



جامعة الحسن الثاني - الدار البيضاء
UNIVERSITE HASSAN II - CASABLANCA

Centre d'Etudes Doctorales
Sciences Fondamentales & Appliquées



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT

Présentée par : **Fatima BELLALI**

En : *Sciences Biologiques*

Spécialité : Biochimie, Biotechnologie et Environnement

Valorisation des coproduits de sardine (*Sardina pilchardus*) des côtes sud atlantiques marocaines: extraction de collagène de type I à partir des écailles

Soutenue publiquement le 11 Juillet 2014

A la *Faculté des Sciences Ain Chock de Casablanca* devant le Jury :

M^r A. FAHDE	<i>Professeur, Faculté des Sciences Ain Chock de Casablanca</i>	Président
M^r H. BAZAIRI	<i>Professeur, Faculté des sciences Rabat</i>	Rapporteur
M^r S. OUBRAIM	<i>Professeur, Faculté des Sciences Ben M'sik de Casablanca</i>	Rapporteur
M^{me} N. RHARBI	<i>Professeur, Faculté des Sciences Ain Chock de Casablanca</i>	Rapporteur
M^r M. MESFIOUI	<i>Professeur, Université du Québec Canada</i>	Examineur
M^r M. BEKKALI	<i>Professeur, Faculté des Sciences Ain Chock de Casablanca</i>	Examineur
M^{me} M. KHARROUBI	<i>Docteur, CSVTPM, INRH, Agadir</i>	Examineur
M^r N. BOURHIM	<i>Professeur, Faculté des Sciences Ain Chock de Casablanca</i>	Directeur de thèse

Considérant le tonnage considérable des écailles générées par les industries de transformation de la sardine et tenant compte des exigences politiques environnementales, cette étude est une mise en lumière de la possibilité d'extraire du collagène à partir des écailles de sardine « *Sardina pilchardus* ». L'analyse par électrophorèse confirme l'isolation d'un collagène de type I constitué de deux chaînes $\alpha 1(I)$ et $\alpha 2(I)$. Le rendement de ce collagène extrait est important et s'est avéré très proche du rendement industriel.

Pour rehausser le rendement et arriver à un degré satisfaisant de collagène, des prétraitements ont été effectués pour éliminer les minéraux et les protéines non collagéniques avant d'entamer l'extraction proprement dite. Notre travail s'est consacré à la modélisation de l'étape de déprotéinisation et de l'étape de déminéralisation et à la détermination des conditions optimales qui conduisent aux produits souhaités. Cette étude a été menée en appliquant la méthodologie des plans d'expériences utilisée pour la première fois comme outil pour l'optimisation et la modélisation de ces performances. En plus, nous avons pu établir des modèles mathématiques satisfaisants décrivant la variation des réponses en fonction des facteurs étudiés. Nos résultats montrent que la déprotéinisation et la déminéralisation ont été optimisées en utilisant de faibles valeurs de concentration de réactifs avec un temps de traitement relativement court. La dernière partie de cette thèse a été dédiée à une étude pilote de déprotéinisation des écailles de sardine qui s'est avérée parfaitement reproductible par rapport à l'expérimentation au laboratoire. Les résultats pionniers, compilés lors de ce travail laissent présager la réalité industrielle de l'extraction de collagène à partir des écailles de sardine, biomasse jusque la inexploitée au Maroc.

Mots clés

Sardina pilchardus, écailles, valorisation, collagène de type I, extraction, déprotéinisation, déminéralisation, modélisation, optimisation, méthode des plans d'expériences.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION	13
1. Contexte général de l'étude.....	13
2. Objectifs de l'étude	15
3. Plan de travail.....	16
PARTIE I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
CHAPITRE 1 : COPRODUITS MARINS	18
1. Introduction	18
2. Coproduits	19
2.1 Définition	19
2.2 Contraintes de valorisation des coproduits marins	22
2.2.1 Contraintes réglementaires	22
2.2.2 Contraintes technico-économiques.....	23
2.2.3 Contrainte humaine	23
3. Voies de valorisation des coproduits.....	23
3.1 Farine et huile de poisson.....	23
3.2 Farine de poissons	23
3.3 Huiles de poissons.....	24
3.4 Hydrolysats	24
3.5 Produits à forte valeur ajoutée.....	25
3.5.1 Chitine/Chitosan.....	25
3.5.2 Collagène et gélatine	25
3.5.3 Peptides	25
3.5.4 Lipides.....	26
CHAPITRE 2 : LE COLLAGÈNE	27
1. Introduction	27
2. Structure du collagène	27
3. Différents types de collagène	28
Source : Wong, (1989) et Belitz et <i>al.</i> , (2004)	29
4. Acides aminés du collagène	29
5. Propriétés fonctionnelles du collagène.....	29
5.1 Résistance mécanique.....	30

