MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE TOLIARA
INSTITUT HALIEUTIQUE ET DES SCIENCES MARINES

OPTION :

BIOTECHNOLOGIE MARINE

Mémoire de fin d'étude en vue d'obtention du diplôme d'étude approfondie (DEA)

VALORISATION DES SOUS-PRODUITS DE CEPHALOPODES : Cas des extraits lipidiques

Présenté par:

FITAHIA Edda Miray

SOMMAIRE

INRODUCTION **1**

I. GENERALITES **4**

1.1. Les lipides 4

1.1.1. Définition 4

1.1.2. Classification 4

1.1.3. Les acides gras 5

1.1.3.1. Nomenclature 6

1.1.3.2. Diversité des acides gras 6

1.1.3.3. Les acides gras essentiels 7

1.1.3.4. Biosynthèse des acides gras 8

1.1.3.5. Biosynthèse des acides gras insaturés et polyinsaturés 10

1.1.3.6. Rôle des acides gras 10

1.1.4. Les lipides simples 11

1.1.4.1. Les glycérides 11

1.1.4.2. Les cérides 11

1.1.4.3. Les stérides 12

1.1.5. Les lipides complexes 12

1.1.5.1. Les lipides phosphorés 13

1.1.5.2. Les lipides azotés 13

1.1.5.3. Les éthers de glycérols ou alkylglycérols 13

1.1.5.4. Les sphingolipides 14

1.2. Les sous-produits de la pêche 14

1.2.1. Les producteurs de sous-produits 14

1.2.2. Les voies de valorisation des sous-produits 14

II. MATERIELS ET METHODES **16**

2.1.Matériels biologiques 16

2.1.1. Les céphalopodes 16

2.1.1.1.Habitat et mode de vie 17

2.1.1.2.Anatomie et physiologie des céphalopodes 18

2.1.2. Matériels biologiques : les sous-produits de poulpe (*Octopus cyanea*) et de calmar(*Sepioteuthis sp*) 20
2.2.Méthodes 21
2.2.1. Collecte des échantillons 21
2.2.2. Extraction des lipides totaux 22
2.2.2.1. Principe 22
2.2.2.2. Mode opératoire 22
2.2.3. Evaporation des solvants 23
2.2.3.1. Principe 23
2.2.3.2. Mode opératoire 24
2.2.4. Analyses chimiques des lipides totaux 24
2.2.4.1. Chromatographie liquide en basse pression (CLBP) 24
2.2.4.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) 27
2.2.4.3. Longueur des chaînes équivalentes (LCE) et analyse des mélanges d'acides gras 30
2.2.5. Evaluation d'éventuelle toxicité des extraits lipidiques 31
2.2.6. Traitement des tourteaux 32
2.2.6.1. Mode opératoire 32
III. RESULTATS 33
3.1.1. Obtention des sous-produits 33
3.1.2. Préparation des lipides totaux 34
3.1.3. Fractionnements des lipides totaux 34
3.1.4. Etudes des fractions phospholipidiques 35
3.3.1.1. Acide gras des phospholipides des sous-produits de poulpe 35
3.3.1.2. Acide gras des phospholipides des sous-produits de calmar 31
3.4. Toxicité des extraits lipidiques 42
3.5. Farines préparés à partir des tourteaux 42
IV. DISCUSSION 43
CONCLUSION 47
BIBLIOGRAPHIE 49

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification des lipides 5

Figure 2 : Représentation d'un acide gras 5

Figure 3 : Aperçu général de la biosynthèse des acides gras 9

Figure 4 : Représentation d'un céride 12

Figure 5 : Cholestérol 12

Figure 6: Classification de *Sepioteuthis sp* et *Octopus cyanea* ..... ….16

Figure 7 : Récifs de la côte Ouest de Madagascar 17

Figure 8 : Section transversale de céphalopodemontrant les structures et organes qui constituent le viscéropallium 18

Figure 9 : Appareil digestif de céphalopodes 19

Figure 10 : Sous-produits de céphalopodes 20

Figure 11 : Quantité des sous-produits de céphalopodes de COPEFRITO 21

Figure 12 : Schéma de l'extraction d'une substance 22

Figure 13 : Extraction des lipides totaux des sous-produits de poulpe 23

Figure 14 : Extraction des lipides totaux des sous-produits de calmar 23

Figure 15 : Evaporation des lipides totaux sous rotavapor 24

Figure 16 : CLBP sur gel de silice 25

Figure 17 : Schéma général d'une membrane cellulaire 27

Figure 18 : Schéma d'un appareil de couplage CPG-SM 28

Figure 19 : Cobayes pour le test toxicologique 31

Figure 20 : Provende tapissé de lipides totaux 31

Figure 21 : Mode opératoire pour fabrication de farines 32

Figure 22 : Lipides totaux des sous-produits de poulpe 34

Figure 23 : Lipides totaux des sous-produits de calmar 34

Figure 24 : Droite de régression des EMAGs saturés des phospholipides des sous-produits de poulpe 35

Figure 25 : Spectre de masse des EMAGs des fractions phospholipidiques des sous-produits de poulpe 36

Figure 26 : Droite de régression des NAP saturés des phospholipides des sous-produits de poulpe 36

Figure 27: Spectre de masse des NAP des fractions phospholipidiques des sous-produits de poulpe 37

Figure 28 : Droite de régression des EMAGs saturés des phospholipides des sous-produits de calmar 39

Figure 29: Spectre de masse des EMAGs des fractions phospholipidiques des sous-produits de calmar 39

Figure 30 : Droite de régression des NAP saturés des phospholipides des sous-produits de calmar 40

Figure 25: Spectre de masse des NAP des fractions phospholipidiques des sous-produits de calmar 40

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Biosynthèse des acides gras polyinsaturées 10

Tableau 2 : Utilisation des différents types de dérivés par types d'application..... 15

Tableau 3 : Déchets de poulpe et de calmar..... 20

Tableau 4 : Solvants utilisés en fonction des classes de lipides en CLBP 26

Tableau 5 : Typologie des sous-produits 33

Tableau 6 : Teneur en lipides des sous-produits 34

Tableau 7 : Fractionnements des lipides totaux des sous-produits de poulpeet de calmar 35

Tableau 8 : Composition en acide gras des phospholipides des sous-produits de poulpe 38

Tableau 9 : Composition en acide gras des phospholipides des sous-produits de calmar 41

Tableau 10 : Rendement de la production de farine..... 42

RESUME

Le présent travail porte sur l'étude des lipides extraits des sous-produits de poulpe (*Octopus cyanea*) et de calmar (*Sepioteuthis sp*). Le principal objectif étant de préserver l'environnement tout en recherchant des valeurs commerciales aux sous-produits par la production d'huile marine.

La méthode de Folch a été choisie pour l'extraction des lipides. Les lipides totaux obtenus, de l'ordre de 0,5%, ont été fractionnés sur CLBP. Les phospholipides ainsi obtenues ont été étudiée surCPG-SM. Le résultat aprésenté une trentaine d'acide gras pour les sous-produits de poulpe contre une vingtaine d'acide gras pour celuide calmar. Les sous-produits de poulpe et de calmar ont révélé une forte proportion d'acide palmitique (C16 :0), pour une valeur respective de 12% et 33 %,et d'acide stéarique (C18 :0) pour une moyenne de 12%. Ils ont aussi une importante quantité d'AGPI (48% et 36%) qui renferment des acides gras essentiels (ω3 et ω6) en quantité variable.

Les tourteaux de l'extraction des lipides totauxont été transformés en farine pour une valorisation totale.

Mots clés : Sous-produits de la pêche, lipides, acides gras, poulpe, calmar

ABSTRACT

This work concerns about study of the lipids extracted into by-products of octopus (*Octopus cyanea*) and squid (*Sepioteuthis sp*). The main objective of this study isbeing to preserve the environment while seeking commercial values with the by-products by the producing a lipid from the marine animals.

The Folch's methodwas selected for the first time of this study. The total lipids obtained (0.5%), were split on CLBP. The phospholipids thus obtained were studied on CPG-SM and was studied on CPG-SM. The result presented thirty fatty acid for the octopus by-products against about twenty fatty acid for that of squid. The by-products of octopus and squid revealed a strong proportion of palmitic acid (C16:0), for a respective value of 12% and 33 %, and stearic acid (C18:0) for an average of 12%. They have also a significant quantity of AGPI (48% and 36%) which contain essential fatty acids (ω3 and ω6) in variable quantity.

Theoil's wastes of the extraction of the total lipids were transformed into flour for a total valorization.

Key words: By-products of fishing, lipids, fatty acid, Octopus, Squid

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Clé d'interprétation des EMAG

Annexe 2 : Clé d'identification des NAP

Annexe 3 : Temps de rétention et pourcentages massique des EMAGs des phospholipides des sous-produits de poulpe

Annexes 4 : Temps de rétention et pourcentages massique des NAP des phospholipides des sous-produits de poulpe

Annexe 5 : Temps de rétention et pourcentages massique des EMAGs des phospholipides des sous-produits de calmar

Annexe 6 : Temps de rétention et pourcentages massique des NAP des phospholipides des sous-produits de calmar

Annexe 7 : recommandations nutritionnelles pour les lipides

LISTE DES ACRONYMES

AG : acide gras

AGI : acide gras insaturé

AGMI : acide gras monoinsaturé

AGPI : acide gras polyinsaturé

AGS : acide gras saturé

ALA : acide gras α-linolénique

ATP : Adénosine Tri Phosphate

BF_3 : Trifluorure de bore

CLBP : Chromatographie liquide à basse pression

CNRE : Centre National de Recherches sur l'Environnement

CO_2 : Gaz carbonique

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse – Spectrométrie de masse

COPEFRITO : COmpagnie de PEche FRIgorifique de TOliara

DHA : acide docosahexaénoïque

DMA : Diméthylacétal

EMAG : Esters méthyliques d'acide gras

EPA : acide éicosapentaénoïque

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

OCDE : Organisation de coopération et de développement économique

KOH: hydroxyde de potassium

IH.SM : Institut Halieutique et des Sciences marines

LA : acide gras linoléique

LME : laboratoire de microbiologie de l'environnement

NaOH: soude

NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide reduced form

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced form

NAP : N-acylpyrrolidide

NH_3: Ammoniac

Tr : Temps de rétention

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait certainement pas pu voir le jour sans l'assistance de plusieurs personnes.

Je tiens d'abord à exprimer mes profonds respects et mes vifs remerciements à monsieur RAMAMPIHERIKA Daniel, Maître de conférences et Directeur de l'Institut Halieutique et des Sciences Marines (IH.SM.) pour l'enthousiasme qu'il met à défendre l'institut.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mon encadreur, monsieur RAHERINIAINA Christian, Docteur en Biochimie et Maître de Conférences à l'IH.SM, sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir. Je tiens à lui adresser toute ma gratitude pour toute l'énergie qu'il a apporté à ce travail. Je lui remercie aussi pour sa disponibilité, son écoute et pour toute l'aide qu'il m'a donné.

Je souhaite exprimer ma reconaissance à mon encadreur technique, Monsieur RALAMBODRAHETY Rahanira, qui m'a acceuillie dans le laboratoire du Centre National de Recherche sur l'Environnement (CNRE), unité « extraction et analyse des produits naturels ». et pour son précieux aide dans la réalisation de ce mémoire. Je lui remercie pour m'avoir initié la chimie et pour m'avoir fait découvrir un goût à cette filière.

Un grand merci également à tous les stagiaires du Laboratoire de Microbiologie de l'Environnement (LME), unité « extraction et analyse des produits naturels »du CNRE qui ont eu l'aimabilité, pendant mon stage dans ce laboratoire, de

passer un petit moment sur ce sujet et de me donner leur avis. Merci à Chantal, Nary et Andry.

Je tiens aussi à remercier madame Vony RABESAOTRA et tout le personnel du laboratoire de chimie marine du groupe Mer-Molécules-Santé de l'Université de Nantes à France dirigé par le Professeur Gilles BARNATHAN pour leur collaboration fructueuse.

Mes sincères remerciements à toute l'équipe du laboratoire de chimie de l'IH.SMpour toutel'aide qu'ils m'ont apportéet, parfois, leur solutions. Merci à madame RASOAMANANTO Irène et madame RASOAMANENDRIKA Faravavy Marie Agrippine.

Je voudrais remercier aussi ma chère famille pour leurs soutiens moral et financier, pour tous les efforts et les sacrifices qu'elle n'a cessé de faire pendant tout mon parcours et pendant la période de réalisation de ce mémoire.

Enfin, je remercie tous ceux que j'aurais omis de nommer et qui ont contribué, de près ou de loin, à ce présent travail.

INTRODUCTION

Les océans se composent d'un ensemble d'organismes et d'écosystèmes caractérisés par une longue évolution et par des conditions de fonctionnement tout à fait originales. Ils regroupent une grande diversité phylétique depuis les planctons, les éponges, les algues, les mollusques jusqu'aux poissons, etc. en développant une plus grande diversité biochimique.

Les organismes marins possèdent des systèmes physiques et biochimiques adaptés aux contraintes du milieu. Ils se communiquent entre eux par des molécules chimiques qui, comme la production de phéromone sexuelle, favorise la ponte chez certains organismes et sert d'attraction sexuelle chez d'autres. Ils émettent des signaux chimiques qui leurs permettent la détection puis la prise des nourritures, provoquent la réaction de fuite en présence des prédateurs ou encore conditionnent la sécrétion de toxines chez de nombreux invertébrés. L'évolution de la recherche des molécules d'origine marin, ces dernières années, a permis d'isoler et de structurer certains de ces signaux chimiques. On parle de la chimiodiversité des organismes marins.

A partir de cette chimiodiversité, on a penché par la suite à l'étude de leur éventuelle valorisation dans divers domaines dont la pharmacologie marine, la cosmétologie marine, la nutraceutique, l'alimentation humaine et animale,… De nombreux résultats prometteurs ont été obtenus motivant ainsi les chercheurs à développer cet axe de recherche. Citons quelques exemples à titre d'illustration. Les algues marines représentent un complément alimentaire intéressant. Elles contiennent des composés d'acides aminés comparables à celle de l'ovalbumine de l'œuf, une grande richesse en vitamines, sels minéraux et oligoéléments qui représentent un des intérêts majeurs des algues utilisées en tant que compléments alimentaires. Les poissons ont également une qualité nutritionnelle plus élevée que celle de la viande et du lait. Ils possèdent des nutriments bien équilibrés. Ainsi, la richesse en acides aminés, en acides gras polyinsaturés, en éléments minéraux et en vitamines fait des produits de la mer des produits de hautes valeurs nutritionnelles (Kato et al, 1990).Certains organismes marins sont également réputés par les activités biologiques de leurs extraits. Par exemple, des produits extraits d'une éponge *Tethya crypta* sont utilisés pour traiter l'herpès (Norse, 1993). La Céphalosporine C, isolée du champignon marin : *Cephalosporium acremonium*, est un antibiotique comparable à la Pénicilline G, isolée du champignon terrestre :*Penicillium notatum.*

Dans cette immense diversité chimique, avancée précédemment, que contient les organismes marins, nous allons distinguer la famille des lipides marins. Les plus primitifs de ces organismes marins produisent une grande variété de lipides et d'acides gras (Ackman, 1989 ; Bergé et Barnathan, 2005 ; Kornprobst, 2010) qui s'incorporent d'espèces en espèces via la chaîne alimentaire. Les poissons sont connus pour contenir beaucoup d'acides gras polyinsaturés de la famille des omégas 3 (ω3) et des omégas 6 (ω6). Les algues et les invertébrés possèdent surtout des acides gras avec des insaturations séparées par plus de méthylènes (Barnathan, 2010). Selon des nombreuses littératures, les lipides présents dans chacun des organismes marins font partie de l'alimentation humaine depuis longtemps et sont d'ailleurs indispensables à la santé. Ils sont actuellement réputés comme des compléments alimentaires grâce à leurs vertus pharmaceutiques. Ils participent à des processus métaboliques très importants comme le fonctionnement du système cardiovasculaire, du cerveau et du système hormonal ainsi que la régulation des réactions inflammatoires. L'huile de requin, par exemple, renferme de l'alkyl glycérol qui a des propriétés immunostimulantes et ralentisse la prolifération tumorale (Torres, 2010). Les lipides fournissent non seulement de l'énergie mais contribuent aussi à la régulation de la température corporelle. En plus, les lipides permettent à l'organisme l'absorption et la fixation des quelques vitamines de la famille A, D, E et K.

L'environnement marin représente ainsi incontestablement un trésor d'organismes qui subissent actuellement une surexploitation. Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) dans son rapport en 2006, environ les trois quart des réserves marines surveillées sont à présent complètement exploitées, surexploitées voire même épuisées. En 2009, la production mondiale totale de poissons, de crustacés et de mollusques continue à augmenter et a atteint 145 millions de tonnes (OCDE, 2011). Pour les céphalopodes (calmars, seiches et poulpes), les captures totales ne cessent d'augmenter et arrivent à plus de 35 % durant les cinq dernières années. Cette augmentation est également observée dans le sud-ouest malgache. En effet, l'exportation des céphalopodes a connu un développement rapide depuis les vingt dernières années pour atteindre, en 2010, près de 1500 tonnes (COPEFRITO, 2010).

La hausse de la production mondiale des produits de pêche est liée à la demande des consommateurs notamment dans les pays développés. Cela a favorisé l'implantation, partout dans le monde, de plusieurs sociétés de pêche qui pratiquent des activités de collecte, de pêche directe en mer et/ou d'élevage des espèces ciblées via la technique d'aquaculture. Dans tous les cas, avant d'exporter leurs produits, ces sociétés de pêche

doivent les traiter (éviscération, étêtage,…) et ce, suivant les exigences de leurs clients importateurs. Ces activités génèrent une quantité considérable des sous-produits qui ne sont pas valorisés et sont traités comme des déchets. En tant que tels, nombreuses sociétés les jettent dans divers sites soit en terre soit en mer. Une fois jetés, en terre ferme, ils subissent une dégradation à cause de la prolifération bactérienne et provoquent ainsi des mauvaises odeurs aux alentours des sites de décharges. Ceux qui sont jetés en mer s'ajoutent aux divers polluants organiques déversés quotidiennement dans les océans. Une fois en mer, ils deviennent des nourritures pour les microorganismes notamment des bactéries. Ils contribuent alors à la multiplication microbienne dans la mer. Les déchets métaboliques de ces microorganismes, essentiellement les CO_2 et NH_3, deviennent à leur tour des nutriments pour les végétaux marins. Une prolifération massive des phytoplanctons pourrait être apparue à tout moment lorsque les facteurs physico chimiques soient favorables : on assisterait à un bloom algal. Ainsi, le fait de jeter les sous-produits de la pêche génère un problème environnemental et aussi un problème économique pour les sociétés de pêche qui doivent engager une charge supplémentaire pour les acheminer vers les sites de décharge.

