



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**Institut National Polytechnique de Lorraine
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Laboratoire de Science et Génie Alimentaires**

Mémoire de Thèse

présenté à l'Institut National Polytechnique de Lorraine
en vue de l'obtention du grade de Docteur de L'INPL

Spécialité : **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires**

par

Kassem AL-SAYED MAHMOUD

le 15 Novembre 2007

**EXTRACTION, FRACTIONNEMENT ET CARACTERISATION
DES LIPIDES POLYINSATURES D'ŒUFS DE LA
TRUITE ARC-EN-CIEL (*Oncorhynchus mykiss*)**

Rapporteurs :

Dr Pierre VILLENEUVE, Directeur de Recherche CIRAD, HDR, Montpellier
Dr Marie-Caroline MICHALSKI-VEILLEROT, Chargé de Recherche INRA, HDR, Lyon

Examineurs :

Danièle BARTH, Professeur, ENSIC-INPL, Nancy
Laurent POISSON, Maître de conférences, IUT de Laval, Laval
Jacques FANNI, Professeur, Directeur de thèse, ENSAIA-INPL, Nancy
Michel LINDER, Professeur, Co-directeur de thèse, ENSAIA-INPL, Nancy

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été effectuée au Laboratoire de Science et Génie Alimentaires (LSGA) à l'ENSAIA, dirigé par Monsieur le Professeur Stéphane DESOBRY, je le remercie sincèrement. Je remercie également Monsieur Joël HARDY, ancien directeur du laboratoire pour son soutien durant sa présence au laboratoire.

Un grand merci pour le Professeur Jacques FANNI, Directeur de ma thèse et pour le Professeur Michel LINDER, Co-Directeur, pour avoir accepté de diriger cette thèse, de m'avoir aidé et transmis les connaissances appropriées.

Je tiens aussi à remercier,

Madame Marie-Caroline MICHALSKI-VEILLEROT, HDR et Chargé de Recherche à l'INRA de Lyon, et Monsieur Pierre VILLENEUVE, Directeur de Recherche au CIRAD de Montpellier, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Madame Danièle BARTH, Professeur, ENSIC-INPL, Nancy et Monsieur Laurent POISSON, Maître de conférences, IUT de Laval, Laval, pour avoir accepté de prendre part dans ce jury.

Monsieur Michel PARMENTIER, Professeur à l'ENSAIA, pour son soutien tout au long de cette thèse et l'esprit d'équipe qu'il a si bien insufflé.

Monsieur Armand GUCKERT, Professeur à l'ENSAIA, pour m'avoir sélectionné en Syrie et m'avoir suivi tout au long des six ans de mon séjour en France.

Tous les membres du LSGA, Marie-Noëlle MAUCOURT, Carole JEANDEL, Carole PERROUD, Fanny CARER, Angèle COLAS, Anne LAPLACE-CHASSARD, Sylvie BANON, Muriel JACQUOT, Christian SANCHEZ, Joël SCHER.

Les chercheurs : Aboubakar, Agnieska, Albarin, Ali, Angélica, Armand, Atmane, Benjamin, Carine, Charbel, Claire, Elie, Elmira, Ghazlène, Khaoula, Laëtitia, Latifa, Leila, Lili, Lynn, Marie, Mireille, Olivier, Rawaa, Reine, Sandrine, Suzanna, Valérie et Virginie.

Tous les membres de l'UMR (Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes) au CIRAD-Montpellier : Pierre VILLENEUVE, Michel PINA, Bruno BAREA, Nathalie BAROUH, Clara LACHGAR, Jérôme LECOMTE, Evane GRAND, Georges PIOMBO et tous les chercheurs pour leur accueil, leur chaleur du sud et leur aide pour faire les analyses de la réiodistribution.

Madame CHANEL et Madame VILLEMIN pour leur disponibilité concernant les travaux en microscopie électronique à transmission (Service Commun de Microscopie, UHP Nancy I).

Toute la communauté syrienne à Nancy, résidents et étudiants, avec eux j'ai passé des grands moments de joie, d'amitié et de partage.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

1.	INTRODUCTION GENERALE	15
2.	OBJECTIFS DE L'ETUDE	21
3.	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	25
3.1.	INTRODUCTION	25
3.1.1.	La pêche et l'aquaculture dans le monde.....	25
3.1.2.	Production mondiale des pêches de capture dans les eaux continentales	26
3.1.3.	Les lipides des poissons marins et d'eau douce	29
3.2.	LA TRUITE ARC-EN-CIEL (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	31
3.3.	LE MARCHE DES ŒUFS DE POISSON	34
3.4.	INTERET DES ŒUFS DE POISSON (source d'oméga 3 ou n-3)	37
3.5.	LES ŒUFS DE POISSON	38
3.5.1.	Biologie des œufs de poisson.....	38
3.5.2.	L'œuf de poisson.....	38
3.5.3.	Composition générale.....	40
3.5.4.	Protéines des œufs de poisson	42
3.5.5.	Composition et rôle de la membrane.....	43
3.5.6.	Œufs de poisson : sources d'AGPI.....	45
3.5.6.1.	Les acides gras n-3 et n-6.....	45
3.5.6.2.	Les lipides neutres.....	48
3.5.6.3.	Les lipides polaires.....	48
3.5.6.4.	L'insaponifiable	50
3.6.	L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE PAR LES PROTEASES	50
3.6.1.	Classification.....	50
3.6.2.	Paramètres influençant l'hydrolyse enzymatique.....	51
3.7.	L'OXYDATION DES LIPIDES	51
3.7.1.	Détermination des diènes conjugués.....	54
3.7.2.	Détermination des hydroperoxydes	54

4. MATERIELS ET METHODES	59
4.1. MATIERE PREMIERE	59
4.2. ENZYMES	59
4.2.1. Alcalase® 2,4L.....	60
4.2.2. Protamex®	60
4.2.3. Neutrase® 0,8L.....	60
4.3. ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES	61
4.3.1. Matière sèche	61
4.3.2. Matière grasse	61
4.3.2.1. La méthode de Bligh & Dyer	61
4.3.2.2. La méthode de Folch <i>et al.</i>	62
4.3.3. Matière azotée.....	62
4.3.4. Cendres	63
4.3.5. Minéraux.....	64
4.3.6. Teneur en sel.....	64
4.4. ANALYSE DES LIPIDES	64
4.4.1. Extraction des lipides	64
4.4.2. Fractionnement des lipides.....	64
4.4.3. Détermination de la teneur en phospholipides.....	65
4.4.3.1. Dosage du phosphore	65
4.4.3.2. Détermination des différentes classes de lipides par Iatroscan®	65
4.4.3.3. Analyse par chromatographie sur couche mince.....	67
4.4.4. Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.....	68
4.4.5. Détermination de l'insaponifiable total et du cholestérol.....	69
4.4.6. Analyse thermique des huiles par calorimétrie différentielle.....	71
4.5. ANALYSE DES PROTEINES	71
4.5.1. Dosage de l'azote total.....	71
4.5.2. Caractérisation de la taille des peptides des hydrolysats protéiques.....	71
4.5.3. Dosage des acides aminés	72
4.6. ETUDE MICROSCOPIQUE	73
4.6.1. Microscopie optique.....	73

4.6.2. Microscopie électronique	73
4.7. <i>HYDROLYSE ENZYMATIQUE</i>	73
4.7.1. Protocole expérimental	73
4.7.2. Méthode du pH-Stat	75
4.8. <i>REGIODISTRIBUTION DES ACIDES GRAS</i>	76
4.8.1. Triacylglycérols	76
4.8.2. Lipides polaires	77
4.9. <i>STABILITE A L'OXYDATION</i>	77
4.9.1. Préparation des échantillons et conditions opératoires	77
4.9.2. Suivi de la stabilité à l'oxydation	78
4.9.2.1. Indice de peroxyde	78
4.9.2.2. Indice de polyènes	79
4.9.2.3. Indice de diènes	79
4.9.2.4. Consommation en oxygène dans l'espace de tête	79
4.9.2.5. Composition en acides gras	80
4.9.2.6. Couleur	80
4.9.2.7. Détermination de la teneur en astaxanthine	81
4.9.2.8. Spectrométrie infra-rouge	81
4.9.2.8.1. Principe	81
4.9.2.8.2. Mode opératoire	83
5. <i>RESULTATS ET DISCUSSION</i>	87
5.1. <i>ANALYSES BIOCHIMIQUES</i>	87
5.2. <i>HYDROLYSES ENZYMATIQUES</i>	89
5.2.1. Cinétique enzymatique des trois protéases utilisées	89
5.3. <i>ANALYSE DES LIPIDES</i>	91
5.3.1. Classes de lipides totaux	91
5.3.2. Détermination des phospholipides	93
5.3.3. Analyse des acides gras	94
5.3.4. Insaponifiable et cholestérol	97
5.3.5. Analyse calorimétrique	99

5.3.6. Analyse des protéines, des peptides et des acides aminés	100
5.3.7. Classes de peptides dans les hydrolysats.....	101
5.4. REGIODISTRIBUTION DES ACIDES GRAS	106
5.4.1. Triacylglycérols.....	106
5.4.2. Lipides polaires	110
5.5. VISUALISATION DE L'EFFET DES PROTEASES SUR LE CHORION PAR MICROSCOPIE OPTIQUE ET ELECTRONIQUE	111
5.5.1. Microscopie optique.....	111
5.5.2. Microscopie électronique	114
5.6. STABILITE A L'OXYDATION	116
5.6.1. Indice de peroxyde	116
5.6.2. Indice de polyènes.....	118
5.6.3. Indice de diènes	119
5.6.4. Oxygène	121
5.6.5. Couleur	123
5.6.6. Astaxanthine	124
5.7. Spectroscopie infrarouge	126
6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	137
7. BIBLIOGRAPHIE	143

ABREVIATIONS

A :	Absorbance
AGE :	acide gras essentiel
AGI :	acide gras insaturé
AGL :	acide gras libre
AGMI :	acide gras monoinsaturé
AGPI :	acide gras polyinsaturés
AGPI-LC :	acide gras polyinsaturé à longue chaîne
AGS :	acide gras saturé
ATR-FTIR :	infra-rouge à transformée de Fourier en réflexion totale atténuée
B:	consommation de base
BF₃ :	trifluorure de bore
BHA :	butyl-hydroxyl-anisole
BHT :	butyl-hydroxyl-toluène
CCM :	chromatographie sur couche mince
CCM-DIF :	chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme
DH :	degré d'hydrolyse
DHA :	acide docosahexaénoïque
DSC :	Analyse calorimétrique différentielle
E/S :	rapport Enzyme / Substrat
EPA :	acide eicosapentaénoïque
FAO :	Food and Agriculture Organization
h :	nombre de liaisons peptidiques clivées
HOS :	huile d'œufs de saumon
HOT :	huile d'œufs de truite
HTS :	huile de têtes de saumon
h_{tot} :	nombre total de liaisons peptidiques
ID :	indice de diènes
IP :	indice de peroxydes
IS :	indice de saponification
LN :	lipides neutres
LP :	lipides polaires
LPC :	lysophosphatidylcholine
MAG :	monoacylglycérol
MetOH :	méthanol
mEq :	milli-équivalent

mM :	millimolaire
Mp :	masse protéique
MT :	millions de tonnes
mt :	milliers de tonnes
NaOH :	hydroxyde de sodium
Nb :	normalité de la base
nd :	non déterminé
NT :	azote total
PC :	phosphatidylcholine
PE :	phosphatidyléthanolamine
PI :	phosphatidylinositol
PL :	phospholipide
PS :	phosphatidylsérine
SPM :	sphingomyéline
TAC :	truite arc-en-ciel
TAG :	triacylglycérol
TLC-FID :	thin layer chromatography-flame ionization detector
UA :	unité Anson

INTRODUCTION GENERALE

1 . INTRODUCTION GENERALE

Les œufs de poisson sont une importante source alimentaire grâce à leur richesse en protéines et en lipides. Ce produit (notamment les œufs d'esturgeon ou caviar) a longtemps été considéré comme un produit de luxe destiné uniquement à la noblesse et au clergé, on l'a nommé « nourriture des rois ». Au Moyen-Age, il aurait même été consommé davantage en Russie comme substitut de la viande pendant les périodes de carême. Le caviar, qui connut sa période de gloire sous le règne des Tsars, reste toujours un produit de luxe et c'est malheureusement pour cette raison que sa principale ressource sauvage, l'esturgeon de la Mer Caspienne, disparaît en raison du braconnage. On cherche donc par tous les moyens à remplacer cette ressource, soit par l'élevage d'esturgeons (on y parvient avec quelque succès en Gironde), soit par des "équivalents" constitués par les œufs d'autres espèces de poissons. Pour l'instant, aucun de ces substituts ne parvient à égaler le caviar, mais le marché se développe régulièrement. C'est dans ce contexte que nous avons cherché à mieux connaître les propriétés de l'œuf de la truite arc-en-ciel (*Onchorynchus mykiss*) et, notamment, son huile.

Une quantité considérable de co-produits de poisson est générée par les industries de la pêche et de l'aquaculture (150 000 tonnes en 2002 en France). Les œufs en font partie, mais sont malheureusement très mal valorisés. Moins prestigieux que le caviar, l'œuf de truite voit cependant sa production progresser. En 2003, son chiffre d'affaire a dépassé 4 millions de dollars aux États-Unis, ce qui représente environ 264 millions d'œufs vendus (Pennsylvania Agricultural Statistics Service, 2004). Les œufs de poisson sont destinés traditionnellement à la reproduction, mais la demande pour le marché de l'alimentation humaine a attiré l'attention des producteurs de poisson pour mieux exploiter cette ressource. En effet, leur intérêt nutritionnel, qu'il concerne les protéines ou les lipides, notamment les acides gras polyinsaturés, n'est pas encore parfaitement démontré et leur valeur ajoutée, excepté pour le caviar, n'est pas encore au rendez-vous.

Parmi les techniques modernes de valorisation des protéines, l'utilisation d'enzymes alimentaires, surtout les protéases, connaît un franc succès. Ce procédé permet une meilleure solubilisation des protéines sous forme d'hydrolysats peptidiques. Il est relativement peu onéreux et facile à maîtriser et il aboutit à l'obtention de produits possédant des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles intéressantes pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

A côté des protéines, les œufs de poisson sont aussi une source importante de lipides, particulièrement riches en acides gras polyinsaturés à longue chaîne dont les propriétés nutritionnelles sont aujourd'hui bien connues (nous ne reviendrons pas ici sur leur rôle, notamment dans la prévention des maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose, les fonctions cognitives et le développement du système nerveux central), ainsi que de micro-nutriments tels que les vitamines A et D, le calcium, le magnésium et le phosphore.

Ces lipides sont généralement extraits par des méthodes chimiques basées sur la solubilité des lipides dans les solvants organiques, ce qui permet de les isoler des autres constituants non lipidiques. Cette méthode d'extraction puissante est aujourd'hui remise en cause, d'abord en raison des risques liés aux traces des solvants utilisés, ensuite à cause de l'image négative que ces substances affichent aujourd'hui.

Compte tenu de ces observations, l'objectif général de ce travail était de rechercher une valorisation des œufs de poisson, en particulier de la truite arc-en-ciel, afin de favoriser leur utilisation en alimentation humaine. Pour ce faire, nous avons choisi un procédé d'hydrolyse enzymatique qui devrait permettre la valorisation conjointe des fractions protéiques et lipidiques. Ce procédé, conduit dans des conditions de température qualifiée de "douce" (inférieure à 60 °C), serait susceptible de garantir, à la fois la qualité alimentaire des produits et la stabilité des huiles riches en acide gras polyinsaturés.

Une synthèse bibliographique présente une vue générale sur la place et l'intérêt des œufs de poisson, tant au niveau économique que nutritionnel, en étudiant leurs différents composants.

La première partie du travail expérimental a été consacrée à la caractérisation des œufs de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*).

Dans la deuxième partie expérimentale nous avons appliqué la déstructuration enzymatique du tissu protéique en utilisant trois protéases alimentaires (Alcalase[®], Neutrase[®], Protamex[®]) pour extraire les lipides et nous l'avons comparée à la méthode d'extraction par solvant organique pour ce qui concerne le rendement d'extraction, la composition en classes de lipides et la composition en acides gras. Dans ce cadre la chromatographie sur couche mince couplée à la détection par ionisation de flamme (Iatroscan[®]) permet de quantifier la proportion relative de triacylglycérols ainsi que la nature des différents lipides polaires.

D'autres fractions issues de la centrifugation qui suit le procédé d'hydrolyse, notamment la phase huileuse, ainsi que la phase dense et la phase soluble ont été également analysées.

La teneur en lipides polaires de ces fractions et l'huile totale extraite par solvant ont été étudiées et analysées. Dans cette partie, nous avons consacré un chapitre important à la réiodistribution des acides gras sur la molécule de glycérol et des phospholipides.

Enfin, la dernière partie de ce travail a été consacrée à l'étude de la stabilité de l'huile des œufs de truite à l'oxydation. Pour cela, les échantillons ont été stockés à différentes températures (4°C, 20°C et 50°C) pendant environs trois mois. La stabilité à l'oxydation a été suivie par différentes techniques et méthodes d'analyse, dont la spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier.

Une discussion sur les potentialités nutritionnelles des œufs de poisson en général et de l'œuf de truite arc-en-ciel en particulier fera l'objet de la conclusion.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

2 . OBJECTIFS DE L'ETUDE

Prenant en compte l'intérêt considérable que représentent les œufs de poisson, tant du point de vue économique que nutritionnel, ce travail s'est donné pour objectif la valorisation simultanée des fractions protéiques et lipidiques issues d'œufs de truite, notamment ceux du genre *Oncorhynchus sp. mykiss*, anciennement plus connu sous le nom de truite arc-en-ciel.

Le procédé de valorisation a fait appel à l'utilisation d'enzymes, notamment des protéases, véritables outils biotechnologiques qui préservent les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des produits.

Dans une première partie, notre objectif était de caractériser les œufs de truite et d'étudier leur composition physicochimique.

Dans une deuxième partie, nous avons appliqué aux œufs de truite une technique de protéolyse enzymatique déjà utilisée avec succès au Laboratoire de Science et Génie Alimentaires, en utilisant trois enzymes commerciales : Alcalase[®], Neutrase[®] et Protamex[®]. Les fractions lipidiques extraites lors de la déstructuration protéique du tissu ont été caractérisées par leur richesse en acides gras, notamment polyinsaturés et en phospholipides. Cette méthode d'extraction de l'huile a été comparée aux méthodes conventionnelles d'extraction par solvant organique (Bligh et Dyer, 1959 ; Folch *et al.*, 1957).

Dans une troisième partie, la stabilité oxydative des lipides extraits par les différentes méthodes a été étudiée à différentes températures (4, 20 et 50°C). Diverses techniques ont été appliquées pour suivre la stabilité oxydative, telles que la mesure des indices de peroxyde, de diènes et de polyènes, la consommation d'oxygène, la composition en acides gras, la teneur en astaxanthine, l'évolution de la couleur et l'analyse par spectroscopie infra-rouge.

