joubert, D. T. de Labrouhe, I. Pauchet and X. Pinochet (2003). "30 years of sunflower breeding in France". OCL-Oleagineux Corps Gras Lipides **10** (1): 66-73.
- Velasco, L., B. Pérez-Vich and J. Fernández-Martínez (1999). "Nondestructive screening for oleic and linoleic acid in single sunflower achenes by near-infrared reflectance spectroscopy". Crop Science **39** (1): 219-222.
- Velasco, L., B. Pérez-Vich and J. M. Fernández-Martínez (2004a). "Novel variation for the tocopherol profile in a sunflower created by mutagenesis and recombination". Plant Breeding **123** (5): 490-492.
- Velasco, L., B. Pérez-Vich and J. M. Fernández-Martínez (2004c). "Development of sunflower germplasm with high delta-tocopherol content". Helia **27** (40): 99-106.
- Velasco, L., J. M. Fernández-Martínez, R. García-Ruiz and J. Domínguez (2002). "Genetic and environmental variation for tocopherol content and composition in sunflower commercial hybrids". Journal of Agricultural Science **139**: 425-429.
- Velasco, L., J. M. Fernández-Martínez, R. García-Ruiz and J. Domínguez (2002). "Genetic and environmental variation for tocopherol content and composition in sunflower commercial hybrids". Journal of Agricultural Science **139**: 425-429.
- Vera-Ruiz, E. M., L. Velasco, A. J. León, J. M. Fernández-Martínez and B. Pérez-Vich (2006). "Genetic mapping of the *Tph1* gene controlling beta-tocopherol accumulation in sunflower seeds". Molecular Breeding **17** (3): 291-296.
- Verleyen, T. (2002). Stability of minor components during vegetable oil refining. Applied biological sciences: chemistry. University of Gent. Gant. 277.
- Verleyen, T., R. Verhe, L. Garcia, K. Dewettinck, A. Huyghebaert and W. De Greyt (2001). "Gas chromatographic characterization of vegetable oil deodorization distillate". Journal of Chromatography A **921** (2): 277-285.
- Villacorta, L., A. V. Graça-Souza, R. Ricciarelli, J. M. Zingg and A. Azzi (2003). "Alpha-tocopherol Induces Expression of Connective Tissue Growth Factor and Antagonizes Tumor Necrosis Factor-alpha-Mediated Downregulation in Human Smooth Muscle Cells". Circulation Research **92**: 104 - 110.
- Vlahakis, C. and J. Hazebroek (2000). "Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting location, and temperature". Journal of the American Oil Chemists Society **77** (1): 49-53.
- Von Bergmann, K., T. Sudhop and D. Lütjohann (2005). "Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights". The american journal of cardiology **96** (1A): 10D-14D.

W

- Wagner, K. H., A. Kamal-Eldin and I. Elmadfa (2004). "Gamma-Tocopherol - An Underestimated Vitamin?" Annals of Nutrition and Metabolism **48**: 169-188.
- Wagner, K. H., B. Isnardy and I. Elmadfa (2003). "Effects of seed damage on the oxidative stability of poppy seed oil". European Journal of Lipid Science and Technology **105** (5): 219-224.
- Wang, S., K. Kanamaru, W. Li, J. Abe, T. Yamada and K. Kitamura (2007). "Simultaneous accumulation of high contents of α -tocopherol and lutein is possible in seeds of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)". Breeding science **57**: 297-304.
- Warner, K. and T. L. Mounts (1990). "Analysis of Tocopherols and Phytosterols in Vegetable Oils by HPLC with Evaporative Light-Scattering Detection". Journal of the American Oil Chemists Society **67** (11): 827-831.
- Warner, K. (2005). "Effects on the flavor and oxidative stability of stripped soybean and sunflower oils with added pure tocopherols". Journal of Agricultural and Food Chemistry **53** (26): 9906-9910.
- Warner, K., B. A. Vick, L. Kleingartner, R. Isaak and K. Doroff (2006). "Compositions of sunflower, nusun (mid-oleic sunflower) and high oleic sunflower."
- Warner, K., W. E. Neff and F. J. Eller (2003). "Enhancing quality and oxidative stability of aged fried food with gamma-tocopherol". Journal of Agricultural and Food Chemistry **51** (3): 623-627.
- Weiser, H., G. Riss and A. F. Kormann (1996). "Biodiscrimination of the eight alpha- tocopherol stereoisomers results in preferential accumulation of the four 2R forms in tissues and plasma of rats". Journal of Nutrition **126** (10): 2539-2549.
- Wurst, S., D. Dugassa-Gobena and S. Scheu (2004). "Earthworms and litter distribution affect plant-defensive chemistry". Journal of Chemical Ecology **30** (4): 691-701.

Y-Z

- Yamada, K. and N. Toshitaka (2002). "Therapeutic approaches to the treatment of alzheimer's disease". Drugs of Today **38** (9): 631-637.

- Yoshida, Y. and E. Niki (2003). "Antioxidant effects of phytosterol and its components". Journal of Nutritional Science and Vitaminology **49** (4): 277-280.
- Zacheo, G., A. R. Cappello, L. M. Perrone and G. V. Gnoni (1998). "Analysis of factors influencing lipid oxidation of almond seeds during accelerated ageing". Food science and technology-lebensmittel-Wissenschaft & technologie **31** (1): 6-9.
- Zacheo, G., M. S. Cappello, A. Gallo, A. Santino and A. R. Cappello (2000). "Changes associated with post-harvest ageing in almond seeds". Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology **33** (6): 415-423.
- Zangerberg, M., H. B. Hansen, J. R. Jorgensen and L. I. Hellgren (2004). "Cultivar and year-to-year variation of phytosterol content in rye (*Secale cereale* L.)". Journal of Agriculture and Food Chemistry **52** (9): 2593-2597.
- Zhang, H. Y., T. Vasanathan and M. Wettasinghe (2007). "Enrichment of tocopherols and phytosterols in canola oil during seed germination". Journal of Agricultural and Food Chemistry **55** (2): 355-359.
- Zhou, W. X., Z. H. Song, R. Kanagasabai, J. L. Liu, P. Jayasimha, A. Sinha, P. Veeramachanemi, M. B. Miller and W. D. Nes (2004). "Mechanism-based enzyme inactivators of phytosterol biosynthesis". Molecules **9** (4): 185-203.
- Zock, P. L. and M. B. Katan (1998). "Linoleic acid intake and cancer risk: a review and meta-analysis". American Journal of Clinical Nutrition **68**: 142-153.

Sources internet

- www.1001huiles.fr (2008). "Composition des huiles." Retrieved 20/02/2008.
- www.cyberlipid.org. (2005). "Vitamin E." Retrieved 24/02/2005.
- www.foodscience.az.nz (2007). "Amande douce ». www.foodscience.az.nz. Retrieved 15/07/2007

ANNEXES

ANNEXE 1

Mise en place d'un essai dans des conditions contrôlées / Impact d'un stress thermique sur le remplissage de la graine en composés mineurs.

Rappels des objectifs de cette étude

L'objectif de cette étude est de connaître l'influence de la température lors du remplissage de la graine à différents stades sur la teneur finale en tocophérols et en phytostérols.

Conditions de culture

Lumière: En serre, les lampes sont allumées périodiquement (6-10h et 16-20h) afin d'augmenter le nombre de degrés jour et la température ambiante pour limiter l'étiolation des jeunes plantes. En phytotron, le cycle de lumière-obscurité est de 14h vs 10h. La mesure de l'intensité lumineuse est réalisée en serre et dans les phytotrons à l'aide d'un luxmètre (LI-250A, Eurosep instruments, Saint Chamond, France).

Température: En serre, la température est contrôlée deux fois par jour (7h et 16h) pendant toute la durée de l'expérience. Les phytotrons sont réglés en position « normal » (25°C le jour /18°C la nuit) ou en position « stress » (35°C le jour /25°C la nuit).

Humidité: 80% d'humidité relative en conditions normales et à 60% en conditions de stress.