Face à cette situation, problèmes environnemental et économique, un programme de recherche axé sur la « ***Valorisation biotechnologique des sous-produits de la pêche*** », qui s'intègre dans le domaine de la Biotechnologie Marine, a été mis en place au Laboratoire de Chimie de l'Environnement de l'IH.SM depuis 2010. D'après notre bibliographie, aucune institution universitaire ni de recherche à Madagascar ne s'intéresse pas encore sur cette thématique de recherche démontrant ainsi l'originalité de notre étude. La valorisation constitue l'unique solution aux problèmes générés par les sous-produits de la pêche d'où la volonté des sociétés de pêche à soutenir le programme. Parmi les thèmes liés à ce programme de recherche, nous avons choisi d'étudier les lipides extraits des sous-produits de poulpe et de calmar. Aussi, avons-nous intitulé de notre mémoire par « ***Valorisation des sous-produits de céphalopodes : cas des extraits lipidiques*** ».

Pour pouvoir bien présenter notre travail, nous allons rapporter après cette introduction des généralités, d'abord sur les lipides, puis les sous-produits de la pêche. Les matériels et méthodes adoptées seront donnés après. Les résultats obtenus seront présentés puis discutés avant de tirer une conclusion.

I. GENERALITES

1.1. LES LIPIDES

1.1.1. Définition

Les lipides (du grec *lipos*, graisse) sont des molécules biologiques qui constituent les principaux des corps gras alimentaires et du tissu adipeux de l'organisme. Ayant la propriété commune d'être insolubles dans l'eau, ils sont caractérisés par leur grande solubilité dans les solvants organiques tels que le méthanol, le chloroforme, les éthers ou les alcools.

Grâce à une très bonne perméabilité, ils permettent de délimiter les différents compartiments cellulaires des organismes, qu'ils soient de type animal ou végétal, et constituent de ce fait les éléments essentiels des membranes biologiques. Mais cette caractéristique des lipides ne constitue pas leur unique fonction. En effet, ils jouent également un rôle très important dans la constitution des réserves énergétiques, ou dans les propriétés des pigments photosynthétiques.

1.1.2. Classification

On classe les lipides en deux catégories : les lipides à base d'acide gras et les lipides à base d'isoprène (lipides polyisopréniques).

Dans la catégorie des lipides à base d'acides gras, on retrouve les acides gras eux-mêmes ainsi que deux familles nommées lipides simples et lipides complexes. Les lipides simples regroupent les glycérides, les cérides et les stérides. Les lipides complexes désignent les lipides phosphorés, les lipides azotés et les lipides soufrés. Chacun de ces familles est elle-même divisée en plusieurs catégories de composés lipidiques regroupés par leur homologie de structure.

Les lipides à base d'acides gras sont également appelés « lipides saponifiables » (lipides qui, traités avec NaOH ou KOH, donnent du savon). En revanche, les lipides ne donnant pas savon par traitement alcalin sont appelés « lipides insaponifiables ». Ce dernier groupe renferme les lipides polyisopréniques qui sont divisés en quatre catégories : les terpénoïdes, les caroténoïdes, les quinones à chaîne isoprénique et les stéroïdes. Cette classification de lipide est illustrée par la figure 1.

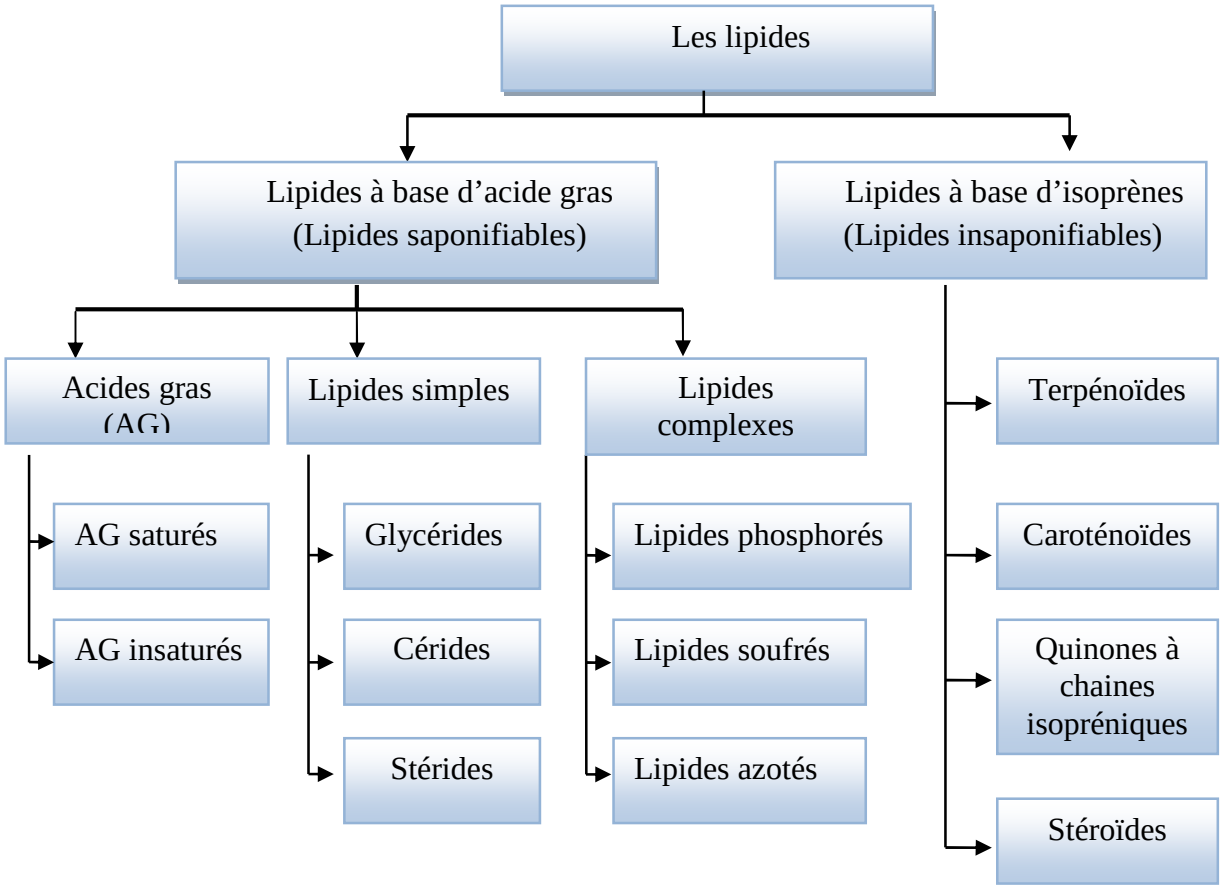


Figure 1 : Classification des lipides
Source : http://www.azaquar.com

1.1.3. Les acides gras

Les acides gras sont des acides organiques, monocarboxyliques à chaîne hydrocarbonée longue, généralement linéaire. Leur formule générale est du type $CH_3(CH_2)_nCOOH$ présentant des liaisons saturées ou non. Leurs extrémités sont composées d'un radical méthyle d'une part et d'un groupement fonctionnel carboxylique d'autre part.

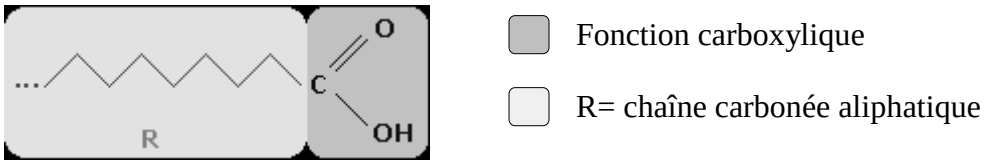


Figure 2 : Représentation d'un acide gras (d'après Elatiqy, 2010)

Les acides gras se rencontrent sous forme libre uniquement au cours de la synthèse et de la dégradation des lipides. Ils sont dans la majorité des cas intégrés dans les molécules lipidiques.

Les acides gras se caractérisent par le nombre d'atomes de carbone entrant dans la composition de la chaîne aliphatique, les éventuelles ramifications, ainsi que par le nombre de doubles liaisons présentes, leurs positions et leur configuration (cis ou trans). La ou les double(s) liaison(s) des acides gras insaturés d'origine biologique se trouvent sous la configuration cis. Quelques exceptions présentent une configuration trans (exemples : produits laitiers, produits transformés,…).

1.1.3.1. Nomenclature

Deux nomenclatures principales sont à ce jour utilisées pour indiquer la position des différentes doubles liaisons :

Dans la nomenclature «Δ», la position d'une double liaison sur la chaîne est notée en précisant la position du premier atome de carbone porteur de la double liaison. La position 1 est celle de l'atome de carbone du groupement carboxylique.

Une autre nomenclature dite «n-x», ou «ω» consiste à numéroter la position de la dernière double liaison à partir du carbone terminal (radical méthyle) de la chaîne d'acide gras. Même si cette nomenclature ne donne aucune précision sur la position des autres doubles liaisons, elle possède l'avantage de mettre en évidence la filiation des acides gras insaturés par famille.

Dans les molécules d'origine biologique, les doubles liaisons sont disposées selon le motif dit de « méthylène intercalé » ($–CH=CH–CH_2–CH=CH–$). Les propriétés physiques des acides gras dépendent de la longueur de la chaîne et du nombre d'insaturations présentes. Ainsi, il a été montré que la solubilité dans l'eau des acides gras est moindre quand la chaîne est longue et les insaturations nombreuses (Dumay, 2006).

Les acides gras peuvent également être appelés par leur nom trivial. Ce dernier fait généralement référence à l'organisme dans lequel ils ont été originellement identifiés. Ainsi, l'acide arachidonique de formule $CH_3–(CH_2)_4–(CH=CH–CH_2)_4–COOH$ s'écrit également 20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$ ou encore 20:4ω6 et fait référence à l'arachide.

1.1.3.2. Diversité des acides gras

On classe les acides gras en deux différentes catégories:

- **Les acides gras saturés (AGS) linéaires ou ramifiés** qui sont des acides gras dont tous les atomes de carbone sont saturés en hydrogène. Ils sont majoritairement présents dans les matières grasses d'origine animale et sous forme cachée dans les viandes,

les charcuteries, les fromages et les pâtisseries. Il faut en limiter les apports car consommés en excès, ils favorisent l'apparition des maladies cardiovasculaires.

- **Les acides gras insaturés (AGI)** qui comportent une ou plusieurs doubles liaisons. Ils sont mono insaturés s'ils ne contiennent qu'une seule double liaison et polyinsaturés s'ils ont plusieurs doubles liaisons. Comme on l'a présenté auparavant, la présence de double liaison entraîne une isomérie « cis » ou « trans ». Les acides gras naturels sont généralement de configuration « cis » et se retrouvent principalement dans les huiles végétales et les poissons gras. Ils interviennent dans de nombreuses réactions de l'organisme. Mais on peut aussi trouver des acides gras « trans » dans certains aliments comme les produits laitiers, les graisses et la viande des ruminants. Les acides gras « trans » sont obtenus quelque fois par transformation bactérienne.

Les acides gras insaturés se rencontrent aussi bien dans le monde animal que végétal: viandes, poissons et fruits oléagineux. Dans le cadre d'une alimentation équilibrée, ces acides gras ont un rôle bénéfique sur le fonctionnement du cœur et des vaisseaux sanguins.

1.1.3.3. Les acides gras essentiels

Un acide gras est dit essentiel lorsque l'organisme ne peut pas le biosynthétiser. Par conséquent, il doit être apporté quotidiennement dans l'organisme.

Chez l'homme, deux acides gras polyinsaturés sont essentiels : les acides gras linoléique (LA ; 18:2ω6) et α-linolénique (ALA ; 18:3ω3) appartenant respectivement à la famille des oméga-6 et des oméga-3. En effet, seuls les végétaux ont la capacité de les synthétiser. Par contre, les acides gras γ-linolénique et arachidonique sont considérés comme quasi-essentiels (leurs synthèses dans l'organisme diminuent avec l'âge).

Les animaux sont capables de convertir les acides linoléique (18:2ω6), α-linolénique (18:3ω3), oléique (18:1ω9) et palmitoléique (16:1ω7) en 4 familles d'acides gras polyinsaturés. Tous ces composés vont par la suite subir l'action des enzymes spécifiques pour aboutir à la formation de nombreuses classes de molécules indispensables au bon fonctionnement de l'organisme.

Les familles ω6 et ω3 ont pour caractéristique d'avoir leur première double liaison située respectivement au carbone n°6 (n-6) et carbone n°3 (n-3) de l'extrémité méthyle. Ces deux doubles liaisons sont impossibles à insérer chez l'homme et l'animal. En revanche, l'homme et l'animal peuvent ajouter (grâce à un ensemble d'enzymes), aux deux acides gras indispensables (LA et ALA), des doubles liaisons supplémentaires vers

l'extrémité carboxylique et allonger la chaîne à cette extrémité. L'ensemble des dérivés obtenus, ajoutés aux deux acides gras indispensables précurseurs, constituent les deux familles d'acides gras essentiels, nécessaires au maintien d'une fonction biochimique, cellulaire ou physiologique donnée. Les familles ω7 et ω9 ne sont pas considérées comme essentielles.

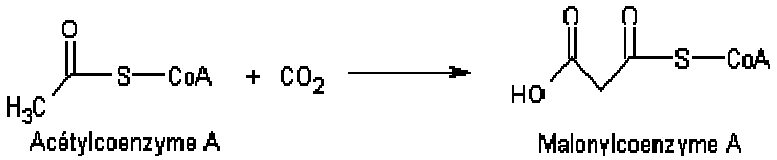
Dans la grande famille des ω3, on note également l'existence de deux acides gras clés qui sont largement utilisés par l'organisme. Ces derniers sont l'acide éicosapentaénoïque ou EPA (20:5 ω3) et l'acide docosahexaénoïque ou DHA (22:6 ω3). Le DHA est directement synthétisé à partir de l'EPA. Ces AGPI sont présents en très grande quantité dans le cerveau et paraissent jouer un rôle particulièrement important dans les fonctions comportementales et de la perception. Le DHA se retrouve également au niveau des cellules de la rétine et paraît jouer un rôle dans la création et l'entretien de la vision oculaire (Uauy-Dagach et Valenzuela, 1996).

1.1.3.4. Biosynthèse des acides gras

En 1893 Norman Collie, s'appuyant sur des bases purement structurales en étudiant des composés aujourd'hui appelés acétogénines, émet l'idée que l'acide acétique est un composé de départ possible lors de la biosynthèse de différentes molécules organiques. Cette hypothèse s'est confirmée plus tard, lorsque le marquage des molécules par l'isotope radioactif ^{14}C a été possible.

La biosynthèse d'acide gras est assurée par l'acide gras synthase. Elle est précédée par la voie du malonylCoA par laquelle, et sous l'action de l'acétylCoA carboxylase, l'acétylCoAse condense avec du CO_2pour donner du malonylCoA en consommant de l'énergie sous forme d'ATP. La fixation du malonyle et de l'acétyle sur les deux bras de l'acide gras synthase déclenche la biosynthèse des acides gras. Le schéma donné dans la figure 3 suivante nous donne un aperçu général de la biosynthèse des acides gras.

Voie du malonylCoA :



Fixation de l'Acétyle et du Malonyle sur l'Acide gras synthase.

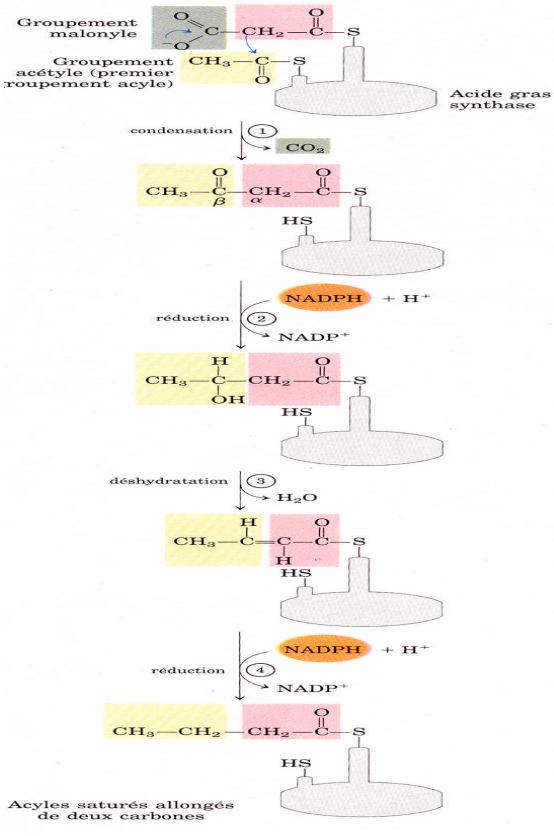


Figure 3: Aperçu général de la biosynthèse des acides gras

Après condensation des deux molécules (acétylCoA et malonylCoA) sur l'acide gras synthase, trois réactions (deux réductions et une déshydratation) s'en suivent et il se forme un radical acyle à 4 atomes de carbone qui va se déplacer sur le bras périphérique de l'enzyme. Un nouveau malonyle vient se fixer sur le bras central de l'enzyme qui, après condensation avec le radical acyle, met en route les réactions nécessaires pour additionner deux carbones allongeant ainsi la chaîne. A terme de l'élongation de la chaine par addition des deux carbones, une réaction d'hydrolyse catalysée par des acylase détache l'acide gras nouvellement biosynthétisée du complexe enzymatique : l'acide gras synthase. On obtient alors un acide gras de formule générale CH_3–$(CH_2)_{2n}$–COOH.

La lipogenèse permet la synthèse d'acides gras saturés par condensation de molécules d'acétate à 2 carbones. Chez les mammifères, ce processus a lieu dans le cytoplasme des cellules, principalement du foie, des tissus adipeux et des glandes mammaires. Cependant, il ne permet pas de synthétiser des acides gras saturés à plus de 16 carbones (acide palmitique) ou des acides gras insaturés.

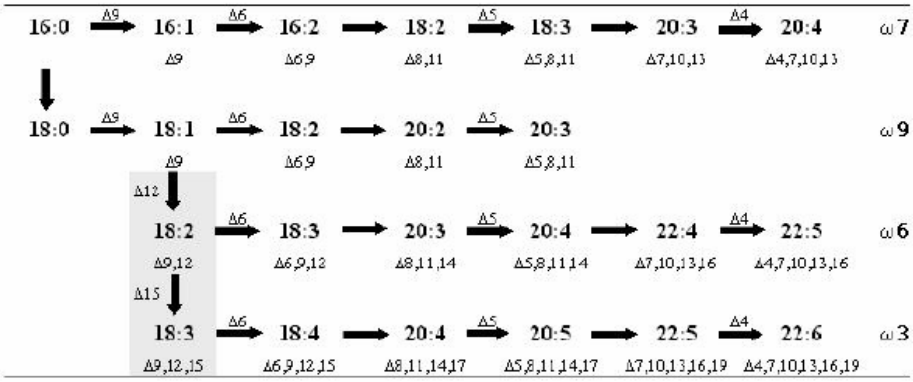
L'élongation des acides gras saturés ainsi que l'insaturation des chaines d'acides grasse font à partir des acides gras à 16 et à 18 atomes de carbone.

1.1.3.5. Biosynthèse des acides gras insaturés et polyinsaturés

La synthèse des acides gras insaturés à partir des acides gras saturés a lieu aux niveaux de la membrane du réticulum endoplasmique par des acide gras désaturases (en présence de coenzymes réduits NAD+, NADP+) qui agissent spécifiquement entre la double liaison et le groupement carboxyle chez les animaux. Chez les végétaux, en revanche, les doubles liaisons peuvent être ajoutées entre la double liaison qui préexiste et l'extrémité méthylique. Par ailleurs, l'élongation s'effectue à partir du groupement carboxylique.