Enfin, dans une dernière partie, une étude de la régidistribution des acides gras sur les triacylglycérols et les lipides polaires a été réalisée au moyen de méthodes enzymatiques spécifiques.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

3 . ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

3.1 INTRODUCTION

3.1.1 La pêche et l'aquaculture dans le monde

En 2004, l'aquaculture a produit environ 106 millions de tonnes de poisson destiné à l'alimentation. Cela représente une moyenne de 16,6 kg (équivalent poids vif) par habitant, soit la plus forte jamais enregistrée. Le poisson a assuré à plus de 2,6 milliards de personnes au moins 20 pour cent de leur apport en protéines animales. Les protéines de poisson sont passées de 14,9% en 1992 à 15,5% en 2003 dans le total mondial de l'apport protéique d'origine animale (FAO, 2007).

La pêche de capture mondiale a atteint 95 millions de tonnes en 2004, pour une valeur marchande estimée à 85 milliards de dollars. Les Etats-Unis d'Amérique, la Chine et le Pérou demeurent les principaux pays producteurs (**Figure 1**).

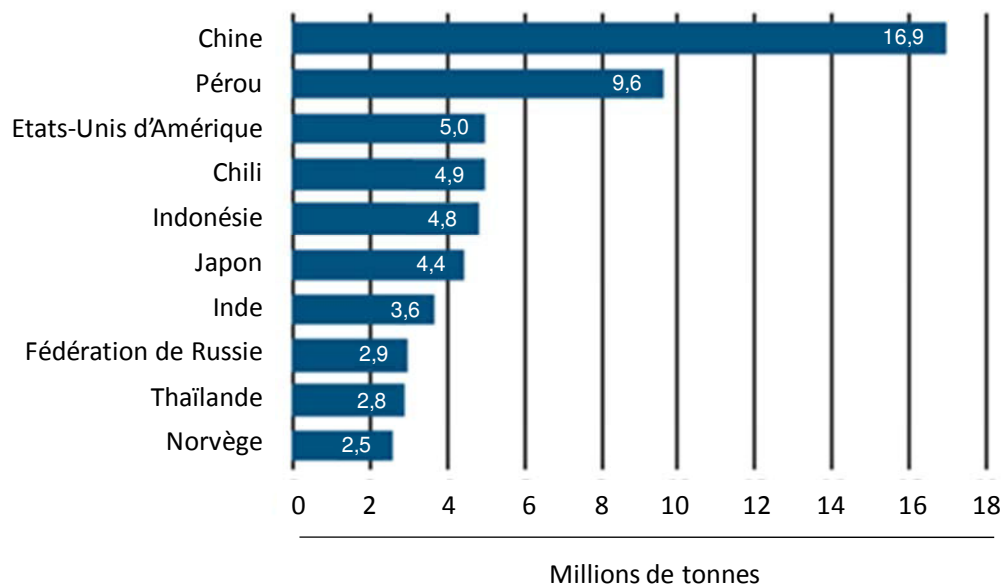


Figure 1. Pêches de capture marines et continentales: les 10 principaux pays producteurs en 2004 (FAO 2007).

Il faut noter que les captures marines sont en chute libre alors que les pêches continentales augmentent régulièrement. Ainsi, les captures dans les eaux continentales, notamment en Afrique et en Asie pour 90% environ, ont atteint un niveau de 9,2 millions de tonnes en 2004 (FAO 2007).

L'aquaculture connaît une croissance plus rapide que tous les autres secteurs de production alimentaire d'origine animale, avec un taux moyen annuel de 8,8% depuis 1970, contre seulement 2,8% pour la production animale terrestre. A elle seule, la Chine représenterait près de 70% du total et plus de la moitié de la valeur mondiale de la production aquacole.

En 2004, le commerce mondial du poisson et des produits dérivés a atteint une valeur totale record de 71,5 milliards de dollars EU (valeur des exportations), en très forte croissance (23% par rapport à 2000), avec des estimations très positives pour le futur. La Chine est devenue le principal exportateur mondial de poisson depuis 2002, avec un marché évalué à 6,6 milliards de dollars EU en 2004.

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, la crevette se situe au premier rang des échanges, avec environ 16,5% de la valeur totale des produits piscicoles échangés dans le monde en 2004. Elle est suivie par les poissons de fond (10,2%), les thonidés (8,7%) et le saumon (8,5%). En 2002, la farine de poisson représentait environ 3,3% de la valeur des exportations. L'huile de poisson, qui fait l'essentiel du travail présenté ici se situe pour l'instant à moins de 1% en valeur.

3.1.2 Production mondiale des pêches de capture dans les eaux continentales

Le total mondial des captures en eaux continentales a atteint 9,2 millions de tonnes en 2003 et 2004. L'Afrique et l'Asie représentent toujours 90% du total mondial et leurs parts respectives sont relativement stables. La crise est cependant aiguë en Europe où le total des captures a chuté de 30 pour cent depuis 1999 (FAO 2007).

Les 10 principaux groupes d'espèces en volume et en pourcentage d'augmentation de la production entre 2002 et 2004 sont présentés dans le **Tableau I**.

Tableau I. Les dix principaux groupes d'espèces dans la production aquacole : volume et croissance émergente (FAO, 2007).

Groupe d'espèces	2002	2004	Taux de croissance
	(Tonnes)		annuel moyen (Pourcentage)
Carpes et autres cyprinidés	16 673 155	18 303 847	4,8
Huîtres	4 332 357	4 603 717	3,1
Clams, coques, arches	3 457 510	4 116 839	9,1
Poissons d'eau douce divers	3 763 902	3 739 949	-0,3
Crevettes	1 495 950	2 476 023	28,7
Saumon, truites, éperlans	1 791 061	1 978 109	5,1
Moules	1 700 871	1 860 249	4,6
Tilapias et autres cichlidés	1 483 309	1 822 745	10,9
Peignes, pectens	1 228 692	1 166 756	-2,6
Mollusques marins divers	1 389 586	1 065 191	-12,4

La production globale de salmonidés d'eau douce augmente régulièrement, passant de 23% en 2003 à 31% en 2004, notamment en Asie. On assiste à une diminution relative des parts de l'Europe et de l'Amérique du Nord (Europe : 55% en 2004; Amérique du Nord : 8,6% en 2004). L'Amérique du Sud voit sa production progresser, ainsi que l'Océanie et l'Afrique. La production en eaux marines est très importante (77%), le saumon atlantique étant l'espèce la plus représentée. En eau douce, c'est la truite arc-en-ciel (TAC) qui est prépondérante (**Figure 2**). Sa production a beaucoup augmenté au cours de la deuxième moitié du XX^{ème} siècle (**Figure 3**). Elle a atteint plus 490 mt en 2005, alors qu'elle était de moins de 6 mt en 1950. Parmi les premiers pays producteurs de la truite arc-en-ciel en Europe, Amérique du Nord, Chili, Japon, et Australie, la France, avec 40 000 tonnes annuelles, en est le 1er producteur mondial (FAO, 2002-2007).

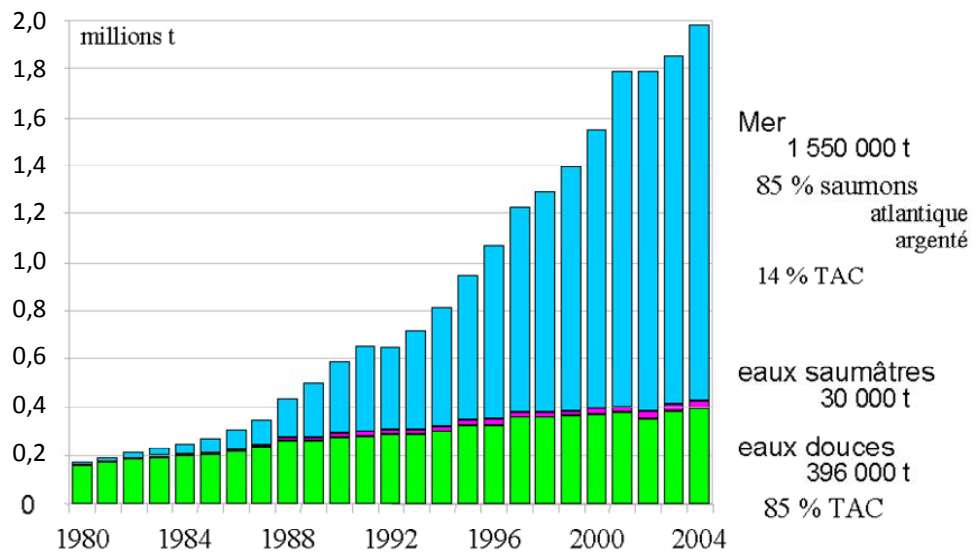


Figure 2. Production de salmonidés par milieu (FAO, 2007).

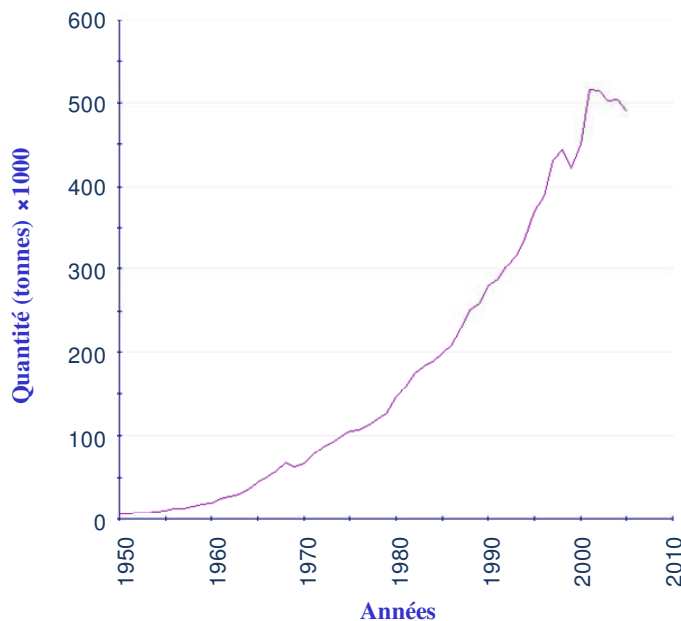


Figure 3. Evolution de la production mondiale de truite arc-en-ciel (FAO, 2007).

Les progrès récents de l'aquaculture (salmoniculture, crevetticulture, écloseries de mollusques, production de semences d'algues, sélection de souches à croissance rapide et à reproduction aisée, etc.) sont dus à des efforts importants de recherche fondamentale et

appliquée. Ainsi, alors qu'un saumon norvégien parvenait à 2 kg en quatre ans en 1974, il pèse aujourd'hui 6 kg à 18 mois et 18 kg à 30 mois (Bœuf, 2002). Un effort très important devra cependant être réalisé dans le domaine de l'environnement, car les pratiques aquacoles actuelles restent très polluantes.

3.1.3 Les lipides des poissons marins et d'eau douce

Les lipides sont les constituants biochimiques les plus étudiés chez les poissons et d'autres organismes aquatiques. On remarque que toutes les classes lipidiques connues chez les vertébrés sont présentes chez les poissons. Les poissons d'élevage sont les plus riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série $n-3$ (oméga 3), alors que chez les mammifères ce sont les AGPI de la série $n-6$ qui prédominent (Corraze, 1996). Ainsi, la teneur en AGPI $n-3$ de la chair des poissons varie entre 15 et 36% alors qu'elle n'est que de 2% chez le bœuf et de 4% chez le poulet. Par ailleurs, on constate généralement que les poissons marins sont plus riches en AGPI $n-3$ que les poissons d'eau douce.

De grandes différences peuvent être constatées quant à la richesse en AGPI $n-3$ et à leur nature entre les écosystèmes marins et dulçaquicoles. Les AGPI à longue chaîne (C20 et plus) prédominent en effet dans le phytoplancton marin, alors que l'acide linoléique ($18:3n-3$) est majoritaire en eau douce (Sargent *et al.*, 1989).

Tableau II. Besoins en acides gras de différentes espèces de poissons (Kanazawa *et al.*, 1979).

Espèce	Acides gras essentiels	Besoin (% de la ration)
Truite arc-en-ciel	$18:3n-3$	1%
Saumon	$18:3n-3$	1-2%
Carpe commune	$18:3n-3$	1%
Bar	AGPI $n-3$	1-2%
Turbot	AGPI $n-3$	0,8%
Daurade	AGPI $n-3$	1%

Les poissons d'eau douce, contrairement aux poissons marins, sont capables de synthétiser les acides gras en C18 par les réactions de désaturation et d'élongation des AGPI à

longue chaîne (20:5n-3 et 22:6n-3) (Kanazawa *et al.*, 1979). Cela entraîne de grandes différences sur les besoins en acides gras essentiels (AGE) chez les diverses espèces de poissons (**Tableau II**).

Les lipides sont stockés chez les poissons dans les différents tissus, principalement le foie, le muscle et le tissu adipeux périviscéral (Sheridan, 1988 ; 1994). La teneur en lipides varie aussi dans les mêmes organes des différentes espèces de poissons marins et d'eau douce (**Tableau III**).

Tableau III. Teneur en lipides dans le muscle et le foie de différentes espèces de poissons (% poids frais) (Corraze, 1996).

Espèce	Muscle	Foie
Morue	0,4	50-75
Thon	4	4-28
Saumon Atlantique	4-10	10
Truite arc-en-ciel	2,5-5,7	3,5-6
Carpe	1,5-12,5	4,8-8,8
Maquereau	13	8

Le dépôt lipidique du foie de la daurade, un poisson marin, est plus élevé et contient une quantité plus importante de triacylglycérols, comparé à la truite, poisson d'eau douce (**Tableau IV**). La PC et la PE sont les classes majeures de phospholipides avec respectivement 60 et 12 à 16% chez les deux espèces, avec une teneur plus élevée de phosphatidylinositol (PI) chez la truite (Hazel, 1979 ; Ando *et al.*, 1993). Le foie, chez les espèces marines, a généralement une teneur lipidique plus élevée comme la morue qui représente le cas extrême avec plus de 60% (Corraze, 1996).

La différence dans les sites de stockage des lipides en fonction des espèces est un critère utile pour classer les poissons. Un poisson est dit maigre quand sa teneur en lipides dans le muscle est faible (<1%), ce qui est le cas de la morue. Il est semi-gras quand il accumule entre 2 et 10% de lipides (chez les salmonidés par exemple) et il est gras si le stock de lipides dans le muscle est massif (>10%), comme chez le maquereau (Corraze, 1996).

Tableau IV. Composition lipidique du foie chez la truite et la daurade japonaise (Corraze, 1996).

Lipides (% frais)	Daurade japonaise	Truite
Lipides totaux	7,7	5,6
Lipides neutres	5,9	2,8
Lipides polaires	1,8	2,7
Classes de phospholipides (%)		
Phosphatidylcholine (PC)	58,1	62,8
Phosphatidyléthanolamine (PE)	12,4	16,0
Sphingomyéline (SPM)	16,1	5,1
Phosphatidylsérine (PS)	10,9	1,9
Phosphatidylinositol (PI)	2,5	7,6

Dans les muscles de la truite, les triglycérides constituent la majeure partie des lipides neutres, mais on trouve aussi des esters de cholestérol. La phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont majoritaires dans les classes de phospholipides et représentent respectivement plus de 50 et 30% des phospholipides (Ingemansson *et al.*, 1991).

La teneur et la composition en lipides des tissus varient entre les espèces, mais également au sein de la même espèce. De nombreux facteurs sont la cause de ces différences, notamment l'alimentation, les facteurs environnementaux (température, salinité), l'âge et le cycle sexuel (Corraze, 1996).

3.2 LA TRUITE ARC-EN-CIEL (*Oncorhynchus mykiss*)

Les truites sont des poissons téléostéens. Elles sont représentées par un genre, en particulier *Salmo* (du latin *salire*, sauter) et par un grand nombre d'espèces, de sous-espèces et de variétés. Les genres concernés par l'élevage sont : *Salmo trutta fario* ou truite Fario et *Oncorhynchus mykiss* ou truite arc-en-ciel (**Figure 4**).

Originaire d'Amérique du Nord, la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, a été introduite au XIX^{ème} siècle dans toute l'Europe. Son intérêt économique est très important puisque cette espèce est présente dans de très nombreuses piscicultures où son élevage est bien

maîtrisé. Dénommée à l'origine *Salmo mykiss* par Walbalm en 1792 au Kamtchatka (Behnke, 1992), elle fut également appelée *Salmo gairdneri* par Richardson en 1836 en Colombie Britannique (McPhail et Lindsey, 1970).

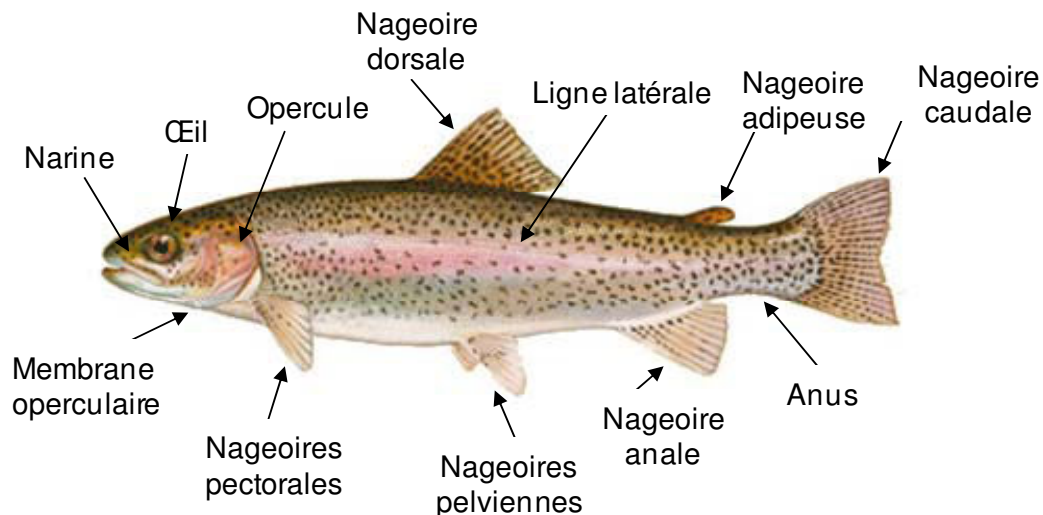


Figure 4. Description de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*).

Pendant des années on a pensé que la truite arc-en-ciel native de l'Amérique du nord était différente de celle du Kamtchatka, mais on considère aujourd'hui qu'il s'agit de la même espèce. Avant 1989, la truite arc-en-ciel était classée dans le genre *Salmo*, dans l'espèce *gairdneri*, mais elle est aujourd'hui classée dans la famille du saumon pacifique et a pris le nom de *Oncorhynchus mykiss* (Hardy *et al.*, 2001). La truite vit dans les eaux froides et claires des fleuves et des lacs, dans des zones à fort courant, avec du bois ou des rochers submergés et de la végétation aquatique (Staley et Muel, 2000). On trouve également une variété dite "truite à tête d'acier" vivant dans les estuaires, mais il s'agit d'une forme migratrice alors que l'arc-en-ciel est une forme sédentaire (Knockaert, 2006).