Étapes de croissance

Différentes étapes de croissance ont été différenciées :

Phase 1: Dans une chambre de culture, les semences des 2 hybrides (120 graines / hyb.) ont été mises à la germination sur du papier filtre humidifié pendant 10 jours sans lumière (21°C, Humidité: 100%).

Phase 2: Les semences germées ont été transférées par deux dans des pots (ϕ 7cm) avec du terreau spécial semis et les pots ont été installés dans le phytotron pendant 3 semaines dans des conditions normales.

Phase 3 : Les plantules, suffisamment développées ont été transférées individuellement dans des pots de 30 cm de diamètre (une par pot) avec un mélange de terreau et d'engrais. Les pots ont été placés dans la serre.

Phase 4 : Les plantes ont été placées alternativement dans les phytotrons, selon le Calendrier d'introduction dans le phytotron des différents groupes en fonction de la date de floraison des plantes (c.f. Tableau I)

Phase 5 : Une fois que les plantes ont eu une humidité entre 9 et 12%, les graines ont été récoltées. Seuls les 3 cercles extérieurs du capitule ont été pris pour avoir une homogénéité entre les graines.

Tableau I. Calendrier des stress des différents groupes en fonction de la date de floraison des plantes GH : serre ; PH : phytotron

Témoin	GH	GH	GH	GH	GH	GH	GH
Groupe 1	GH	PH	GH	GH	GH	GH	GH
Groupe 2	GH	GH	GH	PH	GH	GH	GH
Groupe 3	GH	GH	GH	GH	GH	PH	GH

Notations

Stade B1-B2 (première paire de feuilles) (CETIOM, *et al.*, 2000):

- Jours pour sortir dans les pots
- Germination (%)

Stade B4-B6 (4-6 feuilles):

- Homogénéité de la levée, mesure de l'internoeud
- Notation de la date lorsque la moitié des plantes ont 4-6 vraies feuilles
- État sanitaire des plantes (maladies, insectes, phytotoxicité)
- Mesure journalière de la durée jour/nuit, de la température et de la luminosité (3 fois par jour)

Stade E2-E4 (séparation du bouton florale):

- Date de séparation du bouton pour 50% des plantes
- État sanitaire des plantes (maladies, insectes, phytotoxicité)
- Hauteur des plantes

Stade F1 (floraison):

- Date de floraison de chaque plante
- État sanitaire des plantes (maladies, insectes, phytotoxicité)
- Mesure de la surface foliaire

Stade M1-M4 (maturation):

- État sanitaire des plantes (maladies, insectes, phytotoxicité)
- Séchage prématuré
- Date de récolte

ANNEXE 2

Comparaison des méthodes d'extraction Soxhlet & Accelerated Solvent Extractor (ASE).

L'objectif de cette étude a été de déterminer la validité de l'extraction par ASE en comparaison avec la méthode de référence par Soxhlet en estimant la répétabilité de ces deux types d'extraction par rapport à la teneur en tocophérols et en phytostérols par les analyses standardisées.

Tout d'abord, la combinaison des paramètres optimaux pour l'ASE ont été déterminés puis des répétitions sur les analyses pour comparer avec la méthode par extraction au Soxhlet ont été réalisées.

Matériel et Méthode

Un plan d'expériences de Taguchi a été établi selon les conditions du tableau 1. 3 répétitions par combinaison du plan L27 ont été réalisées par ASE et 6 répétitions par soxhlet sur un même échantillon.

Tableau 1. Conditions d'extraction à l'ASE définies pour déterminer les conditions optimums selon un plan d'expériences Taguchi.

Conditions d'extraction à l'ASE			
Température (°C)	100	Temps d'extraction (min)	5
	110		10
	120		15
Solvant	Hexane	Sable (%)	0
	Hexane 95%, Isopropanol 5%		25
	Ether de pétrole		50

A partir de la combinaison présentant les paramètres optimaux, deux hybrides commerciaux de tournesol : Melody (M) et Prodisol (P) ayant une teneur en tocophérols respectivement faible et forte ont été mélangés dans différentes proportions (100% P ; 80% P et 20% M ; 60% P et 40% M ; 40% P et 60% M ; 20% P et 80%M ; et 100% M). Neuf extractions d'huile par mélange ont été effectuées : 6 par ASE et 3 par soxhlet. Chaque huile a été caractérisée pour sa teneur en huile, ses teneurs en tocophérols et en phytostérols. Les erreurs standards des moyennes ont été calculées en regroupant par méthode d'extraction les écart-types des répétitions de mesures.

Résultats

Le tableau III montre les différences en pourcentage d'huile extraite et la teneur totale en tocophérols pour chaque paramètre d'extraction par la méthode ASE. Les valeurs (en rouge) maximisant la teneur totale en tocophérols ont été retenues pour la suite de l'étude. En résumé, la cellule d'extraction est préparée en mélangeant $\frac{3}{4}$ de graines broyées avec $\frac{1}{4}$ de sable. L'extraction est réalisée pendant 10 minutes à 120°C avec un mélange hexane- isopropanol (95 :5 v/v).

Tableau III. Valeurs moyennes des différentes conditions d'extraction calculées à partir d'un plan d'expérience de Taguchi

Conditions d'extraction		% Huile	Teneur totale en tocophérols (mg/kg huile)
Soxhlet		48,50%	463,13
Température (°C)	100	-0,60%	-9,67
	110	1,35%	-7,80
	120	-0,75%	17,47
Solvant	Hexane	0,30%	-7,54
	Hexane 95%, Isopropanol 5%	0,37%	3,55
	Ether de pétrole	-0,67%	3,99
Temps d'extraction (min)	5	-0,12%	6,93
	10	-0,73%	-8,08
	15	0,85%	1,15
Sable (%)	0	0,81%	-2,44
	25	-0,56%	4,04
	50	-0,25%	-1,59
Plan d'expérience de Taguchi : résultats ASE			
Moyenne Générale		45,07%	394,04
Somme générale		5,49	4192244,44
SC température		0,25%	4135,93
Somme des carrés: Solvants		0,06%	768,92
Somme des carrés: Température		0,11%	1031,84
Somme des carrés: % Sable		0,09%	223,18
Somme des carrés: Totale		2,53%	15731,82
Somme des carrés: Résiduel		2,01%	9571,94

A partir de cette méthode par ASE optimisée, les tests de répétabilité ont été mis en place. Les résultats montrent qu'il existe une différence significative sur le rendement en huile lié aux différentes conditions d'extraction, l'erreur commise lors de l'extraction par la méthode au Soxhlet est supérieure à celle commise par la méthode ASE (Figure 1, Tableau IV).

L'étude des différents mélanges montrent une diminution régulière de la teneur totale en tocophérols ; plus la teneur en Melody augmente et moins le mélange présente de tocophérols. Cette technique d'extraction par ASE n'affecte pas la teneur totale en tocophérols. Il n'y a pas de différence significative entre les deux méthodes d'extraction pour la détermination de la teneur en tocophérols (Figure 1, Tableau IV).

Cependant, l'analyse des résultats pour la teneur en phytostérols montrent que les échantillons choisis ne permettent pas de donner de conclusions aussi affirmatives que pour les tocophérols. En effet, l'ensemble des mélanges étudiés présentent des teneurs en phytostérols qui ne sont pas

significativement différentes. Cependant, les deux techniques d'extraction n'affectent pas la teneur totale. Afin de compléter cette étude, il serait nécessaire de trouver deux échantillons dont les teneurs en phytostérols sont significativement très différentes pour valider l'analyse des stérols par CPG et connaître l'erreur analytique commise.