Ces deux spécificités ont conduit à la notion de famille (cf. les acides gras essentiels p7, §3), déterminée à partir de la position de la première double liaison, à partir du groupement méthyle terminal. Ceci est illustré dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : biosynthèse des acides gras polyinsaturés (d'après Bergé, 1996)



Ainsi, les acides gras mono insaturés 16:1ω7 et 18:1ω9 produits respectivement à partir du 16:0 et du 18:0 donnent naissance aux familles ω7 et ω9. Les acides gras 18:2ω6 (LA) et 18:3ω3 (ALA) sont eux les précurseurs des familles ω6 et ω3.

1.1.3.6. Rôle des acides gras

- **Rôle métabolique**: les acides gras sont une source d'énergie importante pour l'organisme. Ils sont stockés sous forme de triglycérides dans les tissus adipeux. Lors d'un effort, en particulier lors d'un effort de longue durée, l'organisme va puiser dans ces stocks et dégrader les acides gras afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP.

- **Rôle structural**: les acides gras servent à la synthèse d'autres lipides, notamment les phospholipides qui forment les membranes autour des cellules et des organites. La composition en acides gras de ces phospholipides donne aux membranes des propriétés physiques (élasticité, viscosité) particulières.

- **Rôle de messager**: les acides gras sont les précurseurs de plusieurs messagers intra et extracellulaires. Par exemple, l'acide arachidonique est le précurseur des eïcosanoïdes et prostaglandines, hormones intervenant dans l'inflammation, la coagulation sanguine, etc.

1.1.4. Les lipides simples

Les lipides simples sont des lipides qui ne contiennent que du carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Ils sont classés en trois différents groupes : les glycérides, les cérides et les stérides.

1.1.4.1. Les glycérides

Les glycérides sont connues sous le nom de lipides neutres. Les glycérides sont des esters de glycérol et d'acide gras. Les glycérides peuvent être classées en trois groupes selon le nombre d'acides gras greffés sur le glycérol : les monogycérides, les diglycérides et les triglycérides. Si les triglycérides sont solides, on les appelle des graisses et s'ils sont liquides, on les qualifie d'huile.

Les diglycérides sont présents dans de très nombreux types cellulaires (adipocytes, hépatocytes, graines végétales…). Ces derniers sont plus particulièrement localisés à l'intérieur du cytoplasme des vacuoles de réserve. Leur principale fonction est de constituer des réserves énergétiques. De plus, certains diglycérides membranaires jouent le rôle de molécules informationnelles (=seconds messagers) (Dubois, 2005).

1.1.4.2. Les cérides

Les cérides, appelés couramment cires, sont des esters d'acides gras et d'alcools aliphatiques à longues chaînes. Ils sont en général des alcools primaires, au nombre pair de carbones, saturés et non ramifiés.

Les cérides jouent un rôle essentiel dans la protection extérieure des organismes, qu'ils appartiennent au monde animal ou végétal. Ils peuvent néanmoins constituer, dans certains cas, des réserves énergétiques (par exemple chez le plancton marin). Il est également important de préciser que l'organisme humain est incapable de métaboliser les cérides. En effet, seuls les insectes en sont capables.

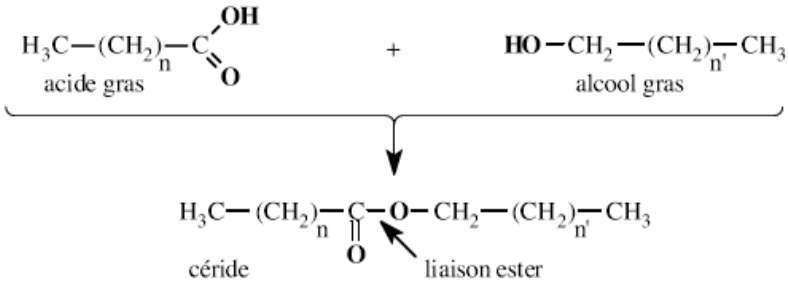


Figure 4 : représentation d'un céride

Source : Elatiqy, 2010

1.1.4.3. Les stérides

Les stérides sont des esters d'acides gras et de stérols. Selon l'origine des stérides, on distingue trois groupes : les fungistérols (spécifiques aux champignons), les phytostérols (constituants la partie insaponifiable des végétaux) et les zoostérols (présents dans les tissus animaux) (Vioanova et al, 1994). La molécule la plus représentée de ce dernier groupe est le cholestérol.

Le cholestérol est la substance lipidique la plus importante d'un point de vue métabolique notamment en tant que précurseur des hormones stéroïdes, des sels biliaires, etc.

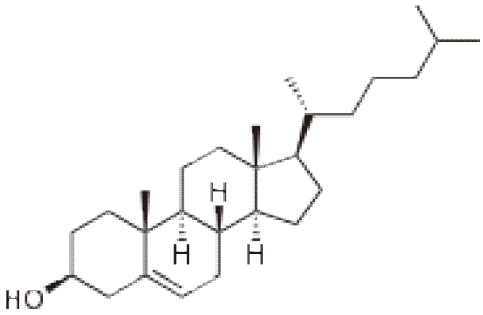


Figure 5 : Cholestérol

Source : http://www.wikipedia.org

1.1.5. Les lipides complexes

Les lipides complexes à part d'être composé de carbone, hydrogène et oxygène contiennent aussi des groupements phosphates, sulfates ou glucidiques. Ils sont classés en fonction de la partie moléculaire qui fixe l'acide gras.

1.1.5.1. Les lipides phosphorés

Les lipides phosphorés ou phospholipides sont des composés lipidiques qui contiennent du phosphore. Ce sont les lipides les plus abondants dans les membranes biologiques. On désigne sous le terme de phospholipides l'ensemble des glycérophospholipides et des sphingophospholipides.

Les glycérophospholipides sont formés à partir du squelette d'un monoester de glycérol. Leur structure de base est formée d'un diacylglycérol et d'un phosphate appelé acide phosphatidique. En générale, le phosphate est également lié à un composé polaire hydroxylé (ex. la choline, la sérine, l'éthanolamine). Un exemple bien connu de phosphatidyle est la lécithine, souvent utilisée comme additif alimentaire. La lécithine est présente dans tous les cellules vivantes, en particulier dans les cellules nerveuses et dans les globules rouges du sang.

Ces molécules ont des propriétés tensio-actives. Ils se manifestent plus particulièrement au niveau des poumons, à la surface des alvéoles. Lors des échanges gazeux, les phospholipides vont empêcher les cellules de ces dernières de se collapser (Dubois, 2005).

1.1.5.2. Les lipides azotés

Les lipides azotés sont les composés lipidiques qui contiennent de l'azote. Ils sont également des constituants des membranes biologiques. Dans ce groupe, on distingue les acyles sphingosines ou céramide et les sphingosidolipidiques ou glycolipides.

1.1.5.3. Les éthers de glycérols ou alkylglycérols

Les éthers de glycérol, encore appelés alkylglycérols, ont une origine essentiellement hépatique, et se retrouvent dans la fraction insaponifiable des extraits lipidiques. Ce sont des composés présents exclusivement chez les animaux et existants en très grande quantité chez des organismes tels que le requin, la raie et la chimère (Mangold et Paltauf, 1983). Chez ces organismes, ce sont des composés mineurs à l'état libre, car ils se retrouvent majoritairement sous forme liée par une liaison de type ester à des acides gras et/ou à de l'acide phosphorique, un ose, ou une chaîne oligosacharidique.

L'huile de foie de certaines espèces de requins contient jusqu'à 50% d'alkylglycérols.

1.1.5.4. Les sphingolipides

Les sphingolipides sont des molécules qui se retrouvent au sein des membranes des cellules de tous les organismes vivants. Ils ont un rôle de protection contre les infections. Ces molécules favorisent également l'équilibre cellulaire et ralentissent le vieillissement des cellules, comme celles de la peau, du cerveau ou de l'intestin. Ce sont des lipides dont l'acide gras est lié à une base azotée à longue chaîne (18-20 carbones) par une liaison amide.

Parmi la grande famille des sphingolipides, différentes classes de composés se distinguent. La sous-classe la plus importante est celle des céramides. Un exemple bien connu de sphingolipide est la sphingomyéline, impliquée dans la transmission nerveuse chez les mammifères.

1.2. LES SOUS-PRODUITS DE LA PECHE

Sur la production annuelle des produits de pêche qui s'élève à 145 millions de tonnes (OCDE, 2011), la moitié environ fait l'objet d'une consommation directe par l'homme. Le reste, soit 20 % de la production globale, est constitué par les sous-produits : les têtes, les viscères, les coquilles internes et externes des céphalopodes, etc. Ces sous-produits sont retirés de la consommation humaine sous forme de déchets de transformation ou de produits altérés.

1.2.1. Les producteurs de sous-produits

Les « producteurs » de sous-produits sont ceux qui réalisent la première transformation du produit brut, c'est-à-dire des poissons, des mollusques ou des crustacés entiers.

- les pêcheurs car certaines espèces sont directement éviscérées à bord (baudroies, cabillaud, congre, églefin, lingues, lieus, merlan, requins, etc.) et parfois étêtées.
- les mareyeurs
- les industriels de la transformation des produits de la mer : conserveurs, saurisseurs, industriels du filetage, découpage, décorticage et cuisson.

1.2.2. Les voies de valorisation des sous-produits

A partir d'un sous-produit, il est possible d'obtenir différents produits qu'on appelle des produits dérivés qui devient un produit commercial. La transformation de ces sous-

produits conduit en effet à divers domaines d'application. Elle permet d'obtenir de simples engrais agricoles jusqu''à celle d'aliments pour la consommation humaine, ou pour l'alimentation des animaux et des poissons d'élevage. De leur côté, les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques et cosmétologiques, qui ont actuellement une forte valeur ajoutée, font déjà appel à de nombreuses substances extraites des sous-produits de la pêche. Les utilisations des produits dérivés sont présentées dans ce tableau.

Tableau 2: Utilisation des différents types de dérivés par types d'application

Marché de valorisation	Applications	Produits dérivés
Agriculture	Enrichissement des sols Amendement calcaire Protections graines, fruits et légumes	Compost/engrais Minéraux Chitine/chitosan
Energie / industries	Production d'énergie Ameublement Tannerie Epuration des eaux Biomatériaux pour chimie lourde	Biodiésel/biogaz Colle de poisson Graisses industrielles Chitosan
Alimentation animale	Elevage agricole sauf ruminants Elevage aquacole Elevage d'animaux à fourrure Animaux domestiques	Farines de poisson Huiles marines Hachis congelés Hydrolysats protéiques
Agroalimentaire et alimentation humaine	Alimentation humaine directe Produits alimentaires Gélifiants Arômes Epaississant Enzymes Floculant pour boissons	Foie, œufs,… Huiles marines Pulpes alimentaires Gélatine Hachis congelés Chitine/chitosan Enzymes
Diététique et nutraceutique	Apports en phospholipides Apports en minéraux Apports en vitamines, oméga 3 ou Diverses applications	Lécithine marine Minéraux (Ca, P, Mg) Huiles raffinées Collagène
Cosmétiques	Beauté de la peau Beauté des ongles et des cheveux Implants sous-cutanés	Collagène Elastine Dérivés d'acides nucléiques Chitine/chitosan Squalane Kératine
Médecine, pharmacologie et biotechnologies	Diverses propriétés thérapeutiques Pansements, implants biocompatibles Fils de suture,… Milieux de culture Capsules molles, microencapsulation	Peptides bioactifs Chitine/chitosan Collagène Peptones Gélatine

Source : Ifremer, 2010

II. MATERIELS ET METHODES

2.1. MATERIELS BIOLOGIQUES

2.1.1. Les céphalopodes

Dans cette étude, deux espèces de Céphalopodes : poulpe (*Octopus cyanea*) et calmar (*Sepioteuthis sp*) sont les sources principales de nos matériels biologiques. Ils sont classifiés suivant la figure suivante.

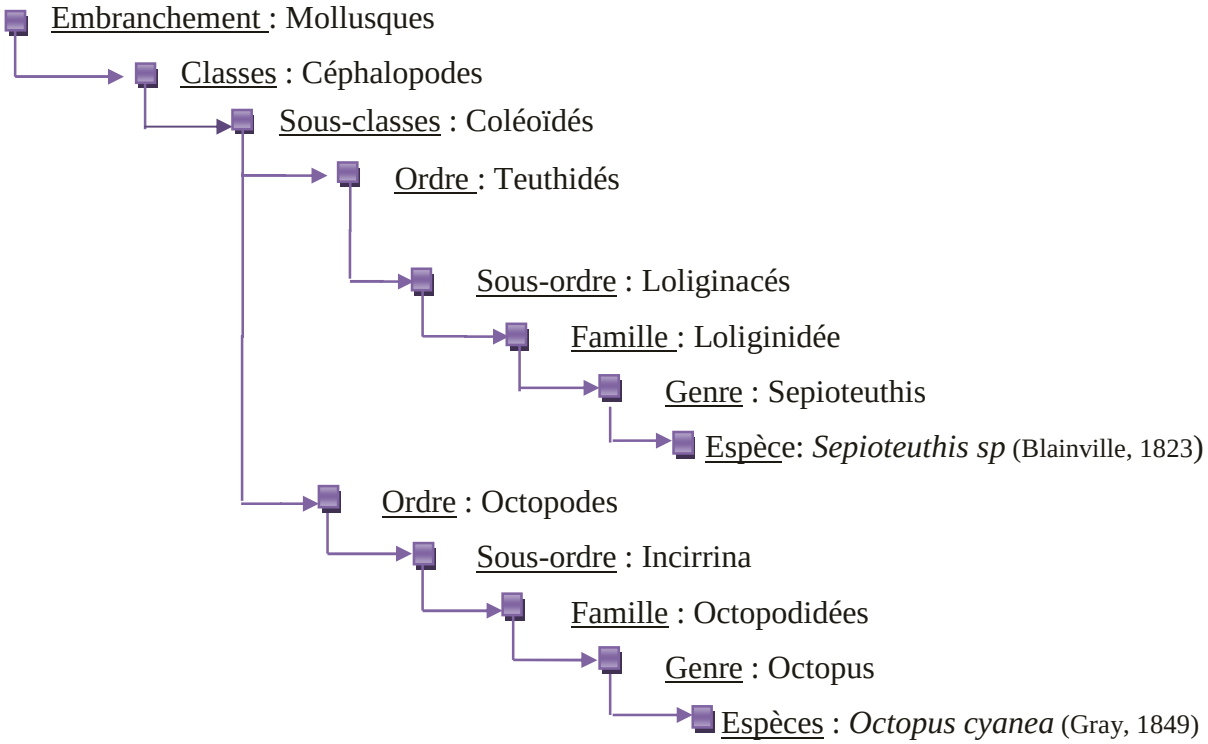


Figure 6: Classification de *Sepioteuthis sp* et *Octopus cyanea*

Les céphalopodes sont caractérisés par le rattachement du pied, divisés en tentacules, à la tête. Ils possèdent une coquille, soit externe comme chez le nautile soit interne comme chez la seiche (*Sepia officinalis*) et le calmar (*Sepiotheuthis sp* ou *Loligo sp*), ou absente comme le cas du poulpe (*Octopus sp*). Ce sont des animaux exclusivement marins. Ce sont les mollusques les plus évolués, et leur complexité égale celle des vertébrés. Ce sont également de redoutables prédateurs. Ils se nourrissent de mollusques, crustacés ou poissons qu'ils capturent à l'aide de leurs tentacules.

Les céphalopodes nagent par réaction, en expulsant l'eau contenue dans leur cavité palléale par un orifice orientable, un siphon en forme d'entonnoir. En présence d'une menace, ils émettent un nuage d'encre comme système de défense. De nombreux céphalopodes ont la capacité de changer de couleur. Cette faculté se voit surtout chez les seiches et les calmars lors des parades nuptiales. Les céphalopodes ont les sexes séparés et la fécondation est interne, le mâle dépose ses spermatozoïdes à l'aide d'un tentacule spécialisé appelé l'hectocotyle dans la cavité palléale de la femelle. Et les femelles pondent des œufs qui sont accrochés sur différents supports tels que algues, éponges, gorgones, etc. Les petits ne passent pas par des stades larvaires et ressemblent à leur naissance aux adultes en miniature.

2.1.1.1. Habitat et mode de vie

Octopus cyanea et *Sepioteuthis sp* sont reparties dans le monde entier. On les trouve aussi bien dans les mers tempérés des récifs coralliens que dans les mers tropicales ou subtropicales. La plupart des espèces de poulpes et de calmars existants vivent à proximité des côtes. Toutefois, *Sepioteuthis sp* peut séjourner à de grandes profondeurs ou à proximité du fond, entre 20 et 250 m suivant la saison tandis qu'*Octopus cyanea* évolue surtout près des côtes (Guerra, 1979).

Ainsi, ces deux espèces de céphalopodes peuplent les récifs des eaux territoriales de la côte Ouest de Madagascar qui sont des fonds continentaux de plus de 200 m de profondeurs (fig.7).

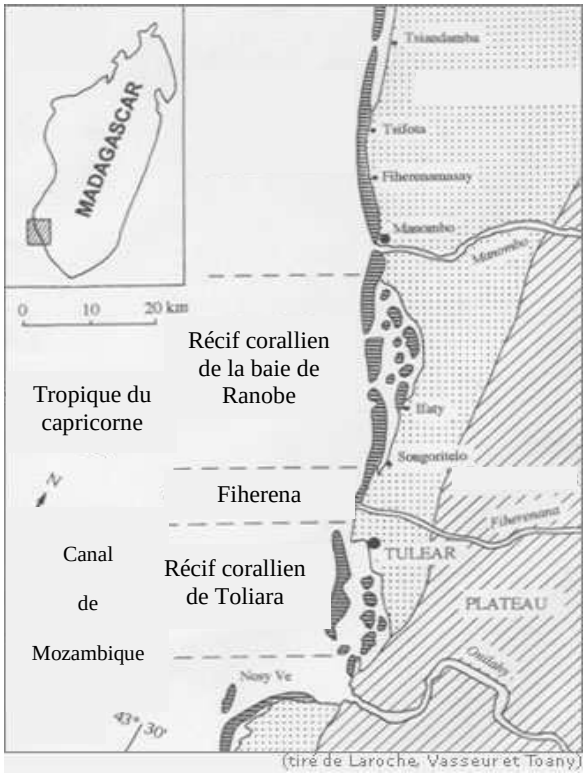


Figure 7: Récifs de la côte Ouest de Madagascar

Source : COPEFRITO, 2010

2.1.1.2. Anatomie et physiologie des céphalopodes

Le céphalopodium

Le céphalopodium englobe la tête, l'appareil brachial et l'entonnoir. Chez les céphalopodes, la tête est munie de deux yeux latéraux aussi complexes que ceux des poissons ou des hommes. Elle est équipée d'une bouche entourée d'un nombre plus ou moins grand de tentacules pourvus de suçoirs.

Les ganglions cérébroïdes, palléaux et pédieux, comme l'a stipulé Bernay dans son étude en 2005, sont fusionnés en un système nerveux central céphalé qui, sur un plan anatomique, est composé de deux parties : le cerveau et le lobe optique. Un crâne cartilagineux à structure solide et complexe protège le cerveau.