Le Canada a produit 4723 tonnes de truites en 2005 pour une valeur de 21 millions de dollars canadiens (Rapport de pêches et océans, 2005). La France, avec 40 000 tonnes annuelles, reste le premier producteur mondial.

La truite peut être élevée en eau douce, ou en eau de mer dans le cas de la variété "à tête d'acier", dès qu'elle a atteint sa taille normale (Hardy *et al.*, 2001). La truite se reproduit d'octobre à mars. Les jeunes poissons se nourrissent d'invertébrés et les adultes ajoutent à leur

régime la consommation de petits poissons. Il faut 18 mois pour que la truite d'élevage atteigne le poids de 250 g et 3 ans pour une grosse truite de 1,5 kg. Le cycle de production de la truite arc-en-ciel est résumé dans la **Figure 5**.

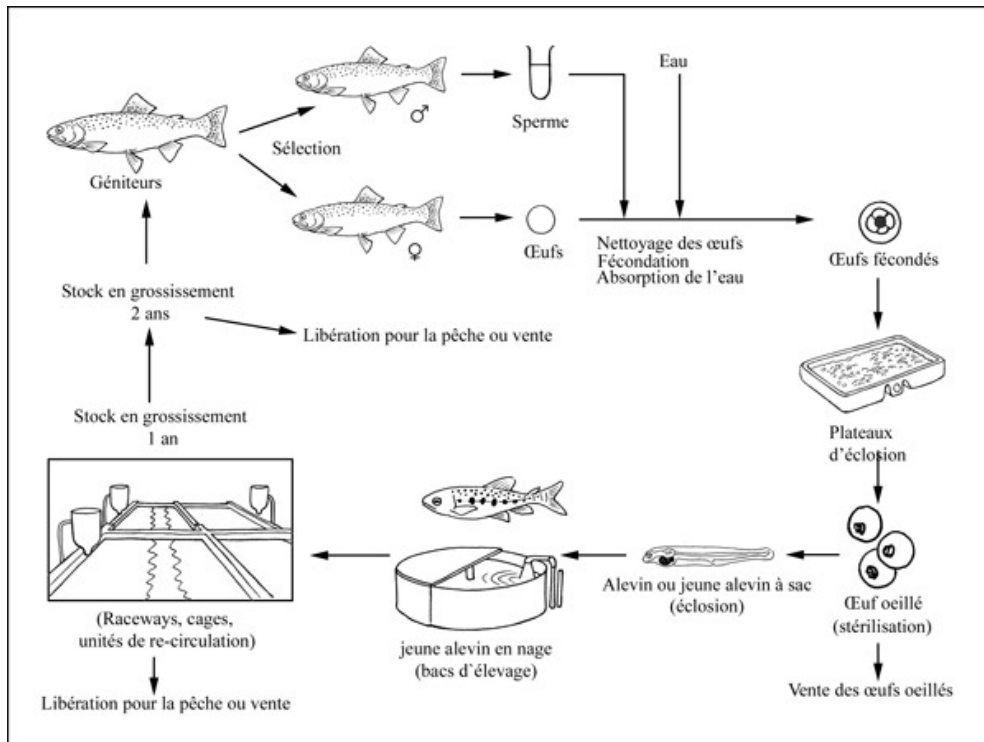


Figure 5. Cycle de production de la truite arc-en-ciel (FAO, 2000-2007).

Quand un ovocyte est formé dans l'ovaire, sa future source d'énergie est constituée par les protéines et les lipides du vitellus. L'ovocyte est mou et très collant à ce stade, il est entouré par une membrane molle (le chorion). Cette enveloppe entoure le liquide périvitellin, qui remplit l'espace intérieur. Un orifice particulier, le micropyle, assure la fécondation par l'entrée d'un seul spermatozoïde. Les œufs restent collants à cause de l'eau qui traverse la membrane poreuse, puis ils durcissent progressivement et finissent par perdre leur caractère collant. L'œuf devient turgescent en raison de la pression osmotique et le chorion se sépare de la membrane du vitellus. Cela permet au vitellus et au disque germinatif de tourner librement à l'intérieur de l'œuf, avec le disque toujours en haut.

En pisciculture, les œufs fécondés sont "durcis" une heure avant d'être versés dans la jarre d'éclosion. Cette étape permet également la fermeture du micropyle, interdisant l'entrée d'un

nouveau spermatozoïde. L'embryon formé après la fécondation reste très fragile, notamment pendant les 48 premières heures. Il s'agit d'une période extrêmement sensible. Les œufs ne doivent pas être déplacés jusqu'à ce que le blastopore soit totalement formé. Les œufs restent tendres jusqu'à ce qu'ils soient pigmentés par des taches minuscules (les œufs ont des "yeux"). Dès ce moment, ils peuvent être déplacés.

À l'éclosion, le poids du sac vitellin augmente rapidement. La teneur en eau de la larve augmentera jusqu'à 10 semaines environ après l'éclosion, il représentera alors 80% du poids de corps. Puis, la teneur d'eau du corps restera sensiblement constante à partir de là.

Les larves vont consommer les réserves vitellines héritées de la mère et continuer leur développement corporel jusqu'à l'état adulte.

L'impact de la culture de la truite sur l'environnement est considéré comme minimal, tout au moins aux Etats-Unis qui semblent respecter les règlements fédéraux exigés pour réduire la quantité de farine de poisson et d'huile dans l'alimentation des poissons. Sur le plan international, les situations sont cependant très variables (Stevens, 2003).

La truite arc-en-ciel présente d'abord un intérêt économique, car elle est l'espèce dominante de la truiticulture en Europe et en Amérique. Son intérêt est également d'ordre halieutique, car elle est l'une des espèces les plus prisées dans le monde, en particulier par la pêche sportive. Elle a également un intérêt scientifique, car elle est très utilisée pour l'expérimentation au laboratoire, en physiologie, en génétique, en immunologie et en toxicologie. Enfin, elle a aussi un intérêt écologique puisqu'elle apparaît comme l'une des espèces les plus représentatives de la faune d'eau douce des zones tempérées froides et des plans d'eau de montagne (Bruslé *et al.*, 2001).

3.3 LE MARCHE DES ŒUFS DE POISSON

Les œufs de poisson sont considérés comme un co-produit issu de la femelle avant le frai, comme c'est le cas pour la truite arc-en-ciel. Le rendement en œufs (% poids de femelle) varie d'une espèce de poisson à l'autre, il est de 6% chez le maquereau (*Scomber japonicus*), de 10% chez le saumon de Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), de 20% chez l'esturgeon blanc (*Acipenser transmontanus*) et de plus de 26% chez la carpe (*Cyprinus sp.*) (Bledose *et al.*, 2003).

Malheureusement, les statistiques, tant locales qu'internationales, ne sont ni fiables ni récentes. Le manque de programmes nationaux et de collaboration entre les organismes de statistiques et les producteurs, en plus de la méconnaissance de la valeur nutritionnelle et économique de ce produit, peuvent être des raisons de ce manque d'information. Cependant, la production mondiale d'œufs de poisson et des produits dérivés (ovules complets, caviar, substituts de caviar, produits traités, caviar artificiel), a tendance à augmenter depuis les années 1970 (Figures 6-7).

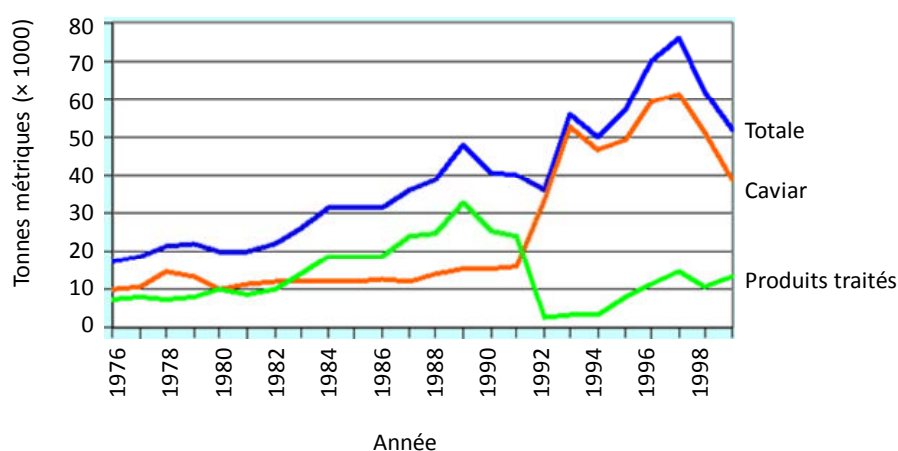


Figure 6. Production mondiale d'œufs de poisson (Price, 2003).

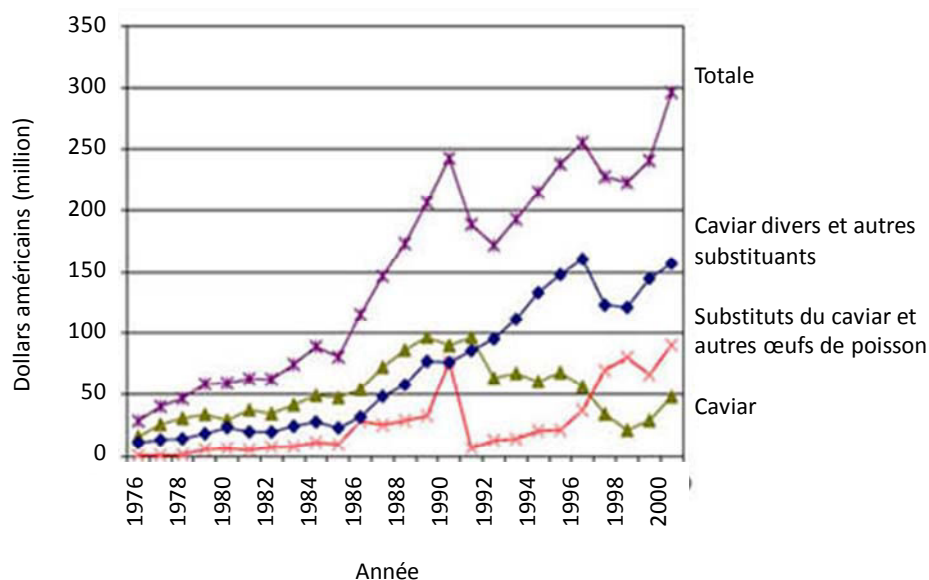


Figure 7. Chiffre d'affaire mondial du caviar, des substituts de caviar et autres œufs de poisson, valeurs 1976-2000 (Catarci, 2004).

Le caviar (œufs non fécondés de la femelle d'esturgeon) garde depuis longtemps sa place et sa valeur grâce à son histoire et à son image de produit noble. C'est un produit alimentaire riche, délicat et cher, car il est rare et difficile à obtenir. Les pays de la mer Caspienne (Russie, Iran, Azerbaïdjan, Kazakhstan et Turkménistan) exportent 90% de la production mondiale (Taylor, 2006). Cependant, les statistiques sur le caviar sont fortement biaisées par des pratiques de braconnage généralisées.

La demande de caviar d'esturgeon d'élevage a explosé ces dernières années, bien que l'exportation du caviar sauvage de la mer Caspienne reste toujours en tête. Plusieurs pays comme les Etats-Unis, la France, l'Allemagne, l'Italie et l'Uruguay ont développé leur production et d'autres nouveaux pays comme la Bulgarie, le Canada et la Chine ont également commencé à s'intéresser à ce produit. Un projet de 48 milliard de dollars US a été programmé pour s'achever en 2008 dans le désert d'Abou Dhabi et devrait produire 32 tonnes de caviar par an, soit deux fois plus que la production actuelle de la Californie (Black, 2006). En terme de valeur, les pays principaux important le caviar en 2000 sont : les Etats-unis avec 90 millions de tonnes, d'une valeur de 22,1 millions dollars américains ; la France qui produisait 36 MT, l'équivalent de 15,9 millions dollars ; et l'Allemagne avec 34 MT, d'une valeur de 15,7 millions dollars. Malgré sa rareté et son prix élevé, le caviar a reconnu une augmentation d'importation totale de 243 MT (correspondant à une valeur de 13,8 millions dollars américains) en 1976 à 488 MT (d'une valeur de 80,95 millions dollars) en 2000 (Catarci, 2004).

Produit moins prestigieux, l'œuf de truite voit cependant sa production progresser. En 2003 elle a dépassé 4 millions de dollars aux États-Unis, ce qui représente environ 264 millions d'œufs vendus (Pennsylvania Agricultural Statistics Service, 2004).

En 2004, la production totale de truite en Russie était 7653 tonnes, avec 5,5 tonnes de caviar de truite. La production totale a ainsi plus que doublé en quelques années, elle était de 3193 tonnes en 1999. En outre, plus de 30 millions d'œufs ont été vendus sur le marché intérieur et extérieur en 2003 (Eurofish International Organisation, 2005). En Mer Noire, l'exploitation truiticole Adler est un des plus grands producteurs, avec 1000 tonnes de truite par an, 20 à 30 tonnes de caviar de truite et un potentiel de 30 millions d'œufs par an. Le caviar de truite pressé est considéré comme un produit de luxe, appelé à se développer.

Les producteurs de truite de l'état de Washington aux Etats-Unis ont vendu 253 millions d'œufs en 2003 (Washington Agricultural Statistics, 2004), ce qui représente 96% de la production totale américaine estimée à 264 millions d'œufs. La vente d'œufs de poisson a été de 4 millions de dollars avec un prix moyen de 16 dollars pour 1000 œufs. Il n'en demeure pas moins que le caviar d'Almas tiré de l'esturgeon Beluga reste toujours le plus cher. Son prix moyen en 2007 a atteint 23300 dollars par kilogramme, alors que le caviar "standard" varie entre normalement entre 2400 et 7000 dollars! (Bledose *et al.*, 2003).

En France, quand on parle d'œufs de poissons, la dénomination "caviar" ne s'applique, en toute rigueur, qu'aux œufs d'esturgeon, même si le langage courant, ou certains produits commerciaux nomment caviar des œufs d'autres poissons ("caviar rouge" d'œufs de saumon de la Mer de Béring, ou œufs de lavaret, de corégone blanchâtre et de lotte éventuellement fumés dans les pays nordiques, jusqu'au "caviar de poisson volant" ou tobiko).

La fabrication du caviar peut nécessiter jusqu'à 13 opérations : une fois extrait du ventre de la femelle, il est tamisé, puis lavé et égoutté, trié selon la fermeté, la grosseur et la couleur des œufs, puis il est salé avant séchage et conditionnement.

3.4 INTERET DES ŒUFS DE POISSON (source d'oméga 3 ou *n*-3)

Suite aux observations faites sur les populations Inuits, selon lesquelles ceux-ci développaient peu de maladies coronariennes, malgré une alimentation composée principalement de poissons et de mammifères marins comportant un taux élevé de lipides, de nombreuses études ont mis en lumière que les acides gras *n*-3 sont essentiels au bon développement de l'organisme et ont des effets bénéfiques sur la santé (Dewailly *et al.*, 2001 ; Demers, 2001).

Les acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA) sont efficaces contre les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et sont essentiels au développement du cerveau (Blanchet *et al.*, 2005). Ils s'accumulent dans les membranes cellulaires du muscle cardiaque, les cellules sanguines et autres tissus (Nudds, 2002). Ils aident à maintenir la fluidité des membranes et assurent le fonctionnement normal des cellules et des tissus. Le DHA est l'acide gras *n*-3 le plus abondant dans le cerveau et la rétine, où il représente plus de 50% du total des acides gras insaturés présents.

Des études approfondies ont d'ailleurs démontré que la consommation de deux portions de poisson par semaine a des effets protecteurs sur le système cardiovasculaire (Harris et Von Shacky, 2004).

3.5 LES ŒUFS DE POISSON

3.5.1 Biologie des œufs de poisson

L'œuf de poisson n'a longtemps tenu qu'une place modeste dans la recherche biologique, comparé à l'œuf de poule par exemple. Cependant, quelques études avaient démarré en URSS pour avancer dans la compréhension de l'embryologie expérimentale de l'œuf d'esturgeon. D'autres études ont porté sur l'œuf de truite aux U.S.A. et en Allemagne. Aujourd'hui, avec l'évolution de la recherche en embryologie, l'œuf de poisson bénéficie d'un regain d'intérêt. Un survol rapide de la composition biologique générale de l'œuf de poisson, peut permettre de mieux comprendre l'intérêt qu'il suscite afin de mieux exploiter cette ressource mal valorisée.

3.5.2 L'œuf de poisson

- Compartiments cellulaires :

L'œuf de poisson peut être décrit comme une cellule géante, généralement sphérique et enveloppée par une membrane complexe ou enveloppe formée durant l'oogenèse (Depêche et Billard, 2004). De l'extérieur vers l'intérieur, on peut distinguer (**Figure 8**) :

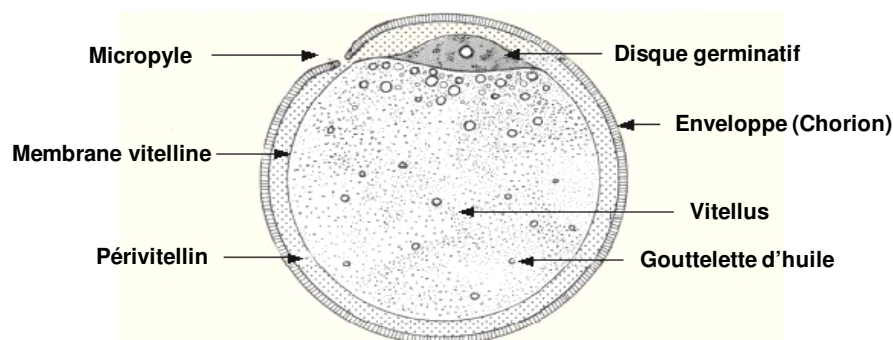


Figure 8. Diagramme d'un œuf de truite (Gardiner, 2000 ; Piper *et al.*, 1982)

- **Les enveloppes** : elles constituent le compartiment extracellulaire, le chorion, qui porte des noms différents en raison des aspects complexes de sa formation et de sa transformation. Il s'agit avant tout d'une membrane primitive formée par l'oocyte mais il contient souvent des éléments secondaires du follicule (*zona radiata*). Le chorion est perforé par le micropyle par lequel les spermatozoïdes pénètrent. Il sera modifié chimiquement et structuralement après l'émission de l'œuf dans le milieu extérieur. Cette étape est appelée "durcissement des œufs par l'eau" (water-hardening). Le chorion assure une protection mécanique, osmotique et chimique face aux échanges de l'œuf avec l'eau et il peut jouer un rôle important comme filtre.

- **Le fluide périvitellin** : il occupe l'espace périvitellin formé durant la réaction corticale et sépare le cytoplasme de la membrane. Le volume et la composition de ce fluide sont modifiés par l'exocytose de la vésicule corticale et aussi par l'eau et les mouvements ioniques à travers le chorion. Il joue un rôle régulateur entre le milieu extérieur et l'embryon et peut participer à la nutrition primaire de l'embryon.

