

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MER ET DE L'AQUACULTURE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

Doubbi Bounoua Hadjira et Aissou Asma

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER

En Hydrobiologie Marine et Continentale

Spécialité: Ressources Halieutiques

Thème

Etude du potentiel antioxydant et antimicrobien
d'hydrolysats protéiques de poisson marin : cas du thon
rouge (*Thunnus thynnus*, Linnaeus 1758)

Soutenu publiquement le 16/09/2019

Devant le jury

Président	M ^{er} . BELBACHIR N	MCB	Université de Mostaganem
Encadreur	M ^{me} . SOUALILI. D.L	Professeur	Université de Mostaganem
Examineurs	M ^{me} . BENMASSOUD. N	MAA	Université de Mostaganem
Co-Encadreur	M ^{elle} . OULHIZ. A	MCB	Université Mostaganem

Année universitaire : 2018/2019

"Tout le monde est un génie. Mais si vous jugez un poisson à sa capacité à grimper à un arbre, il vivra toute sa vie en croyant qu'il est stupide"

Albert Einstein



Remerciement

Avant tout, nous remercions Allah Tout-Puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour terminer ce travail.

Tout d'abord, nous voudrions exprimer notre sincère gratitude à notre encadreur, Professeur Soualili Dina Lila pour nous avoir encadrées, nous la remercions pour son soutien, enseignement et sa confiance.

Un grand merci est également adressé à notre Co-encadreur mademoiselle Oulhiz Aicha qui nous a suivi tout au long de cette période et nous a conseillé, nous ne pouvons pas exprimer à quel point nous lui sommes reconnaissantes pour son aide, son soutien, vos conseils et ses encouragements.

On tient, aussi, à remercier Mr BELBACHIR Nor-Eddine, maître de conférences enseignant chercheur et chef du département des sciences de la mer et l'aquaculture (FSNV/UMAB), d'avoir accepté de présider le jury ;

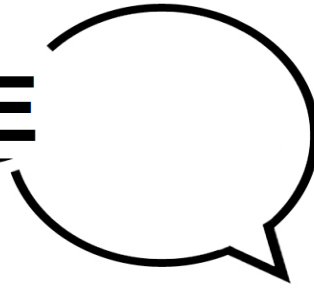
On remercie également Mme BENMASSAOUD Nadjat, enseignante-chercheur au département des sciences de la mer et l'aquaculture (FSNV/UMAB), d'avoir aimablement accepté examiner et d'apporter ses remarques à ce modeste travail.

Nous souhaitant adresser nos remerciements les plus sincères à Mr Benbouziane Djilali ingénieur du laboratoire pédagogique de microbiologie qui nous a permis de mener à bien le Protocole expérimental et nous a aidé au cours des expérimentations.

Nos remerciements vont également à tous les enseignants du Département des sciences de la mer et de l'aquaculture, qui ont fait de leur mieux pour nous guider au cours de ces dernières années. Nous ne serons pas là sans vous.

Nous tenons à remercier vivement tous ceux qui, de près ou de loin ont participé et aidés à notre formation dans cette filière.

DÉDICACE



Je dédie ce modeste travail à :

À ma charmante maman

Pour son amour, ses soins, son soutien et son encouragement tout au long de ma vie. Sans son soutien pendant les années de mon étude, je ne serais pas ici aujourd'hui, je vous promets que vos sacrifices ne seront pas vains. Merci pour tout ce que tu as fait et continue de faire, tu es la meilleure maman.

À la mémoire de mon père

Tu étais le meilleur papa et sera toujours... repose en paix papa.

À mon adorable petite sœur **Rania** qui sait toujours me faire sourire, tu es le plus beau cadeau que j'ai jamais reçu.

À mon petit frère **Walid**, le personne le plus drôle de la famille, qui sait exactement comment nous faire rire et à mon frère **Fayçal**, avec qui j'ai passé les meilleurs souvenirs d'enfance.

A ma très cher tante **Zoulikha** et oncle **Ali**.

À mon binôme et très proche amie **Asma** qui a partagé avec moi ce travail.

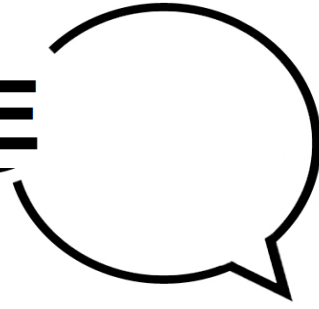
À tous les étudiants et collègues de la spécialité Ressources Halieutiques pour les bons moments qu'on a passé ensemble.

À tous mes amies, cousins et cousines

À tous les gens qui m'ont fait ce que je suis aujourd'hui et ceux qui n'ont jamais changé.

D.Hadjira

DÉDICACE



Je dédie ce modeste travail :

À mes très chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consacré pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

À ma tante Aicha

Que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

A ma chère sœur Hayat

Pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

A mon cher frère Abed Erahmen

Sans oublier mon binôme *Hadjer* pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet

À tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

A tous ceux que j'aime.

Merci !

Aissou Asma

Tableau de matière

Tableau de matière	page
Liste des figures	a
Liste des tableaux	b
Liste des abbreviations	c
Introduction	1-2

CHAPITRE I

Etude Bibliographique

PARTIE I : Généralités Sur Le Thon Rouge

I. Généralités sur le thon <i>Thunnus thynnus</i> (Linnaeus, 1758)	3
I.1. Classification et taxonomie	4
I.2. Régime alimentaire	4
I.3. Valeur nutritive	4
I.4. Répartition géographique	5
I.5. L'exploitation du thon rouge	6
I.6. Les quotas pêchés aux cotes algériennes ces dernières années du thon rouge	6

Chapitre I :

Partie II : Valorisation des coproduits de poisson

II. Valorisation des co-produits de la mer	8
II.1. Définition	8
II.2. Les voies de valorisation des co-produits marins	9
II.3. Autres possibilités de valorisation des co-produits	10
II.3.1. Hydrolysats	10
II.3.1.1. Hydrolyse enzymatique	11
II.3.1.2. L'Hydrolyse chimique	12
II.4. Composition des hydrolysats	12

II.4.1. La fraction protéique	12
II.4.2. Les autres fractions	12
II.5. Intérêts des hydrolysats de poisson	13
II.5.1. En alimentation animal	13
II.5.2. Intérêts fonctionnels	13
II.6. Les activités antioxydants et anti radicalaires	14
II.7. Les activités biologiques des hydrolysats du poisson	14

CHAPITRE II:

PARTIE I : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel	16
I.1. Matériel biologique ou animal	16
I.2. Matériel enzymatique	16
II.3. Hydrolyse enzymatique	16
II.3.1. principe et but	16
II.3.2. Déroulement de l'hydrolysat	17
II.3.3. Traitement des hydrolysats et Lyophilisation	18
II.4. Pouvoir antioxydant des hydrolysats protéiques obtenus	19
II.4.1. activité anti oxydante total (TAC)	19
II.4.2. le piégeage du radical libre DPPH	20
II.5. Pouvoir antimicrobien des hydrolysats protéiques	21
II.5.1. Le renouvellement et l'enrichissement des souches pathogènes	21
II.5.2. Méthode de diffusion en puits AWDT (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983)	21

CHAPITRE II:

PARTIE II : RESULTAT ET DISCUSSION

III. Identifications des propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques	23
III.1. la capacité anti oxydante total (TAC)	23
III.2. Capacité de récupération des radicaux libres DPPH	24

III.3. Recherche des propriétés antimicrobiennes	25
Conclusion	28
Références bibliographique	
Annexe	

Résumé

Résumé

Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité antioxydant de l'hydrolysate enzymatique issue des coproduits du thon rouge (*Thunnus thynnus*), pêché dans la région de Mostaganem, et cela par deux tests : l'activité antioxydant total (TAC) et le test de piégeage du radical libre DPPH. Ainsi qu'une étude du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion en puits AWDT contre quatre souches bactériennes et deux souches fongiques : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus* et *Candida albicans*.

Dans le test du TAC, l'hydrolysate enzymatique a montré une activité antioxydante considérable, représentée par son absorbance maximale qui est de l'ordre de 139 $\mu\text{mol/mg}$, de même dans le test au DPPH avec une activité antiradicalaire (71,32 %).

Les résultats de l'activité antimicrobienne sont exprimés par le diamètre des zones d'inhibitions qui ont montré une activité antibactérienne et antifongique contre la plupart des souches par une activité inhibitrice considérable vis-à-vis des souches pathogènes testées ; il ressort que : la souche *Aspergillus niger* est la plus sensible vis-à-vis l'hydrolysate avec un diamètre d'inhibition de $21,5 \pm 2,12$ mm. Tandis qu'aucune activité inhibitrice n'a été enregistrée de la part de la souche *Candida albicans* qui apparaît comme la souche la plus résistante.

Les résultats obtenus révèlent un effet antimicrobien et antioxydant important de l'hydrolysate enzymatique et donc ces résultats ont prouvé l'efficacité du pouvoir antimicrobien l'hydrolysate enzymatique contre les germes pathogènes. Aussi, on a pu déceler des propriétés biologiques pour une application thérapeutique.

Mots clés : thon rouge, *Thynnus thynnus*, activité antioxydant et antimicrobienne, Hydrolysate, co-produits, Mostaganem.

Résumé

Abstract

The present work aims to evaluate the antioxidant activity of the enzymatic hydrolyzate obtained from the bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) co-products, fished in the region of Mostaganem, and this by two tests: the total antioxidant activity (TAC) and the DPPH free radical scavenging test. As well as a study of antimicrobial potency by AWDT well diffusion method against four bacterial strains and two fungal strains: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus* et *Candida albicans*.

In the TAC test, the enzymatic hydrolyzate showed a considerable antioxidant activity exhibited by its maximum absorbance which is of the order of 139 $\mu\text{mol} / \text{mg}$, likewise in the DPPH test with an antiradical activity (71.32%).

The results of the antimicrobial activity are expressed by the diameter of the zones of inhibition which showed an antibacterial and antifungal activity against the majority of the strains by a considerable inhibitory activity vis-à-vis the pathogenic strains tested, it appears that: the *Aspergillus niger* strain is the most sensitive against the hydrolyzate with an inhibition diameter of 21.5 ± 2.12 mm. While no inhibitory activity was recorded from the *Candida albicans* strain which appears to be the most resistant strain.

The results obtained reveal an important antimicrobial and antioxidant effect of the enzymatic hydrolyzate and thus have proved the effectiveness of the enzymatic hydrolyzate against pathogenic germs which shows that the latter has biological properties for a therapeutic application.

Key words: bluefin tuna, thynnus thunnus, antioxidant and antimicrobial activity, hydrolyzate, co-products, Mostaganem.

ملخص

يهدف العمل الحالي إلى تقييم نشاط مضادات الأكسدة للتحليل المائي للإنزيمات الناتجة من المواد المشتركة لسمك التونة الحمراء (*thynnus thunnus*)، المصطادة في ولاية مستغانم وهذا عن طريق اختبارين: النشاط الكلي للأكسدة (TAC) واختبار الاضطياذ الجذري الحر DPPH. وكذلك دراسة قوة المضادات الميكروبات بواسطة طريقة نشر البئر AWDT ضد أربع سلالات بكتيرية واثنين من سلالات الفطرية: *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*.

في اختبار TAC، التحليل المائي للإنزيمات أظهر نشاط ضد الأكسدة كبيرة والمعبر عنها بقوة الامتصاص القصوى بقيمة 139 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ الذي هو بالمثل في اختبار DPPH مع نشاط مضاد لبكتيريا (71,32%).