La couronne brachiale entoure la masse buccale. Elle peut être au nombre de huit chez les octopodes et dix chez les décapodes.

Le viscéropallium

Le viscéropallium comprend la coquille, le manteau, les nageoires, les organes de la cavité palléale et la masse viscérale.

La cavité palléale se trouvant en face ventrale est obstruée dans sa partie médiane par l'entonnoir. Chez tous les céphalopodes, elle contient la partie interne de l'entonnoir, les branchies, l'anus, les orifices rénaux et génitaux (Mangold, 1989). Ceux-ci sont représentés par la figure 8 suivante.

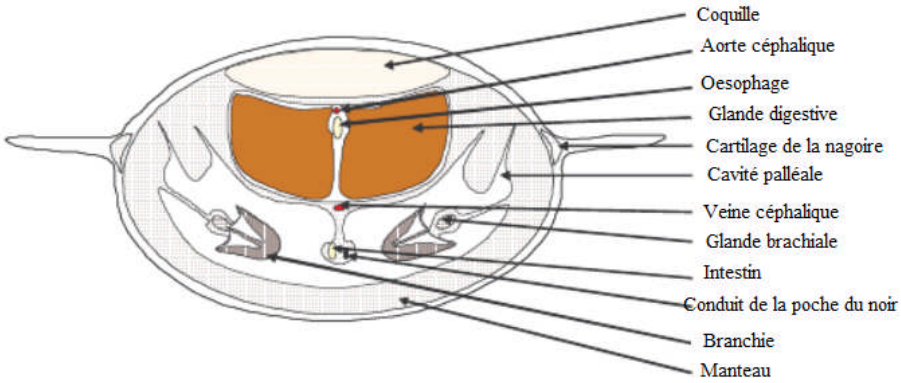


Figure 8 : Section transversale de céphalopode montrant les structures et organes qui constituent le viscéropallium (d'après Mangold, 1989)

L'appareil reproducteur

Chez les céphalopodes, les sexes sont bien séparés et stables. Chez le mâle, le testicule débouche sur un gonoducte, impliqué dans la formation des spermatophores (Bernay, 2005). Après leur élaboration, les spermatophores sont accumulés dans la poche de Needham avant

d'être évacués par les contractions musculaires du pénis. Un bras modifié, le bras hectocotyle, assure le transfert des spermatophores à l'intérieur de la poche sous buccale de la femelle lors de l'accouplement.

L'appareil digestif

L'appareil digestif est composé du bulbe buccal, des glandes associées au bulbe buccal, du tube digestif, de la glande digestive et des appendices des canaux digestifs (Fig.9). Chez ces animaux, les organes de digestion sont disposés en U.

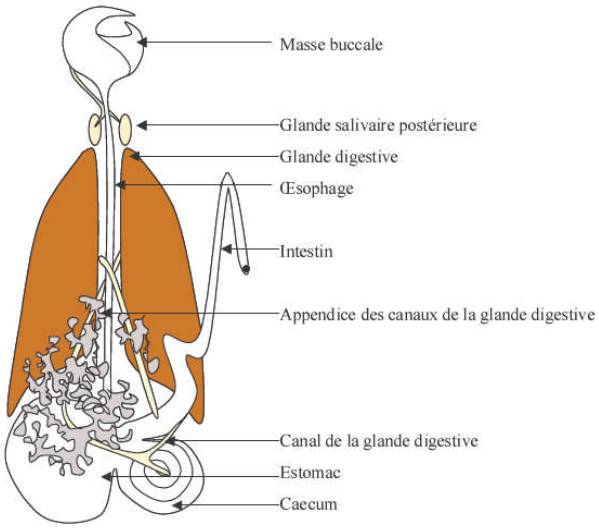


Figure 9 : Appareil digestif de céphalopodes (d'après Bihan, 2006)

La digestion débute au niveau du bulbe buccal qui sert à déchiqueter les proies mécaniquement mais aussi à l'aide d'enzymes sécrétées par les glandes salivaires postérieures (Koueta, 1983).

Ensuite, la nourriture passe par l'œsophage vers l'estomac et les débris non digérables sont directement évacués vers l'intestin. L'estomac, très musculeux, broie les aliments qui vont aussi subir l'action des enzymes sécrétées par la glande digestive. Le bol alimentaire passe ensuite directement dans la glande digestive et dans le caecum où se poursuit la digestion intracellulaire. L'absorption se déroule dans la glande digestive, les appendices de la glande digestive et le caecum. Les résidus issus de la digestion intracellulaire forment des corps bruns dans la glande digestive et sont évacués par l'intestin.

2.1.2. Matériels biologiques : sous-produits de poulpe (*Octopus cyanea*) et de calmar (*Sepioteuthis sp*)

Les sous-produits de poulpe et de calmar ont été offerts par la COmpagnie de PEche FRIgorifique de TOliara (COPEFRITO) (cf. fig. 10).Les sous-produits sont les parties de céphalopodes, poissons ou encore crustacés, non destinés à la consommation humaine qui sont les viscères, les têtes, les arêtes, la peau, etc.

Figure 10: Sous-produits de céphalopodes

Source : Cliché de l'auteur, 2010

Ces sous-produits proviennent des procédés de transformation. L'estimation exacte de leur volume dépend de chaque espèce traitée et de la typologie des transformations effectuée sur chaque espèce capturée.

Ainsi, le tableau 3 suivant quantifie le pourcentage des sous-produits généré par la compagnie de pêche COPEFRITO.

Tableau 3: Déchets de poulpe et de calmar

Produits traités	Déchets récupérables	
	Types	**Pourcentage (%)**
Poulpe	Viscères et poche d'encre Yeux Bec	9
Calmar	Viscères et poche d'encre Yeux Peau Coquille interne	14

Source : COPEFRITO, 2010

La production journalière des sous-produits sont en moyenne 113 Kg pour le poulpe et 34 Kg pour le calmar soit une cinquantaine de tonne par an pour les deux produits. Ce tonnage est resté plus ou moins constante depuis quatre ans (cf. fig. 11).

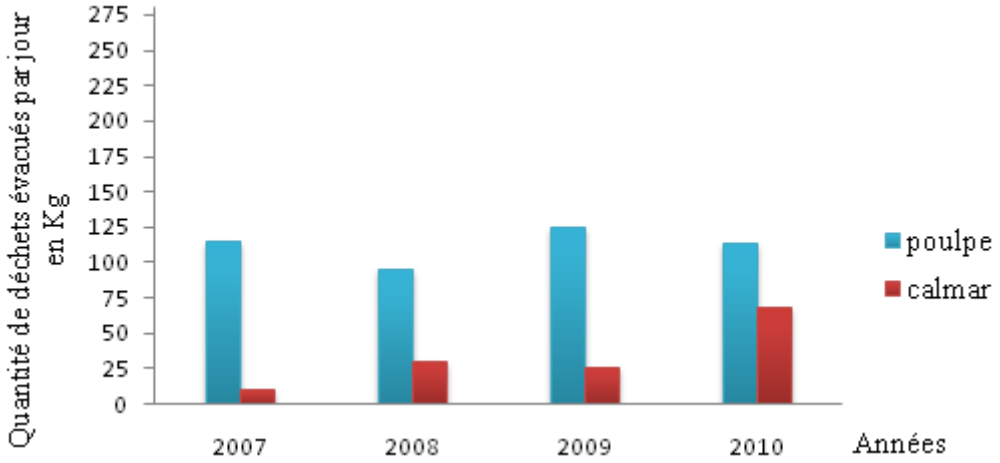


Figure 11: Quantité des sous-produits de céphalopodes de COPEFRITO

Source : COPERFRITO, 2010

Après chaque traitement des produits de pêche, les déchets sont acheminés vers un site de décharge qui se trouve à 8 km de la ville : Ankoronga. Ce travail est assuré par un camion et quelques ouvriers chargés personnellement à décharger les sous-produits.

2.2. METHODES

2.2.1. Collecte des échantillons

Les sous-produits de poulpe (*Octopus cyanea*) et de calmar (*Sepioteuthis sp*), constitués surtout par leurs viscères, leurs têtes et les dermes de calmars, ont été prélevés une fois le mois de juillet. Un échantillon de 200 g de chacun des sous-produits ont été utilisé pour la réalisation de cette étude. Toutefois, on a repris l'échantillonnage des sous-produits le mois de Novembre et de Décembre pour avoir une plus grande quantité de lipides totaux.

Les échantillons sont tout de suite récupérés après que les céphalopodes traités aient produits la quantité suffisante de 200 g de sous-produits. Ils sont acheminés directement dans le laboratoire de chimie de l'IH.SM et sont macérés dans un mélange de solvant (chloroforme + méthanol, 2:1 v/v) pour l'extraction des lipides totaux.

2.2.2. Extraction des lipides totaux

2.2.2.1. Principe

L'extraction consiste à faire passer une substance dissoute d'une phase liquide, dite phase à extraire, dans une phase extractive non miscible à la précédente et dans laquelle la substance considérée est plus soluble que dans la phase à extraire. Cette opération permet de purifier la substance, éventuellement de la concentrer et de la doser. L'opération comporte plusieurs étapes :

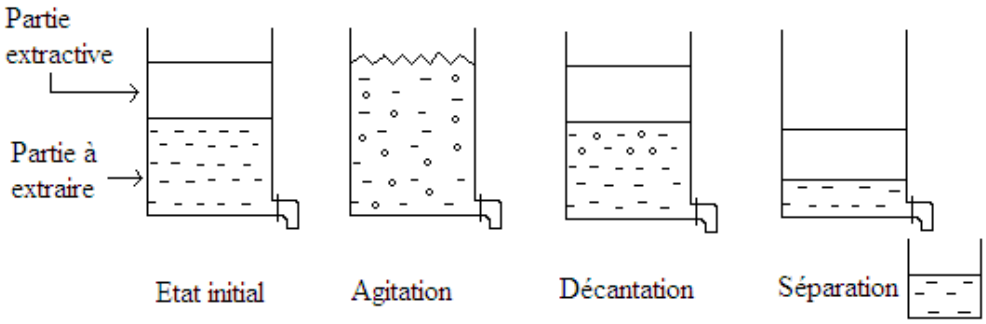


Figure 12: Schéma de l'extraction d'une substance

Pour extraire les lipides des produits aquatiques dans leur totalité (qu'ils soient inclus dans des molécules polaires ou apolaires), il faut au préalable extraire de façon non altérante les lipides. Il faudra donc employer une méthode qui associe un solvant polaire (pour extraire les phospholipides,) et un solvant apolaire (pour extraire les triglycérides) : c'est la méthode de Folch (Folch et al, 1957), beaucoup moins courante du fait de l'emploi de solvants toxiques (chloroforme + méthanol, 2:1 v/v). Elle a été utilisée car elle répond à la particularité de constitution lipidique des produits aquatiques. Ce mélange de solvants permet ainsi d'extraire la totalité des lipides, des lipides les plus polaires au moins polaires en rompant en même temps les membranes phospholipidiques.

2.2.2.2. Mode opératoire

Fraîchement prélevés, 200 g d'échantillons de chacun des sous-produits ont été plongés dans un mélange de Chloroforme et Méthanol (2:1, v/v) suivant la méthode de Folch de façon à ce qu'ils soient complètement immergés. Le système est mis sous agitation magnétique pendant 30 min et laissé macérer pendant 2 jours dans un congélateur. Par filtration sur papier filtre, les composés solides non lipidiques et non

solubilisés dans le mélange des solvants sont éliminés et on obtient deux phases : une phase organique (phase inférieur) dans laquelle se trouve les lipides neutres, les glycolipides et les phospholipides, et une phase aqueuse (phase supérieure) qui contient les gangliosides, les lipides très ionisés et les autres composés solubles non lipidiques (protéines, sucres, sels…). A l'interface se trouvent majoritairement des protéines (Dumay, 2006). Ceci est illustré dans les figures ci-dessous.

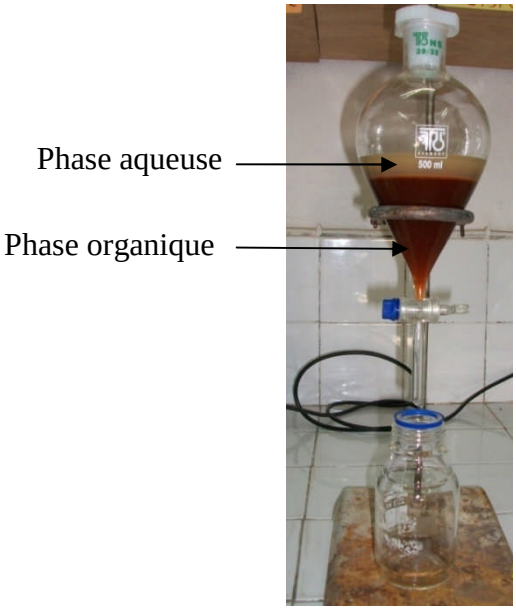


Figure 13: Extraction des lipides totaux des sous-produits de poulpe

Source : Cliché de l'auteur, 2010

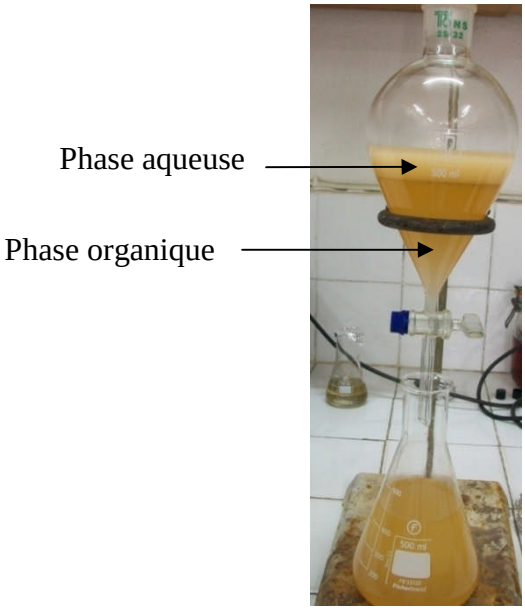


Figure 14: Extraction des lipides totaux des sous-produits de calmar

Source : Cliché de l'auteur, 2010

2.2.3. Evaporation des solvants

On enlève les solvants par une technique d'évaporation pour qu'on puisse avoir les substances à extraire. Dans cette étude ce sont les lipides totaux.

2.2.3.1. Principe

Mis sous évaporation rotative, dans le bain-marie, les solvants de l'extraction subissent une température de 40°C et s'évaporent. Au contact d'un réfrigérant alimenté avec de l'eau, ils se condensent et se versent dans un ballon récupératif. Les solvants ainsi récupérés peuvent être utilisé de nouveau en passant tout d'abord par une distillation. La figure suivant nous illustre ce procédé.

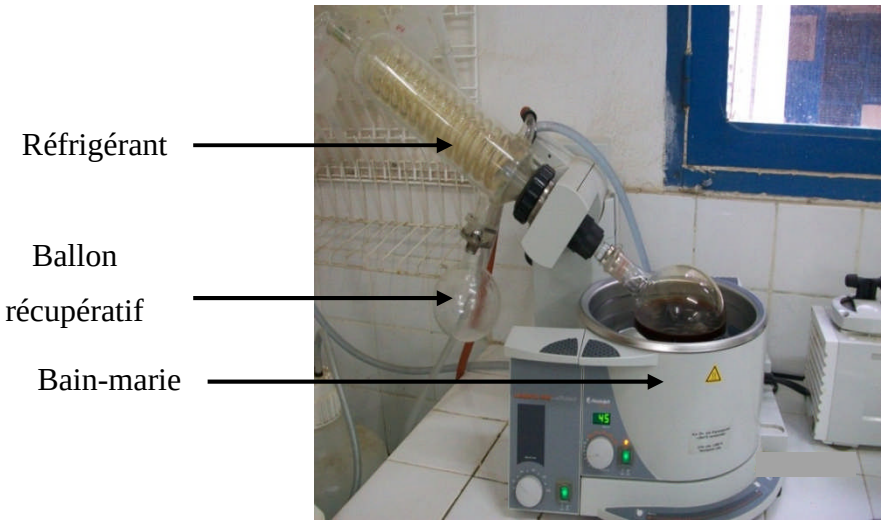


Figure 15: Evaporation des lipides totaux sous rotavapor

Source : Cliché de l'auteur, 2010

2.2.3.2. Mode opératoire

La phase organique de l'extraction est récupérée puis débarrassée de toute trace d'eau à l'aide du sulfate de sodium anhydre. Cette opération est réalisée trois fois afin de pouvoir enlever toutes les phases organiques. Ces dernières sont alors évaporées au rotavapor à 40°C. Une fois les fractions lipidiques récupérées, on les conserve avec un peu de mélange de Chloroforme/Méthanol dans un congélateur.

2.2.4. Analyses chimiques des lipides totaux

Le fractionnement des lipides totaux ont été réalisés dans le laboratoire de microbiologie de l'environnement (LME), unité « extraction et analyse des produits naturels » du Centre National de Recherches sur l'Environnement (CNRE) à Antananarivo. Et les analyses des acides gras ont été optimisées en collaboration avec le laboratoire de chimie du groupe Mer-Molécules-Santé, Université de Nantes à France. Deux méthodes chromatographiques ont été utilisées : la chromatographie liquide à basse pression (CLBP) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).

2.2.4.1. Chromatographie liquide en basse pression (CLBP)

Le fractionnement des lipides en CLBP est une méthode pour l'analyse quantitative d'une substance. Les lipides totaux sont fractionnés en différentes classes en fonction de leur polarité.

Principe

Cette technique est basée sur la différence d'affinité des composants lipidiques pour des phases mobiles et fixes. Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant (Chavanne et al, 1986). L'écoulement des différents éluants provoque alternativement l'adsorption et la désorption des molécules à travers la phase mobile ou l'adsorbant (gel de silice).

Mode opératoire

Pour cette opération, on doit d'abord activée la silice. Cela consiste à la mettre dans une étuve à 100°C pendant 2 à 3h. La quantité de silice est calculée de façon à ce que le rapport silice/extraits lipidiques soit 50g/g d'extraits lipidiques. Ensuite, elle est introduite dans la colonne (diamètre interne: 5 cm, longueur : 60 cm) contenant de la laine de verre, à l'aide de l'éluant hexane (solvant apolaire) pour former le gel de silice. C'est le remplissage de la colonne par voie humide. Après que le gel de silice s'y dépose progressivement pour former une couche d'environ 2 cm, on tapote les parois de la colonne pour favoriser l'entassement de l'adsorbant. La colonne est remplie de sorte que l'adsorbant atteigne les $^{2}/_{3}$ de sa hauteur. Il faut noter que le niveau de l'éluant soit supérieur à celui de l'adsorbant. La figure suivant nous permet de visualiser le remplissage de la colonne.