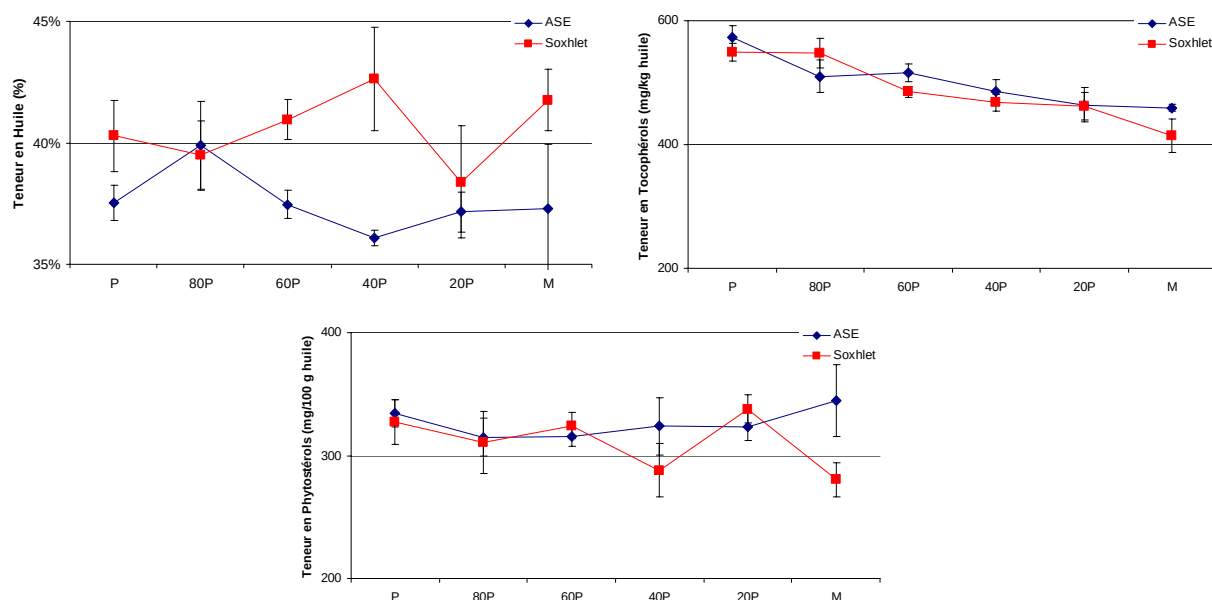


Figure 1. Comparaison des rendements d'extraction d'huile (%) et des teneurs totales en tocophérols (mg/kg huile) et en phytostérols (mg/100g huile) entre la méthode ASE et la méthode Soxhlet de 6 mélanges constitués de différentes proportions des variétés Melody et Prodisol

Tableau 3 Moyennes des carrés de l'ANOVA réalisée sur 54 extractions de 6 mélanges par ASE et Soxhlet pour le rendement en huile, la teneur en α -, β - et totale en tocophérols (mg/kg huile) et pour la teneur en campésterol, stigmasterol, β -sitostérol et phytostérols totaux (mg/100g huile).

	d.l	Huile	Total-T	α -T	β - T	Total-P	Camp.	Stig.	B-sito.
Mélange	5	0,000	16347*	15180*	20	855,3	12	10	400
Extraction	1	0,010*	2152	1169	167**	2484	36	30	1119
Mél. x Ext	5	0,001	1554	1461	7	1607	15	9	764
Erreur	35	0,001	1752	1592	15	1184	15	9	549
E-type e		<0	385,9	352,1	-	250,5	3,1	1,9	117,2

; d.l. : degré de liberté ; * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

Conclusion

L'extraction par ASE offre la possibilité d'accélérer les analyses des tocophérols et des phytostérols en apportant de la sécurité lors de la manipulation ainsi qu'une réduction du temps de travail et de la consommation de solvants sans altérer la teneur et la composition finales en ces composés mineurs par rapport aux méthodes de référence.

Variability of tocopherols and phytosterols in sunflower hybrids

*Alicia Ayerdi-Gotor, Anne Calmon, Monique Berger,
Françoise Labalette, Laurence Klein*

Introduction

Phytosterols have the same basic structure as cholesterol and they were seemed to reduce total and low density lipoprotein cholesterol levels as well as to inhibit colon cancer development. Vitamin E (tocols) has long been recognized as a classic free radical scavenging antioxidant and the alpha-tocopherol isomer is considered more desirable for human and animal consumption because it presents a high biological activity. Indeed, vitamin E has been used for prevention of age-related diseases, including cardiovascular disease and Alzheimer's disease. These potential utilizations have driven research to determine sterols and vitamin E productions from plant sources. The aim of the present work was to investigate the variation of phytosterol and tocopherol content and composition in sunflower oil between different genotypes and locations.

Materials and methods

Sunflower hybrids samples

Eleven common sunflower hybrids were grown at three locations in the south of France: two near Toulouse (Mondonville and St Sauveur - 31) and one in the north of Montauban (Caussade - 81) during 2003. As sunflower is an allogamic plant, all inflorescences were bagged to anthesis, to prevent cross-pollination between sunflowers. Only the three outer rows of six inflorescences

were collected, freeze-dried and pooled in order to conserve plant material from the same development stage.

Chemical analysis of achenes

Solvent extraction of lipids

The analysis of the total oil content was performed by hexane extraction using a soxhlet extractor apparatus. Fifty grams of achenes were grounded and placed in a cartridge. The grounded achenes were submitted to hexane extraction for 4 hours. Then, the extraction solvent was removed from the extracts under low pressure evaporation. Lipid extracts were weighed and conserved at -18°C before tocopherol analyses.

Tocopherol determination

Complete separation of all native tocopherols was achieved using a high-performance liquid chromatography (HPLC) (SpectraPhysics; TSP, USA). A normal-phase LiChrosorb Si60 (250cm x 4mm x 5µm; Cluzeau) was used. The eluate was monitored with a fluorescence detector (excitation wavelength = 298nm and emission wavelength = 330 nm). One gram of oil sample was diluted in hexane and injected directly into the HPLC.

Tocopherols were identified by comparison of retention times with respective standards (Tocopherol Kit; ChromaDex, USA). Total tocopherol content was calculated as the sum of α -, β -, γ - and δ - tocopherol contents.

Sterol determination

The total and individual sterol content were analysed by gas chromatography after a preparation with trimethylsilyl (TMS) ether derivatives. 1 µl of the TMS solutions were injected into a silica capillary column in a gas chromatography (Hewlett-Packard) fitted with a flame ionisation detector. Sterols were identified using the ratio obtained between betulin (internal standard, Sigma Aldrich) and respective standards β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, avenasterol; Phytosterol kit; ChromaDex, USA).

Statistical analysis

The data were statistically analyzed using Microsoft Statistica. A two-factors analysis of variance (ANOVA) was performed to determine the relationships between total tocopherol content, α -tocopherol, hybrids and planting location.

Results and discussion

Effects of planting location and genotype

The tocopherol content in analyzed oil from ten sunflower hybrids that were grown at three different locations is shown in figure 1.

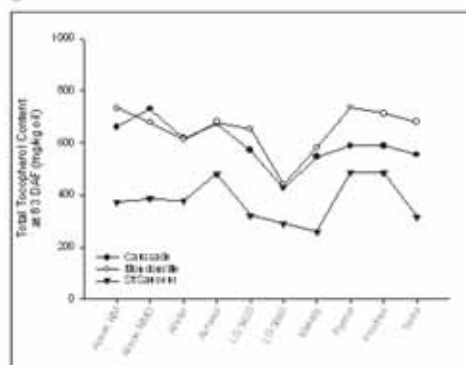


Figure 1. Tocopherol contents of oil fractions of ten sunflower hybrids according to three different planting locations

Total tocopherol concentration was ranged from 261 to 770 mg.kg⁻¹ in sunflower oil. As

expected, the tocopherol composition was largely composed of α -tocopherol, which accounted for 90,4% to 98,5% of the total tocopherol; β -, γ - and δ - tocopherol were not present in significant amounts in sunflower oil.

The difference between locations could be due to the difference of crop management technics. All inflorescences were bagged to anthesis, to prevent cross-pollination between sunflowers and after pollination all bags are take out. But for St Sauveur all bags are stayed on the inflorescences until maturation. So during the seed maturation, the temperature in the bag was higher and degraded the tocopherol content. Dolde, et al. [1] have shown that tocopherol content decreases with high temperatures for soybean in growth chambers.

For the phytosterol composition, it was largely composed of β -sitosterol accounted for 57-65% of the total phytosterols, followed by campesterol and stigmasterol. There is also a difference between total phytosterol contents and locations (figure 2). But, total phytosterols levels increased with higher temperature (St Sauveur). These results are in accordance with results on soybean [2].

