

# Limitations extractives des ingrédients fonctionnels natifs : lipides bioactifs par modifications chimiques

Zéphirin MOULOUNGUI  
Jane ROCHE  
Andrée BOUNIOLS

Plate-forme technologique lipochimie Inra,  
Unité de chimie agro-industrielle UMR 1010  
Inra/INP-Ensiacet,  
118 route de Narbonne,  
31077 Toulouse Cedex 4,  
Fax : 05 62 88 57 30  
<Zephirin.Mouloungui@ensiacet.fr>

**Abstract:** Phytosterols draw their origin from plants (oilcrops and cereals seeds, vegetables, fruits, nuts). Their chemical structures and their biological functions are similar with those of cholesterol. Efficiency of phytosterols and their saturated homologues (phytostanols) on the reduction of high cholesterol level is proven and confers to them uses as functional ingredients. In nonfood industries, the molecular volume of the triterpenic skeleton of phytosterols, as in the case of cholesterol, is exploited for many uses particularly as a hydrophobic part in production of polydisperse "new surfactants". Due to their physicochemical behaviour to the air/water interfaces, phytosterols are good raw materials for the development of liquid crystals and original biological and pharmaceutical applications. At native state, phytosterols have however low and variable biological levels in seeds. Taking into account the possibilities of chemical modifications and industrial development prospects of phytosterols and their derivatives, selection of varieties associated with the management of crop and wild plants cultural practices represents an interesting way to improve phytosterols content and to modify their component composition to answer to a scheme of vegetable refinery guided by the added value guaranteed by the presence of these minor components.

**Key words:** lipids, phytosterols, chemical modification, industrial application

Les stérols d'origine végétale, appelés aussi *phytostérols*, sont des molécules présentes chez tous les végétaux dans la nature. Ils possèdent des structures et des propriétés qui leur sont propres et qui déterminent leur activité biologique dans le monde du vivant. Depuis plusieurs années, ces molécules bioactives, encore peu exploitées il y a cinq ans, connaissent un essor important dans plusieurs secteurs industriels. L'intérêt majeur des phytostérols réside dans leur propriété hypocholestérolémiante naturelle [1-5], qui leur permet de se substituer au cholestérol et de diminuer les risques cardiovasculaires.

Ainsi, à l'état natif, ils sont utilisés en nutrition sur le marché des aliments fonctionnels (en ration alimentaire) notamment les margarines enrichies en phytostérols [6] ; ou à l'état modifié, dans des produits composés en pharmacie pour la fabrication de stéroïdes [7], ou encore dans le domaine des cosmétiques en tant que émoussant, émulsifiant, dispersant, solubilisant [8].

La plus grande part des phytostérols mis sur le marché provient de l'industrie de la trituration et de raffinage des huiles et des matières grasses, comme le soja ou le colza. Les phytostérols, considérés comme sous-produits, sont ensuite issus du recyclage des eaux perdues de désodorisation [9]. Cette source de phytostérols

soulève le problème de la traçabilité car les matrices graines utilisées sont souvent issues d'un mélange dont l'origine n'est pas toujours identifiée. De plus, pour une production issue de la trituration, l'extraction des phytostérols implique parfois des méthodes « à risque » car elles mettent en jeu des produits chimiques nocifs, voire toxiques pour l'homme et/ou l'environnement.

Ainsi, dans l'alimentation humaine, l'origine naturelle des phytostérols est un critère essentiel. La fraction lipidique des graines oléagineuses possède le pourcentage le plus élevé sous forme libre ou estérifiée à raison de 1 à 5 g de stérols/kg d'huile [10].

En ce qui concerne les utilisations industrielles non alimentaires, d'autres alternatives visent à modifier chimiquement la structure acquise des molécules stéroliques pour leur conférer de nouvelles propriétés utiles pour des applications spécifiques insoupçonnées.

Toutefois, l'extraction des dites molécules est parfois limitée du fait de leur faible teneur. L'optimisation de la teneur en phytostérols de la matière végétale constitue une alternative à l'utilisation des stérols végétaux en tant que sous-produit de la trituration. L'amélioration des teneurs est accessible naturellement par la mise en œuvre d'itinéraires techniques et de géotypes adaptés et optimisés et représente une source sûre de molécules bioactives élaborées dans le respect de l'environnement.

Le présent article propose d'exposer l'état de l'art non exhaustif sur la réactivité des phytostérols dans l'alimentaire ; et le non-alimentaire avec pour exemple la modification du cholestérol

pour des applications nouvelles dans les industries de haute technologie.

## Les molécules stéroliques naturelles d'origine végétale

Les stérols végétaux sont toutes les molécules possédant une structure similaire à celle du cholestérol animal (*figure 1*). Ils sont issus de graines oléagineuses, céréales, noix, fruits ou légumes dont les teneurs varient selon l'espèce végétale (*tableau 1*) [11-15]. Les principaux phytostérols, le sitostérol et le campestérol, diffèrent de la structure du cholestérol par des groupements éthyle et méthyle respectivement sur le carbone 24. Cette différence structurale est minime mais présente toutefois un effet considérable sur leur assimilation par l'organisme humain. Le campestérol, par exemple, est trois fois moins absorbé que le cholestérol tandis que l'absorption du sitostérol, le plus répandu des phytostérols dans le règne végétal, atteint un taux d'absorption 10 fois plus faible que celui du cholestérol (4-5 %) (*tableau 2*) [16]. De même, les stanols, forme saturée des stérols, possèdent des propriétés qui leur sont propres permettant de réduire encore leur absorption intestinale (< 0,5 %) [17]. Ainsi, consommés avec un régime normal à des doses optimales comprises entre 1,5 et 3 g/jour, ces molécules d'origine végétale réduisent efficacement l'absorption intestinale du cholestérol [18-20, 5] et le taux de LDL-cholestérol plasmatique (-10 à 15 %) (« mauvais cholestérol ») sans modifier le HDL-cholestérol (« bon cholestérol ») [21, 22]. Une

Cette contribution a été présentée oralement à la journée d'Automne AFECG du 25.10.2005 intitulée « Ingrédients bioactifs issus des huiles végétales et marines ».