- **La membrane plasmique (*Oolemma*)** : son rôle est limité mais important, il est défini par la régulation des facteurs osmotiques et ioniques de l'œuf par action enzymatique durant la phase initiale du développement. La membrane sera ensuite altérée au cours de la réaction corticale.

- **Le cytoplasme** : il est distribué de manière inégale dans l'œuf. Le cytoplasme cortical forme une couche périphérique fine entre le vitellus et la membrane plasmique. Il est plus abondant vers le micropyle et participe à la formation de la première masse cellulaire, le blastodisque. Il se propage ensuite sur toute la surface durant l'épibolie.

- **Le nucléus** : il se trouve au milieu du cytoplasme polaire. Sa localisation durant les premières phases d'oogenèse indique la polarité de la future cellule ovulaire (différentiation bipolaire).

- **Le vitellus** : il est situé sous le cytoplasme périphérique et inclut des éléments de nature et d'origine différentes (glucides, lipides, phospholipides, cholestérol). Tous ces composants peuvent être utilisés par l'embryon et constituent une couche syncytiale (périblaste) particulière au poisson, qui envahit la périphérie du vitellus et le digère. La composition du vitellus n'est pas encore parfaitement établie, il contient notamment une grande quantité d'ADN et de différents facteurs hormonaux (stéroïdes).

3.5.3 Composition générale

Dans le paragraphe précédent, nous avons exploré la structure et les propriétés des différents compartiments d'un œuf de poisson. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons à sa composition physico-chimique et aux composants chimiques principaux.

Des comparaisons interspécifiques ont montré que la teneur en eau des œufs de poissons marins est plus élevée que celle des espèces d'eau douce (Kamler, 1992). Les œufs des espèces migratrices (*Oncorhynchus spp.*, *Salmo salar* et *Salmo trutta*), qui grandissent en mer et vont se reproduire en eau douce, comme les œufs d'Acipenseridae (esturgeons), contiennent moins d'eau que ceux des espèces marines sédentaires (moins de 62%). En général, la teneur en eau des œufs de poisson peut varier entre 52 et 91% (Bledose *et al.*, 2003 ; Kaitaranta et Ackman, 1981). Les œufs de la truite arc-en-ciel contiennent de 61,1 à 66,1% d'eau (Kamler, 1992 ; Satia *et al.*, 1974 ; Vuorela *et al.*, 1979).

Les protéines interviennent pour 50 à 85% de la matière sèche (Kaitaranta *et al.*, 1980). Selon deux études, la teneur en protéines d'œufs de la truite arc-en-ciel varie de 24,1-27,4% de la matière humide totale (Satia *et al.*, 1974 ; Vuorela *et al.*, 1979). Kamler (1992) a trouvé que la teneur moyenne des protéines d'œufs de truite est de 69,3% de la matière sèche. La majorité des protéines des œufs de poisson dérivent de l'incorporation de la vitellogénine du vitellus qui est composé essentiellement de protéines et de lipides (Depêche et Billard, 2004). Cependant, d'autres protéines internes ou externes et des glycoprotéines sont présentes dans l'œuf (Inoue *et al.*, 1971 ; Inoue et Iwasaki, 1978 ; Inoue et Inoue, 1986 ; Kitajima *et al.*, 1986 ; Inoue *et al.*, 1987). La vitellogénine dérive elle-même de la lipovitelline (glycolipophosphoprotéines), de la phosvitine (des phosphoprotéines) et peut être du composant $\beta 1$ qui est un dérivé de la lipovitelline (Depêche et Billard, 2004).

Les lipides d'œuf de poisson sont, soit associés aux protéines du vitellus dans la lipovitelline, soit séparés en globules huileux en bordure du vitellus (**Figure 9**). Les lipovitellines sont composées essentiellement de phospholipides (87% dans l'œuf du poisson doré ou "glodfish" (Hori *et al.*, 1979)), alors que dans les globules huileux, les lipides neutres sont majoritaires, notamment les triacylglycérols. La teneur maximale rapportée des lipides dans l'œuf de poisson est de 37% du poids total, mais elle varie en moyenne entre 8 et 32% de la matière sèche totale (Kaitaranta et Ackman, 1981). Les œufs de la truite arc-en-ciel contiennent en

moyenne de 3,8 à 7,1% de lipides (sur la matière humide totale) (Satia *et al.*, 1974 ; Vuorela *et al.*, 1979), mais ces valeurs peuvent augmenter en fonction de l'alimentation et de la production des poissons. Selon Kamler (1992), la teneur moyenne en lipides totaux d'œufs de truite peut atteindre 29,3% de la matière sèche. Les AGPI représentent la majorité des acides gras des lipides de l'œuf (50% des phospholipides ; 30-40% des lipides neutres chez les téléostéens marins) (Depêche et Billard, 2004).

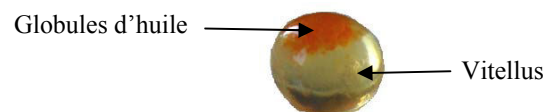


Figure 9. Œuf de la truite arc-en-ciel (le vitellus et les globules huileux sont colorés).

Les salmonidés sauvages ont une couleur très variable qui peut aller du blanc au rose, jusqu'au rouge. La coloration est en général le résultat de l'alimentation du poisson sur des nutriments contenant des caroténoïdes, en particulier l'astaxanthine qui est le responsable majeur de la pigmentation des poissons et des coquillages (Knockaert, 2006). Les caroténoïdes sont classés selon une échelle de couleur basée sur les différences de teneur en astaxanthine, qui procure une couleur rose rouge et la canthaxanthine qui donne plutôt une couleur jaune (**Figure 10**).

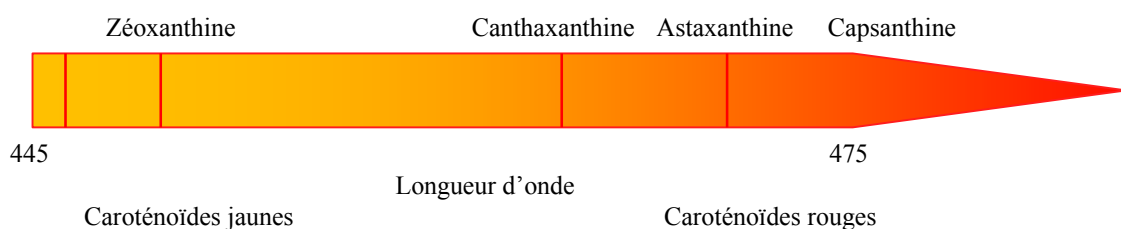


Figure 10. Echelle de couleur des caroténoïdes (Knockaert, 2006).

Le saumon est en général plus riche en astaxanthine que la truite, mais une alimentation plus ou moins riche en caroténoïdes peut changer la règle. L'astaxanthine représente 66% des caroténoïdes chez la truite arc-en-ciel, alors que le saumon atlantique en contient 97% et elle peut

atteindre 98% des caroténoïdes chez les saumons rose, argenté et keta (*Oncorhynchus keta*) (DSM Nutritional Products, 2000).

Comme on l'a vu, la pigmentation des œufs de truite dépend fortement des conditions de production, de l'espèce et en particulier de l'alimentation du poisson. Il s'agit d'un paramètre de qualité important, tant pour l'aquaculture en général que pour le producteur d'aliments.

Une étude a montré que l'astaxanthine est aussi performante que la canthaxanthine (Buttle *et al.*, 2001), mais il est démontré dans une autre étude que la truite arc-en-ciel utilise l'astaxanthine plus efficacement que la canthaxanthine et que l'astaxanthine est plus stable pendant et après la transformation du produit (Baker *et al.*, 2002). Cette dernière étude a également montré que les caroténoïdes sont retenus dans le muscle après absorption des pigments par le tractus digestif et transport par le flux sanguin du poisson. La pigmentation de la chair est influencée par de très nombreux facteurs schématiquement représentés dans la **Figure 11**.

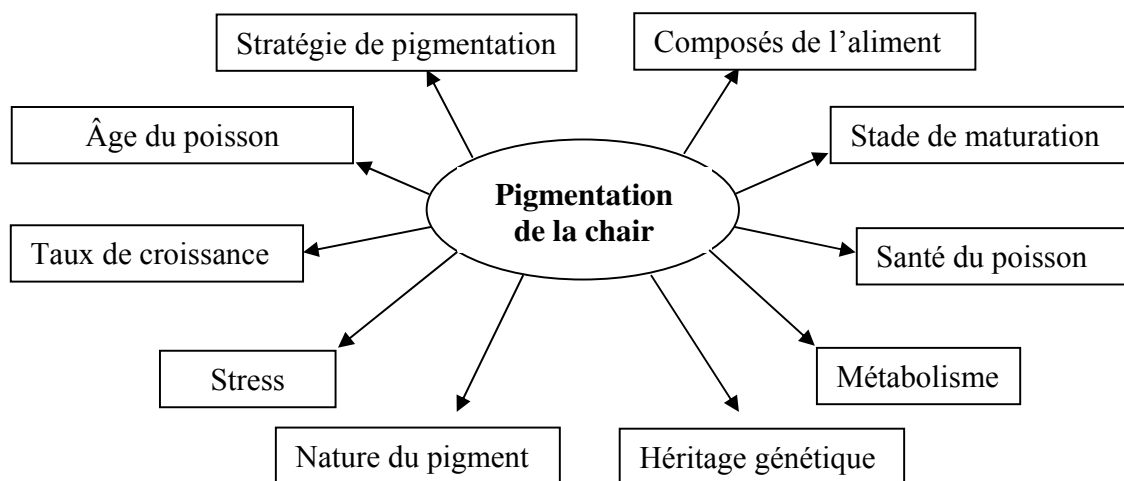


Figure 11. Représentation schématique des facteurs influant sur la pigmentation de la chair du poisson (Knockaert, 2006).

3.5.4 Protéines des œufs de poisson

Comme on l'a vu dans le chapitre introductif, l'aquaculture mondiale est en très forte expansion et représente une gigantesque source de protéines pour le futur (Bœuf, 2002). Dans l'œuf de poisson, elles sont le constituant dominant. La majeure partie des protéines du vitellus

est transformée en tissus embryonnaires et le reste est consommé pour fournir l'énergie. Le pourcentage des protéines des œufs de poisson peut varier entre 35 et 89% de la matière sèche, mais les valeurs les plus représentatives vont de 55 à 75%, avec une teneur moyenne de 66,3% de la matière sèche (Kamler, 1992).

Dans les œufs des salmonidés, les protéines varient entre 52% (*Coregonus albula*) et 81% (*Oncorhynchus gorbusha*) de la matière sèche. La truite *Oncorhynchus mykiss* en contient 68,6 à 71,3% et le saumon *Salmo salar*, 71,6%.

Les acides aminés majeurs de l'œuf de poisson sont la leucine, l'alanine, la lysine et l'acide glutamique (Suyama, 1958 ; Kamler, 1992). Les acides aminés libres dans les œufs de poisson d'eau douce ne constituent que 1% de la matière sèche.

3.5.5 Composition et rôle de la membrane

Tous les changements du développement de l'œuf de poisson dans le milieu extérieur se produisent à travers les membranes. La structure et l'épaisseur de ces constituants de l'œuf varient d'un groupe (ou espèce) à un autre, mais elles ont toutes le même aspect général. Plusieurs noms ont été attribués aux membranes: membrane vitelline ou enveloppe, pellicule extracellulaire, coquille, *zona radiata* ou *zona pellucida* (Papadopoulou *et al.*, 1996 ; Litscher et Wassarman, 2007 ; Sardet *et al.*, 2002 ; Barisone *et al.*, 2003), mais le plus courant est le terme de chorion qui désigne la membrane primaire définitive produite par l'oocyte (Dumont et Brummett, 1980 ; Yamagami *et al.*, 1992). Le chorion est composé en général de trois couches protéiques de grande densité formant une architecture hélicoïdale qui sert, avec ses liaisons isopeptidiques et ses ponts disulfures à la défense de l'œuf contre les agressions extérieures et au développement de l'embryon (Shabanipour et Heidari, 2004 ; Papadopoulou *et al.*, 1996).

La structure et l'épaisseur du chorion dépendent des conditions écologiques du frai et du développement de l'œuf (Stehr et Hawkes, 1979). En général, le chorion des œufs des téléostéens marins pélagiques est très mince rapporté au diamètre, alors que les œufs de poissons demersaux ont un chorion plus épais. Ainsi, l'épaisseur du chorion de l'œuf de *Platichthys stellatus* est de 2 à 5 µm pour un œuf de 0,9 mm de diamètre, alors qu'il est de 55 à 77 µm pour un œuf du saumon rose de 7 mm de diamètre (Depêche et Billard, 2004). La taille moyenne d'un œuf de la truite

arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est de 4,0 à 4,50 mm de diamètre pour une épaisseur de chorion de 20- à 25 μm (Papadopoulou *et al.*, 1996).

Les couches externes du chorion varient énormément entre les espèces ; il est possible qu'elles soient complètement absentes, comme chez les poecilidés, ou bien elles sont extrêmement épaisses et adhésives, c'est le cas des oeufs de *Cynolaebias* et *Cynopoecilus* (Depêche et Billard, 2004).

Le chorion possède un micropyle (chez les œufs des téléostéens) ou plusieurs (comme chez l'esturgeon) (Iwamatsu et Ohta, 1978 ; Cherr et Clark, 1982), par lequel un seul spermatozoïde passe pour assurer la fécondation. Celle-ci a d'ailleurs lieu à travers un site spécifique qui garantit la réception du sperme (Beck *et al.*, 1992).

Le chorion est partiellement protéique. Sa composition en acides aminés montre une grande richesse en acides aminés basiques (arginine, lysine, histidine) qui relie la protéine à la pseudokératine (ichthyokératine). On trouve 30 acides aminés dans le chorion du médaka (*Oryzias latipes*), un petit poisson japonais et 19 dans le saumon keta (Kobayashi, 1982), où l'acide glutamique et la proline prédominent.

Le précurseur des polypeptides de l'enveloppe vitelline possède une région externe hydrophobe dans la partie C-terminale. (Litscher et Wassarman, 2007).

La réaction corticale entraîne des changements chimiques et structuraux du chorion. Il devient dur et moins épais, résistant et rigide. Ce durcissement le rend ainsi plus résistant aux attaques d'enzymes protéolytiques (Depêche et Billard, 2004).

Le chorion joue un rôle essentiel dans la protection de l'œuf, notamment après le durcissement. En raison de sa résistance aux protéases, le chorion joue aussi un rôle de protection mécanique contre les bactéries et les autres agents protéolytiques. Il est particulièrement riche en acide glutamique chargé négativement, ce qui lui permet de chélater sélectivement les cations (Kobayashi, 1982). Par exemple, les œufs de la truite arc-en-ciel ont une forte capacité de liaison avec Hg^{2+} , Ca^{2+} , Ag^+ (Rombough, 1985). Ainsi, le chorion interdit l'entrée de ces métaux dans le liquide vitellin, mais d'un autre côté, il permet à d'autres métaux de pénétrer et de s'accumuler (Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}). Ces propriétés jouent un rôle dans la résistance à de nombreux polluants (Depêche et Billard, 2004).

Le chorion est aussi considéré comme un régulateur de pression osmotique entre le liquide périvitellin et le milieu aqueux externe. Curieusement, la régulation de la pression

osmotique permet une relative régulation de la température interne de l'œuf. En outre, la structure poreuse du chorion de l'œuf de poisson lui ajoute une fonction respiratoire, elle contrôle aussi les échanges gazeux et le transfert d'eau pour limiter, par exemple, la perte d'eau lors des périodes de sécheresse (Depêche et Billard, 2004).

3.5.6 Œufs de poisson : sources d'AGPI

3.5.6.1 Les acides gras *n-3* et *n-6*

On sait depuis quelques années que les acides gras de la famille des *n-3* remportent un vif succès marketing et commercial et il est vrai que leurs propriétés sont nombreuses.

Seuls les végétaux synthétisent les acides linoléique (C18:2 *n-6*) et linolénique (C18:3 *n-3*) qui doivent donc être apportés lors de l'alimentation. En revanche, les animaux sont capables de convertir les acides linoléique, linolénique, oléique (C18:1 *n-9*) et palmitoléique (C16:1 *n-7*) en 4 familles d'acides gras polyinsaturés. Un acide gras essentiel est un acide gras que l'organisme ne peut synthétiser par lui-même, ou en quantité insuffisante. Il doit donc alors être apporté par l'alimentation. Les acides gras des familles *n-3* et *n-6* (**Figure 12**) comportent plusieurs acides gras essentiels chez l'homme: ils sont très importants pour l'organisme car ce sont des constituants des membranes cellulaires. Un acide gras indispensable est un acide gras que l'organisme ne peut pas synthétiser. Il doit donc obligatoirement être apporté par l'alimentation. Chez l'homme, deux acides gras indispensables se distinguent par l'importance de leur rôle : l'acide linoléique (18:2 *n-6*), que l'on peut trouver dans certaines huiles (par exemple l'huile de colza et l'huile de soja) ; et l'acide α -linolénique (18:3 *n-3*), que l'on peut trouver dans les graines et l'huile de lin, les noix...

Les recherches sur les AGPI se sont accrues depuis la découverte de leurs actions préventives et thérapeutiques sur de nombreuses pathologies il y a une vingtaine d'années.

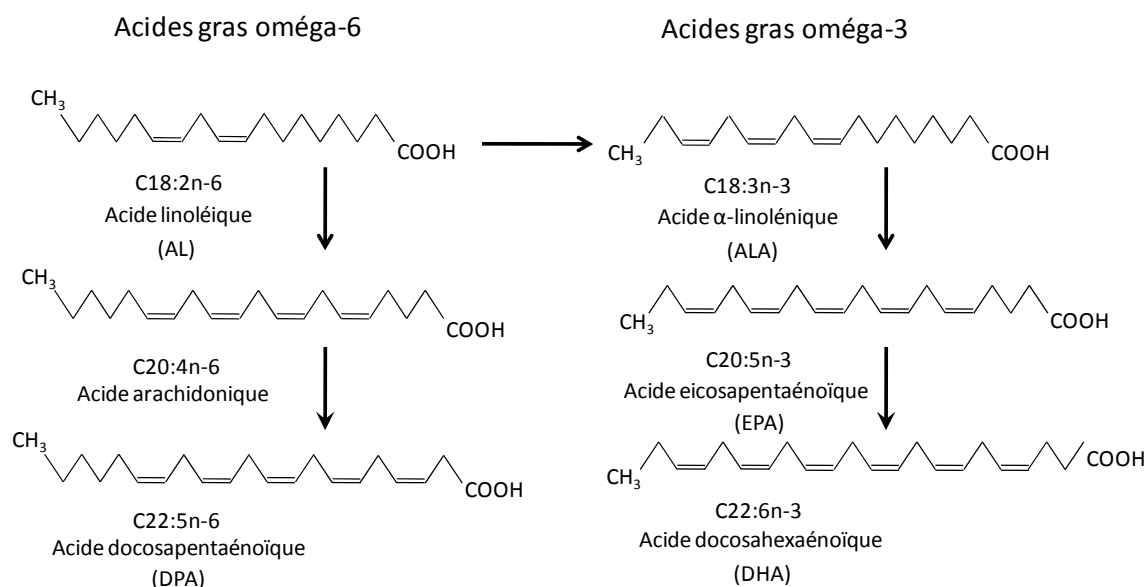


Figure 12. Acides gras de la famille *n*-3 et *n*-6.