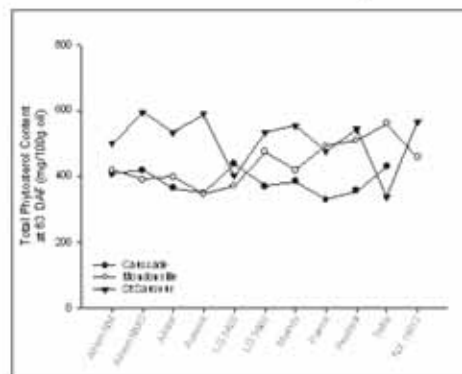


Figure 2. Phytosterol contents of oil fractions of sunflower hybrids according to three different planting locations.

Composition also changed with locations. ANOVA (table 1) reveals that both genetic and planting location significantly affect

Table 1. Analysis of variance for ten hybrids sunflower at three locations
a ANOVA : df, degrees of freedom; SS, sum of squares; MS, mean square; F, test statistic; * $P < 0,01$.

Source of variation	df	Total Tocophérols			Total Phytostérois		
		SS	MS	F	SS	MS	F
Location	2	1212324	606162	319,5*	374167	187083	55,5*
Hybrid	9	843992	71555	37,8*	126481	14053	4,2*
Location x Hybrid	18	153053	8503	4,5*	217014	12056	3,6*
Error	83	157468	1897		280027	3374	

tocopherol contents. For α -tocopherol and total tocopherol contents, location planting has the greater effect. Furthermore, the {location x genotype} interaction is significant but a small percentage of the variance is associated to this interaction. Total phytosterol is also affected by location but the differences are less important than tocopherol contents.

Conclusion

This study shows that tocopherol and phytosterol contents varied in the sunflower oil and this variability was due to both the genetic of the plants and environmental factors.

Further investigations about the determination of tocopherol and phytosterol contents on parent lines will contribute to understand if it is possible to increase tocopherol content by selection breeding.

Acknowledgement

The authors thank Caussade semences, Maïsador semences, Monsanto Deklab, RAGT, Soltis, Syngenta Seeds for field experiments and sunflower plant material providing.

Financial support was provided by Association Inter-professionnelle du Développement des Semences du Sud Ouest (ASEDIS-SO), ONIDOL (French Oil seeds organization) and Midi-Pyrénées Region (Pôle Lipo-oléochimie).

We also thank

Cognis-France for their technical support.

References

1. Dolde D., Vlahakis D., Hazebroek J. *Tocopherols in breeding lines and effects of planting location, fatty acid composition, and temperature during development*. Journal of the American Oil Chemists Society, **76** (3), 349-355, 1999.
2. Vlahakis C., Hazebroek J. *Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting location, and temperature*. Journal of the American Oil Chemists Society, **77** (1), 49-53, 2000.

The authors

Alicia Ayerdi-Gotor, Anne Calmon,
Monique Berger
Laboratoire d'Agro-Physiologie
ESA Purpan
BP 57611
31076 Toulouse Cedex 3 - France.
e-mail : anne.calmon@esa-purpan.fr

Françoise Labalette
ONIDOL
12 avenue George V
75 008 Paris, France

Laurence Klein
ASEDIS-SO,
39 chemin Virebent, France

Estimation of breeding potential for tocopherols and phytosterols in sunflower

Alicia Ayerdi Gotor¹, Monique Berger¹, Françoise Labalette², Sylvie Centis³, Jean Daydé¹, Anne Calmon¹

¹E.I. Purpan, Laboratoire d'Agro-Physiologie, 75 voie du TOEC, BP 57611, 31076 Toulouse, France, alaygo@hotmail.com; monique.berger@purpan.fr; jean.dayde@purpan.fr; anne.calmon@purpan.fr

²ONIDOL, 12 Av. Georges V Paris 75008, France, f.labalette@prolea.com

³ASEDIS-SO, 39 chemin Virebent, Toulouse 31200, France, sylvie.centis.aubay@gnis.fr

ABSTRACT

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil is a good source of tocopherols and phytosterols, interesting bioactive molecules with beneficial health effects. The objective of this work was to determine the possibility of breeding sunflowers with improved oil quality for these traits. Seven B lines (females) and seven R lines (males) were crossed to obtain 49 F₁ hybrids progenies. The F₁ hybrids were then grown for two consecutive years (2005 and 2006) on six locations / year. General combining abilities (GCA) for total tocopherol content were higher than for the total phytosterol content. In both B and R parental lines, there was a positive correlation between the parental lines values and their GCA for total tocopherol content, suggesting additive effects and the possibility of genetic gain for this parameter. This was not the case for total phytosterol content, which displayed important year effects on GCA. The specific combining abilities (SCA) were very important, particularly the negative ones, for the total tocopherol content indicating that some dominance effects could change the predicted hybrid performance. The results of this study indicate the existence of genetic variance for total tocopherol content, but phytosterol content variability is lower than that of tocopherols and subjected to year interactions.

Key words: breeding – GCA – phytosterols – tocopherols – sunflower.

INTRODUCTION

Several studies have shown that tocopherols and sterols can have many positive health effects: they prevent cancer (Bramley et al., 2000), reduce blood cholesterol level (von Bergmann et al., 2005; Patel and Thompson, 2006) and they are effective antioxidants (Niki and Noguchi, 2004). An increasing interest in such active molecules has promoted research in the natural sources of these substances. Tocopherols are lipid antioxidants, vitamin E-active substances, with four isomers (α -, β -, γ -, and δ -tocopherol) with species-dependent proportions. Naturally, sunflower oil has more than 95% of α -tocopherol (Ayerdi Gotor et al., 2006a), the most efficient Vitamin E bioactive tocopherol homologue. In literature, references can be found on sunflower tocopherol mutants with a high content in β -, δ -, or γ -tocopherol (Velasco et al., 2004a,b; Demurin et al., 2007). The total content can vary between 300 to 1873 mg·kg⁻¹ of oil (Demurin et al., 1996; Velasco et al., 2002; Nolasco et al., 2006). Phytosterol content in sunflower oil varies from 200 to 700 mg·100g⁻¹ of oil (Vlahakis and Hazebroek, 2000; Ayerdi Gotor et al., 2007) and β -sitosterol is the major form (40-60%).

Genotype as well as environment can influence the total tocopherol content in sunflower oil. Temperature is one of the most influential environmental factors (Velasco et al., 2002; Ayerdi Gotor et al., 2006b; Nolasco et al., 2006). Phytosterols content is less influenced by genotype or by environmental factors (Ayerdi Gotor et al., 2006b; Roche et al., 2006).

In spite of the growing importance of tocopherols and phytosterols as micronutrients and as natural oil stabilizers, few studies have focused on breeding programs for these minor components in oilcrops, especially on sunflower. It has been shown in rapeseed that genetic progress is possible for the oil tocopherol content (Goffman and Becker, 2001a,b). In these studies, tocopherol content and composition inheritances were highly associated with additive gene action.

Breeding for tocopherol and phytosterol contents can increase the market value of sunflower oil by means of health-promoting effects associated with these nutrients. The objective of the present study was to determine the feasibility of breeding for these molecules in sunflower oil.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Seven restorers (males) and seven females (cytoplasmic male sterile) parental lines of sunflower, *Helianthus annuus* L., were selected for their high and low tocopherol and phytosterol content. The F₁ hybrids seeds were produced in a 7 X 7 factorial design (NCII). Crosses were made in Chile during winter 2005. Three of the 49 hybrids formed were not viable and produced no seed. The fourteen parental lines were provided by six sunflower breeders: Caussade semences, Maïsadour semences, Monsanto Dekalb SAS, RAGT-R2n, Soltis and Syngenta seeds.

Field trials

The progenies (from grains F₁) were cultivated in the summers of 2005 and 2006 in six different places throughout France (Table 1), with two blocks in each place. Hybrids were randomized in the blocks to limit the effect of interactions between plants. Just before flowering, the buds were covered with microperforated bags to ensure self-pollinated achenes; these bags were taken away at the end of flowering. F₂ achenes from F₁ plants were collected at maturity, the lab samples (for analysis) were made with 5 plants from the same plot.