5.2 Effet hémostatique.....	31
5.3 Immunogénicité réduite.....	31
5.4 Action sur la différenciation cellulaire.....	31
6. Principales utilisations du collagène.....	32
6.1 Cosmétique.....	32
6.2 Biomédical et pharmaceutiques.....	32
6.3 Alimentaire.....	32
7. Avantages du collagène des écailles de poisson.....	32
8. Méthode d'extraction du collagène de type I.....	33
8.1 Déprotéinisation.....	34
8.2 Déminéralisation.....	35
8.3 Extraction du collagène.....	35
8.3.1 Extraction acide.....	35
8.3.2 Extraction enzymatique.....	35
8.4 Précipitation.....	36
CHAPITRE 3 : LA METHODE DES PLANS D'EXPERIENCES	37
1. Introduction.....	37
2. Terminologie.....	38
2.1 Facteur.....	38
2.2 Niveau des facteurs.....	38
2.3 Réponse.....	39
2.4 Effet.....	39
2.5 Interaction.....	39
2.6 Domaine expérimental réel ou domaine d'étude.....	39
2.7 Résidu.....	40
2.8 Expérience.....	40
2.9 Plan d'expérience.....	40
3. Démarche d'un plan d'expérience.....	41
4. Plans factoriels.....	42
5. Plans pour surface de réponse.....	43
6. Méthode d'analyse statistique des résultats.....	46
6.1 Evaluation de l'adéquation du modèle statistique.....	46
6.1.1 Analyse de variance.....	46
6.1.2 Evaluation des coefficients R^2 et $R^2_{\text{ajusté}}$	47
6.2 Influence des facteurs.....	48
7. Méthode d'analyse graphique des résultats.....	48
8. Optimisation multicritère : fonction de désirabilité.....	49
PARTIE II MATERIEL & METHODES	50

CHAPITRE 1 : ENQUÊTE R & D VALORISATION DES ÉCAILLES DE SARDINE, SARDINA PILCHARDUS	51
1. Méthodologie.....	51
2. Echantillons.....	51
3. Instruments.....	51
4. Démarche suivie.....	52
4.1 Entretiens.....	52
4.2 Questionnaire.....	52
4.3 Analyse de contenu.....	52
CHAPITRE 2 : EXTRACTION DU COLLAGÈNE DE TYPE I.....	53
1. Echantillonnage de la matière première.....	53
2. Extraction acide du collagène.....	53
2.1 Déprotéinisation.....	53
2.2 Déminéralisation.....	53
2.3 Extraction acide.....	55
2.4 Purification.....	55
2.4.1 Ultracentrifugation.....	55
2.4.2 Précipitation.....	55
2.4.3 Dialyse.....	55
CHAPITRE 3 : MODELISATION ET OPTIMISATION LES DIFFÉRENTES ÉTAPES D'EXTRACTION DU COLLAGÈNE.....	56
1. Modélisation et optimisation de l'étape de déprotéinisation.....	56
1.1 Déprotéinisation.....	56
1.2 Paramètres étudiés.....	56
1.3 Plan d'expérience utilisé.....	57
1.3.1 Plan factoriel complet.....	57
1.3.2 Plan composite centré.....	58
2. Modélisation et optimisation de l'étape de déminéralisation.....	60
2.1 Déminéralisation.....	60
2.2 Paramètres étudiées.....	60
2.3 Plan d'expérience utilisé.....	61
2. Traitement statistique des données.....	63
CHAPITRE 4 : TRAITEMENT DES ÉCAILLES DE SARDINE À L'ÉCHELLE PILOTE.....	64
1. Préparation de l'échantillon.....	64
2. Déprotéinisation des écailles de sardine à l'échelle pilote.....	64
3. Traitement au niveau d'une société japonaise d'extraction de collagène à l'échelle industrielle	66
CHAPITRE 5 : ANALYSE BIOCHIMIQUE.....	67