نتائج نشاط مضادات الميكروبات يعبر عنها بقطر مناطق التثبيط اللذين اظهروا نشاطاً مضاداً للبكتيريا ومضاداً لفطريات ضد معظم السلالات عن طريق النشاط المثبط الكبير بالنسبة للسلالة الممرضة المختبرة، نجد أنه: السلالة *Aspergillus niger* هي الأكثر حساسية بالنسبة للتحليل المائي مع قطر تثبيط بمقياس $2,12 \pm 21,5$ مم. بينما أنه لم يتم تسجيل أي أحد من الأنشطة التثبيطية للسلالة *Candida albicans* التي تظهر كسلالة الأكثر مقاومة.

النتائج التي تم الحصول عليها تكشف تأثير ضد الميكروبات و ضد الأكسدة معتبر للحلماة الانزيمية وهكذا أثبتنا فعالية الحلماة الانزيمية ضد الجراثيم المسببة للأمراض مما يدل على أن هذا الأخير له خصائص بيولوجية لتطبيق علاجي.

الكلمات المفتاحية: التونة الحمراء، *thynnus thunnus*، نشاط مضاد للأكسدة ومضاد للميكروبات،

التحليل المائي، المواد المشتركة، مستغانم.

Liste des figures

N°	Titre des figures	Page
Figure		
1	Thon rouge (<i>Thunnus thynnus</i>)	03
2	Répartition du thon rouge de l'Atlantique (Menanteau, 2015)	05
3	Quota de thon rouge des côtes algériennes (ministère de l'agriculture, du développement rural et de la pêche; Mai 2019)	07
4	Les produits dérivés des co-produits de poisson (Guerard, 2004)	08
5	Voies de valorisation des co-produits de la mer (IFREMER, 2012)	09
6	schéma de Principe de fabrication des hydrolysats protéiques. (Ifremer, 2012)	11
7	déchets du thon rouge (les coproduits)	16
8	Montage pour l'hydrolyse enzymatique	17
9	Tube à centrifuger contenant les différentes fractions de l'hydrolyse	18
10	La poudre de l'hydrolysats protéique obtenue (surnageant) après lyophilisation	18
11	Réaction de test DPPH	20
12	mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en puits	22
13	Capacité antioxydant totale de hydrolysats à différentes concentrations (mg/ml) ; Hyd.Enz : Hydrolysats enzymatique de thon ; A.Asc : Acide ascorbique	23
14	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH. De hydrolysats à différentes concentrations	24
15	Aspect des zones d'inhibition de la croissance microbienne en présence du l'hydrolysats protéique par la méthode de diffusion en puits	26

Liste des Tableaux

<i>N° tableaux</i>	<i>Titre de tableau</i>	<i>Page</i>
1	Résultats de la diffusion sur agar semi-solide par la méthode des puits AWDT (Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques tests)	25

Liste des abréviations

HCl: Clorure d'hydrogène.

NaOH: Hydroxide sodium.

°C : Degré Celsius.

PH : Potentiel d'hydrogène.

H : Atome d'hydrogène

h : Heure

M : Molarité

Min : Minute

mg : Milligramme

mg /ml : Milligramme/ Millilitre

ml : Millilitre

mM : Milimolarié

OH : Groupe hydroxyle

% : Pourcentage

µg : Microgramme

L : Litres.

F.A.O. : Food and Agriculture Organisation (Organisation des nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture).

N : Normalité.

AWDT : Agar Well Diffusion Test.

BHI : Brain Heart Infusion

H₂SO₄ : Acide Sulfurique.

LB: milieu Luria-Bertani

V : Volume.

CICTA : La Commission internationale pour la conservation des thonidés de l'Atlantique

TAC : le Total autorisé de capture

Introduction

Introduction générale

Introduction

Le thon est une des espèces marines les plus importantes économiquement. En Méditerranée, la pêche au thon rouge est sous haute surveillance ; Les quotas autorisés dans la pêche au thon ont été augmentés et il a été affecté en année 2017 un quota de 2 000 t pour la Méditerranée. ce qui génère une quantité importante de déchets estimée à 50% du volume total du poisson. Malgré leurs qualités intrinsèques, comme par exemple une grande richesse en protéines, très souvent ; ces déchets ne font l'objet d'aucun traitement spécifique et sont directement rejetés dans l'environnement, entraînant des problèmes de contaminations.

Les coproduits désignent les sous-produits, les captures accessoires, les rejets, les invendus., représentaient généralement par les poissons ou parties de poissons (crustacés - céphalopodes) non consommés classiquement (peau, arrête, tête, viscères) mais récupérables et utilisés après traitement. Ils proviennent des procédés traditionnels de transformation des produits de la mer comme le filetage, l'éviscération, l'étêtage, le pelage, le lavage, la décongélation ou la cuisson de produits bruts. Ce sont, par exemple, les viscères, branchies, squelettes internes, carapaces ou coquilles...etc. Ils représentent de 30 à 60% de l'animal (Ifremer, 2010)

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du «*stress oxydant*», qui se définit par un déséquilibre de la balance entre la formation des radicaux libres à caractère pro oxydants et le système de défense antioxydants. Ces radicaux libres sont une conséquence inévitable dans les organismes aérobies, produits pendant la respiration dans des circonstances quotidiennes normales, en permanence et en faible quantité comme médiateurs tissulaires (Mahadik *et al.*, 2001).

L'objectif principal de ce travail, c'est de valoriser les coproduits de thon rouge *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758), en utilisant la méthode de préparation de l'hydrolyse enzymatique des protéines et d'étudier l'activité antioxydante et antibactérienne de l'hydrolysate protéique obtenue contre des germes pathogènes.

Introduction générale

Ce travail est réparti en deux grandes parties : la première concerne la partie traitant de la recherche bibliographique et la deuxième est consacrée à la partie recherche expérimentale.

- La première partie est divisé en deux volets : le premier est consacré à donner un aperçu générale sur l'espèce étudiée : Thon rouge *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758) et le deuxième concerne la valorisation des co-produits de la mer.

- la deuxième chapitre est représenté par deux parties dont le premier est intitulé matériels et méthodes où les étapes de l'obtention de l'hydrolysate enzymatique sont détaillées ainsi que les protocoles d'évaluation de l'activité antioxydante et de l'activité antimicrobienne de hydrolysate protéique du thon rouge, et le second est consacré aux résultats et discussion.

Et enfin à la fin de ce travail, on présente la conclusion et les références bibliographiques ayant servie à documenté cette thématique.

CHAPITRE I :
Etude
Bibliographique

CHAPITRE I :
PARTIE I : Généralités Sur
Le Thon Rouge

I.1. Généralité sur le thon *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758)

Le thon rouge de l'Atlantique *Thunnus thynnus* (figure 1), appartient à la classe des Actinoptérygiens, à l'ordre des Perciformes et à la famille des Scombridés (dont le type est le maquereau), famille relativement abondante de poissons marins pélagiques qui fréquentent les eaux tropicales, subtropicales et tempérées des océans de la planète (Scott et Scott, 1988).

Le thon rouge de l'Atlantique est appelé Atlantic Bluefin Tuna en anglais et Atun rojo en espagnol. Par le passé, cette espèce a aussi porté divers noms scientifiques. D'eux espèces sont maintenant reconnues, le *Thunnus thynnus* pour le thon rouge de l'Atlantique et le *Thunnus orientalis* pour le thon rouge du Pacifique Nord (Scott et Scot, 1988 ; Carpenter, 2002 ; Maguire *et al.*, 2006). Une autre espèce apparentée plus petite, le thon rouge du Sud, *Thunnus maccoyii* (Castelnau, 1872), est présente dans l'océan Austral. Le thon rouge de l'Atlantique est le plus gros des membres de la famille des Scombridés (le plus gros spécimen connu pesait 679 kg et sa longueur à la fourche était de 304 cm) (Scott et Scott, 1988). C'est une espèce pélagique qui nage constamment pour ventiler ses branchies (Fromentin et Powers, 2005). Le thon rouge de l'Atlantique est une espèce au corps fusiforme massif mais éminemment hydrodynamique, qui est un peu comprimé Scott et Scott (1988).



Figure 01 : Thon rouge (*Thnnus thynnus*).

I.1.1. Classification et taxonomie :

Selon Collette *et al.* (2001), le thon rouge est classé comme suit :

Règne : Animalia

Sous-Règne : Eumetazoa

Embranchement : Chordata

Infra-embranchement : Vertebrata

Super-Classe : Gnathostomata

Classe : Actinopterygii

Infra-classe : Teleostei

Ordre : Perciformes

Sous-Ordre : Scombroidei

Famille : Scombridae

Genre : Thunnus

Espèce : thynnus (Linné, 1758)

I.1.2. Régime alimentaire

Comme le font un grand nombre de poissons marins, les larves de thon rouge se nourrissent principalement de petit zooplancton, surtout des copépodes et des nauplii de copépodes (Uotani *et al.* 1990). Comme la plupart des prédateurs, les juvéniles et adultes de thon rouge sont des chasseurs opportunistes, Chase (2002) a cité la présence de plus de 20 espèces de poisson et d'environ 10 espèces d'invertébrés dans l'estomac du thon rouge.

Son régime alimentaire peut également comprendre des méduses et des salpes, ainsi que des espèces démersales et sessiles telles que les poulpes, les crabes et les éponges. En général, les juvéniles s'alimentent surtout de crustacés, de poissons et de céphalopodes, tandis que les adultes se nourrissent principalement de poisson, surtout de hareng, anchois, lançons, sardine, sprat, tassergal et maquereau (Ortiz de Zarate et Cort 1986 ; Eggleston et Bochenek 1990).

I.1.3. Valeur nutritive

Le thon rouge est un poisson gras et l'un des poissons les plus énergétiques (225 cal/100g). Avec la raie et l'anchois, c'est le poisson le plus riche en protéines, excellent pourvoyeur d'acides aminés « essentiels ». Excellent pour la croissance, il apporte du fer en bonne quantité, du magnésium et du calcium.

Ses acides gras, en grande partie des Oméga 3, sont utiles dans la prévention des maladies cardio-vasculaires et de certains cancers. Ces lipides amènent aussi des vitamines A (antioxydant) et D (nécessaire à la fixation du calcium) : 100 g de thon couvrent plus de 50 % du besoin journalier en vitamine D et 30 % en vitamine A.

I.1.4. Répartition géographique

Le thon rouge de l'Atlantique est présent de part et d'autre de l'océan Atlantique, depuis les îles Lofoten, au large de la Norvège septentrionale, jusqu'aux îles Canaries et dans les mers Méditerranée et Noire dans l'est, et depuis Terre-Neuve jusqu'à la mer des Antilles et aux eaux côtières du Venezuela et du Brésil dans l'ouest (figure 2). C'est une espèce surtout pélagique ayant une large répartition géographique et l'un des seuls gros poissons pélagiques qui vit en permanence dans les eaux tempérées de l'Atlantique. Les résultats du marquage électronique (Rooker *et al.*, 2008 ; Block *et al.*, 2009) montrent que le thon rouge de l'Atlantique peut nager dans des eaux à la température très variable (de 3 °C à 30 °C) tout en maintenant une température corporelle interne stable. Les résultats de ce marquage révèlent aussi que le thon rouge de l'Atlantique plonge fréquemment à des profondeurs allant de 500 m à 1 000 m et n'est pas confiné aux eaux de surface et de subsurface, comme on le croyait auparavant. Les petits thons rouges de l'Atlantique se regroupent en bancs selon la taille, parfois avec des germans (ou thons blancs *Thunnus alalunga*), des thons albacores (*Thunnus albacores*), des thons obèses (*Thunnus obesus*), des bonites à ventre rayé (*Katsuwonus pelamis*) et des auxides (*Auxis thazard*).