Table 1. F₂ hybrid growing places in 2005 and 2006.

Breeder company	Place (French department)	Geographical location
Caussade semences	Cayrac (81)	44°6'N 1°28'E
Maïsadour semences	Conan (41)	47°48'N 1°15'E
Monsanto Dekalb SAS	Savenès (82)	43°49' N 1°11'E
RAGT-R2n	Villampuy (28)	48°2'N 1°30'E
Soltis	Mondonville (31)	43°40'N 1°17'E
Syngenta seeds	Saint sauveur (31)	43°45'N 1°24'E

*Chemical analysis**Oil extraction*

Grains were ground in a sample mill (KnifeTec 1095; Foss Tecator AB, Sweden) for 2 periods of 10 s. Around 15 g of ground seeds were placed in a 33ml cartridge with Fointainebleu sand for extraction in an accelerated solvent extractor apparatus (ASE-200, Dionex, France) with the following extraction conditions: 120°C, 10 min of static extraction, 95% Hexane (n-hexane Prolabo-Subra, France) and 5% Propanol-2 (HPLC grade, SDS, France) under a pressure of 100 bar. Oil was recovered after solvent evaporation under low pressure with a rotavapor (HS 40 Huber, Bioblock Scientific, Heildolph, Germany). Lipid extracts were weighed and conserved at -18°C to minimize oxidative reactions before analysis.

Tocopherol determination

Complete separation of all native tocopherols was achieved using high-performance liquid chromatography (HPLC) (SpectraPhysics; TSP, USA) (ISO 9936, 1997). A normal-phase LiChrosorb Si60 column was used. The mobile phase was hexane/isopropanol (99.7:0.3 v/v) and the solvent flow was 1 mL/min. One gram of oil sample was diluted in 25 mL of hexane and 20 µL were injected. Tocopherols were identified by comparison of retention times with their respective standards (Tocopherol Kit; ChromaDex, USA). Total tocopherol content was calculated as the sum of α -, β -, γ - and δ -tocopherol contents and expressed in mg kg⁻¹ oil.

Phytosterol determination

The analyses of sterol required a saponification with KOH 0.5M and a purification on an aluminium oxide basic (Panreac, Spain) column. The total and the individual sterol contents were analyzed by GC, after silylation with trimethylsilyl (TMS) ether derivatives. 1 µl of the TMS solutions were injected on a silica capillary column (ZB-5) in a gas chromatograph (Clarus 600, Perkin Elmer, USA) fitted with a flame ionization detector. Sterols were identified by their retention time relative to betulin internal standard. They were quantified using the ratio obtained between betulin (Internal standard, Sigma-Aldrich, France) and sterol standards. Sterols were expressed in mg 100 g⁻¹ oil (NF EN ISO 12228, 1999).

RESULTS AND DISCUSSION

Total tocopherol content in the parental lines varied between 548.0 to 1096.4 mg·kg⁻¹ oil. Total phytosterol content varied between 260.7 to 455.7 mg 100g⁻¹ oil. Mean values of F₂ seeds of the 6 growing places and the two years are in Table 2.

Table 2. Mean values, standard deviation (SD) and range of tocopherol and phytosterol total contents for the 6 locations in 2005 and 2006 of the 46 F₁ hybrids

Minor component	2005			2006		
	Mean	SD	Range	Mean	SD	Range
α-tocopherol (mg·kg ⁻¹ oil)	452.3	52.6	346.9- 570.2	516.5	65.0	390.4-679.6
Total tocopherol (mg·kg ⁻¹ oil)	469.8	55.8	354.8- 590.0	469.8	76.8	427.7- 733.9
β-sitosterol (mg·100g ⁻¹ oil)	215.7	14.3	176.4- 241.7	227.5	23.4	183.6- 317.1
Total phytosterol (mg·100g ⁻¹ oil)	315.7	20.6	254.7-366.4	319.6	27.6	262.2- 398.8

The general combining ability (GCA) for each parent was calculated as the difference between the mean of its half sib offsprings and the mean of its overall hybrids, which was calculated separately for each growing place. A mean GCA was then calculated over the six places. The correlations between parental line values and the corresponding mean GCA of their offsprings are shown Fig. 1. GCA for the total tocopherol content was greater than for total phytosterol content, in accordance with the fact that phytosterol variability is less important than that of tocopherols (Ayerdi Gotor et al., 2006b).

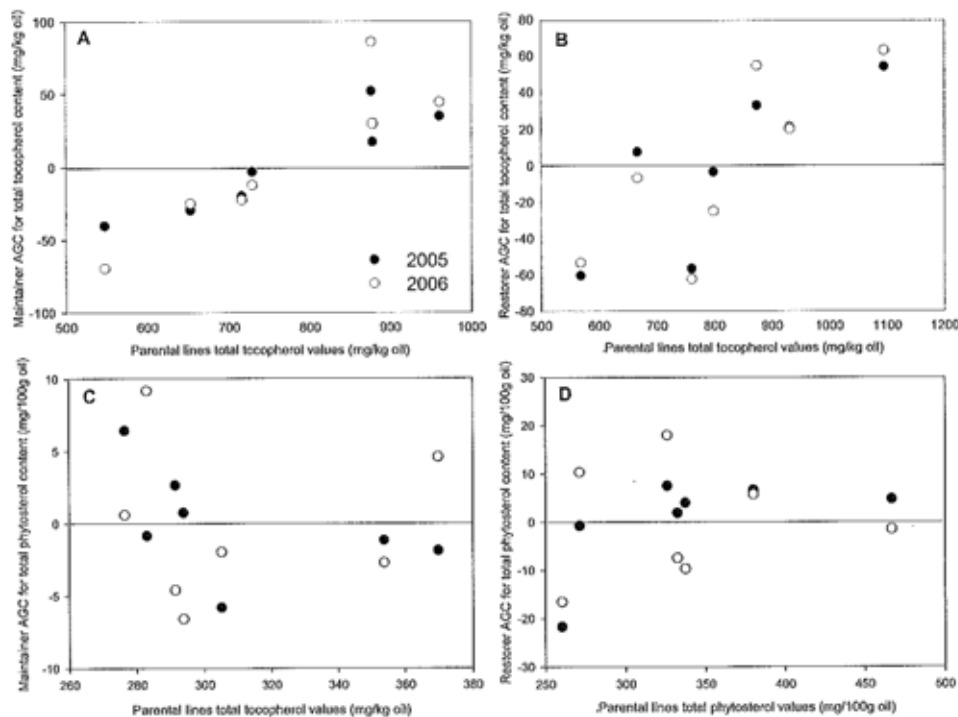


Fig. 1. Correlations between parental values and general combining ability (GCA) in 2005 and 2006. A - B: total tocopherol contents (mg/kg oil), female lines and restorer lines, respectively; C - D: total phytosterol contents (mg/100g oil), female lines and male lines, respectively.

For the total tocopherol content, the GCA and parental values were positively correlated for both female and restorer lines. The tendency was the same in the two years. Such correlations were not observed for the total phytosterol content, which also showed an important year effect.

For each location by year, the specific combining ability (SCA) was calculated as differences between a given hybrid mean and its two parental half sib means deviations from the general mean. Then the means were given by year over the six locations.

Table 3. Range of specific combining ability (SCA) of the 49 hybrids for 2005 and 2006

Year	SCA total tocopherol content (mg/kg oil)		SCA total phytosterol content (mg/100g oil)	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
2005	40.25	-52.84	58.94	-29.25
2006	57.18	-117.92	56.49	-48.32

SCA range was larger in 2006 than in 2005 for total tocopherol content. On the contrary, the SCA range showed a lesser year effect for total phytosterol content. Negative SCA for phytosterol and tocopherol content were of a greater amplitude in 2006.

New statistical treatment is currently under development to improve the accuracy of the genetic parameters obtained with these data. This work will soon be completed with heritability information from data of the F3-F4 hybrid seeds from three F2 families selected for their F1 highest GCA (negative or positive, female or restorer) grown during summer, 2007.