1. Matière sèche.....	67
1.1 Principe	67
1.2 Mode opératoire	67
1.3 Expression des résultats	67
2. Dosage de la teneur en cendres	67
2.1 Principe	67
2.2 Mode opératoire	67
2.3 Expression des résultats	68
3. Dosage des protéines par la méthode de Kjeldahl.....	68
3.1 Principe	68
3.2 Mode opératoire	68
3.3 Expression des résultats	69
4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	70
4.1 Principe	70
4.2 Mode opératoire	70
4.3 Expression des résultats	70
5. Dosage de lipides.....	70
5.1 Principe	70
5.2 Mode opératoire	71
5.3 Expression des résultats	71
6. Dosage du collagène.....	71
6.1 Principe	71
6.2 Préparation des solutions.....	72
6.3 Mode opératoire	73
6.4 Expression des résultats	73
7. Analyse électrophorétique.....	74
PARTIE III RESULTATS ET DISCUSSION.....	75
CHAPITRE 1 : RÉSULTATS DE L'ENQUÊTE	76
1. Caractérisation de la production.....	76
2. Aspect environnemental	76
3. Gestion des déchets	76
4. Caractérisation et quantification des rejets.....	77
4.1 Consommation en eaux	77
4.2 Effluents liquides	77
4.3 Coproduits	78
4.4 Valorisation des coproduits.....	78
5. Conclusion.....	78
CHAPITRE 2 : EXTRACTION DU COLLAGENE DU TYPE I.....	80
1. Ratio des écailles	80

2. Composition biochimique des écailles de sardine (<i>Sardina pilchardus</i>)	81
3. Déprotéinisation	82
4. Déminéralisation	83
5. Rendement du collagène	83
6. Electrophorèse SDS-PAGE	84
7. Conclusion.....	85

**CHAPITRE 3 : MODELISATION ET OPTIMISATION DE DEPROTEINISATION
DES ECAILLES DE SARDINE 87**

1. Résultats expérimentaux du plan d'expérience	87
1.1 Résultats du plan factoriel	87
1.2 Résultats du plan composite centré	88
2. Analyse statistique des résultats du plan factoriel	88
2.1 Analyse de variance des résultats (ANOVA)	88
2.2 Interprétation de l'analyse du plan factoriel	89
3. Analyse statistique des résultats du plan composite centré	90
3.1 Analyse statistique des coefficients des modèles	90
3.1.1 Modèles mathématiques	90
3.1.2 Qualité des estimateurs des coefficients.....	90
3.2 Analyse statistique des résidus	91
3.3 Analyse de variance des résultats (ANOVA)	91
3.4 Validation des modèles	93
4. Analyse graphique des résultats du plan composite centré	94
4.1 Analyse des surfaces de réponses.....	94
5. Optimisation de déprotéinisation des écailles de sardine	96
5.1 Détermination des conditions optimales.....	96
5.2 Vérification expérimentale	97
6. Conclusion.....	97

**CHAPITRE 2 : MODELISATION ET OPTIMISATION DE DEMINERALISATION
DES ECAILLES DE SARDINE 99**

1. Résultats expérimentaux du plan factoriel	99
2. Analyse statistique des résultats	100
2.1 Analyse statistique des coefficients des modèles	100
2.1.1 Modèles mathématiques	100
2.1.2 Qualité des estimateurs des coefficients.....	101
2.2 Analyse de la variance des résultats (ANOVA)	103
2.3 Validation des modèles	105
3. Analyse graphique des résultats	106
3.1 Etude de l'influence des paramètres sur les réponses	106
3.1.1 Tracé des effets principaux des facteurs.....	106

3.2 Représentation des interactions entre les effets des facteurs	110
3.3 Analyse des surfaces de réponses	113
4. Optimisation de déminéralisation des écailles de sardine	117
4.1 Détermination des conditions optimales.....	117
4.1.1 Conditions optimales pour la déminéralisation par l'EDTA	117
4.1.2 Conditions optimales pour la déminéralisation par l'acide chlorhydrique	118
4.2 Vérification expérimentale	119
5. Comparaison entre la déminéralisation des écailles de sardine par l'EDTA et par l'HCl.....	121
6. Conclusion.....	122
Chapitre 4 : RESULTATS DE DEPROTEINISATION DES ÉCAILLES DE SARDINE A L'ÉCHELLE PILOTE.....	124
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	126
BIBLIOGRAPHIE	130
Résumé	140
Summery	141
ANNEXES.....	142