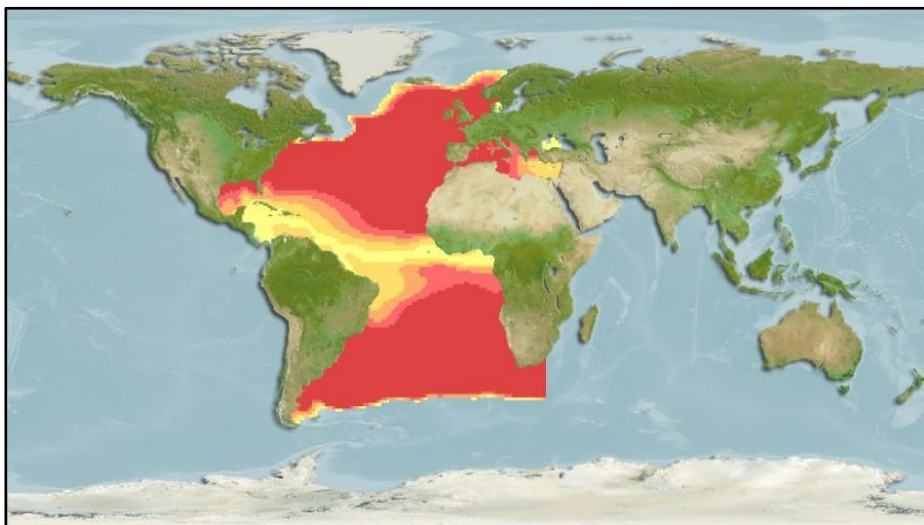


Figure 02: Répartition du thon rouge de l'Atlantique (Menanteau, 2015).

I.1.5. L'exploitation du thon rouge

La pêche excessive effectuée par le passé et encore de nos jours reste la plus grande des menaces qui pèsent sur le thon rouge de l'Atlantique de la population de l'Ouest. La pêche industrielle de ce poisson a commencé dans les années 1950 (population de l'Est) et 1960 (population de l'Ouest). Au cours des 40 dernières années, la pêche a entravé la croissance de la population de l'Ouest. La CICTA évalue et gère les pêches. Un examen récent des résultats obtenus par la CICTA (La Commission internationale pour la conservation des thonidés de l'Atlantique) a conclu que l'objectif de maintien des stocks à des niveaux qui peuvent donner un rendement maximal soutenu n'est pas atteint. Cet examen a été particulièrement critique envers la gestion de la pêche du stock de l'Est (Hurry *et al.*, 2009).

Des recherches montrent clairement que les thons rouges de l'Atlantique de la population de l'Ouest migrent dans une grande partie de l'Atlantique Nord, où ils peuvent être pêchés par des flottilles qui ciblent à la fois la population occidentale et la population orientale. Des quotas sont établis pour ces deux populations, mais il n'est pas possible de distinguer les thons, selon leur population d'appartenance, dans les débarquements. De plus, la sous-déclaration des prises de l'espèce est un problème persistant dans tout l'Atlantique Nord (Maguire, 2011).

L'absence de rétablissement du stock occidental de thons rouges de l'Atlantique est imputable presque entièrement à la pêche excessive, à supposer que les hauts niveaux de recrutement observés dans les années 1970, avant le déclin, puissent de nouveau être atteints si on donnait à la population l'occasion de se reconstituer en réduisant la mortalité due à la pêche. Bien que la pêche dans l'ouest de l'Atlantique, où le TAC (le Total autorisé de capture) de la CICTA est respecté, soit relativement bien réglementée, des thons rouges de la population de l'Ouest sont aussi capturés dans la pêche plus importante et moins bien réglementée de l'est de l'Atlantique (Maguire, 2011).

I.1.5.1. Les quotas du thon rouge pêchés aux côtes algériennes

Le quota de pêche de thon rouge de l'Algérie pour 2018 a été revu à la hausse pour être porté à 1.306 tonnes par la Commission internationale pour la conservation des thonidés de l'Atlantique (CICTA), a indiqué le directeur général de la pêche et de l'aquaculture. Fixé à 1.046 tonnes pour l'année 2017, ce quota a été porté, pour 2018, à 1.306 tonnes.

L'Algérie compte investir localement dans l'engraissement du thon, ce qui augmentera sa valeur marchande. Dans ce contexte, les autorités algériennes avaient proposé à la CICTA la création de trois fermes d'engraissement.

L'Algérie avait bénéficié d'une augmentation graduelle de son quota qui avait été fixé à 243 tonnes au titre de l'année 2014, puis à 370 tonnes en 2015, à 460 tonnes en 2016, soit environ 2% du total admissible de captures (TAC).

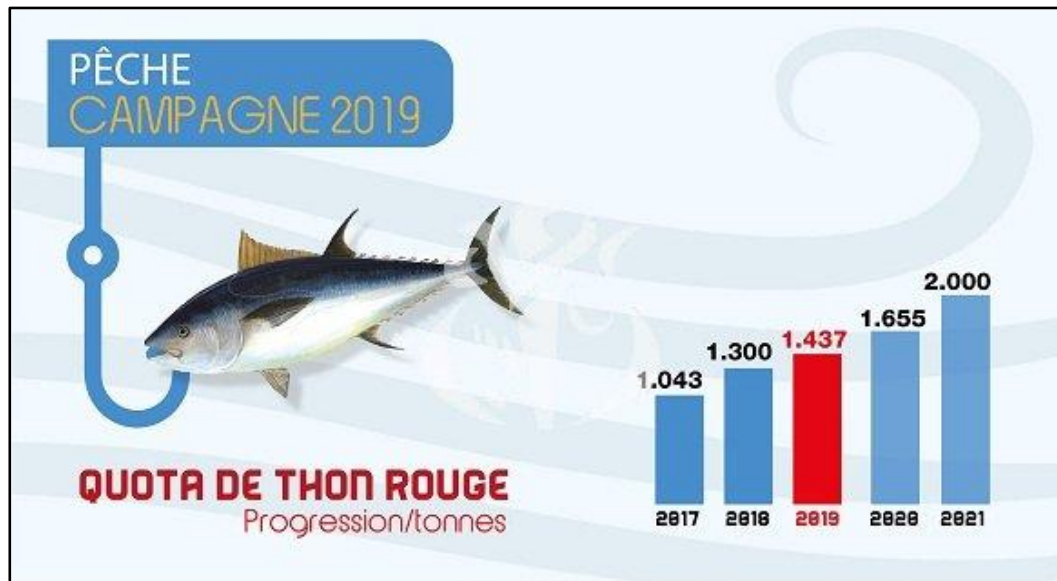


Figure 03: Quota de thon rouge des côtes algériennes (ministère de l'agriculture, du développement rural et de la pêche; Mai 2019)

Chapitre I :

**Partie II : Valorisation des
coproduit de poisson**

I.2. Valorisation des co-produits de la mer

I.2.1. Définition des co-produits de la mer

On utilise comme définition des co-produits, les matières produites au cours des processus de fabrication des produits principaux. Dans le cas de la filière des produits de la mer et d'aquaculture, les co-produits générés sont composés des viscères, des têtes, des arêtes, des chutes de filetage et de la peau.

Ces co-produits sont générés tout au long de la filière : les pêcheurs peuvent par exemple étêter et éviscérer à bord une partie des captures, les halles à marée écartent de la vente le produit impropre à la consommation, les organisations de producteurs gèrent les invendus et enfin les mareyeurs, les préparateurs de plats cuisinés et les détaillants vont découper et préparer le poisson. On parle de déchet lorsqu'aucune voie de valorisation n'existe et que le sous-produit doit être détruit (Andrieux, 2004).

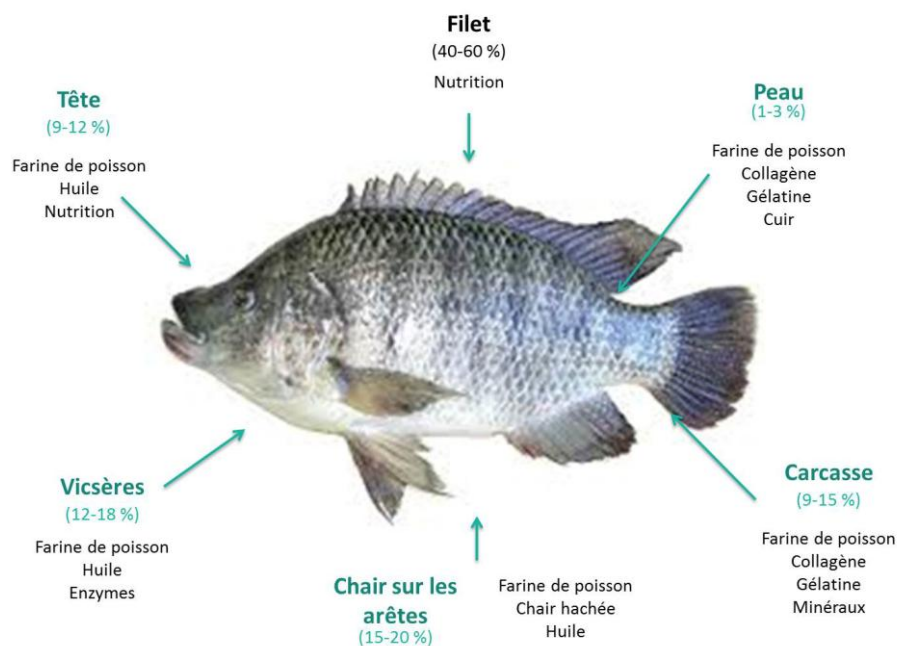


Figure 04: Les produits dérivés des co-produits de poisson (Guerard, 2004)

I.2.2. Les voies de valorisation des co-produits marins

Les co-produits de la mer qui sont valorisés aujourd'hui le sont presque exclusivement sous forme de farine, d'huile ou de hachis pour l'alimentation animale. Cette valorisation qui traite de grandes quantités de co-produits ne dégage qu'une faible valeur ajoutée. On parle de valorisation de « masse ». Il existe beaucoup d'autres solutions de valorisation qui aboutissent à des produits à plus haute valeur marchande. Cependant ce type de valorisation suppose bien souvent des co-produits de meilleures qualités et très spécifiques. On parle ici de valorisation de « niche ». Ces voies ne sont pas exclusives l'une de l'autre. Il est par exemple concevable de combiner valorisations de masse et de niche selon les caractéristiques locales de la collecte et les coûts associés (OFIMER, 2007).

On distingue aujourd'hui quatre principales voies de valorisation :

1. Les sous produits peuvent tout d'abord entrer dans la composition d'aliments pour animaux d'élevage, notamment pour l'aquaculture, très demandeuse, ou domestiques. Ils sont donc valorisés sous forme de farine, d'huile, de hachis ou encore d'hydrolysats.
2. Ils peuvent servir de matière première pour l'industrie chimique, agroalimentaire, plastique, nutraceutique ainsi que pour l'industrie cosmétique et pharmaceutique.
3. Ils peuvent aussi être convertis en énergie par divers procédés comme par exemple la méthanisation ou l'incinération.
4. Enfin, les co-produits peuvent être utilisés en agronomie comme fertilisant, comme compost ou épandus.