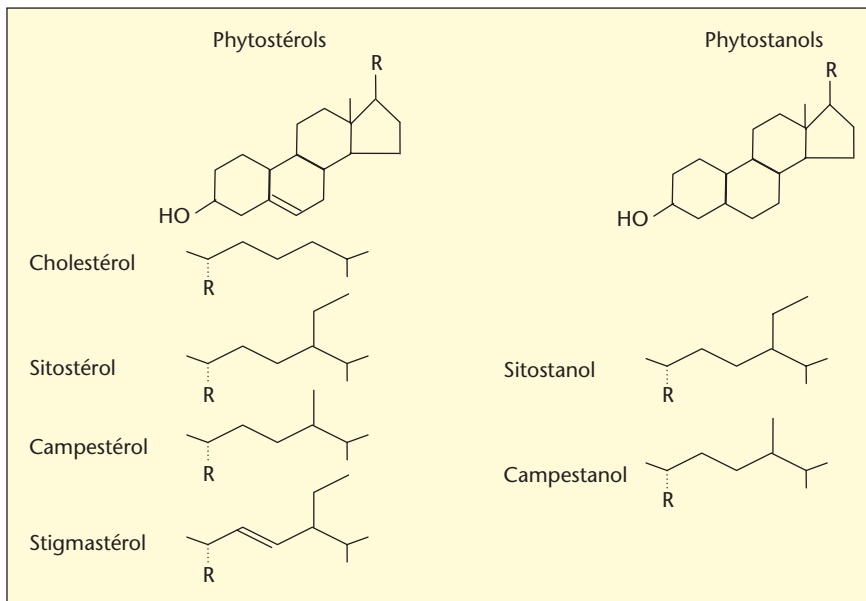


Figure 1. Structure chimique de quelques phytostérols et leurs formes saturées.

telle diminution est associée à la baisse de l'apparition des maladies cardiovasculaires [23]. Les stanols végétaux sont également présents naturellement. Leur concentration à l'état natif est très faible. Les principales sources de stanols sont les céréales comme le seigle, l'orge, le blé et l'avoine, contenant respectivement 51, 50, 38 et 25 mg de stanols pour 100 g de matière fraîche graine [10]. Ils peuvent toutefois être issus d'une hydrogénation chimique des phytostérols [6].

Outre leur propriété d'inhibition de l'absorption du cholestérol néfaste pour la santé, ces molécules stéroliques sont également recherchées pour leurs activités anti-cancéreuses [24, 25], d'anti-athérosclérose [26, 27], d'anti-inflammation [28] et d'anti-oxydation [29].

## Les propriétés et le marché des stérols

Selon leur structure, les stérols possèdent des propriétés différentes qui déterminent le type de produits utilisables. La balance hydrophile/hydrophobe est susceptible d'être modifiée soit par un élément hydrophile naturel de type glycosidique, soit par un élément hydrophile synthétique fourni par les unités oxyéthylène. Pour leur utilisation en tant que tensioactifs, les propriétés physico-chimiques des stérols sont significativement modifiées par la liaison d'une chaîne oxyéthylène générée chimiquement. Par éthoxylation, la tête hydroxyle du stérol modifié acquiert le caractère hydrophile et le squelette triterpénique des stérols est exploité en tant que partie hydrophobe de nouveaux tensio-actifs polydisperses. C'est le comporte-

ment physico-chimique de ces formes éthoxylées aux interfaces air/eau qui détermine leur réactivité chimique en tant que tensio-actifs. Selon la structure des molécules, la tension de surface diminue avec le temps et le temps d'équilibre de la tension de surface est très long (figure 2) [30]. Ceci s'explique par l'existence de réactions d'échange à la surface. Les molécules se réorientent lentement à l'interface air/eau [8]. Ainsi, l'augmentation de la longueur de la chaîne polyoxyéthylène est associée à la diminution de la concentration critique en micelle (CMC) de stérols éthoxylés (tableau 3). Ainsi, selon la composition en structures stéroliques et le degré d'éthoxylation, la réactivité des molécules à l'interface eau/huile diffère et engendre diverses utilisations sur le marché actuel (tableau 4).

Un autre exemple de stérols bioactifs intéressant le monde industriel des tensio-actifs de nouvelle génération est représenté par les stérols glucosidiques qui se comportent comme des lipides polaires à l'inverse des stérols estérifiés qui sont liposolubles. Dans ce cas, le squelette stérolique est un élément hydrophobe qui occupe un large volume aux interfaces air/eau.

## Utilisations du cholestérol en tant que lipide bioactif dans les industries de la chimie par modifications chimiques

Le cholestérol est un stérol gênant dans l'alimentation humaine et les recherches réalisées actuellement s'attachent à trouver les moyens de le substituer par d'autres molécules de

même structure mais moins néfastes pour la santé. Toutefois, dans les domaines industriels, il peut constituer une source de matière première pour la fabrication de lipides synthétiques possédant des propriétés physiques, chimiques et biologiques spécifiques.