Ainsi, les acides gras *n*-3 ont un effet bénéfique au niveau circulatoire dans la prévention et le traitement de l'athérosclérose, de la thrombose, de l'hypertriglycémie (Barnerjee *et al.*, 1992) et comme régulateur de la pression sanguine (Mortensen *et al.*, 1988). Un des rôles les plus étudiés des acides gras *n*-3 est sans doute leur action contre les maladies cardiaques (Jacobson, 2006 ; Kris-Etherton *et al.*, 2006 ; Reiffel et McDonald, 2006 ; Brouwer *et al.*, 2006). Ces molécules peuvent aussi intervenir dans le traitement des inflammations dues à l'asthme, l'arthrite, les migraines, le diabète, les fonctions immunes et le psoriasis (Kinsella, 1988 ; Bajpai et Bajpai, 1993 ; Puglia *et al.*, 2005), ou encore dans l'inhibition de la genèse des carcinomes (Larsson *et al.*, 2004). Récemment, de nouvelles propriétés de ces acides gras ont été découvertes. C'est ainsi que ces acides gras semblent jouer un rôle contre la schizophrénie (Mahadik *et al.*, 2001), le stress et la dépression (Bourre, 2005) et les maladies neurodégénératives, tout comme dans le bon développement fœtal (Weisinger *et al.*, 2001). Les acides gras *n*-3 et *n*-6 offrent un important potentiel commercial et les produits de consommation courante à base de ces composés sont de plus en plus diversifiés (oeufs, produits laitiers, huiles et margarines, plats cuisinés, cosmétiques, ...).

Les acides gras et par extension les lipides en général, sont présents dans toute la chaîne alimentaire marine. Dans tous ces organismes (bactéries, algues, éponges, coquillages, crustacés,

poissons), les acides gras des familles $n-3$ et $n-6$ sont largement représentés. Les poissons possèdent par voie de conséquence des proportions élevées en acides gras polyinsaturés à longue chaîne, en raison de leur position terminale dans la chaîne trophique. En outre, les poissons possèdent l'équipement enzymatique (désaturases, élongases) nécessaire à la synthèse et à la transformation de certains acides gras. En sus des voies métaboliques, les conditions de vie des organismes marins influent sur leur teneur en acides gras. On rencontrera ainsi plus d'acides gras insaturés en eau froide du fait de leur température de cristallisation très basse, qui conduit à une meilleure fluidité des membranes cellulaires. En général, les poissons contiennent entre 25 et 40% d'acides gras polyinsaturés dont l'EPA (14 à 19% des acides gras totaux) et le DHA (5 à 8%) (Bergé et Barnathan, 2005).

Les principales sources industrielles d'acides gras $n-3$ et $n-6$ sont les huiles de poisson. Chez les poissons gras (sardine, maquereau, saumon, truite...) ou semi-gras (bar, flétan...), les lipides sont présents dans toutes les fractions avec une concentration plus importante dans les tissus sous-cutanés, péri-viscéraux ou dans le muscle blanc. Chez les poissons maigres (morue, églefin, lieu, raie), les lipides sont concentrés dans le foie. Pour ces espèces, le foie sera donc la principale source d'acides gras $n-3$ et $n-6$. En effet, cet organe contient en moyenne plus de 60% de lipides par rapport à son poids humide, alors que les viscères, les chutes de filetage ou les œufs en contiennent moins de 5%, ces valeurs connaissant des fluctuations en fonction de la saison, de l'espèce, de la zone de vie, etc... (Dumay, 2003).

Ainsi, de nombreuses activités biologiques ont été recensées dans les huiles de poisson. Certaines études ont mis en évidence les propriétés anti-inflammatoires de l'huile de sardine (Puglia *et al.*, 2005) et de poisson en général (Kim *et al.*, 2006 ; Maroon et Bost, 2006). Les huiles de poisson auraient également une action contre le développement de l'athérosclérose (Zampolli *et al.*, 2006), contre les ulcères et autres affections gastriques (Bhattacharya *et al.*, 2006). Elles participent à la régénération du foie après une ablation (Kirimlioglu *et al.*, 2006), elles semblent avoir une action contre la prolifération de cellules cancéreuses (Pizato *et al.*, 2006) et paraissent améliorer la mémoire (Chen *et al.*, 2006). Chez le rat, l'huile d'anchois permet de voir baisser le taux de cholestérol, de triacylglycérols et de graisse abdominale, par rapport à une alimentation comprenant de l'huile de soja (Toyoshima *et al.*, 2004). La supplémentation en huile de poisson chez la chèvre gestante et allaitante permet une augmentation de la proportion d'acides gras à longue chaîne de la famille $n-3$ dans le colostrum et dans le lait (Cattaneo *et al.*,

2006). D'autres études montrent l'intérêt d'introduire dans les régimes de salmonidés des acides gras *n*-3 et *n*-6 (Geurden *et al.*, 2006 ; Tocher *et al.*, 2006).

3.5.6.2 Les lipides neutres

Les acylglycérols neutres sont les esters du glycérol et d'acides gras, ne comportant pas de fonction ionisable. Ce sont les mono- di et triacylglycérols où les acides gras peuvent tous être différents. Les acylglycérols neutres peuvent être solides (graisses) ou liquides (huiles) à la température ambiante. Leur état dépend de leur composition en acides gras : les graisses contiennent plutôt des acides gras saturés ; les huiles contiennent plutôt des acides gras insaturés.

Ils sont totalement insolubles dans l'eau et les liquides biologiques et s'hydrolysent dans les solutions alcalines (saponification). On les rencontre dans des vacuoles de réserve ou globules à l'intérieur du cytoplasme de nombreuses cellules (adipocytes, hépatocytes, graines végétales). Leur fonction principale est de constituer des réserves énergétiques.

Les diacylglycérols sont peu abondants dans les membranes mais leurs fonctions sont importantes : ce sont des intermédiaires métaboliques des voies de Kennedy, pour la synthèse des triacylglycérols et des principaux phospholipides.

Les cérides (cires) sont des lipides constitués d'acides gras estérifiant des alcools gras à longue chaîne, le plus souvent saturés.

3.5.6.3 Les lipides polaires

Les phospholipides sont des acylglycérols dont la molécule de glycérol est estérifiée par deux acides gras et la dernière fonction alcool primaire par un acide phosphorique. Cette structure commune à tous les phospholipides porte le nom d'acide phosphatidique.

L'acide phosphorique des phospholipides est également estérifié dans la plupart des phospholipides par une autre molécule:

- o La choline (phosphatidylcholine),
- o L'éthanolamine (phosphatidyléthanolamine),
- o La sérine (phosphatidylsérine),
- o L'inositol (phosphatidylinositol),
- o Le glycérol (phosphatidylglycérol), etc...

Ces lipides polaires peuvent être des substances de réserve (jaune d'oeuf), mais ce sont avant tout des constituants majeurs des membranes biologiques. Les quantités les plus importantes de phospholipides dans les co-produits marins se retrouvent dans la tête (Andrieux, 2004), mais également, en saison favorable, dans les oeufs de poisson.

Parfois cités sous l'appellation générale de lécithines, les phospholipides présentent de nombreuses fonctionnalités. Les phospholipides sont très utilisés dans les domaines de l'alimentation, de la nutraceutique, ainsi que dans le monde médical et cosmétique (Peng *et al.*, 2002).

Le rôle essentiel des phospholipides est lié à leur pouvoir émulsifiant. Ainsi, les phospholipides entrent dans la composition des margarines, chocolats, pâtisseries, produits instantanés, produits laitiers, produits cosmétiques et pharmaceutiques. Dans ce type d'applications, les valeurs nutritionnelles des phospholipides sont négligeables du fait de leur faible proportion dans la formulation des aliments (de 0,3 à 1%). La formation de liposomes grâce aux phospholipides dans les dispersions aqueuses permet de plus la solubilisation de composés lipophiles. Ces composés pourront ainsi entrer dans la composition de certains produits industriels. La disponibilité de certaines substances peut, de cette manière, être accrue (jusqu'à un facteur 13) (Schneider, 2001).

Les phospholipides jouent aussi un rôle en aquaculture. Des études menées conjointement entre l'IFREMER et l'INRA ont montré que les phospholipides sont des constituants essentiels des aliments pour larves de poissons. En effet, ce sont de très bons vecteurs qui apportent les acides gras essentiels au développement des larves. De plus, une alimentation des larves enrichie en phospholipides induit une mortalité plus basse et une prise de poids plus importante. Des études ont également révélé la diminution de malformations spinales et des déformations de la mâchoire des poissons grâce à une alimentation riche en phospholipides (Cahu et Zambonino Infante, 2001 ; Cahu *et al.*, 2003).

Les activités biologiques des phospholipides ont également été recherchées. Parmi toutes les classes de lipides, ceux sont les plus actifs. Certains phospholipides issus de bactéries possèdent une activité anti-bactérienne (Tamehiro *et al.*, 2002). Ils possèdent également des actions cytotoxiques et anti-prolifératives, leur donnant un rôle potentiel dans la lutte contre le cancer. En effet, les phospholipides jouent des rôles divers dans le métabolisme cellulaire, notamment du fait de leur participation à la composition de la membrane cellulaire. Le récepteur

de la phosphatidylcholine, par exemple, est un signal de reconnaissance de l'apoptose. Or, l'apoptose donne lieu à une redistribution des lipides membranaires (Arnoult *et al.*, 2001). Des analogues de l'acide phosphatidique sont des régulateurs des facteurs de croissance. Ainsi, le LPA (acide lysophosphatidique) et le plasmalogène glycérophosphate induisent la prolifération cellulaire, alors que le LPA cyclique inhibe cette prolifération (Fisher *et al.*, 1998).

3.5.6.4 L'insaponifiable

Les stérides sont des lipides constitués d'acides gras estérifiant des stérols. Les stérols sont des dérivés du cholestérol caractérisés par la présence d'une ou plusieurs fonctions alcool. Dans le plasma les lipoprotéines transportent des esters de cholestérol résultant de l'action de la lécithine cholestérol acyl-transférase.

Le cholestérol est le plus ancien des stéroïdes connus. Il comporte 8 carbones asymétriques, un seul isomère, sur les 256 possibles. Il est présent dans tous les tissus nerveux des mammifères soit sous forme libre soit sous forme d'ester d'acide gras. C'est un précurseur de l'acide cholique (acide biliaire) et des hormones stéroïdiennes.

3.6 L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE PAR LES PROTEASES

3.6.1 Classification

Les 4 nombres de la nomenclature EC (Enzyme Classification, International Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB) des enzymes désignent chacun une caractéristique de l'enzyme qui permet son identification. Le premier nombre de la nomenclature EC indique le type de la réaction catalysée, le second indique le substrat général impliqué lors de la réaction, le troisième indique le substrat spécifique impliqué, le quatrième indique le numéro de série de l'enzyme. Les enzymes sont également classées comme suit: les oxydoréductases (EC 1), les transférases (EC 2), les hydrolases (EC 3), les lyases (EC 4), les isomérases (EC 5), les ligases (EC 6).

Toutes les enzymes utilisées dans ce travail sont des hydrolases (EC 3) et elles appartiennent plus spécifiquement au groupe des protéases (EC 3.4) en s'attaquant aux liaisons peptidiques.

3.6.2 Paramètres influençant l'hydrolyse enzymatique

Différents facteurs peuvent affecter l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique des protéines : la température, spécifique pour chaque enzyme, le pH dont l'influence sur la cinétique est très grande, car l'hydrolyse des liaisons peptidiques va générer des protons H^+ ce qui va induire une acidification du milieu (ce principe est valable pour les hydrolyses se déroulant à pH supérieur à 6,5, pour que le degré de dissociation des ions $R-N^+H_3$ soit suffisant (Ravallec-Plé, 2000 ; Gbogouri *et al.*, 2004, 2006)), la concentration du substrat et de l'enzyme, la force ionique, la quantité d'eau ajoutée et enfin la présence ou l'absence de substances inhibitrices ou activatrices. Dans le cas qui nous préoccupe, il est peu probable de rencontrer des inhibiteurs compétitifs, mais nous verrons que certaines protéases utilisées dans ce travail semblent curieusement ralenties pour des raisons difficilement explicables. Cette inhibition pourrait être de nature non-compétitive. Les co-produits marins, comme toute matrice vivante, possèdent un certain nombre de ces substances inhibitrices (Gildberg, 1993).

3.7 L'OXYDATION DES LIPIDES

La stabilité des lipides vis à vis de l'oxydation dépend de leur localisation dans les différents tissus (Eymard, 2003). Lorsque le tissu est vivant, il existe des mécanismes naturels de contrôle qui permettent de prévenir la destruction oxydative des lipides membranaires, des protéines et des acides nucléiques. Le dérèglement intervient lors de la destruction du tissu (Hultin, 1994), notamment lors de la dégradation des membranes (Huang *et al.*, 1993). En ce qui concerne plus précisément les lipides, les facteurs qui influencent l'oxydation sont nombreux : composition en acides gras, nombre et position des insaturations, présence de pro-oxydants (ions métalliques, enzymes) ou d'antioxydants naturels (tocophérols, caroténoïdes...), température, lumière en particulier.

L'oxydation des lipides peut résulter de causes multiples. Ainsi, l'auto-oxydation est catalysée par la température, les ions métalliques, les radicaux libres ; la photo-oxydation est initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs ; l'oxydation enzymatique est initiée par la lipoxygénase.

Il s'agit dans tous les cas d'une réaction auto-catalytique, par enchaînement de réactions radicalaires se déroulant en trois étapes. Une première réaction produit un radical libre par élimination d'un hydrogène de l'acide gras en présence de lumière ou d'oxygène (initiation). Elle se poursuit par une étape de propagation (réaction en chaîne) et s'arrête par une phase de terminaison quand les substrats radicalaires sont épuisés selon le schéma général (**Figure 13**) ci-dessous. La **Figure 14** exprime également de façon synthétique les diverses phases de l'oxydation des lipides.

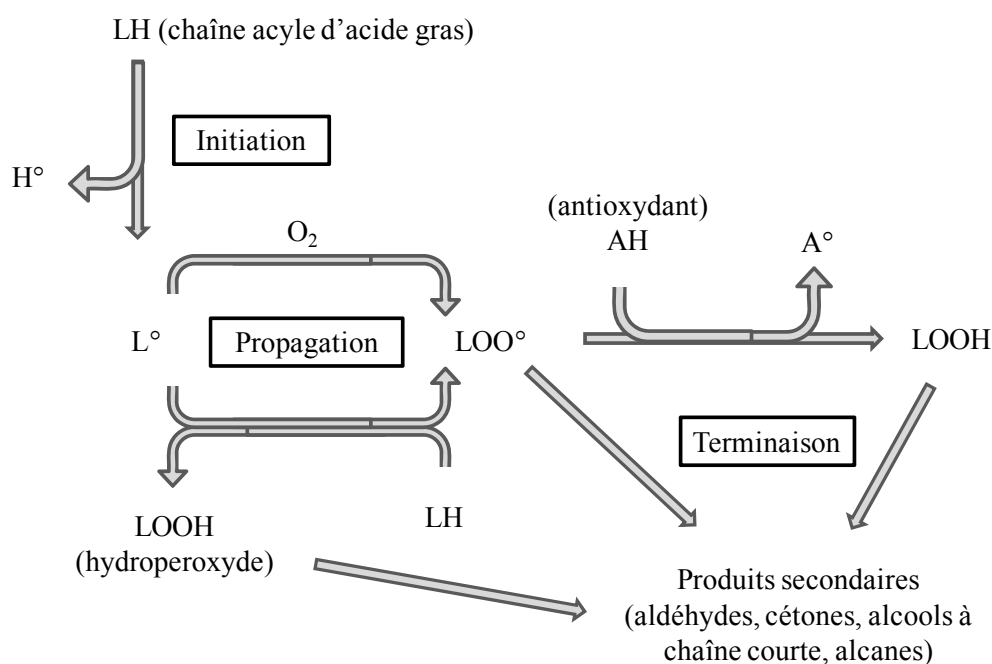


Figure 13. Autooxydation des lipides polyinsaturés.

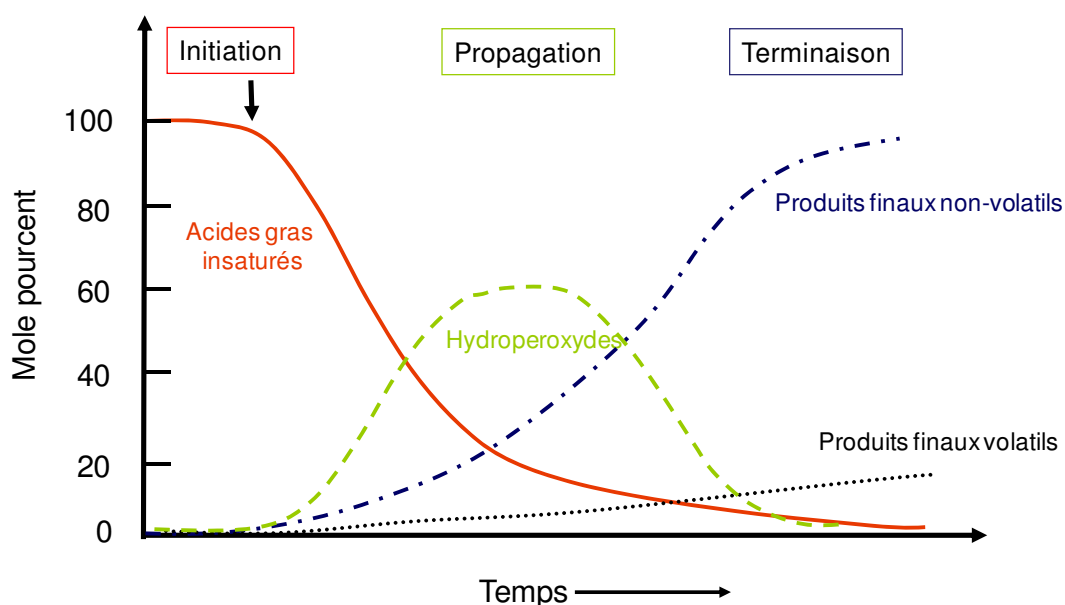


Figure 14. Evolution schématique des divers composants au cours de l'oxydation des lipides.

Pendant les phases d'initiation et de propagation, des hydroperoxydes apparaissent. Ces molécules sont des intermédiaires importants et sont systématiquement dosés lors des analyses d'oxydation. Cependant, ce sont des composés instables qui se dissocient par scission homolytique de la liaison O-O pour former un radical alcoyl et un radical hydroxyl qui interviennent dans une série de réactions complexes aboutissant notamment à la formation de composés secondaires, tels que des aldéhydes et des hydrocarbures. L'analyse des peroxydes n'est donc pas un critère suffisant pour déterminer l'état oxydatif du milieu. D'autres indicateurs doivent être utilisés. C'est le cas de l'indice de diènes, de polyènes et d'autres méthodes indirectes, comme la détermination du taux de caroténoïdes (astaxanthine, par exemple) et de l'évolution de la couleur. Une technique prometteuse, quoique coûteuse, est l'analyse par spectrométrie infra-rouge à transformée de Fourier. Une investigation fine des certaines bandes met en évidence des caractéristiques extrêmement précise de l'état d'oxydation des molécules.