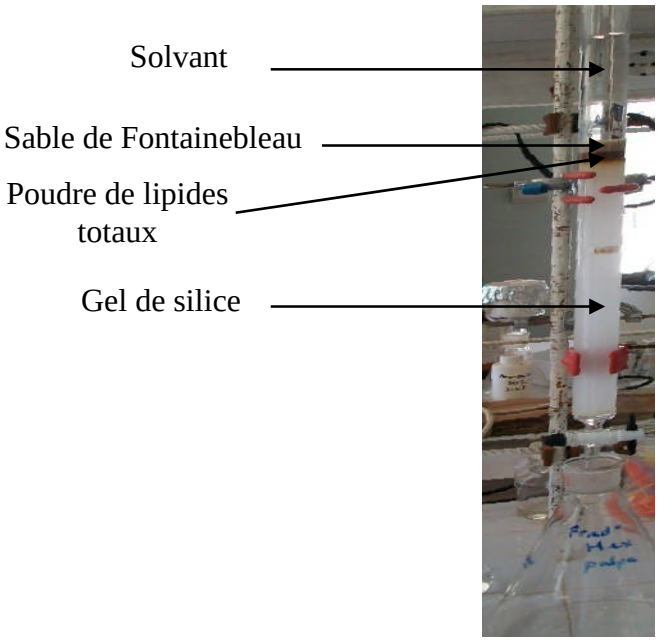


Figure 16:CLBP sur gel de silice

Source : Cliché de l'auteur, 2010

L'extrait lipidique est ensuite introduit sous forme de poudre pour mieux permettre l'adsorption. Du sable de Fontainebleau est mise au-dessus des extraits pour les stabiliser aux ajouts des éluants.

Les lipides totaux sont alors entraînés et séparés par l'introduction des différents éluants suivant leurs degrés de polarité (du moins polaire au plus polaire). L'Hexane permet d'éluer[1] les lipides apolaires tels que les pigments, les hydrocarbures et les lipides neutres apolaires. Le Dichlorométhane assure l'élution des stérols et des terpènes. L'acétone permet d'obtenir les glycolipides, les glycosides et certains alcaloïdes. Et le méthanol élu principalement les phospholipides. Le tableau ci-dessous représente les classes de lipides éluées par chaque solvant utilisé.

Tableau 4: solvants utilisés en fonction des classes de lipides en CLBP

Solvants	Classes de lipides
Hexane	Pigments, hydrocarbures, lipides neutres apolaires
Dichlorométhane	Stérols, terpènes
Acétone	Glycolipides, glycosides, alcaloïdes
Méthanol	Phospholipides

La colonne est ainsi alimentée en prenant soin de ne jamais la laisser se sécher. Au passage de chaque éluant, un diagramme appelé chromatogramme se développe en formant une succession de zones cylindriques qui se séparent en migrant vers le bas. On récupère alors les fractions correspondant à l'élution des solvants pour être évaporer et peser. Les fractions lipidiques ainsi récupérées sont conservées dans un congélateur.

En effet, comme on l'a déjà annoncé auparavant dans le premier chapitre de ce mémoire (p. 13, §1), les phospholipides sont des constituants essentiels de la membrane cellulaire. Ils forment une bicouche lipidique qui apparaît sur la figure 17. La double couche des phospholipides est stabilisée par les stérols. La figure montre également l'existence des glycolipidiques et des glycoprotéines dont la partie osidique se voit sur la face externe de la membrane.

[1]Balayer avec un fluide un support sur lequel sont adsorbés des espèces chimiques de divers types, qu'il s'agit de séparer (Larousse, 2001)

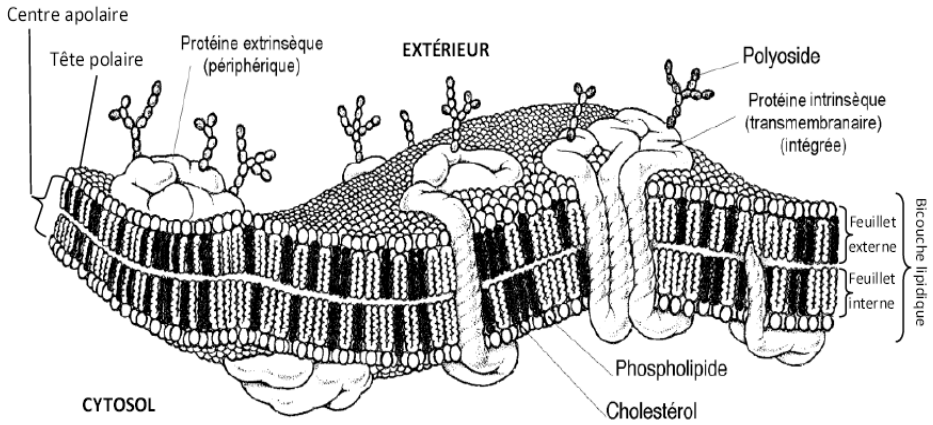


Figure 17: Schéma général d'une membrane cellulaire (d'après Bretscher, 1988)

L'importance des phospholipides nous a poussés à continuer notre étude sur les acides gras de cette classe. L'étape suivant consiste à les analyser sur des méthodes chromatographiques encore plus avancés : la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée au détecteur : spectrométrie de masse (SM).

2.2.4.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) fut découverte par Archer John Porter MARTIN et Richard Laurence Millington SYNGE qui publient dès 1941, la théorie de la chromatographie de partage (Martin et Synge, 1941).

- **Principe**

C'est une technique qui permet de séparer des mélanges complexes de molécules s'établissant entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire appropriée. Cette méthode s'adresse à tous les composés susceptibles d'être volatilisés par élévation de leur température. Il s'agit indubitablement de la technique la plus utilisée, à l'heure actuelle. Il est maintenant possible d'obtenir une analyse quantitative complète des acides gras d'un échantillon en un temps très court, ces derniers étant identifiés individuellement par leur temps de rétention sur une colonne donnée, dans des conditions données de façon quasi certaine (Christie, 1998).

Couplée au détecteur SM, le CPG devient un outil d'analyse très performant pour l'étude de molécules. De plus, la détection par SM permet une identification certaine des

composés en identifiant la nature des ions des composés dans des proportions mêmes très faibles (de l'ordre du nanogramme).

En général, l'appareillage est composé d'un injecteur diviseur, d'une colonne capillaire, d'un gaz vecteur (hélium, azote ou argon), et d'un détecteur.

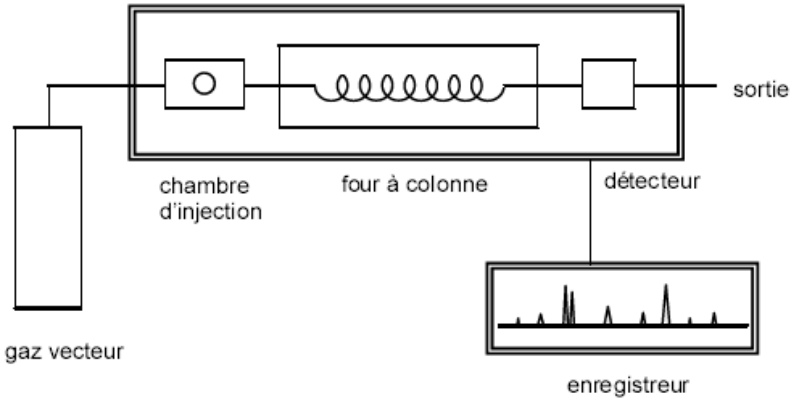


Figure 18: Schéma d'un appareil de couplage CPG-SM (d'après Salghi, 2010)

Préparation des esters méthyliques d'acide gras (EMAG) et conversion en N-acylpyrrolidide (NAP)

Pour être analysés en CPG, les acides gras doivent être volatils. Ils doivent donc être modifiés en dérivés + volatils. Plusieurs méthodes de méthylation peuvent être employées (trifluorure de bore (BF_3), acide ou basique) (Christie - 1988). La méthode au BF_3 est la plus employée dans les laboratoires. Mais des méthanolyses, plus douces, permettent une méthylation simultanée de toutes les classes de lipides, sans altérer les groupements fonctionnels potentiels des acides gras (ramifications, groupements hydroxy, cycles…).

La méthode de transesterification utilisée pour notre étude est une méthylation par le méthanol chlorhydrique qui convertit les phospholipides directement en EMAG.

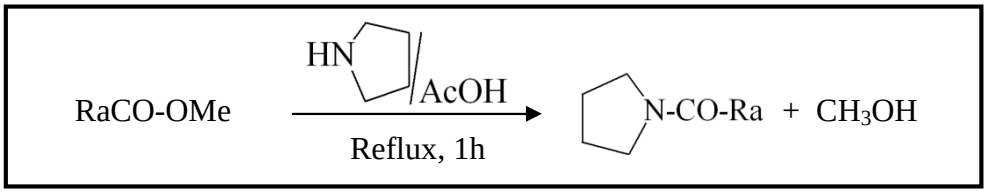
Glycérophospholipides ou glycérides (Peu volatils)	$\xrightarrow{\text{MeOH/HCl à 5\%}}$	RaCO-OMe + RbOH (Très volatils)

Ra = les chaînes grasses libérées des phospholipides

Rb = les fonctions restantes des phospholipides

Pour cela, deux opérations parallèles ont été effectués sur les fractions méthanoliques des lipides totaux des deux sous-produits. On a prélevé respectivement 27mg et 31mg des fractions méthanoliques des lipides totaux des sous-produits de poulpe et de calmar puis séchée dans un tube en verre de 10ml. Le méthanol chlorhydrique à 6% (1ml) est ajouté à l'extrait sec. Le tube est placé à 90°C dans une étuve pendant 1h. Après refroidissement, on y ajoute 1ml d'eau distillée. Les EMAGs sont alors extraits par 4ml de dichlorométhane. Puis le tube est centrifugé (5min à 3000 ppm). On sèche alors la fraction par du sulfate de sodium anhydre. Ensuite, le tube est centrifugé (5min à 3000 ppm) et le surnageant est prélevé dans un autre tube. 1ml des EMAGs est donc conservé pour l'analyse dans la CPG-SM. Le reste est transformé en N-acylpyrrolidide (NAP).

Dans un second temps, une partie des EMAGs doit être converti en NAP afin d'optimiser l'identification des molécules. En effet, certains acides gras ne sont identifiables qu'à partir des spectres de masse des NAP. Cette méthode ci-dessous nous résume la manipulation pour obtenir le NAP par l'EMAG en utilisant l'hydroxyde d'acyle.



Mode opératoire

L'appareillage utilisé pour cette étude est un chromatographe Hewelett Packard 6890 séries GC Système couplé au spectromètre HP 6890 séries. La phase stationnaire est constituée d'un liquide à base de silicone imprégnant une matrice qui couvre la paroi d'un acier de 30 m (diamètre interne 0,32 mm, épaisseur de phase 0,25µm) enroulé sur elle-même dans le four.

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- EMAG : 170°C (4mn) puis 3°C/mn jusqu'à 300°C
- NAP : 200°C (4mn) puis 3°C/mn jusqu'à 240°C.

Après être fixés sur les conditions, les dérivés d'acides gras : EMAGs et NAP sont injectés individuellement en CPG-SM. Le mélange des EMAGs est introduit à l'aide d'une seringue de façon à ce qu'il entre dans la colonne sous forme vapeur. La phase mobile est l'hélium (débit 1ml/min). Celui-ci entraîne avec lui le mélange de composés à travers la colonne qui contient une phase stationnaire. Les composés du mélange traversent la colonne à des vitesses différentes. Lorsqu'ils arrivent à la sortie de la colonne, ils sont

détectés par un détecteur qui transmet un signal électrique à un enregistreur. Les résultats apparaissent sur le chromatogramme sous forme de pics.

Les dérivés de NAP suivent le même mode opératoire.

2.2.4.3. Longueur des chaînes équivalentes (LCE) et analyse des mélanges d'acides gras

En 1956, James et Martin ont mis en évidence une relation entre le logarithme du temps de rétention (Tr) réduit et le nombre de carbones n des acides gras saturés à chaînes normale.

$$\boxed{\text{Log Tr} = an + b}$$

Cette équation donne une droite de régression linéaire, à partir de points correspondants aux acides gras saturés. Cela a donné naissance à la notion de longueur de chaîne équivalente (LCE) selon Tranchant dans le « manuel pratique de chromatographie gazeuse » (Tranchant, 1995). La LCE est, par définition, le nombre d'atomes de carbones d'un acide gras fictif à chaîne normale saturée qui aurait le même temps de rétention (Tr) que l'acide gras considéré (Barnathan, 1993). La valeur de LCE d'un EMAG non saturés peut être déterminée par extrapolation d'une droite tracée à partir des Tr des EMAG saturés (Christie, 1988). La valeur de la LCE vaut pour une phase de CPG donné.

La connaissance du Tr de chaque EMAG est donc indispensable pour calculer la valeur de la LCE à partir d'une droite Tr qui correspond aux acides gras saturés à chaîne normale (14:0, 15:0, 16:0, etc.). La connaissance de la masse moléculaire et la valeur des LCE permettent de déduire si l'acide gras est saturé ou non et porte ou non des ramifications.

Détermination des LCE à partir des spectres de masse des EMAGs

La détermination des LCE est importante pour l'identification de la totalité des acides gras. Pour cela, il est nécessaire d'identifier efficacement au moins trois des spectres des EMAG saturés grâce aux clés d'interprétation des spectres de masse des EMAG (cf. annexe 1). A partir du temps de rétention (Tr) de chaque EMAG saturé, on peut avoir une droite de régression linéaire avec en abscisse le nombre des carbones saturés d'équation :

$$\boxed{y = Tr = a\,(LCE) + b} \qquad (1)$$

Connaissant le Tr de chaque pic du spectre de masse des EMAG, on peut calculer LCE selon la relation (2):

$$LCE = (Tr - b) / a \qquad (2)$$

Détermination des LCE à partir des spectres de masse des NAP

Cette étape consiste à analyser les dérivés des NAP. Cette fois, à l'aide de la clé d'interprétation des spectres des masses des NAP (cf. annexe 2), on identifie les acides gras saturés qui serviront d'abscisse à la droite de régression linéaire d'équation (1). De cette équation, on peut obtenir les valeurs des LCE par la relation (2). La valeur de la LCE des spectres des EMAGs et des NAP nous permettent d'identifier la nature des acides gras.

2.2.5. Evaluation d'éventuelle toxicité des extraits lipidiques

La présente étude évalue la qualité toxicologique des huiles obtenues par extraction des sous-produits afin de s'assurer de leurs innocuités. En raison de l'insolubilité des extraits dans du DMSO (0.5%), le test toxicologique se fait par gavage. Quatre souris (*Mus musculus*) de taille moyenne 28g provenant de l'élevage du laboratoire de biochimie fondamentale et appliqué, Faculté de science de l'Université d'Antananarivo, sont soumis aux tests. Après pesage, les cobayes sont nourris de 22 mg de provende en forme de granules tapissée de 10 mg de chacun des extraits lipidiques et sont observés pendant 24h.

Figure 19 : Cobayes pour le test toxicologique

Source : Cliché de l'auteur, 2010

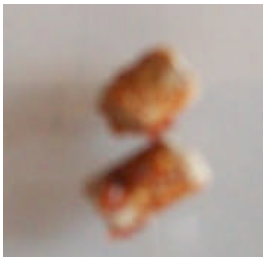


Figure 20 : Provende tapissé de lipides totaux

Source : Cliché de l'auteur, 2010

2.2.6. Traitement des tourteaux

Après les extractions des lipides totaux, les résidus, appelés couramment tourteaux, sont récupérés pour une valorisation totale des sous-produits sous-forme de farine.

2.2.6.1. Mode opératoire

La figure suivante récapitule les différentes étapes du procédé d'obtention de farines à partir des tourteaux. La matière première est séchée dans une étuve à 50°C pendant une semaine pour libérer l'eau afin d'avoir une préparation stable. Ensuite, elle est broyée de façon à obtenir la granulométrie désirée.

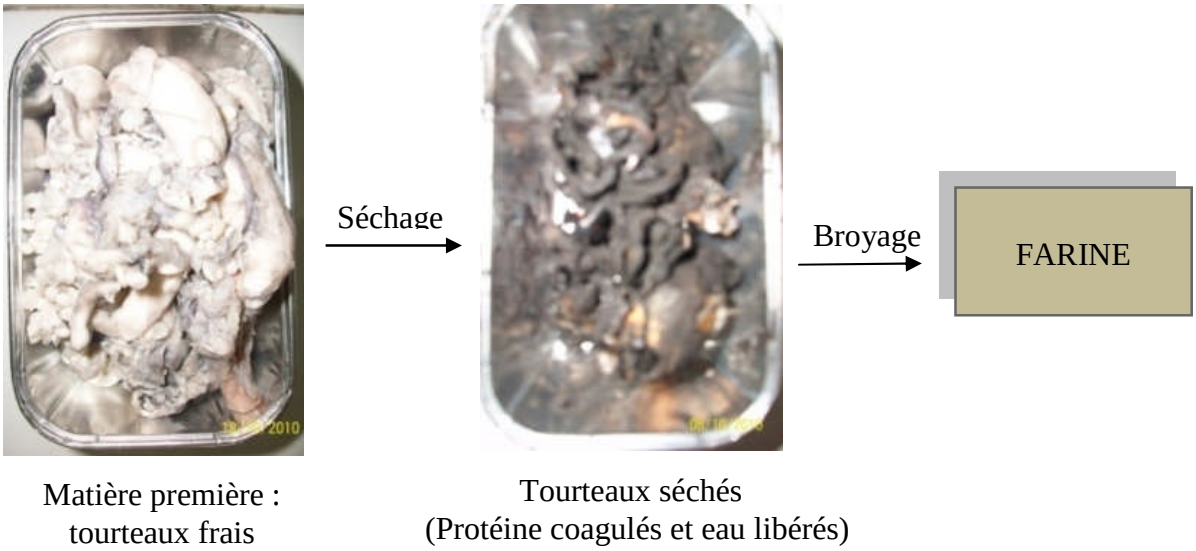


Figure 21 : Mode opératoire pour fabrication de farines

Source : Cliché de l'auteur, 2010

III. RESULTATS

3.1. OBTENTION DES SOUS-PRODUITS

Fraichement pêchés et conservés à 4°C, les poulpes et les calmars sont tout de suite éviscérés, étêtés, puis soumis au pelage pour obtenir les différents types de sous-produits comme le montre le tableau 5 suivant.

Tableau 5: Typologie des sous-produits

Etape d'obtention des sous-produits	Types de sous-produits	Sous-produits
Eviscération	Viscères	Appareil digestif (estomac, glande digestive, intestin, etc.) Cœur Foie Œufs (gonade femelle) Laitance (gonade mâle) Vessie natatoire Encre de céphalopode
	Coquille interne	Plume de calmar
Étêtage	Tête	Yeux Bec
Pelage	Peau	Derme du calmar

Comme on l'a stipulé auparavant, à partir de chaque type de sous-produits, on peut produire différents produits dérivés (p14).Souvent, ils sont utilisés dans l'alimentation humaine ou animale. On peut aussi les transformer pour servir d'ingrédients diététiques et nutraceutiques ou également dans les ingrédients cosmétiques. Et il y a des domaines d'application généralement spécifiques et restreints à un seul type de produit dérivé. Mais dans cette étude, tous les différents types de sous-produits à part la plume de calmar sont nécessaires pour l'extraction des lipides totaux.