En se basant sur les caractéristiques structurales du cholestérol, deux sites de modifications chimiques sont accessibles et engendrent des applications industrielles du cholestérol modifié. La réactivité de ces sites a donné naissance à la formation d'esters ou éthers cholestériques (figure 3) [31].

La double liaison active en position C5-C6 du cholestérol est un site de réactions d'addition appelées « ène-réactions » permettant de former par exemple l'ester monocholestérique d'acide alkényl succinique correspondant à la liaison du cholestérol et d'anhydride alkényl-succinique (figure 4) sans avoir recours à l'utilisation de solvants organiques.

Par modification chimique de la structure rigide stérolique, le groupement hydroxyle (OH) situé sur la position 3 constitue un site privilégié de réactions d'acylation et d'alkylation. Du fait de leur conformation moléculaire régulière et symétrique, les dérivés de cholestérol sont solides à température ambiante. L'estérification du cholestérol par des groupes acyles ramifiés ou l'éthérfication du cholestérol par des groupements alkyles a permis de diminuer le point de fusion des structures cholestériques [32]. Durant les vingt dernières années, différentes structures de ce type ont été générées permettant de dégager de nouvelles utilisations du cholestérol dans le domaine des produits cosmétiques [33]. Ainsi, certains éthers cholestériques, comme les éthers glycéryl cholestériques, sont devenus des ingrédients actifs dans la formulation d'émulsions très stables huile dans l'eau ou eau dans l'huile.

Dans un tout autre domaine, de telles structures stéroliques créées synthétiquement [34-38] se sont également révélées posséder des propriétés particulièrement intéressantes pour la formation de cristaux liquides ou d'agrégats moléculaires [39]; notamment à travers l'acquisition de nouvelles propriétés optiques non linéaires obtenues par hydroxy-substitution de dérivés azo-benzéniques avec des esters de cholestérol [40] (figure 5). La capacité de ces molécules bioactives à modifier leur structure a conditionné leur utilisation dans le contrôle photochimique des changements de phases, dans la formation de dispositifs de mémoire optique ou de conducteurs unidimensionnels et photoconducteurs, etc. [31]. Par exemple, la création d'une structure issue de la combinaison d'une unité d'ester cholestérique avec une unité de diphénylacétylène possède des propriétés chirales qui laissent

Tableau 1. Variation de la teneur en phytostérols totaux selon l'espèce végétale (Cultures oléoprotéagineuses, céréales, fruits, légumes, noix).

Graines oléoprotéagineuses (mg/100 g d'huile)															
Palme	Olive	Colza	Tournesol	Soja	Pois Haricot	Canola	Maïs	Pépins de raisin	Carthame	Lin	Argan	Pastel	Ricin	Crambe	Tabac
71-117 (B) <sup>c</sup>	144-150 <sup>c</sup>	513-979 (B) <sup>c</sup>	374-725 <sup>c</sup>	229-459 (B) <sup>c</sup>	135 <sup>e</sup>	639-658 <sup>b</sup>	809-1557 (B) <sup>c</sup>	259-418 <sup>a</sup>	240-380 <sup>a</sup>	200-410 <sup>a</sup>	147 <sup>g</sup>	522 <sup>g</sup>	225 (R) <sup>g</sup>	530 <sup>g</sup>	1 100 <sup>g</sup>
49-61 (R) <sup>c</sup>	150-162 <sup>b</sup>	250-731 (R) <sup>c</sup>	210-454 <sup>f</sup>	161 <sup>e</sup>	127 <sup>*</sup>	459-807 <sup>f</sup>	715-952 (R) <sup>c</sup>	440 (B) <sup>g</sup>	494 <sup>e</sup>	440 (B) <sup>g</sup>					
66 <sup>b</sup>	141 <sup>g</sup>	715-736 <sup>b</sup>	263-340 <sup>b</sup>	234-466 <sup>f</sup>			699-766 <sup>b</sup>	269 (R) <sup>g</sup>	380 <sup>g</sup>						
60-120 <sup>a</sup>		540-880 <sup>p</sup>	412-588 <sup>d</sup>	203-285 <sup>b</sup>			830-2250 <sup>a</sup>								
29 <sup>g</sup>		691 (B) <sup>g</sup>	325-515 <sup>a</sup>	250-418 <sup>a</sup>			1 390 <sup>*</sup>								
			326 (B) <sup>g</sup>	550 <sup>g</sup>			923 <sup>g</sup>								
<b>Moyenne</b>	<b>67</b>	<b>148</b>	<b>405</b>	<b>323</b>	<b>135</b>	<b>641</b>	<b>1 100</b>	<b>349</b>	<b>395</b>	<b>373</b>	<b>147</b>	<b>522</b>	<b>225</b>	<b>530</b>	<b>1 100</b>
Céréales (mg/100 g d'huile)															
	Blé	Son de riz	Sorgho	Sarrasin	Coton	Sésame									
	2 140 <sup>g</sup>	1 325 <sup>e</sup>	178 <sup>e</sup>	198 <sup>e</sup>	292 <sup>b</sup>	492 <sup>b</sup>									
		3225 (B) <sup>c</sup>			431-539 (B) <sup>c</sup>	714 <sup>e</sup>									
		1 055 (R) <sup>c</sup>			327-397 (R) <sup>c</sup>	539-636 <sup>a</sup>									
<b>Moyenne</b>	<b>2 140</b>	<b>1 868</b>	<b>178</b>	<b>198</b>	<b>380</b>	<b>598</b>									
Légumes/Fruits (mg/kg de matière fraîche)															
	Orange	Banane	Pomme	Choux <sup>h</sup>	Carotte	Céleri	Avocat	Pomme de terre	Amande	Noix de coco	Cacahouète	Noisette	Noix		
	24 <sup>c</sup>	16 <sup>c</sup>	12 <sup>e</sup>	39-43 <sup>c</sup>	16 <sup>c</sup>	6 <sup>e</sup>	353 <sup>b</sup>	4 <sup>c</sup>	143 <sup>e</sup>	133 <sup>e</sup>	167 <sup>b</sup>	75-195 <sup>a</sup>	170-245 <sup>a</sup>		
			13 <sup>c</sup>						120-400 <sup>a</sup>	69-70 <sup>b</sup>	147 <sup>g</sup>				
<b>Moyenne</b>	<b>24</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>41</b>	<b>16</b>	<b>6</b>	<b>353</b>	<b>4</b>	<b>202</b>	<b>107</b>	<b>157</b>	<b>135</b>	<b>208</b>		