These first results suggested that total tocopherol content is influenced by an additive effect showing the possibility of a genetic gain for this parameter. For the total phytosterol content there was a larger year effect on GCA, so genetic gain could be less important. The SCA values indicated that total tocopherol and phytosterol contents could be affected by dominance effects, which could change the predicted hybrid performance. Both families of minor components were subjected to year interactions. These results open up possibilities for breeders to improve sunflower composition by increasing the content of these interesting compounds for human health.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Caussade Semences, Maïsador Semences, Monsanto Dekalb SAS, RAGT-R2n, Soltis, Syngenta Seeds for field experiments and supply of sunflower plant material. Financial support was provided by ASEDIS-SO, ONIDOL (French oilseeds organization) and Midi-Pyrenees Region. We also thank Cognis-France for their technical support.

REFERENCES

- Association Française de Normalisation. 1999. European norm, NF EN ISO 12228 May 1999; French norm T 60-258: Animal and vegetable fats and oils - Determination of individual and total sterols contents - Gas chromatographic method. AFNOR. Paris. 18 p.
- Ayerdi Gotor, A., M. Berger, F. Labalette, S. Centis, J. Daydé, and A. Calmon. 2006a. Etude de la variation des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule: Partie I - Tocophérols. OCL 13: 206-212.
- Ayerdi Gotor, A., M. Berger, F. Labalette, S. Centis, J. Daydé, and A. Calmon. 2006b. Variability of minor components in sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil from a multi-local study. p. 248-252. In: Proc. 17th Int. Symp. Plant Lipids, East Lansing, MI, USA.
- Ayerdi Gotor, A., E. Farkas, M. Berger, F. Labalette, S. Centis, J. Daydé, and A. Calmon. 2007. Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 109:525-530.
- Bramley, P.M., I. Elmafda, A. Kafatos, F.J. Kelly, Y. Manios, H.E. Roxborough, W. Schuch, P.J.A. Sheehy, and K.H. Wagner. 2000. Vitamin E. J. Sci. Food Agr. 80: 913-938.
- Demurin, Y., D. Škorić, and D. Karlovic. 1996. Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality. Plant Breed. 115:33-36.
- Demurin, Y.N., S.G. Efimenko, and T.M. Peretyagina. 2007. Expressivity of tocopherol mutations in sunflower. Helia 29:55-62.
- Goffman, F.D., and H.C. Becker. 2001a. Diallel analysis for tocopherol contents in seeds of rapeseed. Crop Sci. 41:1072-1079.

- Goffman, F.D., and H.C. Becker. 2001b. Genetic analysis of tocopherol content and composition in winter rapeseed. *Plant Breed.* 120:182-184.
- International Standard Organization, 1997. ISO 9936: Animal and vegetable fats and oils - Determination of tocopherols and tocotrienols contents - Method using high-performance liquid chromatography. ISO. Genève. 11 p.
- Niki, E., and N. Noguchi. 2004. Dynamics of antioxidant action of vitamin E. *Accounts Chem. Res.* 37: 45-51.
- Nolasco, S.M., L.A.N. Aguirrezábal, J. Lúquez, and C. Mateo. 2006. Variability in oil tocopherol concentration and composition of traditional and high oleic sunflower hybrids (*Helianthus annuus* L.) in the Pampean region (Argentina). *Grasas y Aceites* 57: 260-269.
- Patel, M.D., and P.D. Thompson. 2006. Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis* 186:12-19.
- Roche, J., A. Bouniols, Z. Mouloungui, T. Barranco, and M. Cerny. 2006. Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108:287-297.
- Velasco, L., J.M. Fernández-Martínez, R. García-Ruiz, and J. Domínguez. 2002. Genetic and environmental variation for tocopherol content and composition in sunflower commercial hybrids. *J. Agr. Sci.* 139:425-429.
- Velasco, L., B. Pérez-Vich, and J.M. Fernández-Martínez. 2004a. Novel variation for the tocopherol profile in a sunflower created by mutagenesis and recombination. *Plant Breed.* 123:490-492.
- Velasco, L., B. Pérez-Vich, and J.M. Fernández-Martínez. 2004b. Development of sunflower germplasm with high delta-tocopherol content. *Helia* 27:99-106.
- Vlahakis, C., and J. Hazebroek. 2000. Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting location, and temperature. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 77: 49-53.
- von Bergmann, K., T. Sudhop, and D. Lütjohann. 2005. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *J. Am. Cardiol.* 96:10D-14D.

Variability of minor components in sunflower (*Helianthus annuus* L.) oil from a multi-local study

A. Ayerdi-Gotor¹; M. Berger¹; F. Labalette²; S. Centis³; J. Daydé¹; A. Calmon^{1,*}

¹Laboratoire d'Agro-Physiologie, EI Purpan, 75, voie du TOEC Toulouse 31076, France;

²ONIDOL, 12 avenue George V, 75 008 Paris, France; ³ASEDIS-SO, 39 chemin Virebent, France

¹To whom correspondence should be addressed (email anne.calmon@purpan.fr)

Abstract

The aim of this study was to evaluate the content and composition, as well as the relationship between minor components (tocopherols and phytosterols) and fatty acids, in four sunflower commercial hybrids during three growing years (2002-2004). Our results show that kinetics of tocopherol and fatty acid storage were similar. However, elevated temperatures during seed development influence tocopherol content in the seed. In 2003 (unusual hot and dry summer) total tocopherol content had a decrease of 40 % compared to 2002 (cold and rainy summer). On the other hand, high temperatures during growth promote phytosterol expression. Moreover genotype is involved in tocopherol content of the seed. α -tocopherol content is positively correlated with oleic acid and negatively correlated with linoleic acid (PCA).

Introduction

Sunflower oil represents 20% of the world oil production for human nutrition since it is naturally rich in unsaturated fatty acids. This oil is also rich in minor components like tocopherols and phytosterols. The presence of high contents of α -tocopherol and phytosterols in sunflower oil could play an important role in the protection of the plant leading to stress tolerance, mainly in dry and hot areas.

The aim of the present work was to compare the content and composition of fatty acids, tocopherols and phytosterols in sunflower oil between different cultivars and locations in a three year study and to determine a relationship between these minor components, fatty acids and climatic conditions.

Materials and Methods

Sunflower hybrids

Four commercial varieties of sunflowers (*Helianthus annuus*) [Allstar RM, Aurazol (High Oleic), Melody and Prodisol] were grown in different locations all over France for three years (2002-2004). The inflorescences were bagged to prevent cross-pollination.

Meteorological dataset

Meteorological data from April 1st to September 30th were collected in 6 strategic planting locations Carcassonne (43°13'0"N; 2°21'8"E), Montignac (45°47'0"N; 0°28'0"E), Auch (43°39'0"N; 0°35'0"E), Montaud (45°16'0"N; 5°34'0"E), Fours (46°49'0"N; 3°43'0"E) and Blagnac (43°38'0"N; 1°24'0"E) in order to compare the influence of climatological conditions between the three years. Four parameters were considered rainfall (mm per day), Maximal temperature (°C per day, T_{MAX}) and Minimal temperature (°C per day, T_{MIN}).

Chemical analysis of achenes

Solvent extraction of lipids

The analysis of the total oil content was performed by hexane extraction using a soxhlet extractor apparatus. Fifty grams of achenes were ground and placed in cartridges. The ground achenes were submitted to hexane extraction for 4 hours. Then the solvent was removed from the extracts under low pressure evaporation. Lipid extracts were weighed and conserved at -18°C.

Fatty acid determination

The total and the individual fatty acid content were analyzed by gas chromatography (GC) after saponification and methylation (BF₃/MeOH). The mixture was injected into a fused silica capillary column ZB-FFAP (Phenomenex, France) in a GC (GC 8000 Fisons) fitted with a flame ionization detector. Fatty acids were identified using the ratio obtained between arachidic acid (Internal standard, Sigma-Aldrich, France) and fatty acid standards. Fatty acids were expressed as the percentage of the total content of fatty acids present in sunflower oil (stearic, palmitic, oleic, linoleic, linolenic acid).