3.2. PREPARATION DES LIPIDES TOTAUX

Rappelons que les lipides totaux ont été obtenus à partir de 200 g de chacun des sous-produits de céphalopode. Après avoir été immergés dans du chloroforme/méthanol (2:1, v/v), nous avons obtenues les résultats de la teneur en lipides de chaque sous-produit montrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6: Teneur en lipides des sous-produits

Produits	Masse (g)	lipides totaux (g)	Rendement (%)
Poulpe	200	0.97	0,48
Calmar	200	1.17	0,58

Pour un même taux d'échantillon, les lipides totaux des sous-produits de calmar est légèrement en plus grande quantité que ceux des sous-produits de poulpe. Cette légère différence s'observe également au niveau de la texture. Les premiers sont colorés en orange foncé, tandis que les seconds sont beaucoup moins teintés en orange.

Figure 22: Lipide totaux extraits des sous-produits de poulpe

Source : Cliché de l'auteur, 2010

Figure 23: Lipide totaux extraits des sous-produits de calmar

Source : Cliché de l'auteur, 2010

3.3. FRACTIONNEMENT DES LIPIDES TOTAUX

Les lipides totaux sont constitués de trois classes principales : les lipides neutres, les glycolipides et les phospholipides. Chaque classe a été obtenue par l'élution de différents solvants. Le tableau suivant présente les pourcentages relatifs des classes des lipides totaux des sous-produits.

Tableau7 : Fractionnements des lipides totaux des sous-produits de poulpe et de calmar

Sous-produits	Lipides neutres (%)			Glycolipides(%)	Phospholipides(%)
	H[2]	**D[3]**	**∑**	**A[4]**	**M[5]**
Poulpe	8	33	41	27	32
Calmar	5	30	35	35	30

Pour les deux sous-produits étudiés, la composition des lipides totaux est légèrement identique avec une forte proportion de lipides neutres. Les quantités des phospholipides des sous-produits de poulpe sont légèrement plus grandes que celles des glycolipides. Ce qui est le contraire pour les sous-produits de calmar.

3.3.1. Etudes des fractions phospholipidiques

Après avoir rassemblé les fractions phospholipidiques, les acides gras ont été transformés en EMAG par méthanolyse chlorhydrique puis convertis en NAP pour être traitées individuellement en CPG-SM.

3.3.1.1. Acide gras des phospholipides des sous-produits de poulpe

- **Détermination de la LCE à partir des EMAGs**

A partir du Tr de chaque EMAG saturé, on peut avoir une droite de régression linéaire avec en abscisse le nombre des carbones saturés (C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C20:0, C22:0, C23:0, C24:0) d'équation y = Tr = 2,738 (LCE) – 23,80 (R^2=0,999).

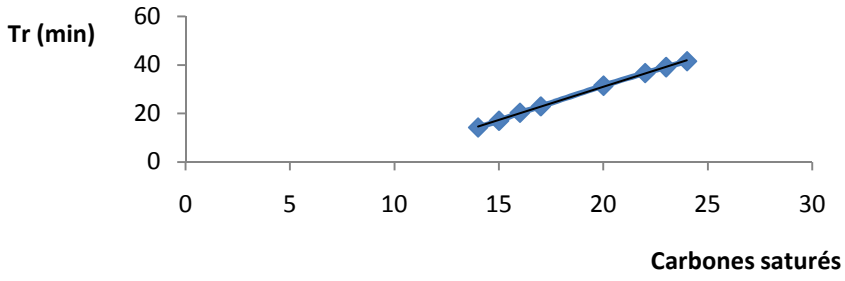


Figure 24: Droite de régression des EMAGs saturés des phospholipides des sous-produits de poulpe

[2]Hexane
[3] Dichlorométhane
[4] Acétone
[5] Méthanol

Connaissant le temps de rétention des spectres des EMAG (cf. fig.25), on peut calculer la valeur LCE de chaque pic chromatogramme.

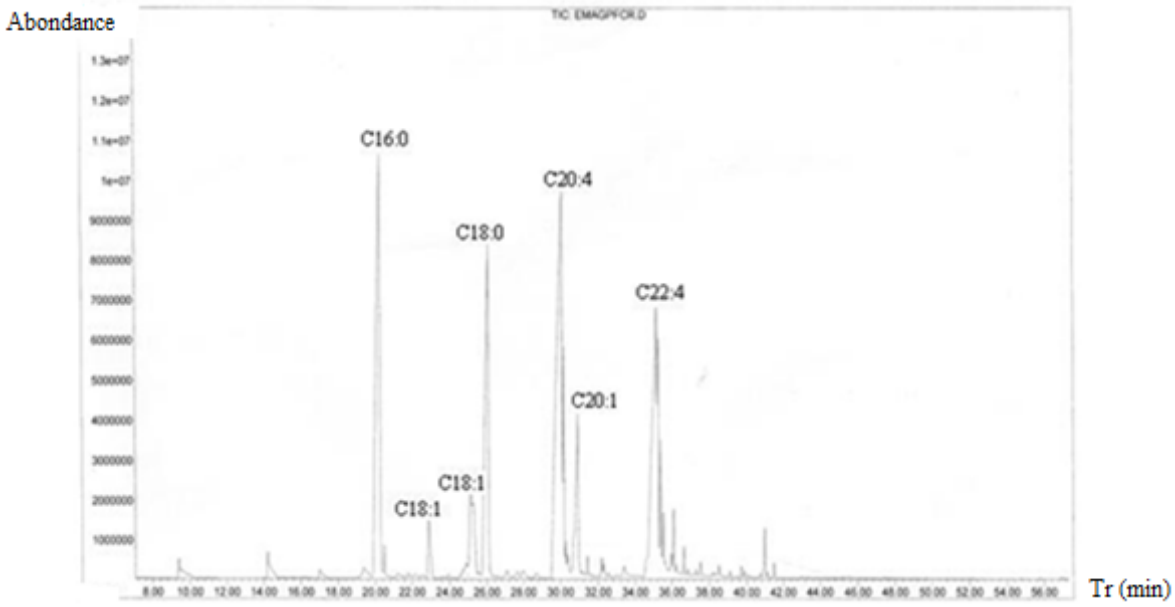


Figure 25 : Spectre de masse des EMAGs des fractions phospholipidiques des sous-produits de poulpe

Une partie des acides gras ont été préalablement identifiés à l'aide de la clé d'interprétation des spectres des masses des EMAGs (cf. annexe.1). Cette clé nous permet déjà d'avoir une vue globale des fractions phospholipidiques des sous-produits de poulpe qui montre une quantité importante d'acide palmitique (C16:0), d'acide stéarique (C18:0) et d'acide arachidonique (C20:4). Les autres acides gras et leurs pourcentages respectifs seront révélés par la détermination des LCE des spectres des masses du NAP.

Détermination de la LCE à partir des NAP

Les acides gras saturés (C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0) serviront d'abscisse à la droite de régression linéaire d'équation y = Tr = 2,302 (LCE) – 8,315 (R^2=0,997).

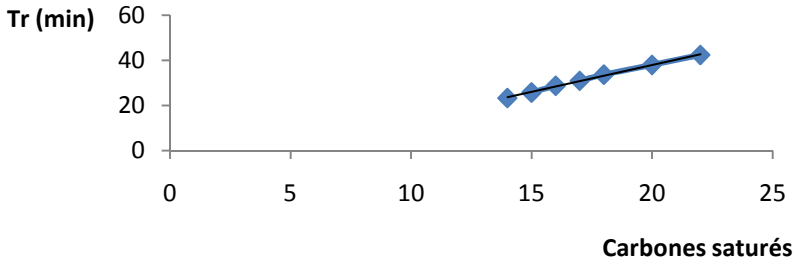


Figure 26 : Droite de régression des NAP saturés des phospholipides des sous-produits de poulpe

Les valeurs des LCE seront calculées selon le Tr de chaque pic des spectres des masses des NAP montré par la figure suivante.

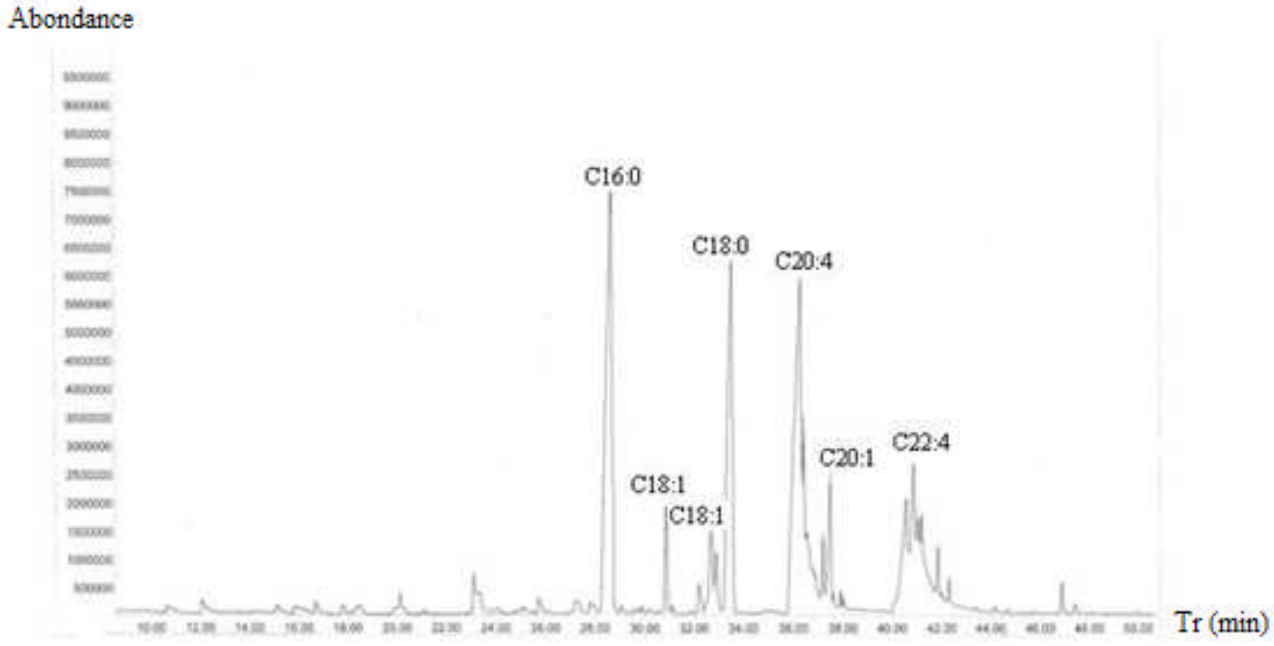


Figure 27 : Spectre des masses des NAP des fractions phospholipidiques des sous-produits de poulpe

Les spectres des masses des NAP nous montrent comme les spectres des masses des EMAGs une prédominance de l'acide palmitique (C16 :0), l'acide stéarique (C18 :0) et l'acide arachidonique (C20 :4). Et aussi les acides gras telle que l'acide gadoléique (C20 :1) et l'acide adrénique (C22 :4).

Composition des acides gras

En plus de la considération simultanée des spectres des masses des EMAGs et des NAP, l'identification des acides gras repose aussi sur la valeur des LCE de chaque acide gras. L'analyse combinée de ces paramètres nous a permis d'identifier une trentaine d'acide gras des phospholipides des sous-produits de poulpe. Le nom de ces acides gras avec la valeur de LCE et leurs pourcentages respectifs sont représentés dans le tableau 8.

Les AGS constituent une importante quantité avec 38% de la totalité. Ils sont représentés surtout par l'acide palmitique (C16 :0) pour un pourcentage de 18%, et l'acide stéarique (C18 :0) pour un taux de 12%. Les AGMI sont à petites quantités. Les AGPI font presque la moitié des phospholipides avec une prédominance de l'acide arachidonique (C20:4) qui constitue 20% des phospholipides des sous-produits de poulpe. L'acide adrénique (C22 :4) représente le quart des phospholipides.

Tableau 8: Composition en acide gras des phospholipides des sous-produits de poulpe

Structure	Nom usuel	LCE	%massique
C14 :0	Acide Myristique	14,00	0,18
C14 :0	Acide Myristique	14,00	0,32
C15 :0	Acide pentadécanoïque	15,00	0,34
C16 :0	Acide Palmitique	16,00	18,19
C17 :0	Acide margarique	17,00	1,19
C17 :0	Acide margarique	17,00	0,12
C18 :0	Acide Stéarique	18,00	12,07
C18 :0	Acide Stéarique	18,00	0,20
C20 :0	Acide arachidique	20,00	0,22
C21 :0	Acide méthylicosanoïque	21,00	0,17
C21 :0	Acide méthylicosanoïque	21,00	0,11
C22 :0	Acide béhénique	22,00	0,29
C23 :0	Acide méthyldocosanoique	23,00	0,16
C23 :0	Acide méthyldocosanoique	23,00	0,06
C24 :0	Acide lignocérique	24,00	0,17
	∑ AS		**34 %**
C16 :1ω7	Acide palmitoléique	15,76	0,55
C18 :1 ω9	Acide oléique	17,60	2,65
C18 :1 ω9	Acide oléique (iso)	17,88	2,10
C18 :1ω9	Acide oléique (iso)	17,92	1,52
C19 :1	Nd[6]	18,92	0,16
C20 :1 ω9	Acide gadoléique	19,77	4,97
C20 :1 ω9	Acide gadoléique (iso)	19,81	1,38
C20 :1 ω9	Acide gadoléique (iso)	19,95	3,19
C21 :1	Nd	20,89	0,35
C22 :1 ω9	Acide érucique	21,92	0,13
C24 :1 ω9	Acide nervonique	23,98	0,50
	∑ AMI		**18 %**
C18 :2 ω6	Acide linoléique	17,78	0,5
C18 :3 ω3	acide α-linolénique (ALA)	17,86	0,23
C20 :2 ω6	Acide homolinoléique	19,45	0,26
C20 :3 ω6	Acide homo-γ-linolénique	19,69	0,35
C20 :4 ω6	Acide arachidonique	19,72	20,34
C20 :4 ω6	Acide arachidonique (iso)	19,75	2,63
C21:2	Nd	19,78	2,87
C21 :4	Nd	20,45	0,22
C22 :2	Nd	21,38	4,38
C22 :4 ω6	Acide adrénique	21,45	14,98
C22 :6 ω3	Acide cervonique(DHA)	21,51	2,12
	∑ AGPI		**48 %**

[6]Non déterminé

3.3.1.2. Acide gras des phospholipides des sous-produits de calmar

Détermination de la LCE à partir des EMAGs

A partir des acides gras saturés (C14:0, C15:0, C18:0, C19:0, C20:0, C22:0)et de leur temps de rétention respectifs, on a obtenu la droite de régression d'équation y = Tr = 2,832 (LCE) – 25,33.

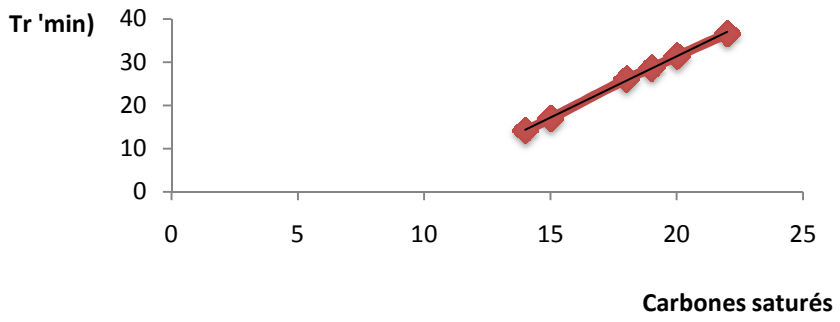


Figure 28: Droite de régression des EMAGs saturés des phospholipides des sous-produits de calmar

La valeur de la LCE sera calculée suivant les temps de rétention de chaque pic des spectres des masses représentés par la figure suivante.

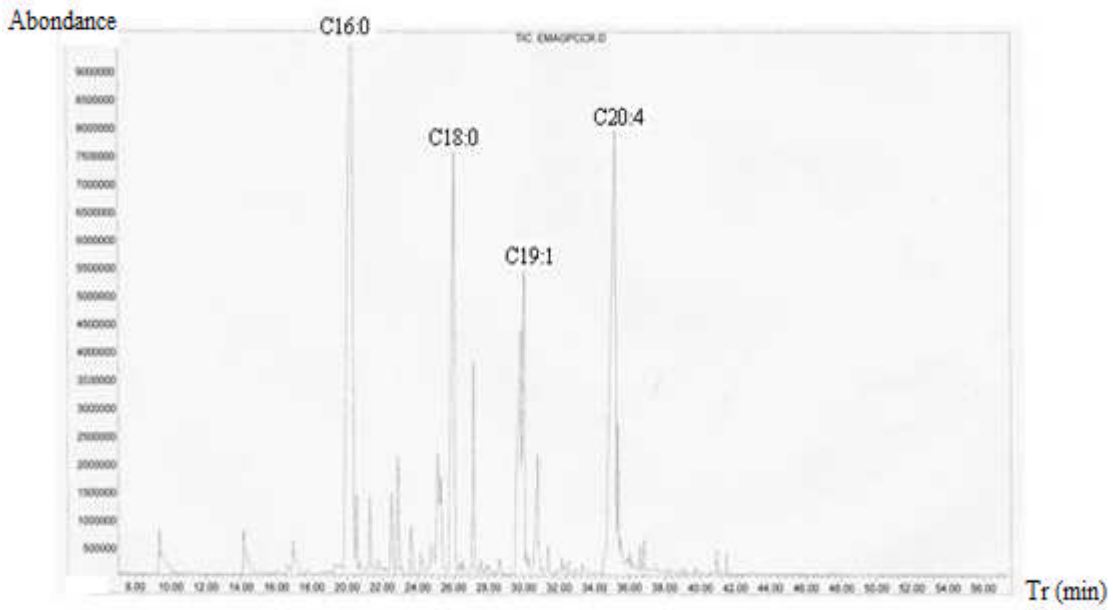


Figure 29 : Spectres des masses des EMAGs des fractions phospholipidiques des sous-produits de calmar

Cette figure nous donne déjà un aperçu de la composition des acides gras phospholipidiques des sous-produits de calmar grâce à la clé d'interprétation des EMAGs. Elle montre un important pic de l'acide palmitique (C16:0) suivit de l'acide stéarique

(C18:0) et de l'acide arachidonique (C20:4). Toutefois, une étude combinée des spectres des masses des NAP et de la valeur des LCE sera nécessaire pour déterminer la totalité des acides gras.

Détermination de la LCE à partir des NAP

La même procédée est adoptée pour le calcul des LCE. Cette fois, ce sont les acides gras saturés (C14 :0, C15 :0, C16 :0, C17 :0, C18 :0, C19 :0 et C20 :0) identifiés préalablement par la clé d'interprétation des NAP (Cf. annexe.2) qui seront les abscisses de la droite de la régression d'équation y = Tr = 2,425 (LCE) – 10,49 (R^2 = 0,997).