Le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés peut également être d'origine enzymatique. La lipoxygénase et la cyclooxygénase sont les deux enzymes principalement impliquées (Hultin, 1994). Les substrats privilégiés de la lipoxygénase de poisson sont les AGPI (Josephson et Lindsay, 1986).

L'oxydation enzymatique se produit aux températures les plus basses, même dans l'état congelé où elle est alors très faible. Il semblerait que, une fois la décongélation amorcée et à des températures de 0°C à 4°C, cette activité reprenne et s'accroît (Frankel, 1998). Les lipoxygénases du poisson sont inactivées à des températures supérieures à 60°C, mais c'est alors l'oxydation non enzymatique qui est favorisée.

3.7.1 Détermination des diènes conjugués

Des radicaux libres sont formés au cours des phases d'initiation et de propagation de la réaction d'oxydation des lipides. Les diènes conjugués, se forment par réarrangement des doubles liaisons du radical lipoylé des acides gras polyinsaturés.

Les produits primaires de l'oxydation des lipides contenant des doubles liaisons conjuguées peuvent être quantifiés par spectrométrie UV (Klein, 1970 ; Corongiu et Banni, 1994). En effet, l'oxydation des acides gras polyinsaturés s'accompagne d'un déplacement des doubles liaisons. Les diènes conjugués absorbent à 232-233 nm et les triènes conjugués à 268 nm. Cette méthode spectrophotométrique est rapide, mais non spécifique (Gray, 1978).

Elle convient bien pour suivre les premiers stades de l'oxydation des lipides dans des systèmes simples, car de nombreuses interférences apparaissent entre les lipides natifs et les diènes conjugués peuvent être observées et viennent perturber les mesures (Berset et Cuvelier, 1996).

3.7.2 Détermination des hydroperoxydes

Les hydroperoxydes se dégradent rapidement pour donner des composés hydroxylés et carbonylés. Les concentrations en hydroperoxydes mesurées correspondent en fait à la différence entre formation et décomposition des peroxydes. De nombreuses méthodes permettent de déterminer la concentration de ces substances. Certaines permettent de déterminer la concentration en hydroperoxydes et d'autres permettent d'identifier et de quantifier la nature et les teneurs en hydroperoxydes spécifiques (Dobarganes *et al.*, 2002).

Les méthodes les plus courantes sont des méthodes iodométriques et colorimétriques. La méthode iodométrique consiste à mesurer l'iode produit par l'oxydation de l'iodure de potassium

par les peroxydes présents. L'iode formé est dosé par une solution titrée de thiosulfate de sodium (Lea, 1946 ; AOCS, 1989).

Les méthodes colorimétriques se fondent sur le principe de l'oxydation du fer ferreux (Fe^{2+}) en fer ferrique (Fe^{3+}) par les hydroperoxydes présents. La méthode au thiocyanate de fer (Chapman et Mackay, 1949 ; Kolthoff et Medalia, 1951 ; Shanta *et al.*, 1994) est basée sur ce principe. Elle est suivie d'une mesure spectrophotométrique du complexe formé entre les ions ferriques et le thiocyanate. La méthode au xylénol orange (Jiang *et al.*, 1992 ; Wolff, 1994) repose également sur le même principe. Le complexe coloré formé entre les ions ferriques et le xylénol orange possède un maximum d'absorption à 560-580 nm. Certaines de ces méthodes ont été mises au point sur des huiles purifiées (Burat *et al.*, 1996 ; Nourooz-Zadeh *et al.*, 1995).

MATERIELS ET METHODES

4 . MATERIELS ET METHODES

4.1 MATIERE PREMIERE

Les œufs de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) utilisés dans cette étude sont des produits du marché fournis par la société Gabriel (Contrisson, Lorraine, France). Ces œufs sont salés et mis en verrines hermétiques de 500 g. Les œufs de saumon pacifique (*Oncorhynchus keta*) ont été fournis par la société Comptoir du Caviar (Mulcent, France) dans des bocaux hermétiques de 500g. Ces œufs ont été conservés au long de cette étude dans une chambre de congélation à -20°C à l'abri de la lumière et sous azote afin d'éviter toute altération ou oxydation (Figure 15).



Figure 15. **A.** Œufs de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), **B.** Œufs de saumon pacifique (*Oncorhynchus keta*).

L'huile de têtes de saumon d'Atlantique d'aquaculture (*Salmo salar*) est extraite par voie enzymatique et utilisée dans l'étude de la stabilité oxydative pour comparaison. L'huile est conservée à -20°C sous azote pendant toute la période d'analyse.

4.2 ENZYMES

Les enzymes utilisées dans cette étude sont des protéases alimentaires conformes à la législation (Journal Officiel de la République Française, arrêté du 14 novembre 2001). Toutes ces enzymes ont été fournies par les laboratoires Novozyme (Bagsvaerd, Danemark). Ces protéases

sont conservées tout au long de la période d'analyse dans les conditions recommandées par le fournisseur. L'activité de ces enzymes a été optimisée lors d'un travail précédent au Laboratoire de Science et Génie Alimentaires (LSGA) (Gbogouri, 2005), c'est la raison pour laquelle elles ont été utilisées dans cette étude.

Les conditions optimales de l'hydrolyse pour chaque enzyme ont été appliquées et les activités protéolytiques ont été mesurées selon les recommandations des laboratoires Novozyme. Toutes les enzymes sont conservées à +4°C.

4.2.1 Alcalase[®] 2,4L

C'est une enzyme à sérine produite à partir d'une souche sélectionnée de *Bacillus licheniformis*. Cette endopeptidase appartient à la famille des subtilisines (EC.3.4.21.14a), elle hydrolyse aussi des liaisons esters et peut catalyser des réactions de transestérification et de transpeptidation. Son activité standard est de 2,4 unités Anson/g (AU/g). Elle présente une activité maximale aux pH compris entre 6,5 et 8,5 et à des températures de 50 à 65°C.

4.2.2 Protamex[®]

C'est une endopeptidase industrielle issue à partir d'une souche sélectionnée de *Bacillus subtilis* (EC.3.4.21.62). Elle est utilisée sous forme d'une poudre de microgranules. Son activité déclarée est de 1,5 AU/g. La Protamex[®] présente une activité maximale lors des réactions aux pH compris entre 5,5-7,5 et aux températures comprises entre 35 et 60°C.

4.2.3 Neutrase[®] 0,8L

La Neutrase[®] est une métalloprotéase à Zn produite par une souche sélectionnée de *Bacillus subtilis* (EC.3.4.24.4f). Cette endopeptidase hydrolyse les liaisons peptidiques dont le groupement aminé est porté par un acide aminé hydrophobe comme la leucine et l'isoleucine. Elle hydrolyse aussi les liaisons peptidiques dont le groupement carboxylique est porté par la

proline. Son activité déclarée est de 0,8 AU/g. Son activité est maximale aux pH compris entre 5,5 et 7,5 et à des températures de 40 à 55°C.

4.3 ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES

4.3.1 *Matière sèche (Norme AOAC 950.01, 1990)*

Les œufs de truite (2-3 grammes) ont été séchés à l'étuve à 103°C pendant 3 heures, puis laissés à reposer dans un dessiccateur jusqu'à masse constante. Les résultats sont calculés pour trois répétitions et sont exprimés en g/100g d'œufs.

4.3.2 *Matière grasse*

Les lipides des œufs de truite ont été extraits par deux méthodes : Bligh & Dyer (1959) et Folch *et al.* (1957). Ces méthodes sont basées sur l'utilisation de solvants organiques pour extraire la totalité des lipides polaires et apolaires.

4.3.2.1 *La méthode de Bligh & Dyer (1959)*

Depuis 1959, cette méthode est largement utilisée pour extraire les lipides des tissus animaux. Les œufs de truite (environ 100g) sont mélangés avec 100 mL chloroforme et 200 mL méthanol dans un mixer (Easy MiXX 260 W Bosch, France) pendant 2 minutes. 100 mL de chloroforme et 100 mL d'eau distillée sont ajoutés ensuite et mélangés pendant 30 secondes. Le mélange est filtré sous aspiration et sous azote sur un verre fritté n°3. L'extraction totale est assurée par l'ajout de chloroforme sur le retentat en respectant un ratio final des solvants 2 :2 :1,8 (v : v : v) de chloroforme : méthanol : eau. La quantité finale d'eau dans le mélange est la somme de l'eau dans l'échantillon et l'eau ajoutée.

Le mélange est mis à décanter dans une ampoule jusqu'à séparation en deux phases. La phase organique inférieure est recueillie dans un ballon taré après ajout de sulfate de sodium anhydre pour éliminer toute trace d'humidité. Le solvant est évaporé ensuite dans un évaporateur rotatif

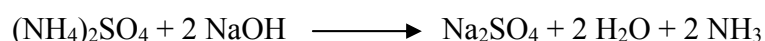
(Laborota 4000, Heidolph Instruments, Nuremberg, Allemagne) sous azote à 50°C. Le résidu lipidique est pesé et le résultat est exprimé en pourcentage (%) de la matière humide (moyenne de trois essais).

4.3.2.2 La méthode de Folch et al. (1957)

Cette méthode est appliquée aux œufs de truite lyophilisés pour extraire les lipides totaux. Environ 50g d'œufs de truite lyophilisés sont mélangés avec 200 mL chloroforme et 100 mL méthanol dans un mixer pendant 2 minutes. Le mélange est filtré ensuite sous aspiration et sous azote sur un verre fritté n°3. On ajoute environ 200 mL de mélange de solvant chloroforme : méthanol (2 :1, v : v) sur le résidu pour assurer l'extraction de la totalité des lipides. Le filtrat est transféré dans une ampoule à décanter avec un ajout de 0,2 volume de solution de NaCl à 0,7%. Après séparation de deux phases, la phase inférieure est récupérée dans un ballon taré, puis le solvant est évaporé dans l'évaporateur rotatif sous azote à 50°C pour obtenir la masse de lipides (moyenne de trois répétitions). Le résultat est exprimé en pourcentage (%) de la matière lyophilisée.

4.3.3 Matière azotée

La détermination de la matière azotée est effectuée selon la méthode de Kjeldahl (Norme AOAC 960.52, 1997). La méthode est basée sur la transformation de l'azote organique en azote minéral sous forme ammoniacale $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par l'action oxydative de l'acide sulfurique bouillant sur la matière organique en présence d'un catalyseur (Na_2SO_4 17g/100g ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,5g/100g). Les échantillons (environ 0,100 g) sont introduits dans des matras (tubes de minéralisation) puis sont minéralisés sur une rampe (Kjeldatherm, Gerhardt, Les Essarts le Roi, France) à 420°C pendant 3 heures. Le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est le produit essentiel de la minéralisation, obtenu par l'ajout d'acide sulfurique (H_2SO_4). On ajoute ensuite une base forte (NaOH) en volume égal au volume d' H_2SO_4 ajouté à l'aide d'un système de type microanalyse (Vapodest 50, Gerhardt, Les Essarts le Roi, France) selon la réaction suivante :



L'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) formé au cours de la distillation est entraîné par la vapeur d'eau et récupéré dans une solution d'acide borique. La formation du borate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_3\text{BO}_3$) fait augmenter le pH de la solution. La solution est ensuite titrée par l'acide sulfurique. Le volume d'acide sulfurique ajouté correspond à l'ammonium contenu dans l'échantillon du départ.

La teneur en azote total (Nt) est alors calculée pour 100g d'échantillon selon la formule suivante :

$$\text{Nt} = (V_1 - V_0) \times M_{\text{N}_2} \times N(\text{H}_2\text{SO}_4) \times 100 / (1000 \times m_e)$$

avec Nt : azote total pour 100 g d'échantillon.

V_1 : volume de H_2SO_4 en mL nécessaire à la titration de l'échantillon.

V_0 : volume de H_2SO_4 en mL nécessaire à la titration du blanc.

M_{N_2} : masse moléculaire de l'azote soit 14g / mole.

$N(\text{H}_2\text{SO}_4)$: normalité de l'acide sulfurique.

m_e : masse de l'échantillon de départ en g.

La teneur en protéines est ensuite calculée selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en protéines (g/100g)} = \text{Nt} \times 6,25$$

Avec Nt : azote total pour 100 g d'échantillon.

6,25 : facteur protéique (Adler-Nissen, 1986)

4.3.4 Cendres (Norme AOAC 923.03, 1997)

Les œufs de truite (quelques centaines de milligrammes) ont été introduits dans un four à moufle pendant 12 heures à 600°C. Le taux de cendres est calculé comme étant le rapport de la masse finale sur la masse initiale après incinération. Le résultat est exprimé en % (moyenne de trois répétitions).

4.3.5 Minéraux (AACC, 1995)

La spectroscopie d'absorption atomique (Perkin-Elmer Instruments, Modèle 1100, Bois d'Arcy, France) est employée pour la détermination des teneurs en magnésium, potassium, sodium et calcium. Les cendres sont diluées au 1/100 dans une solution de HCl concentré à 36% pour le dosage du potassium et du sodium. Le dosage du magnésium et du calcium est réalisé après dilution des cendres dans une solution à 10% de chlorure de lanthane (LaCl_3). Des gammes étalons sont établies à l'aide de solutions contenant les différents cations à des concentrations différentes.

4.3.6 Teneur en sel

La teneur en chlorure de sodium est déterminée par une méthode potentiométrique au moyen d'un chloruromètre (Subra-S100, Grosseron, St-Herblain, France). Environ 10 g d'œufs de truite ($\pm 5\text{mg}$) sont mélangés avec 90 mL d'eau distillée dans un bécher. La mesure est faite sur 1 mL de cette solution introduit dans le récipient contenant la solution d'étalonnage. L'appareil est calibré et les électrodes en argent sont nettoyées à l'eau distillée avant détermination. Le résultat est la moyenne de trois essais, exprimé en pourcentage de masse de chlorure de sodium.

4.4 ANALYSE DES LIPIDES

4.4.1 Extraction des lipides

Les lipides totaux sont extraits par les méthodes de Folch *et al.* (1957) et Bligh & Dyer (1959) décrites ci-dessus (paragraphe 3).

4.4.2 Fractionnement des lipides

La séparation des classes de lipides (lipides polaires et lipides neutres) a été réalisée sur colonne d'acide silicique. Environ 2,5 grammes de l'échantillon sont dissous dans 250 mL

d'éther de pétrole. On mélange la solution étherée à 25 g d'acide silicique (ICN Biomedicals) préalablement activé à 103°C pendant 24 heures. Le mélange est transféré dans la colonne de verre (700 mm × 25 mm) garnie d'un filtre en verre fritté. Après élution à l'éther de pétrole, les lipides neutres sont désorbés par ajout de 300 mL d'un mélange hexane : éther diéthylique (80 : 20, v : v). Les lipides neutres sont récupérés dans un ballon préalablement taré. Les lipides polaires sont ensuite récupérés dans un autre ballon taré par ajout de 300 mL de chloroforme : méthanol (2 : 1, v : v).

4.4.3 Détermination de la teneur en phospholipides

4.4.3.1 Dosage du phosphore (AOAC, 1999)

La teneur en phosphore a été déterminée après minéralisation d'environ 1g d'œufs de truite pendant 12 heures à 550°C dans des creusets en porcelaine. Les cendres sont solubilisées dans 5mL d'acide sulfurique concentré. Cette solution est ensuite introduite dans une fiole jaugée de 250 mL complétée à l'eau distillée. On fait alors réagir en milieu réducteur du molybdate d'ammonium qui va former du phosphomolybdate d'ammonium de couleur bleue. L'absorbance est mesurée à 660 nm contre une gamme étalon allant de 0 à 6 mg/L (8 points). Les résultats sont exprimés en moyenne de trois essais.

4.4.3.2 Détermination des différentes classes de lipides par Iatroscan[®]

La méthode est basée sur le principe d'une détection par ionisation de flamme (DIF) effectuée à la suite d'une chromatographie sur couche mince. Elle permet de séparer, d'identifier et de quantifier des échantillons de quelques nanogrammes, la limite de résolution de l'appareil étant fixée à 0,5 nanogramme. Le support chromatographique ou *chromarod* est une baguette de quartz de 1 mm de diamètre recouverte d'une pellicule de 75µm d'épaisseur de phase SiO₂ à fine granulométrie (3-5µm), associée à un liant inorganique.

Le Iatroscan[®] (Chromarods-SIII, Iatroscan Laboratory Inc, Tokyo, Japon) permet d'apporter une solution chromatographique sans phase préparatoire à presque tous les types

d'échantillons liés aux substances complexes peu ou pas volatiles ou qui présentent un point d'ébullition élevé.

Après dépôt des échantillons sur les *chromarods*, puis migration dans des bains de solvants organiques variés, la détection s'effectue par brûlage au sein d'une flamme dans laquelle les éluats sont vaporisés puis ionisés. Le brûlage et le traitement des données sont effectués par le logiciel Chromstar™ qui permet l'obtention de pics gaussiens représentatifs de la composition des échantillons (**Figure 16**).

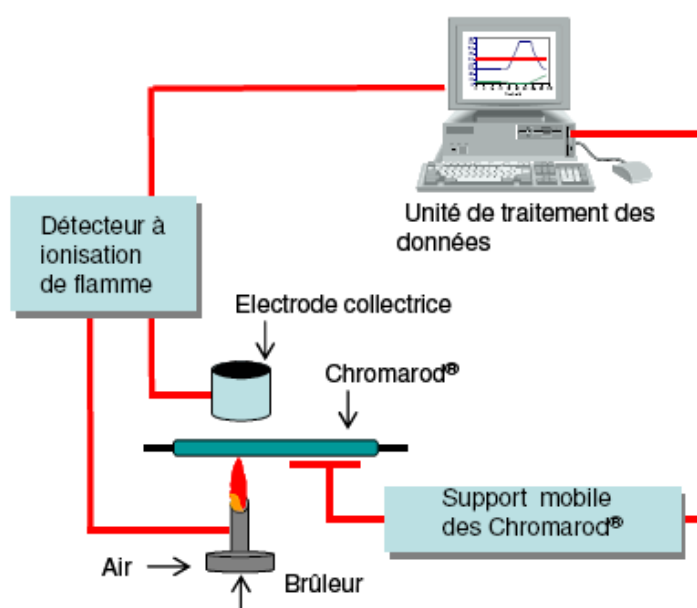


Figure 16. Schéma du principe de fonctionnement de l'analyseur Iatroscan® MK IV.