<sup>a</sup> Karleskind, 1992 [11].

<sup>b</sup> Phillips *et al.*, 2002 [12].

<sup>c</sup> Piironen *et al.*, 2000 [10].

<sup>d</sup> Roche, 2005 [13].

<sup>e</sup> Venkateshwar Rao et Janezic, 1992 [14].

<sup>f</sup> Vlahakis et Hazebroek, 2000 [15].

<sup>g</sup> Données personnelles (desméthylstérols totaux).

<sup>h</sup> Choux de Bruxelles, chou fleur, brocoli.

B : Huile brute.

R : Huile raffinée commerciale.

Tableau 2. Absorption des stérols par l'organisme humain

Cholestérol	40-50 %
Campestérol	12-16 %
Sitostérol	4-5 %
Sitostanol	< 0,5 %

Source : Wester, 2000 [16].

entrevoir des applications pour des technologies de stockage d'informations optiques [41].

Ces molécules originales dérivées du cholestérol possèdent majoritairement des utilisations très porteuses dans le secteur industriel non alimentaire. Toutefois, la capacité intrinsèque du cholestérol à adopter naturellement une autre conformation dans la double couche phospholipidique des membranes cellulaires a contribué à développer des applications dans le domaine de la santé. Ainsi, du fait de leur capacité à interagir avec un environnement polaire et un environnement non polaire, les esters cholestériques ont été désignés comme

molécules vectrices. Ces molécules amphiphiles bioactives possèdent la capacité de s'insérer dans la membrane facilitant ainsi la délivrance intracellulaire des molécules thérapeutiques actives [42-45]. De plus, contrairement à des structures liposomiques artificielles classiques permettant de véhiculer des drogues ou autres molécules pharmaceutiques, celles contenant du cholestérol présentent une viabilité dans le sang cent fois plus longue [8], permettant d'optimiser la délivrance des molécules contenues dans ces structures. Un autre secteur d'application du cholestérol dans le domaine de la santé est celui de la thérapie génique qui développe l'utilisation de lipopolyamines comme alternative plus sûre et plus efficace dans des stratégies de transfert de gènes. Une molécule de cholestérol est associée au domaine cationique des polyamines, classiquement utilisées pour leurs propriétés de stabilisation de conformations d'ADN spécifiques (figure 6). De telles molécules constituent un bon véhicule pour le transfert de gènes car elle évite le déclenchement d'une réponse immunitaire du fait de leur interaction privilégiée avec la membrane cellulaire [46, 47].

La capacité du cholestérol modifié à s'insérer efficacement dans les membranes cellulaires a permis de développer de nouvelles applications du cholestérol. Ainsi, la molécule de cholestérol est utilisée en tant que monomères synthétiques de construction de structures biologiques. C'est le cas par exemple de pseudo-membranes artificielles construites à partir de composés issus de cholestérol polymérisés possédant des propriétés semblables à celles des cristaux liquides qui sont utilisés dans la préparation de matériel dentaire [48].

Dans la même optique, le cholestérol peut entrer dans la polymérisation à partir de monomères préorganisés qui sont eux-mêmes élaborés pour former des milieux à contraintes ou à partir de monomères dans des espaces confinés de milieux organisés [49]. Ces structures amphiphiles forment, par exemple, des micel-

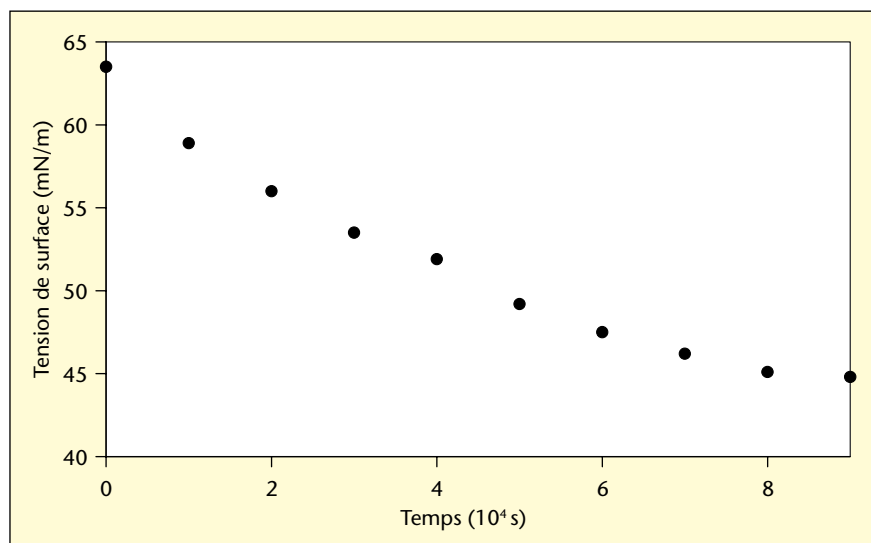


Figure 2. Tension de surface pour un phytostérol contenant 20 unités oxyéthylène en fonction du temps à une concentration fixe ( $3,44 \times 10^{-6}M$ ) (source : Folmer et al., 1999 [30] reproduit avec permission).