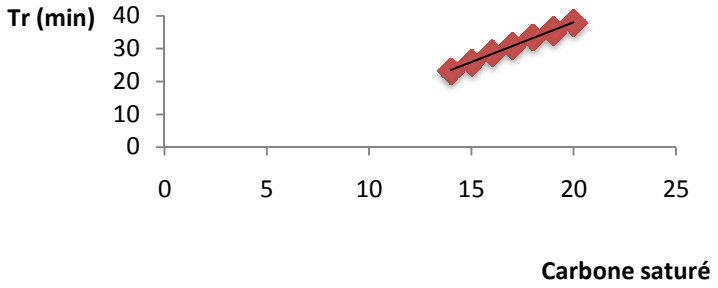


Figure 30: Droite de régression des NAP saturés des phospholipides des sous-produits de calmar

Ainsi, on pourrait calculer la LCE de chaque pic chromatogramme donné par les spectres des masses des NAP représenté par la figure suivante

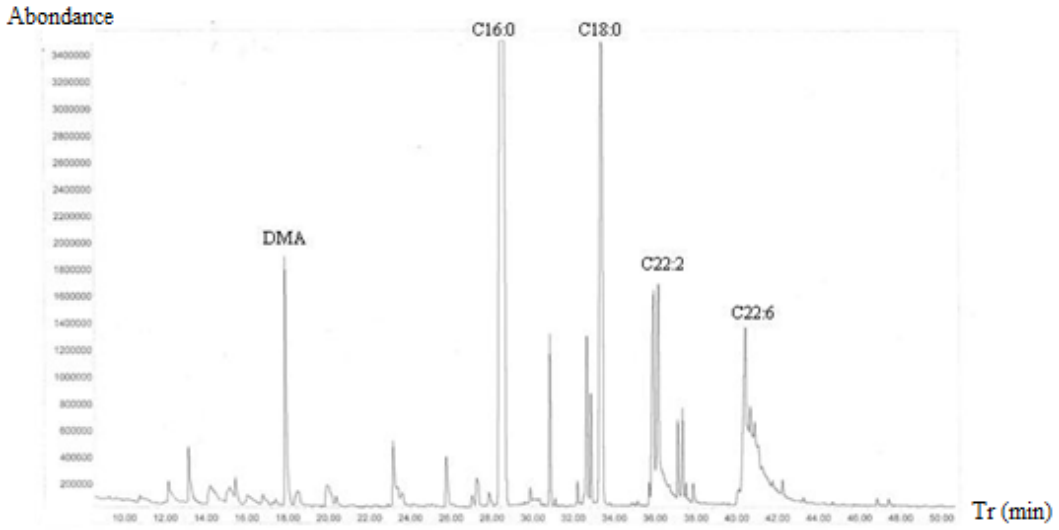


Figure 31 : Spectre des masses des NAP des fractions phospholipidiques des sous-produits de calmar

Ce spectre montre aussi l'important pic des acides palmitiques (C16:0) et stéarique (C18:0) comme le spectre des masses des EMAGs. Ce spectre nous permet de voir les restes d'acides gras qui se sont montrés à l'état de NAP comme l'acide (22 :2) et l'acide

cervonique (C22 :6). Quelques diméthylacétals (DMA) sont aussi présents. Ils proviennent de la réaction d'aldéhydes en milieu MeOH/HCl. Cela signifie que les extraits phospholipidiques des sous-produits de calmar contiennent en faible proportion des éthers vinyliques gras (Velosaotse, 2005).

Composition des acides gras

Le tableau suivant rassemble les acides gras identifiés avec les proportions relatifs. Ils représentent plus d'une vingtaine.

Tableau 9: composition en acide gras des phospholipides des sous-produits de calmar

Structures	Noms usuels	LCE	% massique
C14 :0	Acide myristique	14,00	1,35
C15 :0	Acide pentadécanoïque	15,00	0,92
C16 :0	Acide palmitique	16,00	33,11
C17 :0	Acide margarique	17,00	0,23
C17 :0	Acide margarique	17,00	0,09
C17 :0	Acide margarique	17,00	2,14
C18 :0	Acide stéarique	18,00	13,33
C19 :0	Acide nonadécanoïque	19,00	0,24
C20 :0	Acide arachidique	20,00	0,25
	∑ AGS		**52%**
C17 :1	Acide heptadécanoïque	16,73	0,09
C18 :1ω9	Acide oléique	17,81	0,37
C18 :1 ω9	Acide oléique (iso)	17,87	0,06
C18 :1 ω9	Acide oléique (iso)	18,02	2,53
C18 :1 ω9	Acide oléique (iso)	18,09	1,46
C19 :1	Acide méthylicosanoïque	18,90	0,08
C19 :1	Acide méthylicosanoïque (iso)	19,03	5,76
C20 :1 ω9	Acide gadoléique	19,84	1,01
C20 :1 ω9	Acide gadoléique (iso)	20,15	0,26
C22 :1 ω9	Acide érucique	21,75	0,51
	∑ AGMI		**12%**
C18 :2ω6	Acide linoléique	17,95	0,15
C20 :3 ω6	Acide homolinolénique	19,67	0,50
C20 :4 ω6	Acide arachidonique	19,36	20,55
C22 :2	Nd	19,46	6,12
C22 :5 ω3	Acide docosapentaènoïque	21,25	2,55
C22 :6 ω3	Acide cervonique(DHA)	21,30	5,85
	∑ AGPI		**36%**

Les résultats des acides gras des phospholipides des sous-produits de calmar montrent une quantité considérable d'AGS, avec un taux de 52% soit la moitié des acides gras des phospholipides. Ils sont dominés par l'acide palmitique (C16 :0) et l'acide stéarique (C18 :0) avec une valeur respectif de 33% et 16%. De faible proportion similaire, les AGMI sont représentés surtout par les acides gras appartenant à la famille des ω9.Les AGPI représentent une part importante de 36% de la totalité des phospholipides. Les acides gras ω3 sont représentés par l'acide docosahexaénoïque (DHA).

3.4. TOXICITEDES EXTRAITS LIPIDIQUES

Les tests de toxicités des extraits lipidiques évalués sur des souris se sont révélés négatifs pour les deux sous-produits. Aucun signe pathologique n'a été signalé sur les cobayes.

3.5. FARINES PREPARES A PARTIR DES TOURTEAUX

Pendant les processus d'obtention de farine, le contenu de l'eau a réduit de 50 % pour les tourteaux des sous-produits de poulpe, et un peu plus de 60 % quant aux tourteaux provenant des sous-produits de calmar. Les rendements de chaque farine obtenue sont montrés sur ce tableau.

Tableau 10 : rendement de la production de farine

	Tourteaux frais	Farine	Rendement
Poulpe	124 g	14 g	37 %
Calmar	152 g	18 g	47%

IV. DISCUSSION

A la lumière des résultats issus des analyses effectuées sur les lipides extraits des sous-produits de poulpe et de calmar, on constate que les sous-produits sont relativement pauvres en lipides, mais par contre riches en fractions lipidiques potentiellement intéressantes, notamment du fait de leurs compositions en acides gras.

En effet, nos résultats nous montrent une petite quantité de lipides totaux des sous-produits de l'ordre de 0,5%. Ce qui est normale parce que les céphalopodes ne contiennent que 2 à 3% de lipides. Selon Thomson et Rosjo (1989) et Arzel et al. (1994), la teneur des lipides corporels des animaux aquatiques reflète celle des matières grasses alimentaires. Ce qui stipule que les céphalopodes ont une faible matière grasse.

Par ailleurs, les études axées sur la caractérisation biochimique des sous-produits de poulpe et de calmar sont rare, rendant ainsi difficile toute comparaison de nos résultats avec la littérature. Toutefois, certains résultats obtenus sont en accord avec ce qu'a étudié Dumay en 2006 : les viscères sont des matrices relativement pauvres en lipides de réserve (essentiellement des lipides neutres). Ils se logent principalement dans le foie. Les viscères des poulpes de même que ceux de calmar ont une importante quantité de lipides de réserves qui sont respectivement de 41 à 35% des lipides totaux. Ce résultat confirme que les céphalopodes stockent plutôt les lipides dans leur foie mais pas dans la partie sous-cutanés. Parmi l'infime quantité des lipides totaux des sous-produits, les lipides neutres sont les plus représentatifs. Les glycolipides varient de 27 % à 35 % tandis que les phospholipides, qui seront étudiés plus profondément, constituent respectivement 32 % et 30 % des lipides totaux des sous-produits de poulpes et de calmar.

D'une part, les résultats sur les phospholipides des lipides totaux des sous-produits de poulpe nous permettent d'avoir une vision globale sur les pourcentages des acides gras essentiels. En effet, les acides gras polyinsaturés regroupés par la famille des ω3 et ω6 dont les intérêts sont été dits par de nombreux auteurs (Hoffman et Uauy en 1992 ; Dubois en 2005 et Dumay en 2006) participent à une foule de processus importants comme, le fonctionnement du système cardiovasculaire, du cerveau et du système hormonal, ainsi que la régulation des processus inflammatoires. Ils sont en grande quantité et représentent plus de 23% de la totalité des lipides totaux des sous-produits. Les résultats nous montrent également une série d'isomère d'acides gras : deux acides 14 :0, deux acides 17 :0, deux

acides 18 :0, deux acides 23 :0, trois acides 18 :1, trois acides 20 :1 et deux acides 20 :4. Les acides gras des phospholipides des sous-produits de poulpe sont donc caractérisés par un nombre élevé d'acides gras ramifiés. Ces isomères présentent des caractéristiques métaboliques et tiennent chacun leur rôles métaboliques dans l'organisme aquatique. L'acide oléique (C18:1(n-9)), par exemple, est le plus abondant dans les tissus animaux, il constitue les lipides structuraux et les graisses. Il peut comporter 30-40% de tous les acides gras en graisses adipeuses des animaux, et 20 à 80% d'huiles de graines de commerce. Son isomère : l'acide de Vaccenic (18:1(n -11)) est un acide gras commun des lipides bactériens. Il est aussi présent dans les lipides des éponges. Et il est habituellement présent, mais comme composant mineur, dans les tissus des animaux (Christie, 2010). Sa présence dans les sous-produits de poulpe nous révèle la présence de bactéries dans ses tubes digestifs.

D'autre part, les phospholipides des lipides totaux des sous-produits de calmar présentent également une série d'isomère d'acides gras. On trouve trois acides 17:0, quatre acides 18:1, deux acides 19:1, deux acides 20:1 et trois acides 22:6. Les acides gras des phospholipides des sous-produits de calmar présentent aussi des acides gras à chaine ramifiés. Les sous-produits de calmar abritent aussi des bactéries par la présence de l'isomère (18:1) comme les sous-produits de poulpe.

Pourtant, des différences au niveau des compositions des molécules d'acides gras apparaissent dans les phospholipides des deux sous-produits. Les sous-produits de calmar sont beaucoup plus riches en acide gras essentiels que ceux de poulpe (27% contre 23%). Les AGI, majoritairement représenté par acide gras ω9, qui ont des intérêts nutritionnel dans le cadre d'une alimentation équilibré (Bourre, 2004), sont légèrement en forte quantité (38%) dans les sous-produits de calmar. Alors que les sous-produits de poulpe n'en possèdent que 36%.

En analysant les AGPI, on a pu constater que les acides gras des sous-produits ont chacun leur propriétés. Le DMA n'a été trouvé que chez les acides gras des sous-produits de calmar. Ce DMA montre l'existence de phospholipides particuliers : les plasmalogènes. Ils sont connus par leur rôle structural dans les membranes biologiques. Riche en AGPI dont ils constituent une réserve, ils sont impliqués dans le métabolisme de l'acide aminé et dans le mécanisme de réponses cellulaires. Antioxydants endogènes, ils ont un rôle protecteur face aux espèces réactives de l'oxygène. Les acides gras des phospholipides de

poulpe, a par contre à lui seul, une grande quantité d'acide arachidonique (22%) qui sont médiateurs cellulaires intervenant dans la commande de certaines fonctions cellulaires.

Mais les deux sous-produits ont tous les deux une composante important : le DHA. Il représente 5% pour le poulpe contre seulement 2% pour le calmar. Le DHA est considéré comme nutriment essentiel. Il est nécessaire au développement normal et fonctionnel des cellules et joue un rôle crucial dans divers processus et fonctions biochimiques (Madsen et al, 2001 ; Shalon, 2001 ; Brouwer et al, 2006). Sa nature polyinsaturée lui confère une importance cruciale vis-à-vis des propriétés de la membrane cellulaire, chez les végétaux comme chez les animaux : fluidité, flexibilité et perméabilité sélective permettant, par exemple, une adaptation effective, et même la survie, aux basses températures en particulier chez les poissons (Fodor et al, 1995 et Henderson, 1999).

Le DHA est un constituant structurel majeur du cerveau humain et il en est le principal acide gras. Le DHA représente 15-20 % du cortex cérébral (le cerveau d'un adulte contient au moins 20 g de DHA et 30-60 % de la rétine (Connor, 2000 et Shalon, 2001). Il est indispensable au développement du système nerveux central et à la fonction rétinienne, par incorporation dans les membranes cellulaires, et joue un rôle capital dans l'acquisition et le maintien satisfaisant des mécanismes de la vision et de la mémoire (Bourre, 2010). Le DHA est ainsi devenu, dans le dernier quart du XXe siècle, une molécule de choix et un sujet de préoccupation pour l'avenir, compte tenu du déséquilibre croissant entre l'offre et la demande.

Les acides gras des huiles obtenues par extraction des sous-produits ont principalement pour origine les lipides des micro-algues constituant le phytoplancton (Bergé et Barnathan, 2005). Ces acides gras s'intègrent dans la base des réseaux trophiques marins et sont présents dans les organismes marins à travers les réseaux trophiques suivant la chaîne alimentaire. Des producteurs primaires aux carnivores de second ordre en passant par les herbivores, les omnivores et les carnivores de premier ordre, les valeurs des acides gras sont légèrement identiques pour tous les organismes. Citons par exemple la macroalgue *Grateloupia turuturu*, ces acides palmitiques représentent un taux important de l'ordre de 50% (Denis et al, 2010). L'algue rouge *Schizymenia dubyi*a 16% d'acide palmitique et 14% d'acide stéarique (Barnathan, 1998). Ces valeurs se ressemblent aux acides gras des espèces d'éponges *Cinachyrella alloclada* et *Cinachyrella kükenthali* dont l'acide palmitique constitue les 18% des phospholipides et leur acide stéarique avoisine la valeur de 10% (Barnathan, 2003). En ce qui concerne les poissons, des études réalisées sur la chaire de trois tilapia de Madagascar (*Oreochromi sniloticus*, *Oreochromis macrochir et*

Tilapia rendalli) par Jean ont aussi montrés la forte teneur des deux acides gras (Jean et al, 2005). Ces études nous montrent une similitude avec nos résultats. La majorité des espèces marins étudiées comme les sous-produits des poulpes et des calmars présentent un taux élevé d'acides palmitique (C16 :0) et d'acide stéarique (C18 :0).Ces acides gras contribuent au bon fonctionnement de l'organisme. Ils peuvent réduire le taux du cholestérol total et le taux du mauvais cholestérol (LDL) (Ammerich, 2006). Ces acides gras accentuent l'agregabilité des plaquettes sanguines et potentialisent leur activité coagulante.

Nous avons donc pu montrer que les acides gras présentent dans les sous-produits de poulpe et de calmar ont été véhiculé dans les organismes marins. Certains acides gras comme le DHA se trouvent majoritairement dans ces organismes marins, d'où l'appellation de lipides marins.

CONCLUSION

Ce travail de recherche a comme objectif de valoriser les sous-produits de poulpe (*Octopus cyanea*) et de calmar (*Sepioteuthis sp*) par des procédés biochimiques qui consistent à extraire et à analyser les lipides totaux.

L'extraction des lipides totaux suivant la méthode de Folch a d'abord été abordée. Cette technique nous a permis de constater que les sous-produits de poulpe et de calmar présentent une faible quantité de lipides.

Ensuite, des analyses chimiques sur les lipides totaux ont été effectuées. Les résultats obtenus, par une chromatographie liquide à basse pression, nous a permis de déterminer en premier temps une grande quantité de lipides de réserves tant sur les sous-produits de poulpe que sur ceux de calmar. Compte tenu de ce résultat et de la petite quantité de lipides totaux, on peut dire que les céphalopodes sont parmi les aliments moins gras. Il apparaît aussi que les sous-produits présentent une quantité moyenne de glycolipides et de phospholipides.

Dans un second temps, la qualité des fractions lipidiques des deux sous-produits, notamment la présence de phospholipides (de 30 à 32% des lipides totaux) ayant des importants rôles métaboliques, justifie la poursuite de l'étude sur cette classe de lipides. Les phospholipides ont été analysés sur chromatographie en phase gazeuse couplée au détecteur de masse. Les résultats des spectres des masses des sous-produits de poulpe nous a permis de trouver une trentaine d'acides gras. Ceux des sous-produits de calmar ont montrés une vingtaine d'acide gras. A l'issue de l'analyse des spectres, on a constaté que les deux sous-produits possèdent un très bon profil en acide gras : le pourcentage en acide gras insaturés (34 % pour les sous-produits de poulpe et 52 % pour ceux de calmar), et en acide gras polyinsaturés (36% pour les sous-produits de poulpe et 48 % pour ceux de calmar) est élevé pour les deux sous-produits. Ces résultats montrent qu'il est dorénavant possible d'envisager une valorisation optimisée des sous-produits comme source majeure à venir des acides gras polyinsaturés.

De plus, les extraits lipidiques se sont révélés négatifs après un test toxicologique effectués sur des souris (*Mus musculus*).

Enfin, pour une totale valorisation des sous-produits, les tourteaux obtenus après extraction des lipides totaux, ont été transformés en farine. Cela nous permet d'avoir « zéro » déchets et une meilleure qualité protéinique de la farine.

Grace à ce travail de recherche, deux problèmes seront évités : le problème environnemental dans les sites de décharges et le problème économique des sociétés de pêche pour la décharge des sous-produits. Par la même occasion, on obtient des huiles riches en acides gras polyinsaturés et de farine de meilleurs digestibilités et à haute teneur en protéines.

L'étude des sous-produits des céphalopodes axés sur l'extraction des lipides marins représente ainsi une voie de valorisation digne d'attention. La richesse et le volume des matières premières à Madagascar notamment à Toliara, offre des opportunités intéressantes pour la filière.

Et pour s'assurer du développement de la filière sous-produit, il serait en effet important de mener de nombreuses perspectives en commençant par construire de nouvelle unité de transformation, pour garantir le tri rapide des sous-produits, afin de mieux gérer les approvisionnements des matières premières de bonnes qualités et éviter ainsi la protéolyse. La production spécifique à l'échelle industrielle serait nécessaire en considérant les bénéfices indéniables des acides gras essentiels pour la santé, et les conséquences graves d'une déficience. De plus, des suppléments nutritionnels en acide gras polyinsaturés, particulièrement en DHA, sont de plus en plus recommandés.

L'extraction, la purification et l'identification de la structure de molécules lipidiques constituent une suite d'opération longue mais aujourd'hui réalisable. La recherche de leurs activités biologiques se révèle beaucoup plus complexe. On est donc conduit à mener des opérations longues et coûteuses en soumettant les extraits plus ou moins purifiés à des tests pour contribuer à une meilleure valeur nutritionnelle de l'alimentation de l'homme.

Des études penchées sur les pouvoirs nutritionnels des farines obtenues à partir des tourteaux seraient aussi intéressantes avec enrichissement en huile marin des provendes des génitures ou des juvéniles en développement dans les fermes aquacoles.