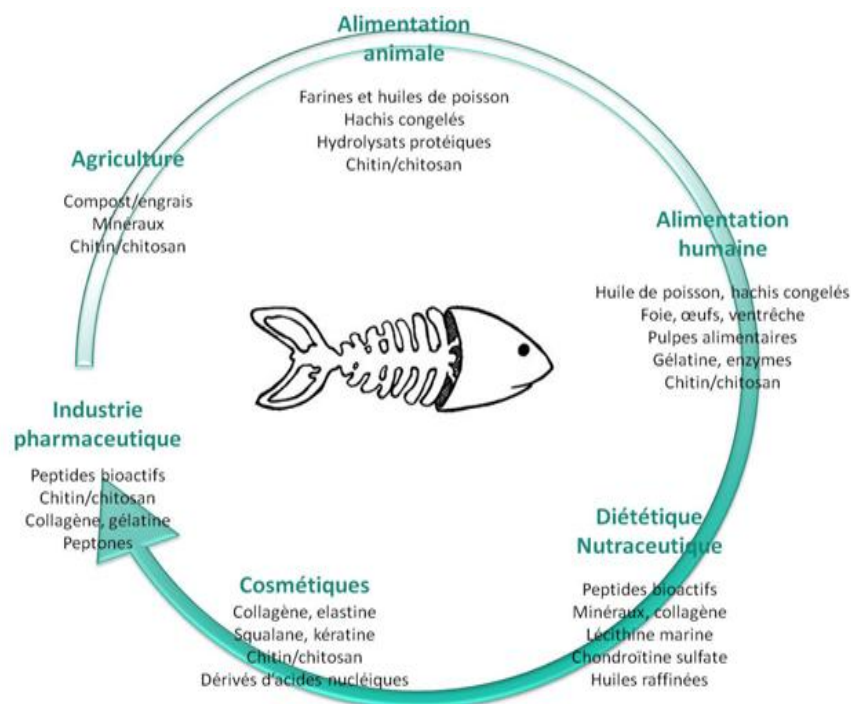


Figure 05: Voies de valorisation des co-produits de la mer (IFREMER, 2012)

I.2.3. Autres possibilités de valorisation des co-produits

Il y a une quantité croissante de co-produits de la chaîne de production de produit de la mer, due à l'augmentation des captures. En effet, de 50000 tonnes en 1965, ces captures sont passées à 450000 tonnes en 2005.

Les co-produits de la mer sont une source importante d'hydrolysats de protéines, de lipides, de nucléotides, de collagène, de gélatine, de chitosane avec des effets bénéfiques de santé positifs, prouvés et potentiels. Les hydrolysats de protéines de poisson peuvent avoir un potentiel en tant que composants bioactifs dans les aliments fonctionnels. Il y a une accumulation de preuves scientifiques que les peptides produits par l'hydrolyse enzymatique possèdent certaines propriétés bioactives (Radier, 2004).

Les hydrolysats de protéines de poisson ont été principalement employés, pour la production animale et aquaculture, comme ingrédients de l'alimentation avec des propriétés fonctionnelles limitées et pour la production des saveurs de produits de la mer. Le traitement systématique des hydrolysats pour la production des peptides bioactifs et l'essai de leur influence dans le règlement de la fonction de l'intestin, de la glycémie, de la pression artérielle, et de la fonction immunitaire, peuvent rapporter des nouveaux composés prometteurs qui peuvent être employés comme aliments fonctionnels (Radier, 2004).

I.2.3.1. Hydrolysats

A l'heure actuelle, des quantités considérables de matériel protéique sont perdues par les industries de transformation du poisson qui ne valorisent guère leurs co-produits ou déchets. Les hydrolysats sont le résultat de la digestion partielle des protéines par hydrolyse protéolytique de poissons entiers ou de co-produits. L'hydrolyse des protéines est donc une des voies privilégiées de la valorisation de ces co-produits mais pour cela il convient d'adopter une stratégie de récupération de ces protéines présentes afin de pouvoir les utiliser ultérieurement en nutrition humaine ou animale.

Les hydrolysats sont des fractions à teneur protéique élevée obtenues soit par autolyse (uniquement sous l'action d'enzymes endogènes) soit par hétérolyse (avec addition d'enzymes exogènes). Une fois séchés, ces hydrolysats ont un aspect identique à celui des farines (Dumay, 2006 ; Nguyen, 2009). L'hydrolyse est l'une des techniques les plus efficaces utilisées pour produire des peptides bioactifs (Abdelhedi, 2016).

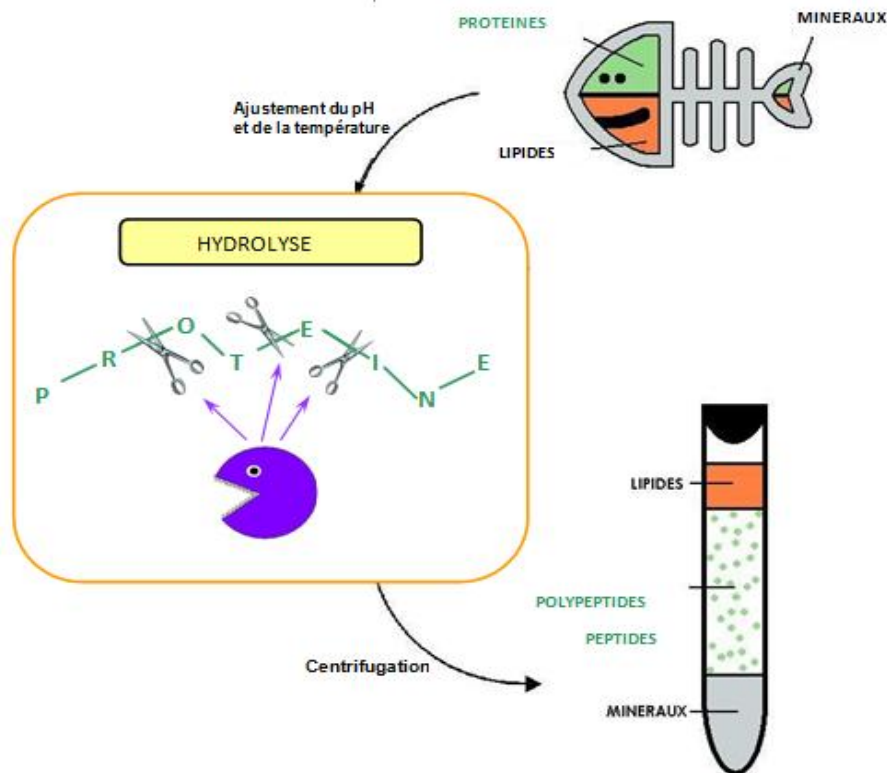


Figure 06: Schéma de Principe de fabrication des hydrolysats protéiques. (Ifremer, 2012)

I.2.3.1.1. Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique est une réaction chimique, catalysée par des enzymes du type hydrolase, au cours de laquelle intervient obligatoirement une molécule d'eau et qui aboutit à la scission d'un composé.

L'hydrolyse d'une substance est sa décomposition par l'eau, grâce aux ions H^+ et OH^- provenant de la dissociation de l'eau. L'hydrolyse est moins connue que sa réaction inverse : l'estérification qui est bien plus intéressante d'un point de vue industriel, alors que l'hydrolyse ne produit que des acides et des alcools. Pour des substances organiques telles que les protéines, une hydrolyse équivaut à la coupure des liaisons peptidiques entre les différents acides aminés qui les constituent. Les acides aminés sont coupés par les enzymes. Les protéines hydrolysées sont utilisées pour conférer, à des aliments, des propriétés nutritionnelles ou fonctionnelles particulières (Ravallec-Plé, 2000).

I.2.3.1.2. L'Hydrolyse chimique

L'hydrolyse chimique est la plus ancienne et peut être conduite en milieu acide (HCl ou H₂SO₄) ou en milieu alcalin (NaOH) dans des hautes températures de l'ordre de 100°C et des fortes concentrations de soude ou d'acide. La production du chlorure de sodium pendant l'hydrolyse acide, contribue à la conservation du produit. Cependant, cette hydrolyse à l'inconvénient de décomposer partiellement certains acides aminés et de détruire complètement le tryptophane. Alors que, l'hydrolyse alcaline provoque la destruction de la cystéine, la cystine, l'arginine et la méthionine. Il sera donc nécessaire de supplémenter l'hydrolysats chimique par des acides aminés (Nguyen, 2009).

I.2.4. Composition des hydrolysats

I.2.4.1. La fraction protéique

Les hydrolysats de co-produits d'origine aquatique sont riches en protéines. Ils contiennent en moyenne 60 à 90% de protéines et sont donc plus riches que les farines de poisson. La composition en protéines dépend directement des organes utilisés pour l'hydrolyse. Par exemple, la peau est connue pour générer beaucoup de peptides de collagène et de gélatine (Choi *et al.*, 2009).

I.2.4.2. Les autres fractions

Les hydrolysats sont pauvres en lipides car cette fraction est éliminée par centrifugation en même temps que les protéines insolubles. Ils contiennent en général moins de 5% de lipides. Néanmoins, certains auteurs rapportent des taux en lipides bien plus importants dans certains hydrolysats, allant jusqu'à 50% (Yin *et al.*, 2010).

Les hydrolysats contiennent également une fraction azotée composée des molécules non protéiques, de faible masse moléculaire et soluble dans l'eau. Il s'agit des acides aminés libres, des nucléotides ainsi que leurs dérivés, comme la créatinine, l'oxyde de triméthylamine et l'ammoniac. Enfin, la fraction minérale représente entre 0,45 et 26% (Nilsang *et al.*, 2005 ; Bhaskar et Mahendrakar, 2008).

I.2.5. Intérêts des hydrolysats de poisson

I.2.5.1. En alimentation animale

Les hydrolysats de poisson sont utilisés comme substitut du lait pour les bovins, les ovins et les porcins. En comparaison avec la caséine, les animaux nourris avec les hydrolysats de

poisson gras, après un début de croissance plus lent, arrivent au même poids au bout de quelques semaines (Orskov *et al.*, 1982; Ritchie *et al.*, 1982). De plus, une étude économique a montré les intérêts des peptides de poisson en tant que substituts du lait (Merritt, 1982) pour le bétail adulte, l'ensilage obtenu à partir d'herbe peut être également remplacé par des hydrolysats de poisson (Ouellet *et al.*, 1997).

Mais c'est dans le domaine de l'aquaculture que ces hydrolysats sont les plus valorisés. En effet, en aquaculture, la charge récurrente la plus importante est la source protéique apportée aux animaux. Les protéines de poisson hydrolysées, en plus de leur faible coût, sont d'une grande digestibilité. De plus, de nombreuses études ont montré que certains hydrolysats de poisson possèdent des propriétés nutraceutiques. Ainsi, le remplacement des farines de poisson par des hydrolysats de poisson augmenterait la croissance des crevettes et des larves de poisson (Cordova-Mureata *et al.*, 2002).

I.2.5.2. Intérêts fonctionnels des hydrolysats de poisson

En plus de leurs qualités nutritionnelles maintenant établies, les propriétés fonctionnelles des hydrolysats de poisson ont été étudiées. En effet, pour pouvoir entrer dans la composition des aliments, les hydrolysats doivent avoir des propriétés particulières, concernant l'hydrophobicité, les facultés d'émulsion (et leur stabilité) ou de formation de mousse, la capacité à retenir l'eau. D'une manière générale, les propriétés fonctionnelles des hydrolysats sont liées aux conditions d'hydrolyse. Ainsi, en contrôlant ces conditions, il est possible d'obtenir les propriétés fonctionnelles voulues, ce qui permettrait de trouver des applications variées dans les domaines alimentaires, comme dans l'élaboration de vinaigrettes ou de saucisses industrielles (Slizyte *et al.*, 2005).