Des analyses de type “brûlages complet ou partiel” ont été réalisées sur les échantillons. 2 µL de lipides à 5 mg/mL ou 10 mg/mL de solvant sont déposés sur les *chromarods*. Après séchage à 100°C pendant une minute et saturation en humidité (10 minutes dans une enceinte saturée en NaCl), la migration des lipides en fonction de leur affinité pour le mélange éluant a lieu dans des cuves adaptées à ce type de réaction. Le premier mélange de solvants utilisé (hexane : éther diéthylique : acide formique, 70 : 30 : 0,2, temps de migration 25 min), permet la séparation des composés apolaires (triacylglycérols : TAG) et des composés polaires (phospholipides et glycolipides). Alors que les composés apolaires migrent sur les *chromarods*, les composés polaires restent au niveau de la ligne de dépôt. Des *chromarods* subissent un

brûlage complet, afin de définir le ratio lipides polaires/lipides apolaires. Les autres subissent un brûlage partiel : les TAG sont révélés alors que les lipides polaires font l'objet d'une seconde élution.

Le second mélange de solvant utilisé (chloroforme : méthanol : eau : ammoniacque, 65 : 35 : 5 : 0,28, temps de migration 45 min), permet la séparation des composés polaires (phospholipides et glycolipides). Les différents composés polaires présents sont alors séparés par discrimination de leur temps de rétention.

Des gammes d'étalons ont permis l'identification des différentes classes lipidiques. Chaque analyse de standard et d'échantillon a été répétée trois fois (voir paragraphe 4.4.3.3).

4.4.3.3 Analyse par chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince a été mise en œuvre pour détecter les principaux phospholipides présents dans les échantillons de lipides extraits. Des plaques de silice 20 cm × 20 cm × 0,5 mm (Silicagel 60, Merck Darmstadt) ont été utilisées à cet effet.

Les différents phospholipides ont été détectés par des réactifs spécifiques en chromatographie unidimensionnelle après séparation dans un solvant d'élution composé d'un mélange de chloroforme : méthanol : ammoniacque à 25% (130 : 70 : 10, v : v : v) (Fanni, 1977).

Après activation de la plaque à l'étuve à 103 °C pendant 30 min, on dépose 20 µl de chaque échantillon préalablement dissous à raison de 50 mg / mL de chloroforme : méthanol (2 : 1, v : v).

Les standards de phospholipides: L α- phosphatidylcholine (PC) à 99 g / 100 g, L α - phosphatidylsérine (PS) à 98 g / 100 g, 3 sn - phosphatidyléthanolamine (PE) à 98 g / 100g, L α - phosphatidylinositol (PI) à 50 g / 100 g, sphingomyéline (S) à 99 g /100 g et lysophosphatidylcholine (LPC) à 99 g / 100 g ont été fournis par Sigma. Ils ont été dissous chacun à raison de 10 mg / mL de chloroforme – méthanol (2 : 1, v : v), dont 20 µl sont déposés en spots sur la plaque.

La chromatoplaque est placée dans une cuve contenant 200 mL du solvant de migration en évitant que la ligne dépôt ne baigne dans le solvant de migration. Après une migration de 45 min pour un front de migration situé à environ 12 cm du dépôt, la plaque est mise à sécher dans

une étuve de 103°C pendant 1 min, puis les divers réactifs spécifiques sont appliqués au moyen d'un générateur d'aérosol.

Le réactif de molybdate d'ammonium – acide perchlorique a été utilisé pour détecter les phospholipides (Nzai et Proctor, 1998). Environ 3 grammes de molybdate d'ammonium sont dissous dans 50 mL d'eau distillée. On y ajoute 5 mL d'acide chlorhydrique 6 N et 13 mL d'acide perchlorique à 70%.

Après pulvérisation de la solution, la plaque est mise à sécher à l'étuve à 80 °C pendant 10 min. Les phospholipides apparaissent sous forme de tâches bleues sur fond blanc.

Le réactif de Dragendorff est un réactif de détection des composés contenant de la choline et de la sphingosine. Il est préparé comme suit :

- Solution 1 ; on dissout 1,7 g de nitrate basique de bismuth dans 100 mL d'acide acétique à 20%.
- Solution 2 ; on dissout 10 g d'iodure de potassium dans 25 mL d'eau distillée.

On mélange ensuite 20 mL de la solution 1 et 5 mL de la solution 2, le tout dilué avec 100 mL d'eau distillée. Des tâches caractéristiques de couleur orange sont observées après pulvérisation.

4.4.4 Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse

Les esters méthyliques d'acides gras ont été préparés par le réactif au trifluorure de bore à la concentration de 8% dans du méthanol (BF₃ / MetOH) (Ackman, 1998).

100 mg d'échantillon sont pesés dans un tube à essai à vis de 10 mL. On y ajoute 1,5 mL d'hexane et 1,5 mL BF₃ / MetOH. Le tube est fermé hermétiquement sous azote, agité énergiquement, puis chauffé à 100°C pendant 1 h. Après refroidissement à température ambiante, on ajoute 1 mL d'hexane, 2 mL d'eau distillée, on agite sous azote. Deux phases se séparent après repos. La phase supérieure est récupérée dans un autre tube mis sous azote. On extrait deux fois la phase inférieure avec 1 mL d'hexane. L'ensemble des phases (esters méthyliques) collectées est lavé avec 2 mL d'eau distillée, puis séché sur sulfate de sodium anhydre. Le solvant est évaporé sous azote. De l'hexane est rajouté pour une concentration des esters méthyliques adaptée à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

L'analyse des esters méthyliques est réalisée sur un chromatographe Péri 2000 (Périchrom, Saulx-lès-Chartreux, France) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Ils sont séparés sur une colonne capillaire (25 m de longueur, 0,25 mm de diamètre, épaisseur du film de 0,5 μm) garnie de polyéthylène glycol dopé à l'acide téréphtalique (Périchrom).

Les températures du détecteur et de l'injecteur sont fixées à 260°C. Le programme utilisé pour l'analyse est le suivant : maintenue au départ à 70 °C pendant 2 min, la colonne est portée à 180 °C (39,9 °C / min) et maintenue durant 8 min à cette température, puis elle subit une seconde phase de réchauffement jusqu'à 220 °C (3 °C / min) pendant 45 min. Le refroidissement s'effectue à raison de 39,9 °C / min.

L'identification des pics est réalisée à l'aide de deux standards d'acides gras fournis par la société Supelco (Bellefonte, USA) : PUFA 1 (source marine) et PUFA 2 (source animale). Le logiciel Winlab 3 (Périchrom, Saulx-lès-Chartreux, France) permet l'intégration des chromatogrammes.

4.4.5 Détermination de l'insaponifiable total et du cholestérol

La méthode d'extraction à l'oxyde diéthylique (AOAC, 1999) a été utilisée pour cette détermination. On pèse 5 g de l'échantillon dans un ballon de 250 mL. On procède ensuite à la saponification. Pour cela on ajoute 50 mL de solution d'hydroxyde de potassium (solution éthanolique à 1 mole/litre) et quelques fragments de pierre ponce comme régulateurs d'ébullition.

Le ballon est adapté au réfrigérant à reflux, puis on chauffe pendant 1 heure à légère ébullition. On arrête le chauffage, on ajoute 100 mL d'eau par le haut du réfrigérant. L'extraction est réalisée après refroidissement. La solution est transvasée dans une ampoule à décanter de 500 mL et le ballon est rincé plusieurs fois avec 100 mL d'oxyde diéthylique. L'ampoule à décanter est bouchée et agitée énergiquement en équilibrant périodiquement la pression par l'ouverture du robinet. On laisse reposer jusqu'à séparation de deux phases. La phase inférieure est recueillie dans une autre ampoule. Avec la phase savonneuse, on procède à deux nouvelles extractions en utilisant à chaque fois 100 mL d'oxyde diéthylique. Les trois extraits sont rassemblés dans une ampoule à décanter contenant 40 mL d'eau pour un lavage. On soutire la phase aqueuse et on reprend deux fois le lavage. La phase étherée est ensuite successivement lavée avec 40 mL de la solution d'hydroxyde de potassium, puis 40 mL d'eau.

La phase étherée est évaporée dans un évaporateur rotatif. Le solvant est complètement évaporé après avoir ajouté 5 mL d'acétone. La teneur en insaponifiable est déterminée par gravimétrie et exprimée en pourcentage par rapport à l'échantillon initial.

Le cholestérol peut être ensuite déterminé spécifiquement par TLC-FID Iatroscan[®] méthode, décrite ci-dessus.

Le cholestérol libre dans l'huile totale d'œufs de truite extraite par la méthode de Bligh et Dyer (1959) est déterminé selon Walton *et al.* (1989) avec modification. On dépose 1 µL d'une solution d'huile dans le chloroforme (5 mg/mL) sur chaque *chromarod*. Les échantillons sont ensuite élués en quatre étapes :

- 1- Premier développement : dans l'éluant A (chloroforme : méthanol : eau, 40 : 20 : 2,5) jusqu'à 4 cm. On sèche les *chromarods* 1 min à 100°C à l'air sec.
- 2- Deuxième développement : dans l'éluant A jusqu'à 4 cm, suivi par un séchage de 1 min à 100°C.
- 3- Troisième développement : dans le même éluant A jusqu'à 4 cm. On sèche 1 min à 100°C à l'air sec.
- 4- Quatrième développement : dans l'éluant B (hexane : éther éthylique : acide formique, 60 : 5 : 0,5) jusqu'à 10 cm, suivi par séchage de 1 min à 100°C à l'air sec.

Les *chromarods* sont ensuite scannés dans un Iatroscan[®] (Chromarods-SIII, Iatroscan Laboratory Inc, Tokyo, Japon) et les résultats sont traités par le logiciel Chromstar[™] (voir paragraphe 4).

Au cours des quatre éluions successives, les lipides polaires sont séparés dans les trois premiers développements, puis les lipides neutres migrent au front d'éluion des *chromarods* au cours du quatrième développement. Par conséquent, toutes les fractions lipidiques (polaires et neutres) peuvent être analysées au même temps. Le pic du cholestérol a été identifié à l'aide d'une courbe étalon du cholestérol standard (pureté 99%, Sigma-Aldrich). L'obtention des résultats corrects exige un contrôle strict des conditions constantes d'analyse, notamment en ce qui concerne la quantité d'éluant, la quantité de l'échantillon déposée et la distance d'éluion.

4.4.6 Analyse thermique des huiles par calorimétrie différentielle

L'analyse thermique différentielle consiste à mesurer une différence de température entre l'échantillon étudié et un échantillon de référence, ne présentant pas de phénomènes thermiques dans l'intervalle de température étudié. Le profil thermique ainsi obtenu reflète les changements d'état du produit analysé et les variations d'énergie associées à ces changements.

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un calorimètre différentiel (Modèle Pyris1, Perkin-Elmer Corp., Norwalk, USA).

L'appareil a été étalonné au préalable en mesurant la température de fusion et l'enthalpie de l'indium (T_f : 156,6 °C, ΔH : 28,45 J / g).

Une micro-capsule en aluminium contenant environ 8 à 10 mg d'échantillon, exactement pesés, est placée dans le calorimètre, en parallèle avec une capsule identique vide placée dans le compartiment voisin. Le passé thermique de l'échantillon est effacé par une exposition à 60°C pendant 3 minutes. Puis, le programme consiste en une descente rapide à -60°C, suivie d'un maintien à cette température pendant 3 min et d'un réchauffement progressif (5°C / min) jusqu'à +60°C. Les températures correspondant aux maxima des pics et les enthalpies de fusion (J / g) ont été calculées par le Logiciel Pyris (Perkin-Elmer Corp, Norwalk, USA).

4.5 ANALYSE DES PROTEINES

4.5.1 Dosage de l'azote total

L'azote total est déterminé par la méthode de Kjeldahl selon la procédure décrite dans le paragraphe 4.3.3 et la teneur en protéines est calculée en pourcentage par multiplication de la valeur de NT par le facteur 6,25 (Adler-Nissen, 1986).

4.5.2 Caractérisation de la taille des peptides des hydrolysats protéiques

La chromatographie liquide d'exclusion de taille est une technique basée sur la rétention sélective des molécules de soluté suivant leur taille lors de leur pénétration dans le réseau poreux

de la phase stationnaire. Les plus grosses molécules ne pénètrent pas dans les pores et sont exclues tandis que les plus petites pénètrent plus profondément dans les pores et sortent les dernières.

La distribution de la taille des peptides des différents hydrolysats a été étudiée par chromatographie liquide d'exclusion de taille à basse pression. La séparation a été réalisée avec une colonne Superdex Peptide HR 10/30 dans 0,1% acide trifluoroacétique contenant 25% d'acétonitrile. Les limites de séparation vont de 1500 à 30000 Da. L'étalonnage de la colonne est réalisé avec des protéines et peptides de masses molaires connues.

4.5.3 Dosage des acides aminés

Les acides aminés des œufs de truite ont été déterminés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (Colonne PTC RP-18, 220 mm de long, 2,1 mm de diamètre interne et une pré-colonne, Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Les échantillons sont d'abord dispersés dans de l'eau osmosée à raison d'environ 0,8 g / L, ils sont ensuite passés sur un filtre Millipore 0,22 µm. Les échantillons sont hydrolysés sous vide à 150°C pendant 60 minutes dans une station Pico-Tag (Waters, Milford, MA, USA) en présence de HCl 6N à 1% de phénol. Ils sont ensuite repris dans de l'eau ultra pure et dérivés automatiquement selon la méthode d'Edman grâce à un auto "dériviseur"-analyseur- 420 a (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Les dérivés d'acides aminés sous forme de phényl-isothiocyanates (PITC) sont séparés par un tampon A (acétate de sodium 45 mM à pH 5,9) et un tampon B (30% acétate de sodium 105 mM, pH 4,6 ; 70% acétonitrile) sous gradient d'élution. La détection est fixée à 254 nm et la durée totale de l'analyse est de 31 minutes. L'acquisition et l'exploitation des résultats sont réalisées en utilisant le logiciel Model 600 Data Analysis System (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.6 ETUDE MICROSCOPIQUE

4.6.1 Microscopie optique

Les œufs de truite et leurs coupes préparées pour la microscopie électronique (voir paragraphe 4.6.2), sont déposés sur des lames et observés à l'aide d'un microscope de Minolta (grossissement x 10 à x 40). Des photographies sont alors réalisées à l'aide d'un appareil numérique Fujifilm, Finepix pour une observation globale.

4.6.2 Microscopie électronique

Les œufs de truite et les hydrolysats protéiques sont observés par microscopie électronique à transmission. Le traitement des échantillons a été réalisé selon la méthode employée par Papadopoulou *et al.* (1996).

Les échantillons sont introduits dans un milieu de fixation à base de paraformaldéhyde à 2% et de glutaraldéhyde 2% dans un tampon cacodylate de sodium (0,08 M). Après rinçage dans 4% de saccharose dans le tampon cacodylate de sodium (0,08 M), les échantillons sont fixés dans 2% de tétr oxyde d'osmium (OsO_4) dans l'eau distillée et incubés à 4°C pendant 2 heures. Les échantillons sont ensuite déshydratés dans un gradient d'éthanol. Les échantillons sont traités à l'oxyde de propylène et fixés dans de la résine Epon puis coupés en couches ultrafines de 80 nm à l'aide d'une lame de diamant (Ultramicrotome : Ultracut E ; Reichert-Jung, Vienne, Autriche). Les coupes sont alors récupérées sur des grilles de cuivre de 100 mesh et lavées à l'acétate d'uranyle 2%. La microstructure est ensuite étudiée à l'aide d'un microscope Philips EM 400.

4.7 HYDROLYSE ENZYMATIQUE

4.7.1 Protocole expérimental

L'hydrolyse a été réalisée (**Figure 17**) dans un réacteur agité thermostaté de 100 mL où les œufs de truite rincés sont mis en suspension dans l'eau distillée. La technique du pH-stat

(Adler-Nissen, 1986) a été utilisée afin de suivre l'hydrolyse. Les conditions de l'hydrolyse ont été optimisées par Gbogouri (2005) et ont été strictement suivies ici. Elle consiste à maintenir le pH constant par ajout automatique de soude 1 N lors de la réaction enzymatique. La quantité de base consommée permet de calculer le degré d'hydrolyse. La réaction est mise en œuvre pendant 2 heures sous agitation constante à 450 tr / min.

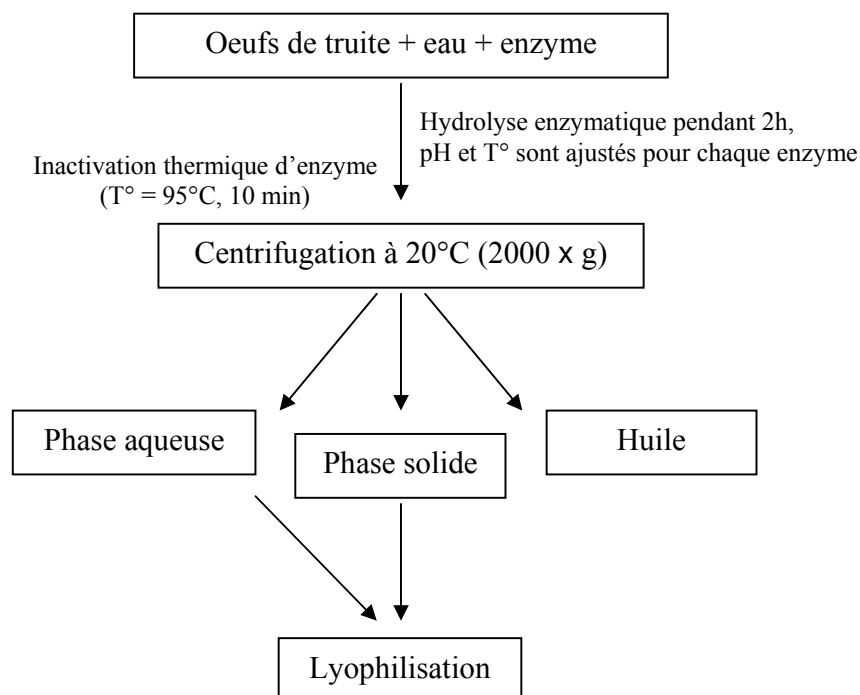


Figure 17. Protocole expérimental de l'hydrolyse enzymatique des œufs de truite.

A la fin de l'hydrolyse, la réaction enzymatique est arrêtée par inactivation thermique du mélange réactionnel. L'hydrolysate est chauffé dans un bain marie pendant 10 minutes à 95 °C.

Le mélange réactionnel est soumis à une centrifugation de 2000 x g pendant 5 minutes à 20°C (**Figure 18**). Trois phases sont obtenues : la phase surnageante (huile), la phase aqueuse intermédiaire (hydrolysate) et la phase plus dense au-dessous (phase dite "solide"). Les différentes fractions sont ensuite séparées et conservées sous azote à -20 °C. La phase dense est séparée puis lyophilisée en vue de caractériser les lipides et les protéines qui y sont contenues.