Tableau 3. Concentration critique en micelle (CMC) et tension de surface en fonction des unités oxyéthylène.

Unité oxyéthylène	CMC ( $\mu M$ )	Tension de surface à la CMC déterminée (mM/m)
10	10	31
20	7	34
30	3	42

Source : Folmer et al., 1999 [30] (reproduit avec permission).

Tableau 4. Exemples de stérols surfactants disponibles dans le commerce.

Nom du produit	Matériel hydrophobe	Degré d'éthoxylation	Stérol libre	Producteur	Application principale
Generol R E5	Stérols issus du colza	5, 10	10-14 %	Cognis, Allemagne	Coémulsifiant pour produits cosmétiques de type
Generol R E10	45 % sitostérol, 25 % campestérol, 20 % stigmastérol		2-6 % Resp.		- eau/huile [5] - huile/eau [10]
BPS-5	Phytostérol :	5, 10, 20, 30		Nikkol, Japon	Émollient [5] Émulsifiant [10-30]
BPS-10	50 % sitostérol $\Delta 5$				Dispersant
BPS-20	25 % campestérol				
BPS-30	25 % stigmastérol				
BPSH-25	Phytostanol : Phytostérols saturés	25		Nikkol, Japon	Émulsifiant Dispersant

Source : Folmer, 2003 [8] (reproduit avec permission).

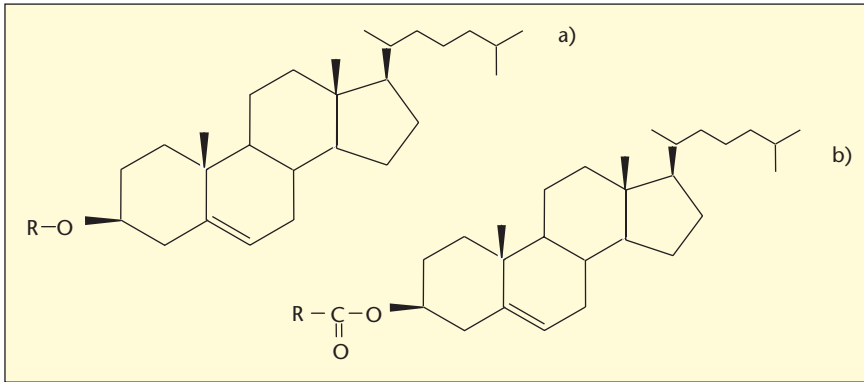


Figure 3. Structure des éthers (a) et esters cholestériques (b) (source : Urata et Takaishi, 2001 [31]).

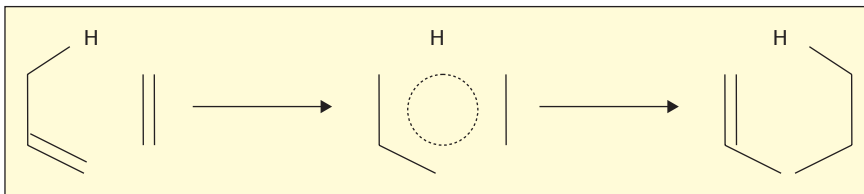


Figure 4. « éne-reaction » (source : Urata et Takaishi, 2001 [31]).

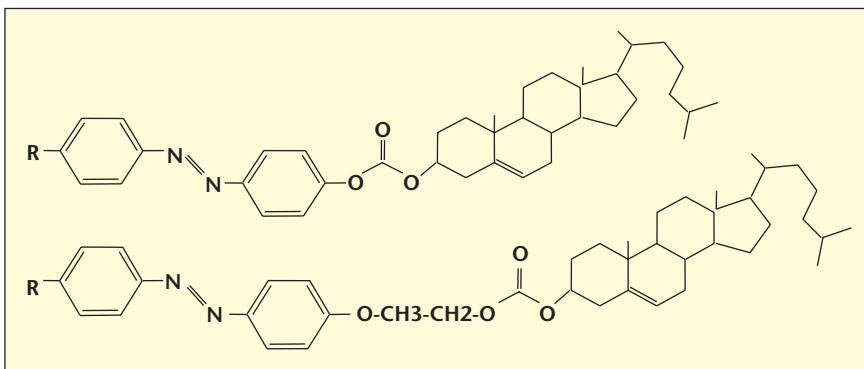


Figure 5. Dérivés azo-benzéniques issus d'une hydroxy-substitution sur des esters de cholestérol (source : Urata et Takaishi, 2001 [31]).

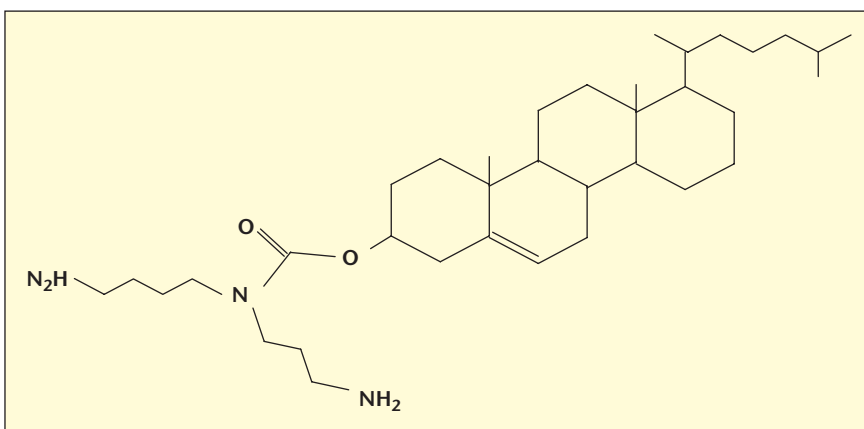


Figure 6. Structure des lipo-polyamines à base d'éthers cholestériques (source : Urata et Takaishi, 2001 [31]).