I.2.6. Les activités antioxydants et antiradicalaires

Des peptides ayant des activités antioxydants *in vitro* ont été identifiés dans de nombreux poissons, mollusques et crustacés. Les mécanismes d'action de ces peptides ne sont pas élucidés. Néanmoins, il a été démontré que ces peptides pouvaient agir en tant que piègeurs de radicaux libres, chélateurs de métaux ou bien sur la peroxydation des lipides. On suppose que les acides aminés comme ceux qui sont aromatiques (Phénylalanine, Tyrosine, Tryptophane), l'histidine avec son noyau aromatique et les acides aminés avec une fonction thiol (Cystéine) peuvent agir en tant que donneurs de protons (Mendis & al., 2005).

Des chercheurs ont montré que le traitement enzymatique de peaux ou de craquasses du poisson fournit également divers peptides antioxydants, d'autres de ces peptides ayant par ailleurs été isolés à partir de jus de cuisson de thon ou de sauces fermentées de poissons ou de moules (Wu & al., 2008).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un électron non-apparié (célibataire) sur leur couche orbitale externe. Ils sont susceptibles de dégrader par oxydation les molécules biologiques et seraient impliquées dans le vieillissement cellulaire et divers états pathologiques : inflammation, athérosclérose, cancer.

Les radicaux libres peuvent être produits par notre propre organisme au cours de réactions particulières, il s'agit de la voie endogène, comme ils peuvent également avoir une origine exogène liée à notre environnement. Le radical-balayage libre est un mécanisme primaire par lequel les antioxydants empêchant des processus oxydants.

L'analyse de radical balayage de DDPH est une méthode largement répandue pour évaluer la capacité des hydrolysats, de nettoyer les radicaux libres produits du réactif de DDPH. C'est un radical libre stable qui montre l'absorbance maximum à 517nm en éthanol quand le radical de DPPH rencontre un substrat dedans tel qu'un antioxydant, le radical est nettoyé et l'absorbance est réduite (Rajapaks & al., 2005).

I.2.7. Les activités biologiques des hydrolysats du poisson

De nombreux articles portent sur les activités biologiques des peptides issus d'hydrolyses protéolytiques. Les peptides marins ne font pas exception. Des études récentes, telles que celles publiées par Bordenave & al. (2002) ; Kim et Mendis. (2006) et Wang & al. (2013), sur les

Composés marins bioactifs listent les différentes activités des peptides. Ainsi, ces derniers peuvent avoir des effets :

- ❖ Antihypertenseurs ;
- ❖ Anti-thrombotiques ;
- ❖ Immuno-modulateurs ;
- ❖ Antioxydants ;
- ❖ Anticoagulants ;
- ❖ Anti radicalaire.

D'autres études ont été consacrées pour étudier les effets bénéfiques des huiles de poissons, de ce fait, de nombreuses activités biologiques ont été recensées pour ce dernier. Certaines études ont montré des propriétés anti-inflammatoires, dans l'huile de Sardine (Puglia & al., 2005) et de poisson en général (Kim & al., 2006 ; Maroon et Bost, 2006).

CHAPITRE II:
PARTIE I : MATERIEL
ET METHODES

II.1. Matériels et méthode

II.1.1 Matériel biologique ou animal

Le matériel qui a servi à la réalisation de ce travail est constitué par les coproduits du thon rouge (*Thunnus thynnus*) qui ont été achetés du grand marché (poissonnerie) de la ville de Mostaganem. Cette espèce est généralement pêchée dans la zone de l'ouest Algérien, à partir de mois de Mai jusqu'au mois d'Aout. Les coproduits du thon rouge, qui sont constitués principalement par les queues, têtes, peaux et arêtes, sont broyer à l'aide d'un broyeur pour obtenir un mélange bien homogène.

Les co-produits du thon rouge (*T. thynnus*) utilisés lors de cette étude vont être hydrolysés par voie enzymatique.

La réalisation de cette étape a été faite dans le laboratoire pédagogique de l'halieutique.



Figure08 : Les coproduits du thon rouge (*Thunnus thynnus*).

II.1.2. Matériel enzymatique

L'enzyme utilisée au cours de cette étude est donc la Pepsine fournie par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne). Il s'agit d'une endopeptidase extraite de la muqueuse gastrique porcine. Elle porte le numéro enzymatique EC. 3.4.23.1.

II.1.3. Hydrolyse enzymatique

II.1.3.1. principe et but

Le but de cette étude est de déstructurer les matrices par le biais de protéases, de façon à libérer la fraction protéique, en vue de la récupérer pour valorisation ultérieure. Il est donc important de travailler dans des conditions précises et contrôlées de température (40°C) et de pH adaptées à l'enzyme utilisée (pH = 2). C'est pourquoi la température et le pH sont

contrôlés tout au long de l'expérience à l'aide du pH-mètre et un thermomètre.

II.1.3.2. Déroulement de l'hydrolyse enzymatique

Les coproduits du thon rouge qui sont constitués par les queues, têtes, peaux et arêtes ont été coupé et broyé à l'aide d'un broyeur.

La figure 09 montre le montage de l'appareil pour la réalisation de l'hydrolyse. Dans un bécher contenant un mélange de coproduits et d'eau distillée sont bien mélangé (agitation continue avec un agitateur à hélice pour augmenter la surface d'action de l'enzyme) est mit dans un bain marie (source de chaleur maintenue à 40°C). Lorsque les conditions de l'hydrolyse : 40°C et pH 2 (ajusté avec de l'Acide Chlorhydrique (HCL 2N), 0,5% de Pepsine est ensuite ajouté au mélange. L'hydrolyse dure 4 heures de temps pendant lesquelles le milieu réactionnel est constamment agité et le pH est ajusté à 2 avec de l'HCL 2N.

L'inactiver de l'hydrolyse se réalise en ajoutant de l'hydroxyde de sodium (NaOH 5N) jusqu'à la neutralité du milieu réactionnel.

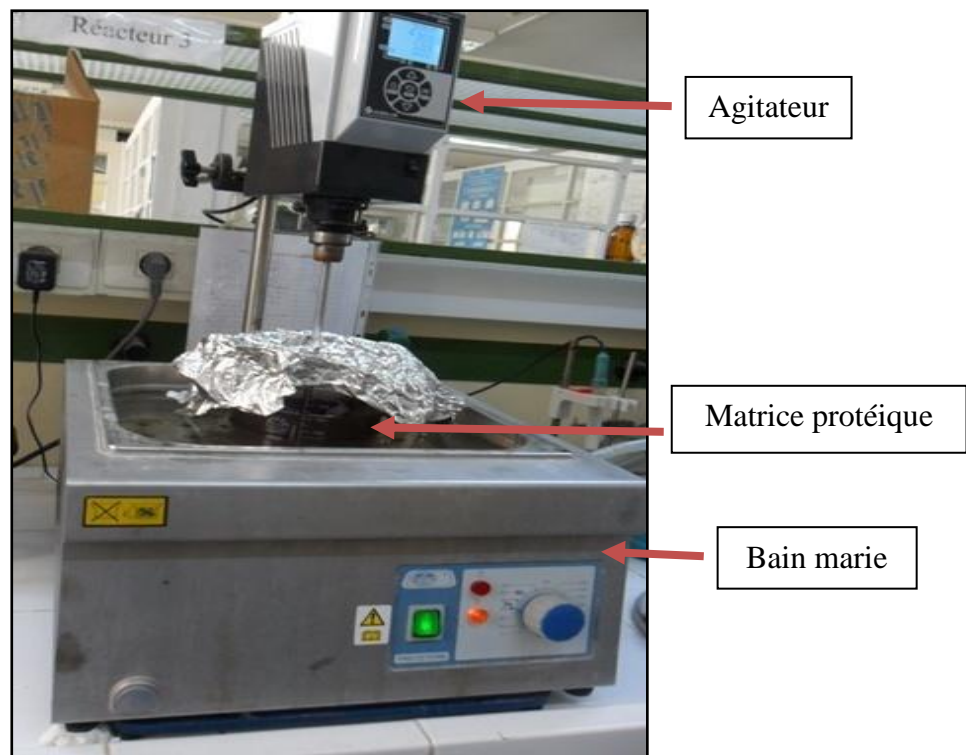


Figure09 : Montage pour l'hydrolyse enzymatique.

II.1.3.3. Traitement de l'hydrolysate

Après inactivation de l'enzyme et refroidissement de la préparation, On prélève 160 ml de mélange que l'on partage dans 4 tubes contenant 40 ml chacun. Et on place les tubes dans la centrifugeuse à 4 000 g pendant 20 minutes à 4°C.

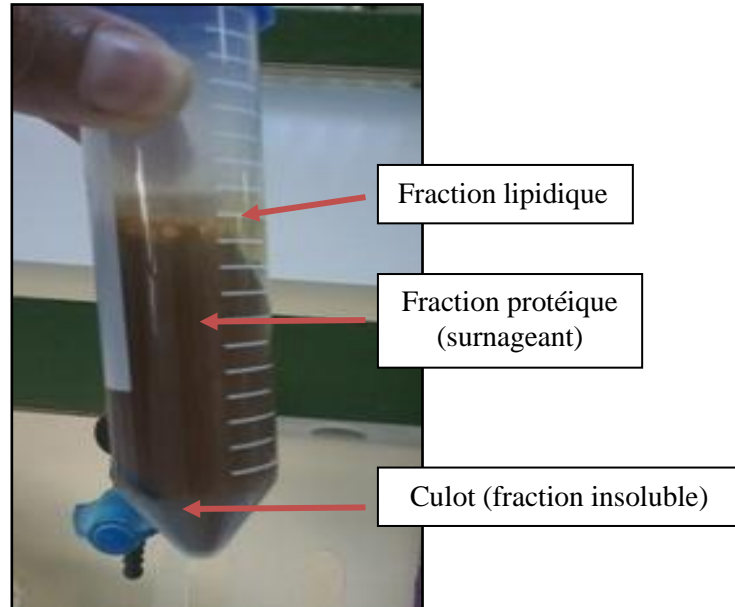


Figure 10: Tube à centrifuger contenant les différentes fractions de l'hydrolyse.

Enfin les deux fractions le surnageant (qui constitue l'hydrolysate protéique) et le culot (coproduits non hydrolysés) sont lyophilisés pendant 2 à 3 jours avec lyophilisateur de type BIOBASE (Freeze Dryer Bk-Fd10s. shandong). Les deux fractions lyophilisées sont ensuite broyées et conservées à -20°C dans des flacons.



Figure 11: La poudre de l'hydrolysate protéique obtenue (surnageant) après lyophilisation.

II.1.4. Pouvoir antioxydant des hydrolysats protéiques obtenus

L'activité antioxydante de l'hydrolysats a été évaluée par 2 tests *in vitro*, à savoir : la capacité antioxydante totale TAC et l'activité de piégeage des radicaux DPPH.

II.1.4.1. la capacité anti oxydante total (TAC) :

La capacité antioxydant totale (TAC) de l'hydrolyse est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de Prieto *et al* (1999). Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO^{2+} en présence de l'hydrolyse pour former un complexe vert de phosphate / Mo(V) à pH acide. La solution réactif qui a été préparé, contient les solutions suivantes : 1 ml d'acide sulfurique dilué dans 20ml l'eau distillée ; 0,1 g de molybdate d'ammonium dans 20 ml l'eau distillée et 0,08 g de phosphate de sodium dans 20 ml l'eau distillée. Ensuite, la solution mère qui contient 10 mg / 1 ml (hydrolysats enzymatique / l'eau distillée) a été préparé et des dilutions ont été préparées.