Compte tenu de l'originalité de ce travail, une étude approfondie de tous les axes de valorisation des sous-produits de pêche et de leur finalité dans chaque domaine : nutraceutique, pharmaceutique ou encore aquacole, s'avère indispensable.

BIBLIOGRAPHIE

- Ackman RG (1989). - Fatty acids. In: Ackman RG, ed. Marine biogenic lipids, fats, and oils, Vol. 1-2. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.

- Arzel, J., Martinez Lopez J.F., Métailler R., Stéphan G. (1994). Effect of dietary lipid on growth performances and body composition of brown trout (*Salmo trutta*) reared in seawater. J. Aquaculture, 123, pp: 361-375.

- Barnathan G. (2008). -Discarded parts of fish as an alternative source of polyunsaturated fatty acids of interest for human uses. In: Added Value to Fisheries Waste, 2008:57-79. Editor: Jean Pascal Bergé.

- Barnathan G. (1993). Acides gras et stérols d'éponges marines du Sénégal et de Nouvelles Calédonie, thèse de doctorat, Université de Nantes.

- Barnathan G. et al (1998). - methoxy fatty acids isolated from the red alga, schizymenia dubyi. Article Phytochemistry, Vol. 47, No. 5, pp. 761-765

- Barnathan G. et al (2003). - Phospholipid fatty acids and sterols of two *Cinachyrella sponges* from the Saudi Arabian Red Sea: comparison with *Cinachyrella* species from other origins. Article Comparative Biochemistry and Physiology Part B 135, 297–308

- Barnathan G. (2010). – Acides gras inhabituels des organismes marins : une illustration de la biodiversité moléculaire marine. Dossier : lipides marins, intérêts nutritionnels et application, vol. 17, num. 4, 238-50

- Bergé J.P. and Barnathan G. (2005). - Recent advances in fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically-active compounds and economical aspects. In Marine Biotechnology, Le Gal Y., Ulber R (Eds). Series Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Springer-Velagre 96 : 49-125.

- Bernay B. (2005).- Contrôle de la ponte ovulaire chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*: utilisation du modèle *Sepia officinalis* pour la caractérisation de peptides régulateurs. Thèse, Université de Caen. 183p

- Bihan E. (2006). – Valorisation des co-produits issus de la pêche des céphalopodes : application à la seiche *Sepia officinalis*. Thèse, Université de Caen. 317p

- Bourre JM. (2004).- Acides gras oméga-3 alimentaires et neuropsychiatrie. pp:362-70.

- Bretscher M. (1988). – Les molécules de la membrane cellulaire, in : les molécules de la vie, E. Sakiz, Ed., librairie « pour la science », Belin, Paris, pp. 62-71.

- Brouwer IA, Geelen A, Katan MB. (2006). -ω3 Fatty acids, cardiac arrhythmia and fatal coronary heart disease. Prog. Lipid. Respp: 357-67.

- Christie W. W. (1988). -Equivalente chain-lengths of methyl ester derivatives of fatty acides on gaz chromatograph. J. Chromatg., 447p

- Christie W.W. (1998). - Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. Lipids, pp. 343-353.

- Christie W.W. (2010). – About lipids. Scottish Crop Research Institute (and MRS Lipid Analysis Unit), Invergowrie, Dundee (DD2 5DA), Scotland. 383 p

- Connor WE (2000).-Importance of n-3 fatty acids in health and disease. pp: 171-175.

- Dubois N. (2005).- Optimisation de l'analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse : Application à l'étude de lipides naturels complexes. Mémoire. École pratique des hautes études. Concarneau. 28p

- Dumay J. (2006). - Extraction de lipides en voie aqueuse par bioréacteur enzymatique combine à l'ultrafiltration : application à la valorisation de co-produits de poisson (*Sardina pilchardus*). Thèse de doctorat. Ecole doctorale mécanique, thermique et génie civile de Nantes. 325p

- Food and Agriculture Organization (FAO), (2006). Review of the state world's marine fishery resources. FAO Fisheries Technical Paper 457.

- Fodor E, Jones RH, Buda C, Kitajka K, Dey I, Farkas T. (1995).-Molecular architecture and biophysical properties of phospholipids during thermal adaptation in fish : an experimental and model study. Lipids pp: 1119-26.

- Folch, J., Lees, M., and Sloan Stanley, G.H. (1957). - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem; pp 497-509.

- Henderson RJ. (1999).-The production of ω3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms. LipidTechnol, pp: 5-10.

- Hoffman, D.R. and Uauy R. (1992). - Essentiality of dietary ω3 fatty acids for premature infants: plasma and red blood cell fatty acid composition. Lipids, 27; pp 886-894.

- Ifremer(2010).-Fiche de synthèse de la valorisation des co-produits. Art BRM/STBM V1

- James, A. T., Martin, A, and J.P. (1956) - Gas-liquid chromatography: The separation and identification of the methyl ester from saturated and unsaturated acids from formic acid to n-octadecanoic acid. Biochem. J., 63; pp 144-152.

- Jean R.E. Rasoarahona a, Gilles Barnathan b, Jean-Pierre Bianchini c, Emile M. Gaydou, 2005. - Influence of season on the lipid content and fatty acid profiles of three tilapia species (*Oreochromis niloticus*, *O. macrochir* and*Tilapia rendalli*) from Madagascar. Article Food Chemistry 91. 683–694

- Kato I, Akhmedkhanov A, *et al*. (1990). -Prospective study of diet and female colorectal cancer: the New York University Women's Health Study. *NutrCancer*; 28p.

- Kornprobst JM. (2010). - Encyclopedia of Marine Natural Products, Wiley-Blackwell, vol3.

- KouetaN. (1983).-Contribution à l'étude de la glande salivaire postérieure de céphalopodes décapodes. Thèse de Doctorat de 3ème cycle, Université de Caen. 168p.

- Madsen T, Skou HA, Hansen VA, et al (2001). - C-reactive protein, dietary n-3 fatty acids, and the extent of coronary artery disease. Am J Cardiol ; 88 : 1139-42.

- Mangold, H. K. and Paltauf, F. (1983) - ether lipids: Chemistry and Biology. AcademicPress Inc.

- Mangold K. (1989). - Organes génitaux. In 'Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Céphalopodes'. (Paris) pp 459-492.

- Martin A.J.P. and Synge R.L.M. (1941). - A new form of chromatogram employing two liquid phases. A theory of chromatography. J. Biochem. ; pp 1358-1368.

- Norse, E.A. (1993). - Global marine biological diversity: A strategy for building conservation into decision making. Island Press, Washington D.C.383 pp.

- Raheriniaina C.E., Fitahia E.M. (2011). - Valorisation biotechnologique des sous-produits de la pêche. Symposium Biomad II. Antananarivo : 14, 15 Avril 2011

- Salghi R. (2010). – Cours d'analyses physico-chimique des denrées alimentaires II. GPEE, 1ère année. ENSA Agadir

- Shalon S. (2001).- Acides gras polyinsaturés et fonctions cognitives. pp: 317-20.

- Thomson, J. M. and Rosjo C. (1989). Different fats in feed for salmon; influence of sensory parameters, growth rate and fatty acids in muscle and heart. Aquaculture, 79, pp: 129-135.

- Tranchant J. (1995). – Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, 4° éd., Mason, Paris, 700p

- Velosaotsy N.E. (2005) - Etude de lipides d'éponges marines: Phospholipides, acides gras, stérols. Identification et évaluation pharmacologique de métabolites secondaires. Thèse de doctorat, école doctorale de chimie biologie. Nantes, 1 ; pp 57.

- Vioanovà, J., Tvrzickà, E., and stulik, K. (1994) - Capillary gas chromatography of underivatized fatty acids with a free fatty acid phase column and a programmed temperature vaporizer injector. *J. Chrom. B*, 656; pp 45-50.

- Uauy-Dagach, R. and Valenzuela A. (1996) - Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutraceutique revue*, 54 (S); pp 102-108.

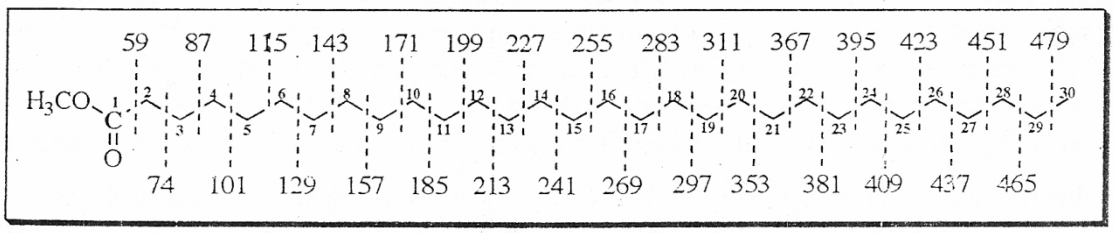
WEBOGRAPHIE

- Ammerich G. (2006). – Acide gras nomenclature. Article: santé-guérir. Disponible sur http://www.notrefamille.com
- COPEFRITO (2010). Disponible sur http://www.copefrito.com
- Blainville (1823) et Gray (1849).- Classification des céphalopodes. Disponibles sur http://fr.wikipedia.org/wiki/classification_scientifique_des_esp
- Elatiqy M. (2010). - Disponibles sur http://www.azaquar.com
- Guerra (1979). Disponible sur http://www.larousse.fr/encyclopedie
- OCDE (2011). Disponibles sur http://www.oecd.org
- Torres C. (2010).Huile de foie de requin, immunité et cancer in *dents de la mer*. Disponible sur http://www.valocean.com
- http://www.wikipedia.org

ANNEXES

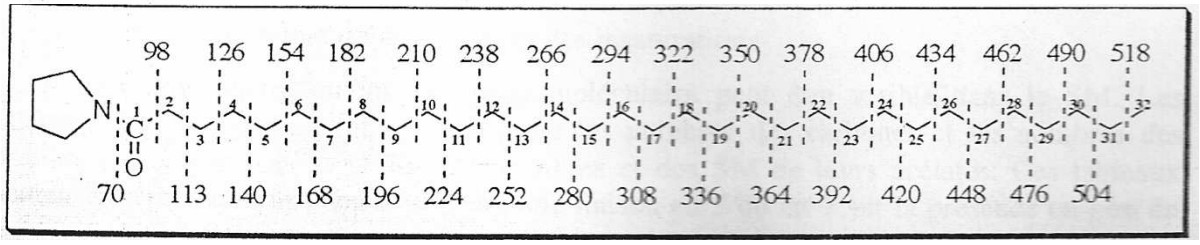
<u>Annexe 1</u> : Clé d'interprétation des EMAG

Nb. C	M (EMAG)	Nb. C	M (EMAG)	Nb. C	M (EMAG	Nb. C	M (EMAG)
12	214	13	228	14	242	15	256
16	270	17	284	18	298	19	312
20	326	21	340	22	354	23	368
24	382	25	396	26	410	27	424
28	438	29	452	30	466	31	480



<u>Annexe 2 :</u> Clé d'identification des NAP

Nb. C	M (NAP)	Nb. C	M (NAP)	Nb. C	M (NAP)
12	253	13	267	14	281
15	295	16	309	17	323
18	337	19	351	20	365
21	379	22	393	23	407
24	421	25	435	26	449
27	463	28	477	29	491
30	505	31	519	32	533



Annexe 3 : Temps de rétention et pourcentages massique des EMAGs des phospholipides des sous-produits de poulpe

N° du pic	Temps de rétention: Tr (min)	Pourcentage (%)
1	9,404	0,328
2	9,533	0,623
3	14,237	0,987
4	17,006	0,342
5	19,358	0,556
6	20,291	18,595
7	20,492	0,445
8	22,916	1,781
9	24,709	0,197
10	24,895	0,5
11	25,153	2,655
12	25,268	2,101
13	26,1	12,472
14	27,09	0,206
15	27,649	0,175
16	27,907	0,118
17	28,008	0,168
18	30,116	24,023
19	30,203	2,663
20	30,274	0,351
21	30,36	0,26
22	30,934	4,971
23	31,436	0,225
24	32,196	0,225
25	32,297	0,195
26	33,401	0,356
27	35,18	14,981
28	35,28	3,519
29	35,41	1,903
30	35,553	0,827
31	35,969	0,294
32	36,112	0,836
33	36,241	0,133
34	36,657	0,299
35	36,873	0,07
36	37,317	0,066
37	37,561	0,164
38	38,522	0,153
39	39,096	0,061
40	39,713	0,129
41	39,885	0,069
42	40,989	0,736
43	41,118	0,071
44	41,491	0,174

Annexe 4 : Temps de rétention et pourcentages massique des NAP des phospholipides des sous-produits de poulpe

N° du pic	Temps de rétention: Tr (min)	Pourcentage (%)
1	10,664	0,288
2	12,084	0,581
3	15,139	0,283
4	15,856	0,149
5	16,702	0,357
6	17,807	0,203
7	18,467	0,447
8	19,873	0,121
9	20,116	0,272
10	23,114	0,815
11	23,286	0,321
12	23,358	0,280
13	25,108	0,104
14	25,725	0,431
15	27,231	0,235
16	27,317	0,356
17	27,819	0,467
18	28,709	21,709
19	29,067	0,156
20	29,899	0,120
21	30,889	1,976
22	31,104	0,144
23	32,208	0,758
24	32,711	2,829
25	32,911	1,524
26	33,6	14,382
27	36,354	20,341
28	36,469	2,875
29	36,569	2,670
30	37,215	1,382
31	37,53	3,197
32	37,616	0,191
33	37,917	0,194
34	38,018	0,100
35	40,585	5,962
36	40,915	4,918
37	41,073	2,129
38	41,217	4,388
39	41,862	1,186
40	42,307	0,365
41	44,157	0,117
42	46,897	0,504
43	47,413	0,172

Annexe 5 : Temps de rétention et pourcentages massique des EMAGs des phospholipides des sous-produits de calmar

N° du pic	Temps de rétention : Tr (min)	Pourcentage (%)
1	9,363	0,557
2	9,492	0,651
3	14,183	1,253
4	16,966	0,941
5	20,365	29,189
6	20,552	0,675
7	21,312	1,203
8	21,771	0,196
9	22,545	1,483
10	22,918	1,776
11	23,621	0,848
12	24,181	0,401
13	24,754	1,126
14	25,142	3,181
15	25,299	1,405
16	26,074	12,343
17	26,533	0,146
18	27,179	3,035
19	27,552	0,243
20	28,627	0,296
21	29,861	7,379
22	30,062	5,765
23	30,808	2,528
24	31,381	0,258
25	32,142	0,186
26	32,515	0,16
27	35,226	20,557
28	35,369	1,233
29	35,484	0,143
30	36,631	0,184
31	36,861	0,254
32	40,935	0,227
33	41,465	0,178

Annexe 6 : Temps de rétention et pourcentages massique des NAP des phospholipides des sous-produits de calmar

N° du pic	Temps de rétention: Tr (min)	Pourcentage (%)
1	10,746	0,089
2	12,166	0,739
3	13,156	1,022
4	14,232	0,982
5	14,519	0,231
6	15,164	0,909
7	15,451	0,588
8	16,025	0,337
9	16,197	0,341
10	16,785	0,256
11	16,957	0,131
12	17,416	0,145
13	17,918	4,106
14	18,492	0,623
15	19,926	0,493
16	20,027	0,561
17	20,371	0,208
18	22,896	0,062
19	23,168	1,350
20	23,383	0,367
21	23,599	0,448
22	25,779	0,920
23	27,027	0,235
24	27,271	0,778
25	27,859	0,393
26	28,676	33,116
27	29,064	0,080
28	29,58	0,092
29	29,91	0,235
30	30,168	0,095
31	30,283	0,128
32	30,871	2,148
33	31,115	0,155
34	32,205	0,375
35	32,348	0,068
36	32,535	0,152
37	32,693	2,531
38	32,879	1,466
39	33,453	13,336
40	34,83	0,055
41	35,146	0,083
42	35,719	0,249

43	35,949	4,712
44	36,193	6,125
45	36,695	0,501
46	37,125	1,010
47	37,369	1,297
48	37,512	0,269
49	37,871	0,250
50	40,094	0,354
51	40,439	5,207
52	40,539	0,974
53	40,668	2,531
54	40,883	2,350
55	41,055	2,552
56	41,758	0,513
57	42,246	0,401
58	43,279	0,063
59	46,85	0,119
60	47,424	0,095

Annexe7 : recommandations nutritionnelles pour les lipides

a. Equilibre entre les macronutriments

Les nutritionnistes recommandent que 30 à 35 % de la ration énergétique globale soient apportés par les lipides, 10 % à 14 % par les protéines et 50 à 55 % par les glucides.Les consommations observées diffèrent de ces recommandations : lipides 39 à 42%, protéines 16 à 19%, glucides 40 à 45% (CREDOC7 99, Données ASPCC8, résultats étude SU.VI.MAX).

b. Apports nutritionnels conseillés en acides gras.

Généralement, ces recommandations peuvent s'exprimer comme suit :

- AGS : 25 % de l'apport lipidique total
- AGMI : 60 % de l'apport lipidique total
- AGPI : 15 % de l'apport lipidique total

c. Les raisons de telles recommandations : déséquilibres et risque cardiovasculaire :

Si l'artériosclérose est une maladie favorisée par de multiples facteurs (sédentarité, tabac, hypertension artérielle, obésité, consommation insuffisante de fruits et légumes, etc.), le rôle des lipides alimentaires a fait l'objet de nombreuses études

indiquant, selon les niveaux de consommation des différents types d'acides gras, un impact significatif sur l'accroissement ou la diminution des facteurs de risque.

- **AGS** : la contribution principale des AGS dans notre alimentation est représentée par l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0), apportés surtout par des produits animaux.

L'effet néfaste d'une consommation excessive d'AGS sur le développement des maladies cardiovasculaires a été mis en évidence par de nombreuses études épidémiologiques.

- **AGMI** :comportent deux familles, ω7 et ω9 dont le représentant principal très répandu est l'acide oléique (C18:1, ω9) que l'on trouve dans les huiles végétales (olive, colza, …) et dans les produits animaux.

Pour ce qui est de son impact sur les facteurs de risque cardiovasculaire, diverses études épidémiologiques d'observation ont montré une corrélation inverse entre consommation d'AGMI (en % de la ration) et mortalité cardiovasculaire. L'augmentation de la consommation de cet acide gras contribue donc à diminuer ce risque.

- **AGPI** : les acides gras linoléiques (ω6) et alpha-linolénique (ω3) sont essentiellement apportés par les huiles végétales. L'acide éicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) sont essentiellement d'origine marine (poisson…), et l'acide arachidonique est surtout apporté par les animaux terrestres (viande, œufs…).

Un déséquilibre en acides gras essentiels peut être à l'origine de troubles fonctionnels (moindre développement de l'acuité visuelle chez le nouveau-né en situation de carence en ω3 par exemple) et peut également jouer sur la fréquence d'apparition ou tout au moins l'intensité des symptômes d'un certain nombre de désordres pathologiques (maladies cardiovasculaires, cancer, diabète, obésité, pathologies inflammatoires et neuropathologies) (Guesnet, 2005). C'est la raison pour laquelle des apports nutritionnels conseillés ont été proposés.

Lorsque l'apport en AGPI est bas, ils mettent en évidence un accroissement du risque de mortalité coronarienne.Ils sont apportés par les produits animaux marins (poissons, crustacés …) et le lait maternel.