les dans un milieu aqueux où les chaînes alkyles s'agrègent pour former un noyau tandis que les groupements hydrophiles sont en contact de l'eau sur la face extérieure afin de minimiser l'énergie interfaciale. D'autres polymères incluant des structures amphiphiles telles que celle du cholestérol entrent dans la formation de bicouches lipidiques, cristaux liquides, cristaux organiques, zéolites microporeux, matériaux mésoporeux ou encore complexes d'inclusion. De telles structures sont utilisées dans le domaine biomédical et pharmaceutique. Dans le cas des complexes d'inclusion par exemple, des canaux cristallins de dérivés d'acide cholique (composant de l'acide biliaire) sont exploités comme monomère d'origine naturelle [50].

## Perspectives de recherche

Bien que les phytostérols possèdent une large capacité à générer des molécules variées dont les applications ne sont probablement pas encore toutes exploitées ou développées, leur faible concentration (moins de 1 % de l'huile) associée à une variabilité non maîtrisée demeure un frein à leur extraction efficace et leur utilisation massive dans le monde industriel. De plus, les sources industrielles de fourniture des phytostérols (trituration, raffinage) sont associées à des risques chimiques, physiques et biologiques qu'il est nécessaire de maîtriser, voire d'éliminer. Compte tenu des possibilités de modifications chimiques associées aux perspectives prometteuses de développement industriel, l'amélioration des seuils biologiques actuels constitue un axe de recherche essentiel. L'agrogénomique peut répondre à ses attentes. Ces outils, développés au sein de notre laboratoire, regroupent l'adaptation des méthodes agronomiques associées à celles de la génomique permettant de caractériser les voies métaboliques impliquées dans la biosynthèse des composés de la graine. Ils visent à optimiser la synthèse dirigée des phytostérols *in vivo* en s'appuyant sur la sélection variétale, à travers l'utilisation de génotypes à potentiel d'expression optimal, et des conduites de culture adaptées et optimisées à l'accumulation des composés désirés, afin d'en étendre les seuils biologiques [51]. Ainsi, à travers l'utilisation d'itinéraires techniques déterminés, nos précédents travaux sur le tournesol révèlent une augmentation de la teneur en stérols sous l'effet d'un stress hydrique sévère et de fortes températures entre le début de la floraison et la fin de maturation des graines (+ 13 % en moyenne tout génotype confondu) [13, 52]. De plus, notre étude a conduit à l'établissement du profil d'accumulation des différents phytostérols dans la graine en maturation de façon à définir les moments d'accumulation

maximale selon le type de phytostérol. La teneur maximale en phytostérols totaux dans la graine de tournesol (230 mg/100 g de matière sèche graine) est atteinte à la moitié du cycle de croissance de la plante, environ 30 jours après floraison, à une maturité physiologique correspondant à une teneur en eau de 50 %. Cette approche permet d'envisager l'utilisation précoce de graines immatures pour mettre en œuvre un procédé d'extraction des phytostérols optimisé tout en raccourcissant le cycle de croissance de la graine. À terme, notre équipe a pour objectif de proposer une matière première améliorée en phytostérols, ou plus généralement en lipides bioactifs, en exploitant la variabilité génétique de composition des espèces végétales, les modes de production au champ et les connaissances sur l'évolution de ces composés dans la graine. Les dites molécules sont destinées à être extraites par des méthodes douces que nous développons au laboratoire où l'eau est le solvant majoritaire [53]. Suite à des résultats préliminaires, il apparaît que la fraction stérolique est extraite en même temps que la fraction lipidique dans une émulsion riche en acides gras. De plus, la modification de la balance hydrophile/hydrophobe des lipides d'intérêt est envisagée par l'insertion d'éléments hydrophiles issus de la glycérine dont les dérivés oligocarboxyles de glycérol s'avèrent des candidats fiables de substitution d'unité oxyéthylène [54-56].

Notre démarche d'amélioration de la teneur en lipides bioactifs et de modification de leur composition s'inscrit dans un schéma intégré de production/transformation des lipides naissant de la raffinerie végétale qui vise à satisfaire les seuils définis pour des demandes industrielles spécifiques. En outre, les nouvelles applications générées par ces molécules représentent une réelle avancée pour le développement d'une agriculture durable car elles génèrent des alternatives d'utilisations guidées par la plus-value garantie par ces constituants mineurs. La démarche entreprise repose donc sur la maîtrise et l'optimisation de la matière première utilisée pour la mise en œuvre de procédés d'extraction facilités des lipides des graines oléoprotéagineuses et implique des connaissances relevant de l'agro-physiologique, de la génomique et de la lipochimie.

Cette démarche s'accompagne également de la mise au point d'outils analytiques de recherche adaptés à de faibles teneurs, comme la détermination des teneurs de différents stérols directement sur la matrice graine qui présente l'intérêt d'éviter une étape d'extraction d'huile contrairement aux technologies actuellement utilisées.