La capacité antioxydant totale (TAC) des hydrolysats protéiques du thon est évaluée par la méthode de phosphomolybdène (Prieto *et al.*, 1999 ; Dhinakaran et Gomathi, 2017; Hamdi *et al.*, 2018). Un volume de 0,1 ml de la solution d'hydrolysats protéique à différentes concentrations (0,5 à 10 mg/ml) a été mélangé avec 1 ml de solution du réactif. Ensuite, les eppendorfs ont été incubés à 90 °C dans un bain marie pendant 1 h et 30 min. Après refroidissement pendant 10 min, l'absorbance des solutions a été mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 1 ml de la solution du réactif et 0,1 ml d'eau distillée, puis il a été incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif. Les expériences sont répétées 3 fois.

L'activité antioxydant totale a été évaluée en tant qu'équivalents de α -tocophérol par l'équation linéaire suivante:

$$A = 0,011 C + 0,0049 ; R^2 = 0,987$$

Où *A* est l'absorbance à 695 nm et *C* la concentration en équivalents α -tocopherol ($\mu\text{mol/ml}$).

II.1.4.2. Le test de piégeage du radical libre DPPH

Le test DPPH permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire de molécules pures ou d'extraits dans un système modèle (solvant organique, température ambiante). Il mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le radical chimique DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d'un hydrogène. Le DPPH, initialement violet, se transforme en DPPH-H, jaune pâle (Fig. 11) (Berset C., 2006).

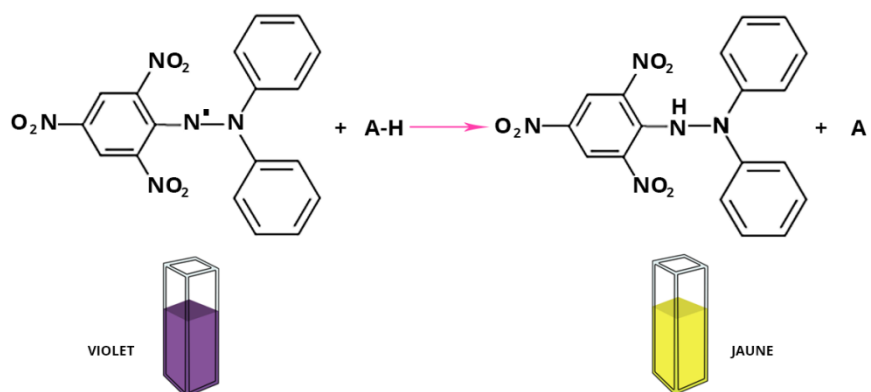


Figure 12: Réaction du test DPPH

L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par (Lopes-Lutz *et al.*, 2008). Une solution de DPPH a été préparée à 2% dans de l'éthanol, et la solution de l'hydrolysate protéique a été préparée à 10mg/ml dans de l'eau distillée.

Un volume de 500 μL d'hydrolysate protéique à différentes concentrations (0,5 à 10 mg/mL) a été ajouté à 375 μL d'éthanol absolu et 125 μL de DPPH éthanolique. Le mélange a été laissé reposer à température ambiante et dans l'obscurité pendant 60 min. L'absorbance (A) a été mesurée à 517 nm par un spectrophotomètre (JENWAY/ BUYNOW/ 6715B0), contre un blanc de contrôle qui contient 500 μL d'eau distillée à la place de l'échantillon, puis il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. L'acide ascorbique a été utilisé comme témoin positif. La capacité de piégeage des radicaux DPPH a été calculée comme suite :

$$\% \text{ d'inhibition des radicaux libres} = [1 - (\text{Abs échantillon} / \text{Abs témoin})] \times 100$$

II.1.5. Pouvoir antimicrobien des hydrolysats protéiques

Cette étude a été réalisée par la Méthode de diffusion en puits AWDT (Agar Well Diffusion Test), méthode de Barefoot et Kaenhammer (1983). Dans ce test, le but était d'étudier l'activité antimicrobienne. Quatre souches bactériennes ont été testées : (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579) et deux souches fongiques : (levure : *Candida albicans* et un champignon : *Aspergillus niger*).

II.1.5.1. Le renouvellement et l'enrichissement des souches pathogènes

Les cultures des souches pathogènes sont réalisées à partir de souches stockées à -20°C dans glycérol. Le renouvellement et l'enrichissement est effectuée par ensemencement des souches pathogène dans un bouillon de BHI à 37°C pour les souches bactéries et à 30 pour les souches fongiques pendant 18 h.

II.1.5.2. Méthode de diffusion en puits AWDT

Les tests antimicrobiens sont réalisés en milieu gélosé semi solide selon le protocole d'écrit par Barefoot et Kaenhammer (1983). Cette méthode est décrite pour la détection d'activité inhibitrice de la croissance des bactéries, elle est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits.

Méthode des puits a permet de détecter les inhibitions dues à l'hydrolysat solubilisée dans de l'eau distillée dans deux différents milieux de culture l'un et LB et l'autre une gélose à l'extrait de malt. Des boites de Pétri ont été coulées avec les deux milieux de cultures, après les suspensions de culture des souches bactériennes ont été bien étalées (1 mL) sur une gélose solidifiée Luria-Bertani (LB) et les souches fongiques ont été étalées sur une gélose à l'extrait de malt. Après 10 min de repos dans une zone stérile pour que la gélose absorbe la solution bactérienne, quatre puits sont creusés à l'aide d'un embout jaune stérile dans chaque boite gélosée.

Ensuite, Un volume de 80 µl de solution d'hydrolysat (de 1g/ml de concentration) est mis dans chaque puits. Un puit a été laissé sert comme témoin négatif. Les boîtes de Pétri sont incubées à 4°C pendant 60 min pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne, et ensuite incubées à 37°C pendant 24 h pour les souches bactériennes et à 30 °C pendant 2 jours pour les souches fongiques. La présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après la durée d'incubation est l'activité

antimicrobienne a été évaluée en déterminant les diamètres (en mm) de ces zones.

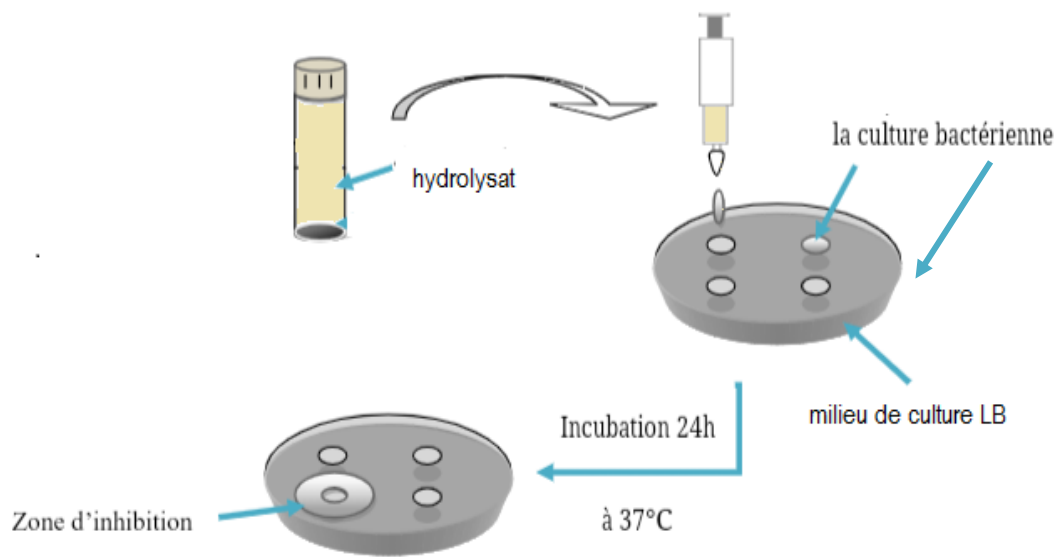


Figure 13: mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en puits.

CHAPITRE II:
PARTIE II : RESULTAT
ET DISCUSSION

II.2. Identifications des propriétés fonctionnelles de l'hydrolysate protéique

II.2.1. la capacité antioxydante totale (TAC)

Les résultats obtenus pour la capacité antioxydante totale de l'hydrolysate protéique du thon sont montrée dans la figure ci-dessous :

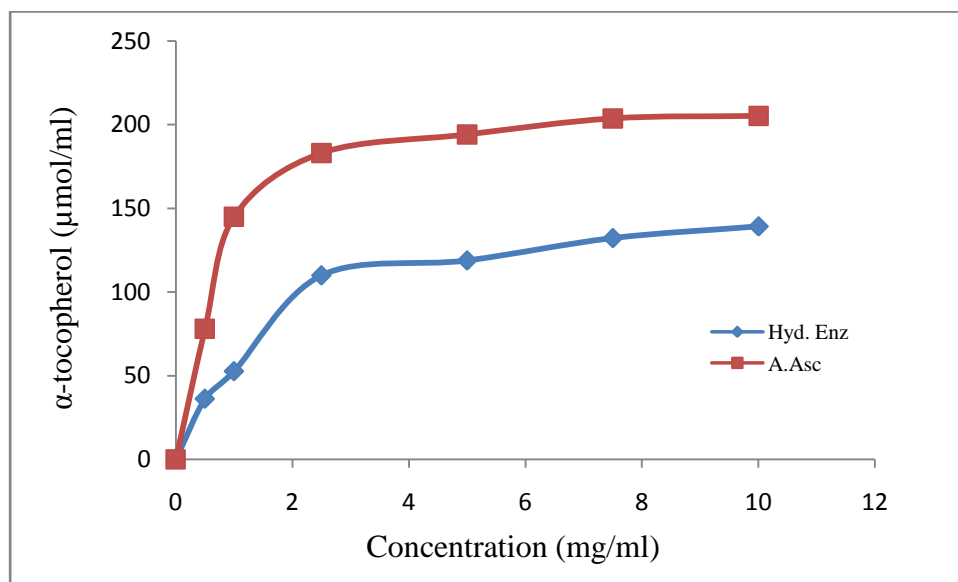


Figure 13 : Capacité antioxydante totale de l'hydrolysate à différentes concentrations (mg/ml) ; Hyd.Enz : Hydrolysate enzymatique de thon ; A.Asc : Acide ascorbique.

Cette figure montre que l'hydrolysate enzymatique de thon présente une activité antioxydante importante. Elle est proportionnelle aux absorbances qui, selon le graphique, augmente en fonction de la concentration. L'acide ascorbique possède une capacité antioxydante très importante représentée par son absorbance maximale de 205 μmol/mg, obtenue pour une concentration de 10 mg/ml. Tandis que, l'hydrolysate protéique du thon révèle une activité inférieure montrée par une absorbance maximale de 139 μmol/mg à la même concentration.

Comparant ces résultats, il est à suggérer que l'hydrolysate protéique a une capacité antioxydante considérable mais reste faible par rapport au standard (l'Acide ascorbique).