Tocopherol determination

Complete separation of all native tocopherols was achieved using a high-performance liquid chromatography (HPLC) (SpectraPhysics; TSP, USA). A normal-phase LiChrosorb Si60 column was used. The mobile phase was hexane/isopropanol (99.7:0.3 v/v) and the solvent flow was 1 mL/min. One gram of oil sample was diluted in 25 mL of hexane and 20 µL were injected into the HPLC. Tocopherols were identified by comparison of retention times with respective standards (Tocopherol Kit; ChromaDex, USA). Total tocopherol content was calculated as the sum of α-, β-, γ- and δ-tocopherol contents and they were expressed in mg / kg oil.

Sterol determination

The total and the individual sterol content were analyzed by GC, after silylation to trimethylsilyl (TMS) ester derivatives. 1 µL of the TMS solutions were injected into a silica capillary column (ZB-5) in a GC (Fisons) fitted with a flame ionization detector. Sterols were identified using the ratio obtained between betulin (Internal standard, Sigma-Aldrich, France) and sterol standards. Sterols were expressed in mg / 100 g oil.

Statistical analysis

The data were statistically analyzed using Microsoft Statistica V7 (StatSoft, France). A three way ANOVA with three crossed factors (genotype, year) and one imbricated factor (location) with second order interaction was performed to determine the relationships between fatty acids, total tocopherol, total phytosterol contents, hybrids, planting location and year of study.

Results and Discussion

Effects of environment and genotype

The meteorological dataset shows that 2003 was the hottest and driest year whereas 2002 was the coldest and the rainiest. These significant differences in the weather during the growing period of sunflower were responsible for the modifications in the content of oil, fatty acids and minor components like tocopherols and phytosterols, independently of genotype.

Fatty acids

According to their fatty acid composition, three cultivars (Allstar RM, Melody, Prodisol) were "classic", with 55% of linoleic acid and one (Aurasol) was "oleic", with 80% of oleic acid. For all cultivars there were differences in the fatty acid composition between the years of this study.

Table 1. Analysis of variance, significance of treatment effects (p Values) for fatty acid contents.

	Oil content	% Palmitic Acid	% Stearic Acid	% Oleic Acid	% Linoleic Acid	% Linolenic Acid
Genotype	0.13	< 0.01	0.07	< 0.01	< 0.01	0.08
Year	0.10	< 0.01	0.29	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Genotype x Year	0.92	0.51	0.32	0.63	0.69	0.29
Location (Year)	0.01	0.53	0.65	0.43	0.56	0.03

The year factor was highly significant for oleic and linoleic acids: the high temperature difference between 2002 and 2003 induced a 15 % decrease in the amount of these acids.

Table 2. Mean values for each growing year.

Year	Oleic Acid (%)	Total Tocopherol (mg / kg oil)	Total Phytosterol (mg / 100 g oil)
2002	49.5a ^a	916.4a	416.7a
2003	42.7a	538.2b	360.1a,b
2004	39.4a	744.3c	328.8b

^a Values in the same column with the same letter are not statistically different at the 5% significance level.

Tocopherols

Table 3. Analysis of variance, significance of treatment effects (p Values) for tocopherol and phytosterol contents.

	Tocopherols		Phytosterols /oil			
	alpha	Total	Campesterol	Stigmasterol	β -Sitosterol	Total
Genotype	< 0.01	< 0.01	0.03	0.12	0.09	0.01
Year	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.99	< 0.01
Genotype x Year	0.02	0.02	< 0.01	0.33	0.23	0.17
Location (Year)	0.13	0.16	< 0.01	0.15	0.87	0.59

ANOVA showed that both genetic background and growth year significantly affected each tocopherol and total tocopherol content in oil. An important decrease (40%) of tocopherol content in 2003 vs. 2002 was observed, mainly caused by the high temperatures during July and August 2003.

Table 2. Mean values for each growing year.

Year	Oleic Acid (%)	Total Tocopherol (mg / kg oil)	Total Phytosterol (mg / 100 g oil)
2002	49.5a ^a	916.4a	416.7a
2003	42.7a	538.2b	360.1a,b
2004	39.4a	744.3c	328.8b

^a Values in the same column with the same letter are not statistically different at the 5% significance level.

These results were in accordance with Almonor *et al.* (1998) who showed similar results on soybeans. Sunflower is considered a drought adapted crop and is often grown in hot and dry areas. Further, α -tocopherol has antioxidant properties, probably leading to protection against heat stress (Blokhina *et al.*, 2003). In fact, tocopherols, especially α -tocopherol, protect fatty acids against stress scavenging singlet oxygen and peroxyl radicals (Munne-Bosh, 2005). As we have shown a decrease of α -tocopherol under high temperature, we suggest that α -tocopherol was used as an antioxidant system activation in the plant.

Phytosterols

Changes in sterols content and composition between growth years were less important than those of tocopherols. Indeed in this study, the year effect (high temperature) was more important than the genotype effect.

Table 3. Analysis of variance, significance of treatment effects (p Values) for tocopherol and phytosterol contents.

	Tocopherols		Phytosterols /oil			
	alpha	Total	Campesterol	Stigmasterol	β -Sitosterol	Total
Genotype	< 0.01	< 0.01	0.03	0.12	0.09	0.01
Year	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.99	< 0.01
Genotype x Year	0.02	0.02	< 0.01	0.33	0.23	0.17
Location (Year)	0.13	0.16	< 0.01	0.15	0.87	0.59

Sterols are considered as plant hormones which play an important role in the protection of the plant against stress as well as in regulation of plant growth (Shaller, 2004) and the decrease was observed could be due to use of sterols in antioxidant mechanisms.

Correlations between oil components

Tocopherol content and each isomer α , β , γ , δ are positively correlated ($r = 0.4$, $p > 0.05$) with oleic acid, and negatively correlated with linoleic acid (0.35). There are no correlations between total phytosterols content and any fatty acid.

Total tocopherol and total phytosterol contents are positively correlated ($r = 0.47$); similar results were obtained by Vlahakis and Hazabroek (2000). Prodisol had the highest tocopherol and phytosterol contents whereas Melody had the lowest tocopherol and phytosterol contents in our study.

Table 4. Mean values for each cultivar (all locations and years included)

Genotype	Oil content (g/g DM)	Tocopherols (mg·Kg ⁻¹)		Phytosterols (mg·100 g ⁻¹)	
		alpha	Total	β -sitosterol	Total
Allstar RM	0.51 a ^a	605.16 a	637.33 a	212.02 a	377.84 a
Aurasol	0.51 a	805.97 c	859.99 b	200.71 a	355.67 a,b
Melody	0.48 b	584.63 a	610.64 a	195.55 a	331.74 b
Prodisol	0.50 a	757.26 b	818.85 b	216.18 a	383.27 a

^a Values in the same column with the same letter are not statistically different at the 5% significance level

Conclusion

This study showed that fatty acid, tocopherol and phytosterol contents in sunflower oil depend on genetic and environmental factors. High temperatures reduce oleic acid, total and individual tocopherols and phytosterols content. This could be due to tocopherols and phytosterols providing a protective role as antioxidants during heat stress, which may lead to a decrease of their content. Further investigations under controlled conditions will contribute to understanding the role of tocopherols and phytosterols in the protection of the seed. These results can provide useful information for the breeding of new cultivars with an improved oil quality (high content in minor components and fatty acids profiles).

Acknowledgement

The authors thank CETIOM network for providing seed material. Caussade semences, Maïsador semences, Monsanto Dekalb, RAGT-R2N, Soltis and Syngenta Seeds for the financial as well as the Association Inter-professionnelle du Développement des Semences du

Sud Ouest (ASEDIS-SO), ONIDOL (French Oil seeds organization) and Midi-Pyrenees Region. We also thank Cognis-France (Boussens) for their technical support.