## RÉFÉRENCES

- MIETTINEN TA, TILVIS RS, KESANIEMI YA. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol* 1990 ; 131 : 20-31.
- PELLETIER X, et al. A diet moderately enriched in phytosterols lowers plasma cholesterol concentrations in normo-cholesterolemic human. *Annal of Nutr and Metab* 1995 ; 39 : 291-5.
- BOSNER MS, LANG LG, STENSON WF, OSLUND JRRE. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res* 1999 ; 40 : 302-8.
- OSTLUND JRRE, et al. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy-Delta (5)-phytosterols and phytostanols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002 ; 282 : E911-E916.
- BERGER A, JONES PJH, ABUMWEIS SS. Plants sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis* 2004 ; 3-5.
- MOREAU R, WHITAKER BD, HICKS KB. Phytosterol, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* 2002 ; 41 : 457-500.
- VAN DANSIK P. Phytosterols. In : *Proc. of the final conference CTVO-net, Bonn (Germany)*. 2000 : 149-80.
- FOLMER BM. Sterol surfactants : from synthesis to applications. *Adv Colloid Interface Sci* 2003 ; 103 : 99-109.
- DAGUET, COÏC JP. Phytosterols extraction: state of the art. *OCL* 1999 ; 6 : 25-8.
- PIIRONEN V, TOIVO J, LAMPI AM. Plants sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Food Compos Anal* 2000 ; 12 : 619-24.
- KARLESKIND A. *Oils and Fats Manual*. Paris : Lavoisier Publishing, 1992 : 323 ; (Vol. 1-1).
- PHILLIPS KM, RUGGIO DM, TOIVO JI, SWANK MA, SIMPKINS AH. Free and esterified composition of edible oils and fats. *J Food Compos Anal* 2002 ; 15 : 123-42.
- ROCHE J. Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse (FR). Composition de la graine de tournesol (*Helianthus annuus* L.) sous l'effet conjugué des contraintes agri-environnementales et des potentiels variétaux. 2005 : 298.
- VENKETESHEWER RAO A, JANEZIC SA. The role of dietary phytostérols in colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* 1992 ; 18 : 44-52.
- VLAHAKIS C, HAZEBROEK J. Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils : effects of genetics, planting location, and temperature. *JAOCS* 2000 ; 77 : 49-53.
- WESTER I. Cholesterol lowering effect of plant sterols. *Eur J Lipid Sci Technol* 2000 : 37-44.
- DE JONG J, PLAT J, MENSINK RP. Metabolic effects of plant sterols and stanols (review). *J Nutr Biochem* 2003 ; 14 : 362-9.
- SUGANO WJ, KAMO I, IKEDA I, MORIOKO H. Lipid-lowering activity of phytostanols in rats. *Atherosclerosis* 1976 ; 24 : 301-9.
- HEINEMANN T, KULLACK-UBLICK GA, PIETRUCK B, VON BERGMANN K. Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. Comparison of sitosterol and sitostanol. *Eur J Clin Pharmacol* 1991 ; 40 : 59-63.
- GRUNDY SM, MOK HYI. Optimizing the effect on cholesterol absorption in man. *J Lipid Res* 1997 ; 18 : 263-71.
- NIGON F, SERFATY-LACROSNIERE C, CHAUVOIS D, NEVEU C, CHAPMAN J, BRUCKERT E. Les phytostérols : une nouvelle approche diététique de l'hypercholestérolémie. *STV* 2000 ; 12 : 483-90.
- QUILES JL, HUERTAS JR, OCHOA JJ, BATTINO M, MATAIX J, MANAS M. Dietary fat (virgin olive oil or sunflower oil) and physical training interactions on blood lipids in the rat. *Nutrition* 2003 ; 19 : 363-8.
- LAW MR, WALD NJ, THOMPSON SG. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *BMJ* 1994 ; 308 : 367-72.
- AWAD AB, ROY R, FINK CS. Beta-sitosterol, a plant sterol induces apoptosis and activates key caspases in MDA-MB -231 human breast cancer cells. *On Col Rep* 2003 ; 10 : 497-500.
- TAPIERO H, TOWNSEND DM, TEW KD. Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* 2003 ; 57 : 321-5.
- MOGHADASIAN MH, MCMANUS BM, PRITCHARD PH, FROHLICH JJ. "Tall oil"-derived phytosterols reduce atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc* 1997 ; 17 : 119-26.
- MOGHADASIAN MH, MCMANUS BM, GODIN DV, RODRIGUES B, FROHLICH JJ. Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol and phytosterols in apolipoprotein E-deficient mice : possible mechanisms of action. *Circulation* 1999 : 1733-9.
- BOUIC PJ. The role of phytosterols and phytosterols in immune modulation : a review of the past 10 years. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001 ; 4 : 471-5.
- VAN RENSBURGET SJ, DANIELS WM, VAN ZYL JM, TALJJARD JJ. A comparative study of the effects of cholesterol, beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside, dehydroepiandrosterone, sulphate and melatonin on in vitro lipid peroxidation. *Metab Brain Dis* 2000 ; 15 : 257-65.
- FOLMER BM, SVENSSON M, HOLMBERG K, BROWN W. The physicochemical behavior of phytosterol ethoxylation. *J Colloid Interface Sci* 1999 ; 213 : 112-20.