II.2.2. Capacité de récupération des radicaux libres DPPH

Le graphe ci-dessous représente la variation du pourcentage du pouvoir piégeage des radicaux libres (DPPH) en fonction de la concentration (mg/ml) :

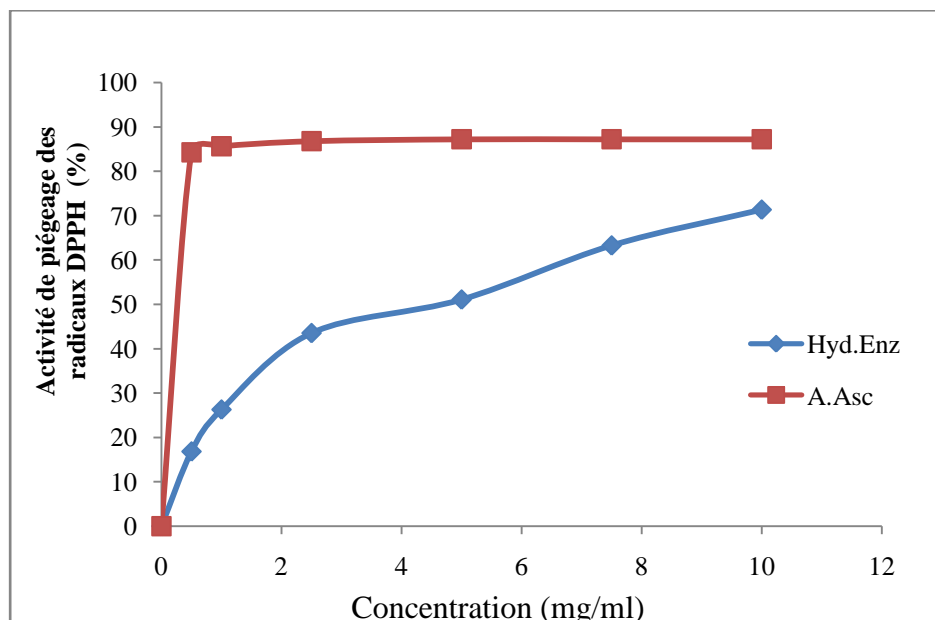


Figure 14: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH de l'hydrolysats à différentes concentrations.

Hyd.Enz : Hydrolysats enzymatique de thon ; A.Asc : Acide ascorbique.

Selon les résultats montrés dans la figure 14, l'hydrolysats enzymatique du thon présente une bonne capacité de piégeage des radicaux de manière dépendante de la concentration.

Le pourcentage maximal enregistré pour les deux graphes de l'hydrolysats et de l'acide ascorbique à 10 mg/ml de concentration est de l'ordre de 71,32 % et 87,18 % respectivement.

Ces résultats sont en accord avec les travaux rapportés par Lassoued et al. (2015) et Nasri et al. (2014) montrant que l'activité antioxydant augmentait avec la concentration, avec une concentration 5 mg/ml Ces auteurs rapportent la capacité de piégeage des radicaux maximum de 15 % ; Alors nos résultat avec l'hydrolysats de thon rouge a montré la capacité de piégeage des radicaux la plus élevée (71,32 % à 10mg/ml).

Le résultat obtenu indique que l'hydrolysats enzymatique du thon contient certains peptides donneurs d'électrons et qui pouvait réagir avec les radicaux libres pour les convertir en produits plus stables et mettre fin à la réaction en chaîne radicalaire (Wu *et al.*, 2003, Abdelhedi *et al.*, 2016). Cela a été expliqué par De Pooter *et al.* (1986) qui ont démontré que

les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique réduisent et décolorent le DPPH à des concentrations faibles en raison de leur immense capacité à céder l'hydrogène.

II.2.3. Recherche des propriétés antimicrobiennes

Après l'incubation, la présence de zone d'inhibition indique un résultat positif qui est observée autour des puits produisant des antimicrobiens actifs contre les souches bactériennes testées. Le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètre, moyennant une règle graduée. L'absence de zones d'inhibition claires des puits, indique un résultat négatif qui montre que les bactéries (Gram+ et Gram-) et les souches fongiques sont résistantes à la molécule qui est l'hydrolysate. Plus cette zone est grande, plus l'activité antimicrobienne est importante.

Pour l'évaluation du potentiel antimicrobien de l'hydrolysate, on a préféré de les tester contre plusieurs cibles, car chacune d'elles possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier. Les résultats trouvés sont présentés dans le tableau ci-dessous:

Tableau 01: Résultats de la diffusion sur agar semi-solide par la méthode des puits AWDT (Les résultats de l'activité antimicrobienne vis-à-vis des souches bactériennes et fongiques tests).

Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
activité bactérienne	
<i>Escherichia coli</i>	15 ± 3,53
<i>Pseudomonas sp</i>	7,5 ± 3,54
<i>Bacillus cereus</i>	13 ± 1,41
<i>Staphylococcus aureus</i>	19 ± 2,83
Activité fongique	
<i>Aspergillus niger</i>	21,5 ± 2,12
<i>Candida albicans</i>	--

Selon Barros et al. (2007) :

- ❖ Diamètre inférieurs à 7 mm, aucune activité antimicrobienne.
- ❖ Diamètre de 7 à 9,9 mm, activité antimicrobienne faible.
- ❖ Diamètre de 10 à 11,9, activité antimicrobienne modeste.
- ❖ Diamètre de 12 à 15, activité antimicrobienne élevée.

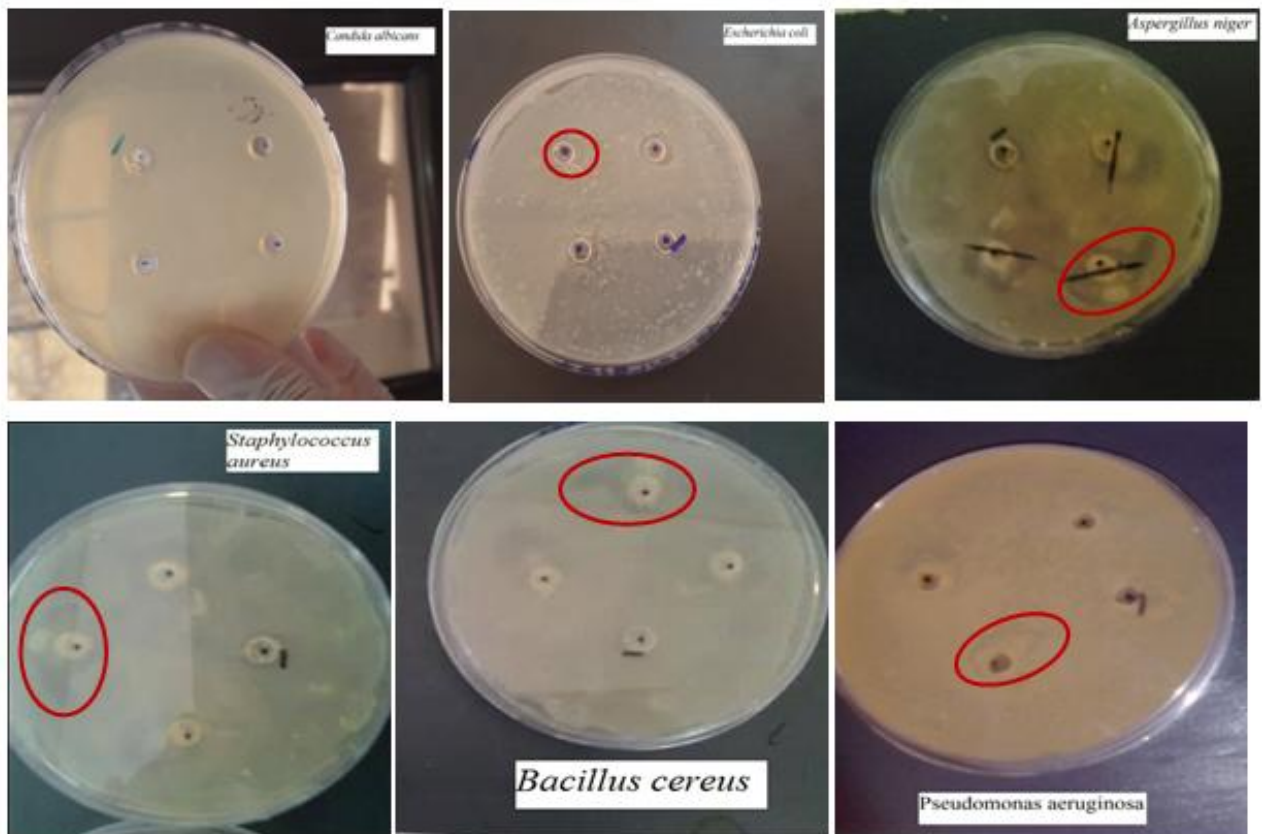


Figure 15: Aspect des zones d'inhibition de la croissance microbienne en présence du l'hydrolysate protéique par la méthode de diffusion en puits

Les résultats sur les propriétés antimicrobiennes dans ce test, présenté dans le tableau 01, ont montré que l'hydrolysate enzymatique du thon a une influence inhibitrice différente sur les souches bactériennes et fongiques, en plus de ça, il semble que les bactéries à Gram positif ont été plus sensibles que celles à Gram négatif. Dans l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que : la souche *Aspergillus niger* est la plus sensible vis-à-vis de l'hydrolysate (activité antimicrobienne forte). Tandis que la souche *Candida albicans* apparaisse comme la souche la plus résistante.

L'hydrolysate a montré des diamètres d'inhibition compris entre $7,5 \pm 3,54$ et $21,5 \pm 2,12$ mm vis-à-vis toutes les souches. L'activité inhibitrice de l'hydrolysate enzymatique la plus élevée était enregistrée avec *Aspergillus niger*, dont on a obtenu un diamètre d'inhibition de $21,5 \pm 2,12$ mm ce qui traduit la forte sensibilité de ce champignon, suivi par la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* qui a enregistré un diamètre d'inhibition de l'ordre de $19 \pm 2,83$ mm. La bactérie *Escherichia coli* a marqué une zone inhibitrice de $15 \pm 3,53$ mm tandis que *Bacillus cereus* a enregistré seulement un diamètre de $13 \pm 1,41$ mm.

Alors que, cette hydrolysats a montrée des diamètres inhibitrices vis-à-vis *Pseudomonas sp* avec un diamètre d'inhibition de l'ordre de $7,5 \pm 3,54$ mm qui été le plus faible, ce qui traduit la forte résistance de cette bactérie, alors qu'aucune activité inhibitrice n'a été enregistrée de la part de souche *Candida albicans* qui apparaisse comme la souche la plus résistantes.

Notre résultats sont comparer avec Les travaux réalisés sur les co-produits de crevette *P. monodon* (Ruttanapornvareesakul, 2006), ont démontré que les hydrolysats obtenus par hydrolyse pepsique ont des activités antimicrobiennes similaires à nos travaux, notamment contre la bactérie *Staphylococcus aureus*. L'étude réalisée par Jemil et al., (2014) sur l'activité antibactérienne de quelques espèces marines : Sardinelle (*Sardinella aurita*), blennie zébrée (*Salaria basilisca*), gobie (*Zosterisessor Ophiocephalus*) et raie (*Dasyatis pastinaca*), était à l'opposé de nos résultats. Ces auteurs rapportent que les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes que les bactéries à Gram positif, sauf pour *E. coli*, qui a présenté une similarité inhibitrice (de 10 à 16 mm). (Jemil et al., 2014)

Not résultats montre que l'hydrolysats possède des propriétés très intéressantes. Elle peuvent être considérés comme un agent de conservation naturel contre les agents pathogènes d'origine alimentaire dans l'industrie de la production alimentaire (Jemil et al., 2014). Par conséquent et selon les résultats, l'hydrolysats protéique peut présenter des propriétés non seulement nutritionnelles, mais aussi biologiques pour une application thérapeutique (Abdelhedi et al., 2016).