References

- Almonor GO, Fenner GP, Wilson RF (1998) Temperature effects on tocopherol composition in soybeans with genetically improved oil quality. *J Am Oil Chem Soc* 75 : 591–596.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals Bot* 91 : 179–194.
- Munne-Bosch, S. (2005) The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol* 162 : 743–748
- Shaller H (2004) New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiol Biochem* 42 : 465–476.
- Vlahakis C and Hazebroek J (2000) Phytosterol accumulation in canola, sunflower and soybean oils : effects of genetics, planting location and temperature. *J Am Oil Chem Soc* 77 : 49–53.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	7
Chapitre I.....	11
Etat des connaissances	11
1. Production du tournesol	11
1.1. Contexte agricole mondial de la culture de tournesol	11
1.2. Contexte politico-économique de la filière tournesol.....	13
1.3. Créer de la valeur ajoutée par des valorisations alimentaire et non-alimentaire	14
2. Valorisations de la culture du tournesol	14
2.1. Transformation des graines de tournesol en huile	14
2.1.1. <i>Procédés d'obtention des huiles</i>	14
2.1.2. <i>Effet des procédés sur la qualité et la stabilité de l'huile</i>	15
2.2. Evolution des débouchés alimentaires.....	17
2.2.1. <i>Huile et profil d'acides gras</i>	17
2.2.2. <i>Composés mineurs</i>	17
2.3. Débouchés de la valorisation non alimentaire	18
2.4. Valorisation des co-produits.....	19
2.4.1. <i>Tourteaux & protéines</i>	19
2.4.2. <i>Résidus lignocellulosiques</i>	19
2.4.3. <i>Composés mineurs</i>	19
3. Le tournesol (<i>Helianthus annuus</i> L.), la plante et sa culture.....	20
3.1. Biologie florale et système de reproduction	20
3.2. Cycle de développement.....	20
3.3. Sélection	21
3.3.1. <i>Evolution du potentiel génétique</i>	21
3.3.2. <i>Utilisation de la stérilité mâle cytoplasmique pour la production d'hybrides commerciaux</i>	22
4. Composition de l'akène de tournesol	23
4.1. Constituants de la coque et de l'amande	24
4.2. Constituants lipidiques	24
4.2.1. <i>Acides gras</i>	24
4.2.2. <i>Fraction insaponifiable</i>	26
5. Composés mineurs de l'akène de tournesol	27
5.1. Les tocophérols.....	27
5.1.1. <i>Structures et caractéristiques</i>	27
5.1.2. <i>Biosynthèse des tocophérols</i>	29
5.1.3. <i>Rôle physiologique des tocophérols dans la plante</i>	30
5.1.4. <i>Facteurs de variation de la teneur et de la composition en tocophérols dans les graines</i> 32	
5.2. Les phytostérols.....	34
5.2.1. <i>Structures et caractéristiques</i>	34
5.2.2. <i>Biosynthèse des phytostérols</i>	35
5.2.3. <i>Rôle physiologique des phytostérols dans la plante</i>	37
5.2.4. <i>Facteurs de variation de la teneur et de la composition en phytostérols dans les graines</i> 37	
6. Qualité des semences de tournesol.....	39
6.1. Qualité germinative des semences de tournesol	39
6.2. La spectrométrie proche infrarouge (SPIR): un outil de diagnostic.....	41
6.2.1. <i>Un outil de diagnostic rapide et performant</i>	41

6.2.2. Développement pour la caractérisation des oléagineux	42
7. Bilan de la revue bibliographique et présentation des travaux.....	43
Chapitre II.	45
Matériel et Méthodes.....	45
1. Matériel végétal et conduite des essais	47
1.1. Cinétiques d'accumulation des composés mineurs	47
1.2. Influence de la conversion oléique sur les composés mineurs.	48
1.2.1. Effet génétique	48
1.2.2. Effet de la température lors du remplissage de l'akène	48
1.3. Etude de la variabilité des teneurs et compositions en tocophérols et phytostérols dans la graine.....	49
1.4. Comparaison de lignées parentales.....	50
1.5. Top Cross ou Plan de croisement North Carolina II	50
1.5.1. Création d'hybrides F1 et témoins utilisés	50
1.5.2. Etude des hybrides	51
1.5.3. Production des lignées recombinantes.....	51
1.6. Etude de l'effet du stockage sur la teneur en tocophérols et en phytostérols par des tests de vieillissement accélérés et de germination	52
1.6.1. Test de vieillissement accéléré	52
1.6.2. Test de germination.....	52
1.7. Prédiction des composés mineurs par spectrométrie proche infrarouge.	53
2. Méthodes analytiques	53
2.1. Détermination des tocophérols et des phytostérols sur un lot d'akènes	53
2.1.1. Extraction de l'huile.....	53
2.1.2. Analyse des acides gras.....	54
2.1.3. Analyse des tocophérols	54
2.1.4. Analyse des phytostérols	55
2.1.5. Répétabilité des analyses	55
2.2. Détermination des tocophérols et des phytostérols dans une plantule.	55
2.2.1. Extraction à froid de l'huile	55
2.2.2. Analyse des tocophérols	57
2.2.3. Analyse des phytostérols	57
2.3. Détermination des tocophérols dans un akène de tournesol.....	57
2.3.1. Extraction de l'huile.....	57
2.3.2. Teneur en tocophérols.....	57
2.4. Analyse par spectrométrie proche infrarouge.....	57
3. Traitement des données.....	58
3.1. Traitement statistique	58
3.2. Traitement du plan de croisement	58
3.2.1. Calcul des variances	58
3.2.2. Héritabilité	59
3.3. Calibration SPIR et procédure de validation	60
Chapitre III.	63
Facteurs de variation génotypiques et environnementaux des tocophérols et des phytostérols dans le tournesol.....	63
1. Accumulation des composés mineurs dans l'akène de tournesol	63
1.1. Etude des cinétiques d'accumulation des composés mineurs	64
1.2. Bilan sur le remplissage en composés mineurs au cours de la maturation des akènes de tournesol.	82

2. Influence de la conversion oléique sur les teneurs et compositions en composés mineurs.	83
2.1. Etude de la variabilité de la composition en composés mineurs en réponse à la conversion oléique.....	83
2.1.1. <i>Analyse de la variabilité</i>	83
2.1.2. <i>Bilan de l'étude</i>	91
2.2. Effet d'un stress thermique au cours du remplissage de l'akène sur l'accumulation des composés mineurs – Comparaison d'un hybride et de sa conversion oléique.....	91
2.2.1. <i>Comparaisons des deux hybrides</i>	92
2.2.2. <i>Bilan de l'étude</i>	93
2.3. Etude d'un vieillissement accéléré d'akènes de tournesol sur la germination et sur les teneurs en composés mineurs	94
2.3.1. <i>Effet du vieillissement accéléré sur la vigueur germinative et sur les teneurs en tocophérols et phytostérols</i>	94
2.3.1. <i>Etude des cinétiques d'accumulation des tocophérols pendant les sept premiers jours de germination</i>	97
2.3.2. <i>Cinétique de transfert des tocophérols pendant les sept premiers jours de germination</i>	99
3. Étude multilocale de la variabilité des teneurs et composition en phytostérols et tocophérols sur 4 hybrides commerciaux.....	100
3.1. Présentation et résultats de l'étude	100
3.2. Bilan de cette étude.....	116
4. Conclusion.....	117
Chapitre IV.....	119
Étude de l'hérabilité des composés mineurs	119
1. Sélection des lignées parentales selon leur teneur en tocophérols et phytostérols.....	120
2. Potentiel de sélection du tournesol pour les teneurs de l'huile en tocophérols et phytostérols - Estimation des paramètres génétiques.....	122
3. Conclusion.....	134
Chapitre V.	136
Prédiction par spectrométrie proche infrarouge des teneurs en tocophérols et en phytostérols dans les akènes de tournesol.....	136
1. Prédiction des teneurs en composés mineurs sur une matrice d'akènes broyés de tournesol	137
1.1. Résultats.....	137
1.2. Synthèse et conclusion.....	149
2. Prédiction de la teneur en tocophérols sur un akène décortiqué de tournesol.....	150
3. Bilan de l'étude sur la faisabilité d'une mesure des composés mineurs par spectrométrie proche infrarouge.	151
CONCLUSION	154
BIBLIOGRAPHIE	161
TABLE DES MATIERES	194