31. URATA K, TAKAISHI N. Cholesterol as synthetic building blocks for artificial lipids with characteristic physical, chemical and biological properties. *Eur J Lipid Sci Technol* 2001 ; 103 : 29-39.
32. URATA K, TAKAISHI N. Cholesteryl ester compounds containing alkyl branched acyl groups – their preparations, properties and applications. *Fett/Lipid* 1997 ; 99 : 327-32.
33. TAKAISHI N, URATA K, INAMOTO Y, OKAMOTO K, TSUCHIYA S. Branched fatty acids cholesteryl esters and cosmetic composition containing the same. US Pat. No. 4309448 Kao Corp ; 1982.
34. GOKEL GW, HERNANDEZ JC, VISCARIELLO AM, *et al.* Steroidal lariat ethers : a new class of macrocycles and the crystal structure of N-(cholesteryloxy-carbonyl)aza-15-crown-5. *J Org Chem* 1987 ; 52 : 2963-8.
35. HE GX, WADA F, KIKUKAWA K, SHINKAI S, MATSUDA TJ. Syntheses and thermal properties of new liquid crystals bearing a crown ether ring : cation binding in the nematic phase. *J Org Chem* 1990 ; 55 : 541-8.
36. SHINKAI S, NISHI T, MATSUDA TJ. Chirality recognition by a color change in crowned cholesteric liquid crystals. *Chem Lett (Jpn)* 1991 : 437-40.
37. JUN Q, MING-GUI X, ZI-LUN H, HUA-MING Z. Synthesis of amicyclic crown ether liquid crystals. *Synth Commun* 1992 : 2253-8.
38. NAGVEKAR DS, DELAVIZ Y, PRASAD A, MEROLA H, MARAND H, GIBSON HW. Synthesis and properties of cholesteryl esters bearing 32- and 16-membered crown ethers. *J Org Chem* 1996 ; 61 : 1211-8.
39. ZHANG JH, BAZUIN CG, FREIBERG S, BRISSE F, ZHU XX. Effect of side chain structure on the liquid crystalline properties of polymers bearing cholesterol, dihydrocholesterol and bile acid pendant groups. *Polym* 2005 ; 46 : 7266-72.
40. GEORGE M, DAS S. Nonlinear optical properties of some cholesterol based liquid crystals. *Chem Lett (Jpn)* 1999 : 1081-2.
41. YELAMAGGARD CV, HIREMATH US, SHANKAR RAODS, PRASAD SK. A novel calamitic liquid crystalline oligomer composed of three non-identical mesogenic entities : synthesis and characterization. *Chem Commun* 2000 : 57-8.
42. FASBENDER AJ, WELSH CS, SIEGEL CS, *et al.* Compositions comprising cationic amphiphiles and co-lipids for intracellular delivery of therapeutic molecules. WO Pat. No. 97/46223 Genzyme Corp. 1997.
43. SIEGEL CS, HARRIS DJ, LEE SC, *et al.* Cationic amphiphiles containing steroid lipophilic groups for intracellular delivery of therapeutic molecules. US Pat. No. 5747471 Genzyme Corp. 1998.
44. SIEGEL CS, HARRIS DJ, LEE SC, *et al.* New N-spermidine cholesteryl carbamate cationic amphiphiles for facilitating the delivery of biologically active molecules into cells. US Pat. No. 5783565 Genzyme Corp. 1998.
45. SIEGEL CS, HARRIS DJ, LEE SC, *et al.* New cationic amphiphiles compounds used for facilitating transport of biologically active molecules into cells. Particularly for gene therapy. US Pat. No. 5910487 Genzyme Corp. 1999.
46. GEALL AJ, TAYLOR RJ, EARLL ME, EATON MAW, BLAGBROUGH IS. Synthesis of cholesterol-polyamine carbamates : pKa studies and condensation of calf thymus DNA. *Chem Commun* 1998 : 1400-4.
47. COOPER RG, *et al.* Polyamine analogues of 3 $\beta$ -[N-(N',N'-Dimethylaminoethane) carbamoyl]-Cholesterol (DC-Chol) as agents for gene delivery. *Chem Eur J* 1998 ; 4 : 134-51.
48. HELMUT R, GEORG D, NORBERT M, ULRICH S, VOLKER R. Polymerizable liquid crystalline monomers and dental materials based thereon. EP 0754675 Ivoclar AG. 1997.
49. TAJIMA K, AIDA T. Controlled polymerizations with constrained geometries. *Chem Commun* 2000 : 2399-412.
50. BENREBOUGH A, ZHU XX. Synthèse des polymères hydrophiles dérivés de l'acide cholique. In : 66<sup>e</sup> Congrès de l'ACFAS. 1998 : 209.
51. ROCHE J, *et al.* Diversified composition of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds within cultural practices and genotypes (hybrids and populations). *Helia* 2004 ; 27(40) : 73-98.
52. ROCHE J, BOUNIOLS A, MOULOUNGUI Z, BARRANCO T, CERNY M. Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower-oil components. *Eur J Lipid Sci Technol* 2006. Sous-presse.
53. MOULOUNGUI Z, MECHLING E. Method for preparing fatty acids by hydrolysing in situ lipids contained in a plant seeds. WO Pat. No. 2004/022677, R28L3970/17/02/2006.
54. MOULOUNGUI Z, TRUONG-DINH NG, MARECHAL P. Polycarbonate de glycérol. Compositions organiques le contenant. Procédé d'obtention de ces compositions organiques et procédé d'extraction du polycarbonate de glycérol et leurs applications. PCT/FR05/02065 (10/08/2005), FR 0408796 (10/08/2004) (WO 2006/021676/02/03/2006)
55. MOULOUNGUI Z. Voies inhabituelles de synthèse de composés oléophiles à partir des substrats végétaux solides (graines oléoprotéagineuses), liquides (huiles végétales et dérivés, glycérol) par l'industrie chimique. *OCL* 2004 ; 11(6) : 425-35.
56. MOULOUNGUI Z, PELET S. Study of the acyl transfer reaction: structure and properties of glycerol carbonate esters. *Eur J Lipid Sci Technol* 2001 ; 103 : 216-22.