Conclusion

Conclusion

L'ensemble des essais réalisés au cours de ce travail permet de conclure que l'hydrolysat protéique obtenu par voie enzymatique présente un grand intérêt dans une vaste gamme d'applications industrielles. Notre étude a porté sur l'évaluation de son pouvoir antimicrobien, et de son pouvoir antifongique et même son pouvoir antioxydant.

Les trois principaux objectifs poursuivis dans ce travail ont été atteints : Le premier objectif était de valoriser les co-produits du thon rouge, et comment fabriquer hydrolysat enzymatique. Le deuxième objectif reposait sur la détermination du pouvoir antimicrobien de l'hydrolysat contre les souches pathogène par la méthode de diffusion en puits AWDT. L'activité inhibitrice de l'hydrolysat protéique la plus élevée était enregistrée avec *Aspergillus niger* avec un diamètre d'inhibition de $21,5 \pm 2,12$ mm ce qui signifie, que cet champignon est le plus sensible, alors que la plus faible a été noté avec *Pseudomonas sp* avec un diamètre de $7,5 \pm 3,54$ mm ce qui traduit la forte résistance de cette bactérie. Tandis qu'aucune activité inhibitrice n'a été enregistrée de la part de la souche *Candida albicans* qui apparaisse comme la souche la plus résistantes. Ce résultat montre une activité antimicrobienne considérable.

Le troisième objectif qu'était basée sur la détermination du pouvoir antioxydant de hydrolysat, nous avons établi deux tests en fonction des concentrations croissantes en comparant avec l'acide ascorbique. Les résultats obtenus a permet de conclure que l'hydrolysat protéique ont des activités antioxydants mais reste faible devant l'activité de l'acide ascorbique.

L'ensemble de ces résultats montre l'intérêt de l'hydrolysat, celui-ci présente un pouvoir antimicrobien, antifongique et antioxydant assez attirant. A cet effet nous préconisons d'exploiter les propriétés de l'hydrolysat protéique du thon rouge dans le domaine médical, pharmaceutique, cosmétique et même dans le domaine de la nutrition.

Références bibliographiques

-A-

Abdelhedi O., Jridi M., Jemil I., Mora L., Toldrá F., Boualga A., Nasri M., Nasri R., 2016. Concepción Aristoy, Combined biocatalytic conversion of smooth hound viscera: Protein hydrolysates elaboration and assessment of their antioxidant, anti-ACE and antibacterial activities. *Food Research International*, 8:9-23.

Andrieux G. (2004). La filière française des coproduits de la pêche et de l'aquaculture : Etat des lieux et analyse. *DESS exploitation des ressources vivantes côtières*, université de Caen, 64 p.

-B-

Barefoot S. F., Klaenhammer T. R., 1983. Detection and activity of lacticin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(6) : 1808-1815.

Barros L., Calhelha R.C., Vaz J.A., Ferreira I.C.F.R., Baptista P., Estevinho L.M., 2007. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research and Technology*, 225(2): 151-156.

Berghe V. A., Vlieinck A. J., 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Method for Plant Biochemistry*, 6: 47-68.

Berset C., 2006. Antioxydants phénoliques. Structures, propriétés, sources végétales. *In Les polyphénols en agroalimentaire*. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, p. 265-294.

Broadasky T.F., Lewis C., Eble T.E., 1976. Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J.Chromatogr.*, 123: 33-44.

-C-

Castelnau, F.L. 1872. Contribution to the ichthyology of Australia. *Proc. Zool. Acclim. Soc. Vict.*, 1:29-247

Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem.*, **40**: 2021-33.

CHASE, B. C. 2002. Differences in diet of Atlantic tuna (*Thunnus thynnus*) at five seasonal

Références Bibliographiques

feeding grounds of the New England continental shelf. *Fishery Bulletin* 100: 168-180.

Choi, Y. J., Hur, S., Choi, B.-D., Konno, K. et Park, J. W. (2009). Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. *Journal of Food Science*, 74(1):C17 {C24.

-D-

De Pooter H L & Schamp N. (1986). Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In : *Progress in essential oil research*. Edition E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin. P: 139,150.

Dumay J., 2006. Extraction de lipides en voie aqueuse par bioreacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration: Application à la valorisation de co-produits de poisson (*Sardina pilchardus*). *Thèse de doctorat de l'Université de Nantes*. 305 pp.

-E-

EGGLESTON, D. B. and E. A. Bochenek. 1990. Stomach contents and parasite infestation of school bluefin tuna *Thunnus thynnus* collected from the Middle Atlantic Bight, Virginia. *Fisheries Bulletin* 88: 389-395.

Ennaas N., Hammami R., Beaulieu L., Fliss I., 2015. Purification and characterization of four antibacterial peptides from protamex hydrolysate of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) by-products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 462: 195-200.

-F-

FAO., 2008. Climate change and food security: a framework document. 110pp.

FAO., 2008. Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Département des pêches et de L'aquaculture de la FAO - Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture Rome, 2008, 92 pp.

FAO., 2018. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Résumé. CA0191FR/1/07.18.

Fromentin, J.-M., et Powers, J.E. 2005. Atlantic bluefin tuna: population dynamics, ecology, fisheries and management. *Fish and Fisheries* 6, 281-306.

-H-

Hoyle N.T., Merritt J.H. (1994) - Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Food Sci.*59(1): 76-9.

Hurry, G., Hayashi, M et Maguire, J.-J. 2009. Rapport de l'évaluation indépendante des performances de l'ICCAT.

-J-

Jemil I., Jridia M., Nasri R., Ktaria N., Ben Slama R., Mehrib M., Hajjia M., Nasri M., 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of proteinhydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis*A26. *Process Biochemistry*, 49 : 963–972.

J.H., 1982 Assessment of the production costs of fish protein hydrolysates. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1: 147-51.

-L-

Lassoued I., Mora L., Nasri R., Aydi M., Toldrá F., Aristoy M. C., Nasri, M., 2015.

Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. *Journal of Proteomics*, 128:458-68.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.007>.

Lopes-Lutz D., Alviano S.D., Alviano C.S., Kolodziejczyk P.P., 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69 :1732-1738.

-M-

Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S. 2006. Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de Fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 7(1): 3-8.

Maguire, J.-J., Sissenwine, M., Csirke, J., Grainger, R. et Garcia, S. 2006. The state of world highly migratory, straddling and other high seas fishery resources and associated species. FAO Fisheries Technical Paper. No. 495. Rome FAO. 84 p.

Références Bibliographiques

Mahadik, S. P., Evans, D., & Lal, H. (2001). Oxidative stress and role of antioxidant and ω -3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Progress in Neuro Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(3), 463-493.

-N-

Nasri R., Jridi M., Lassoued I., Jemil I., Ben Slama-Ben Salem R., Nasri M., Karra-Châabouni M., 2014. The influence of the extent of enzymatic hydrolysis on antioxidative properties and ACE-inhibitory activities of protein hydrolysates from goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) muscle. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173: 1121-1134.

Ngo D.N., Lee S.H., Kim M.M., Kim S.K., 2009. Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in RAW 264.7 cells. *Journal of Functional Foods*, 1: 188-198.

-O-

OFIMER (2007). La filière française des co-produits de la pêche et de l'aquaculture : Situation et perspectives in 4ème symposium Santé Mer. OFIMER. 14 p.

ORSKOV E.R.; SOLIMAN H. S. et CLARK C. F. S., 1982 Use of fish protein hydrolysate in milk replacers. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 7: 135

OUELLET D.R.; SEOANE J. R.; VEIRA D. M. et PROULX J. G., 1997 Effects of supplementation with fish meal or fish protein hydrolysate on growth, nutrient digestibility and rumen fermentation of growing cattle fed grass silage. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 68: 307-26.

-P-

PETROSYAN, P.; GÁRCIA-VARELA, M.; LUZ-MADRIGAL, A.; HUITRÓN, C.FLORES, M.E. *Streptomyces mexicanus* sp., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v.53, p.269-273, 2003

Prieto P., Pineda M., Aguilar M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269: 337-341.

-R-

RADIER S., 2004 Recherche de voies de valorisation d'effluents d'industrie de transformation des Produits de la pêche. Mémoire maîtrise: Ingénierie en Nutraceutique

RAVALLEC-PLÉ R., 2000. Valorisation d'hydrolysats d'origine marine ; optimisation de la concentration en peptides apparentés aux facteurs de croissance et aux agents sécrétagogues. Thèse Méd Vét: Université de Bretagne Occidentale, 171pp.

Ruttanapornvareesakul Y., Somjit K., Otsuka A., Hara K., Osatomi K., Osako K., Kongpun O., Nozaki Y., 2006. Cryoprotective effects of shrimp head protein hydrolysate on gel forming ability and protein denaturation of lizardfish surimi during frozen storage. *Fisheries Science*, 8: 66-72.

-S-

Scott, W.B., et Scott, M.G. 1988. Atlantic fishes of Canada. Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 219: 731 p.

Shaskar, N. et Mahendrakar, N. (2008). Protein hydrolysate from visceral waste proteins of catla (*Catla catla*) : Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. *Bioresource technology*, 99(10):4105-4111.

ŠLIŽYTE R.; DAUKŠAS E.; FALCH E.; STORRØ I. et RUSTAD T., 2005 MERRITT Soyiri I.N., Tano-Debrah K., Amoa-Awuah W.A. (2003) - Physico-chemical and quality characteristics of fish sauce produced from tuna processing wastes. 2nd International Workshop. Food-based approaches for a healthy nutrition. Ouagadougou, 23-28/11/2003

-U-

UOTANI, I., T. Saito, K. Hiranuma and Y. Nishikawa. 1990. Feeding habit of bluefin tuna *Thunnus thynnus* larvae in the western North Pacific Ocean. *Bulletin of the Japanese Society of Science and Fisheries* 56: 713-717.

-W-

Wu H.C., Chen H.M., Shiau C.Y., 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36: 949-957.

-Y-

- Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T., Terao T., 1989.** HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 62(6):1201-4. DOI: 10.1271/bbb.62.1201.
- Yin, H., Pu, J., Wan, Y., Xiang, B., Bechtel, P. J. et Sathivel, S. (2010).** Rhéologique and fonctional propriétés of catfish skin proten hydrolysates. *Journal of Food science*, 75(1):E11 {E17.

La liste de site internet

Ifremer– Août 2010 – v2 – Fiche réalisée pour Bibliomer <http://www.bibliomer.com/>
<http://www.radioalgerie.dz/news/fr/article/20171129/127207.html>
<https://doi.org/10.1007/s00217-006-0394-x>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.05.013>.
http://www.iccat.int/Documents/Other/PERFORM_REV_TRI_LINGUAL.pdf.
www.wwf.fr

Annexes

Annexes

La composition des milieux de culture utilisés.

➤ **Préparation des Milieux de culture (LB)**

Formule* par 1 litre d'eau purifiée

- peptone10 g
- extrait de levure..... 5g
- Nacl.....5g
- Agar..... 19 g
- pH = 7

➤ **Milieux de culture MALT**

Formule* par 500 ml d'eau purifiée

- Extrait de Malt.....18g
- Agar..... 6 g
- pH=5,5

➤ **Milieu de culture BHI (Brain Heart Infusion)**

Formule* par 1 litre d'eau purifiée

- Infusion cœur-cervele (matières solides) 8,0 g
- Digestion peptique de tissu animal 5,0
- Digestion pancréatique de caséine 16,0
- Chlorure de sodium 5,0
- Glucose 2,0
- Phosphate d'hydrogène disodique 2,5
- Gélose 13,5
- pH 7,4 ± 0,2