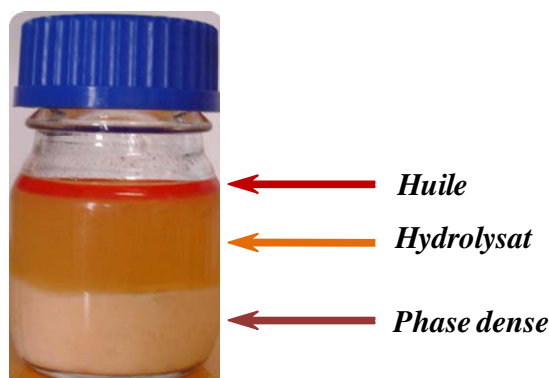


Figure 18. Les différentes fractions obtenues après hydrolyse enzymatique et centrifugation des œufs de truite.

Les hydrolysats protéiques obtenus ainsi que les phases denses sont congelés rapidement dans des ballons par rotation dans un bain d'eau glycolée à -30 °C, avant d'être installés sur un lyophilisateur (Leybold Heraeus, Orsay) pendant 48 heures. Les lyophilisats sont ensuite conservés sous azote dans des pots en plastique à -20 °C pour la suite de l'étude.

4.7.2 Méthode du pH-Stat

La méthode du pH-Stat (Adler-Nissen, 1986) montre qu'il existe une proportionnalité entre la libération des protons et le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées.

Le degré d'hydrolyse est défini comme étant le pourcentage de liaisons peptidiques hydrolysées sur le nombre de liaisons peptidiques totales. Il est défini selon la formule suivante :

$$DH = \frac{B \times N_B}{MP \times \alpha \times h_{tot}} \times 100$$

Avec B : volume de NaOH ajouté (mL)

N_B : normalité de la soude

α : degré moyen de dissociation des groupes alpha aminés

MP : masse de protéines (NT × 6,25) présentes dans le milieu réactionnel (g)

h_{tot} : nombre de liaisons peptidiques dans la protéine (7,5 mEq / g)

Le degré de dissociation est défini comme suit :

$$\alpha = \frac{10^{pH - pK}}{1 + 10^{pH - pK}}$$

où le pK représente le pK moyen des fonctions α -aminés libérées durant l'hydrolyse :

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400$$

où T est la température exprimée en Kelvin.

4.8 REGIODISTRIBUTION DES ACIDES GRAS

4.8.1 Triacylglycérols

L'analyse stéréospécifique des triacylglycérols d'œufs de la truite et du saumon est conduite par déacylation chimique. L'analyse de régidistribution des TAG isolés est déterminée selon Turon *et al.* (2002). Les TAG purs (40 mg) sont dissous dans 2 mL d'éther éthylique sec, puis 670 μ L de solution de bromure d'éthyl-magnésium (EtMgBr) sont ajoutés et le mélange est agité 15 secondes. On ajoute alors 300 μ L d'acide acétique glacial puis 5 mL de solution d'acide borique 0,4 M dans l'eau. Après agitation, la phase organique est extraite et séparée après ajout de 5 mL d'une solution aqueuse d'acide acétique 0,4M : NaHCO₃ eau 2%, 50 : 50 (v : v).

Les monoacylglycérols (MAG) sont isolés par chromatographie préparative sur couche mince (CCM). Les plaques de silice (60 F₂₅₄ TLC plates, Merck, Darmstadt, Germany) sont immergées dans une solution 5% d'acide borique/méthanol (m/v). Les échantillons sont déposés sur les plaques et sont mis à migrer dans une solution de chloroforme : acétone : acide acétique (85 : 15 : 1, v : v : v) pour séparer les α – MAG (ou sn1-monoacylglycérols). Les différentes bandes sont révélées par pulvérisation d'une solution à 0,2% de 2',7'-dichlorofluorescéine dans l'éthanol puis visualisées sous UV (366 nm). Les α -MAG (R_f = 0.26) et β -MAG (R_f = 0.38) sont identifiés. La bande α -MAG est prélevée par grattage au moyen d'une fine spatule, puis elle est transférée dans un tube d'essai à septum de téflon pour la préparation des esters méthyliques et analyse des acides gras par CPG.

4.8.2 Lipides polaires

Les phospholipides des œufs de truite et de saumon sont séparés sur colonne de silice, puis purifiés par CCM pour éviter toute influence d'autres fractions lipidiques. Ils sont dilués dans du chloroforme et déposés sur des plaques de silice déjà préparées comme il est décrit dans le paragraphe précédent. Les phospholipides sont élués dans une solution d'hexane : éther éthylique : acide acétique (50 : 50 : 1). La bande silicique de phospholipides est grattée, puis transférée dans un tube d'essai à septum de téflon. Les phospholipides sont séparés par ajout de chloroforme et centrifugation. La phase organique est extraite et l'opération est répétée pour extraire le maximum de phospholipides.

100 mg de phospholipides purifiés sont transférés dans un tube d'essai à septum de téflon avec un barreau magnétique introduit pour assurer une agitation continue. 2 mL de 1M de tampon Tris (pH 8) puis 0,2 mL CaCl_2 (220 g/L) sont ajoutés. L'hydrolyse est conduite par ajout de 10 μL de phospholipase A_2 (Sigma) et agitation 1 min à 37°C. On ajoute immédiatement 1 mL HCl (6 N) et 1 mL d'éther diéthylique sec et on agite pour 30 s. Les tubes sont ensuite centrifugés 10 min à $2000 \times g$ dans une centrifugeuse J2-HS Beckman (Beckman Instruments, Gagny, France). La phase contenant le solvant est extraite plusieurs fois après ajout d'éther diéthylique sec et centrifugation pour réaliser une CCM. Des fractions aliquotes de cette phase sont déposées sur une plaque de silice et développées dans une solution d'hexane : éther diéthylique : acide acétique (70 : 30 : 1, par v). Les acides gras libres (position *sn*-2 ou β) sont identifiés et récupérés en grattant leur bande de silice afin de préparer les esters méthyliques pour analyse par CPG.

4.9 STABILITE A L'OXYDATION

4.9.1 Préparation des échantillons et conditions opératoires

Les huiles d'œufs de truite, d'œufs de saumon et de têtes de saumon sont extraites par solvant organique selon les méthodes de Folch *et al.* (1957) et Bligh & Dyer (1959). Pour comparaison, les triacylglycérols de saumon sont obtenus par séparation sur colonne de silice

(voir paragraphe 3 ci-dessus) à partir de l'huile totale de têtes de saumon extraite par solvant (**Figure 19**).

1 g de chaque huile est introduit dans une fiole en verre transparent de 10 mL scellée ensuite par un bouchon en aluminium et un septum de silicone sous atmosphère naturelle. 250 pots en total sont préparés et stockés à l'abri de lumière pendant 3 mois à 4°C, 20°C et 50°C.

Un prélèvement quotidien est appliqué la première semaine suivi par prélèvement tous les trois jours jusqu'à 60 jours. Le prélèvement est réduit dans la période entre 60 et 90 jours et devient ensuite hebdomadaire.

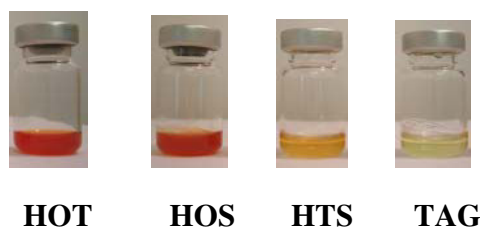


Figure 19. Les différentes huiles utilisées pour l'étude de la stabilité oxydative.

HOT : huile d'œufs de truite, HOS : huile d'œufs de saumon, HTS : huile de têtes de saumon, TAG : triacylglycérols de têtes de saumon.

4.9.2 Suivi de la stabilité à l'oxydation

4.9.2.1 Indice de peroxyde (Norme AOAC 965.33, 1997)

L'indice de peroxyde correspond à la quantité d'oxygène actif du peroxyde contenu dans une certaine masse de produit capable d'être libéré dans les conditions de l'expérience. Environ 1g de produit sont dissous dans du chloroforme et de l'acide acétique. L'iode libéré est titré avec une solution de thiosulfate de sodium (0,02N), en utilisant l'empois d'amidon comme indicateur coloré.

L'indice de peroxyde (IP) se détermine ainsi :

$$IP = (V - V_0) \times N / g \text{ de lipides}$$

où V_0 est le volume de thiosulfate de sodium (mL) nécessaire pour titrer le blanc

V est le volume de thiosulfate de sodium (mL) nécessaire pour titrer l'essai

N est la normalité de la solution de thiosulfate de sodium

4.9.2.2 *Indice de polyènes*

Les acides gras sont convertis en esters méthyliques d'acides gras et analysés par chromatographie en phase gazeuse. L'indice de polyènes est calculé selon la formule suivante (Aubourg *et al.*, 2005) :

$$\text{Indice polyène} = \frac{C_{20:5} + C_{22:6}}{C_{16:0}}$$

4.9.2.3 *Indice de diènes*

Les diènes conjugués, produits primaires de l'oxydation des lipides se forment par réarrangement des doubles liaisons du radical lipoylé des acides gras polyinsaturés. Ces diènes conjugués possèdent un maximum d'absorption à 233 nm (Klein, 1970; Eymard, 2003).

Environ 0,5 mg de lipides sont évaporés sous courant d'azote puis repris dans 1 mL d'hexane. Le spectre d'absorption de la solution hexanique est enregistré au spectrophotomètre, contre le solvant entre 200 et 300 nm. Les absorbances des échantillons sont lues à 233 nm et à 214 nm. L'indice de diènes est obtenu par calcul du rapport des absorbances mesurées à ces deux longueurs d'onde (A_{233}/A_{214}). Ce calcul permet de corriger des variations de concentrations en lipides liés aux prélèvements (214 nm correspond au point isobestique, Klein, 1970). Les mesures ont été réalisées en double sur chaque échantillon.

4.9.2.4 *Consommation en oxygène dans l'espace de tête*

La consommation en oxygène a été déterminée par analyse chromatographique en phase gazeuse (Shimadzu) de l'atmosphère présente dans l'espace de tête (Colakoglu, 2007) de chaque

flacon renfermant les échantillons d'huile stockés à différentes températures pendant 60 jours. 500µl de l'espace de tête de chaque échantillon a été prélevé puis injecté dans une colonne inox (2M×1/8") tamis moléculaire 5Å a été utilisée. La température de la colonne était de 50°C, de l'injecteur et le détecteur de 120°C. Le temps d'analyse était 5 minutes pour chaque injection.

4.9.2.5 Composition en acides gras (voir paragraphe 4.4 ci-dessus)

4.9.2.6 Couleur

L'évolution de la couleur des lipides totaux a été mesurée en utilisant un appareil Microflash[®] 200d (Datacolor International).

Ce colorimètre permet de déterminer les paramètres de l'espace chromatique CIE $L^*a^*b^*$, définie par la commission internationale de l'éclairage. Ce système de paramètres L, a et b, a pour avantage de représenter des différences égales de couleurs perçues par des distances égales sur le diagramme de chromaticité. Le paramètre L correspond à la clarté (Luminance), tandis que a et b correspondent aux indices chromatiques vert-rouge et bleu-jaune. Respectivement, plus les indices sont négatifs plus les échantillons sont verts et bleus, plus ils sont positifs plus les échantillons sont rouges et jaunes (**Figure 20**).

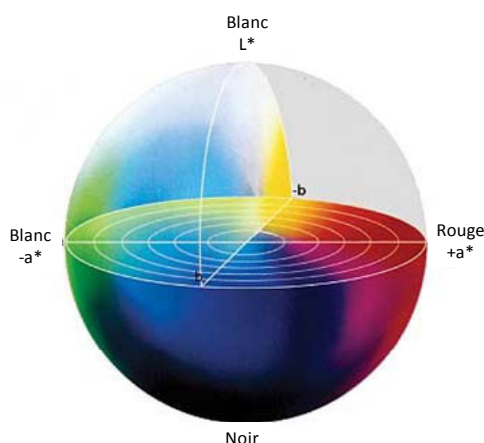


Figure 20. Schéma représentatif de l'espace chromatique CIE $L^*a^*b^*$.

La mesure de couleur est effectuée après étalonnage de l'appareil avec les étalons noir puis blanc. Cette opération s'effectue par l'apposition directe de la cellule de mesure sous le flacon d'échantillon. Les résultats représentent la moyenne de cinq mesures et leur écart-type associé.

4.9.2.7 Détermination de la teneur en astaxanthine (Gobantes et al., 1998)

La teneur en astaxanthine des lipides est déterminée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur une colonne Waters (Nova-Pak[®] C18, 3,9 × 150 mm, Cartridge, Irlande). La phase mobile utilisée est un mélange de solvants : acétonitrile : dichlorométhane : méthanol : eau : acide propionique (71 : 22 : 4 : 2 : 1, par volume) avec un débit de 0,3 mL/min. Le pic de l'astaxanthine est identifié et quantifié pour chaque échantillon à l'aide d'une gamme étalon réalisée à partir d'un échantillon d'astaxanthine standard à 480 nm. Les résultats sont exprimés en mg/100mg d'huile (moyenne de trois valeurs).

4.9.2.8 Spectrométrie infra-rouge

4.9.2.8.1 Principe

La spectroscopie infrarouge permet de mesurer les énergies de vibration des liaisons moléculaires. Sous l'effet d'un rayonnement électromagnétique infrarouge, les liaisons moléculaires assimilables à des dipôles peuvent absorber cette énergie. Pour cela, il faut que la fréquence d'oscillation de la liaison soit égale à celle de l'onde émise. Il existe plusieurs modes de vibration dans un groupe d'atomes : des vibrations d'élongation symétriques ou anti-symétriques, qui affectent la longueur d'une liaison atomique et des vibrations de déformation angulaire qui se produisent dans le plan d'une molécule ou hors du plan.

Les spectres représentent l'absorbance de l'échantillon en fonction du nombre d'onde. Le nombre d'onde ν (en cm^{-1}) correspond à l'inverse de la longueur d'onde, λ (en cm). Il faut une énergie moindre pour déformer une molécule que pour l'étirer. En conséquence, les nombres d'ondes d'élongation sont toujours plus élevés que ceux de déformation. Il existe trois domaines

d'infrarouge : le proche infrarouge ($14283\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$) ; l'infrarouge moyen qui est utilisé dans notre cas ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) et l'infrarouge lointain ($400\text{--}10\text{ cm}^{-1}$).

En spectrométrie IR de transmission, un faisceau de lumière monochromatique de longueur d'onde donnée traverse un échantillon d'épaisseur dx et de concentration c en substance absorbant spécifiquement la lumière du faisceau. Du fait de l'absorption de la lumière par l'échantillon, l'intensité du faisceau est atténuée depuis la valeur I_0 à l'entrée d'un côté de l'échantillon jusqu'à la valeur I_T , à sa sortie ($I_T < I_0$). Toutefois, dans le cas présent c'est en mode réflexion que le spectromètre a été atténué, mais le principe reste le même.

Lorsque la surface de la matière illuminée est brillante, la lumière est réfléchiée selon les lois classiques de l'optique géométrique. Les ondes réfléchies se propagent dans le même plan que les ondes incidentes et leur direction forme avec la normale un angle égal à l'angle d'incidence (Bertrand et Dufour, 2000). L'angle critique ϕ est défini par son sinus :

$$\sin\phi = \frac{n_2}{n_1}$$

où n_1 , est l'indice de réfraction plus élevé du milieu solide plus dense servant de porte-échantillon et n_2 , l'indice de réfraction du produit étudié. Pour des angles d'incidence supérieurs à ϕ , le faisceau subit une réflexion totale à l'intérieur du milieu plus dense, s'il provient de celui-ci (**Figure 21**). Si l'échantillon absorbe la lumière, une partie de l'énergie lumineuse est atténuée d'où la dénomination de réflexion totale atténuée. La réflexion totale atténuée (RTA) est particulièrement adaptée aux échantillons sous forme de films de faible épaisseur, comme les membranes.

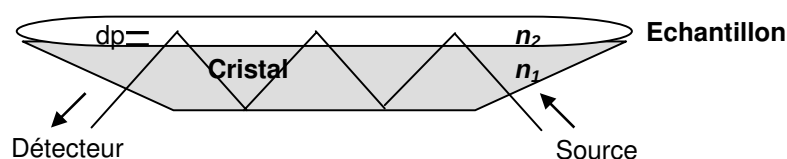


Figure 21. Schéma illustrant le processus de réflexion totale atténuée à des points de la surface supérieure d'un cristal ATR plat (indice de réfraction n_1) et un échantillon (indice de réfraction n_2) dans lequel l'onde évanescente pénètre jusqu'à une profondeur dp .

La profondeur de pénétration des ondes évanescentes dans l'échantillon dépend de la longueur d'onde λ , de l'angle ϕ d'incidence du faisceau par rapport à la normale à l'intérieur du cristal et des indices de réfraction n_1 et n_2 selon la formule :

$$dp = \lambda / (2\pi.n_1 (\sin^2\phi - (n_2/n_1)^2))^{1/2}$$

4.9.2.8.2 Mode opératoire

D'éventuelles modifications du spectre infra-rouge des différentes huiles ont été recherchées au cours de ce travail. Les essais ont été réalisés dans le mode Infra-Rouge à Transformée de Fourier en Réflexion Totale Atténuée (ATR-FTIR) à 22°C dans un spectromètre Tensor 27 mid-FTIR Bruker (Brüker, Karlsruhe, Allemagne) équipé d'une cellule optique A537-L11 ATR et d'un détecteur DTGS (Mercure-Cadmium-Tellure, Bruker, Karlsruhe, Allemagne). Le diaphragme était réglé à 4 mm et la vitesse de balayage à 20 kHz. 256 passages ont été nécessaires, tant pour la référence que pour l'échantillon entre 4000 et 850 cm^{-1} avec une résolution spectrale de 4 cm^{-1} .

La première étape du traitement des spectres bruts consiste à soustraire la contribution du CO_2 atmosphérique. L'étude approfondie des spectres infrarouges nécessite ensuite un second traitement qui comporte plusieurs étapes. Il a été effectué avec le logiciel de traitement de données OPUS/IR (Bruker, Wissembourg, France). Les spectres ont été lissés en utilisant un algorithme de Savitzky-Golay avec une fenêtre de 13 points. Ils ont ensuite été redressés en corrigeant leur ligne de base en 2 points. Pour comparer l'absorbance des différentes bandes vibrationnelles, les spectres sont normalisés selon la moyenne des valeurs d'absorbance de la bande et leur écart-type, selon l'équation :

$$\text{Valeur normalisée} = (\text{valeur} - \text{moyenne des valeurs de la bande}) / \text{écart-type des valeurs}$$

Le calcul des dérivées secondes d'une bande vibrationnelle a également été effectué sur certaines régions à partir des spectres lissés, corrigés en ligne de base et normalisés. Le calcul des dérivées secondes permet d'optimiser l'exploitation des spectres en augmentant la résolution spectrale et la détection des épaulements présents lors des recouvrements spectraux importants entre les bandes. Cette méthode de déconvolution des spectres infrarouges apparaît comme la

plus objective car elle n'implique pas de choisir des valeurs de paramètres de calcul. Il faut noter que le signe des variations des dérivées secondes est opposé à celui des spectres originaux, c'est-à-dire qu'un pic de dérivée seconde est orienté vers le bas. Une bande d'absorbance du spectre infrarouge original correspond donc à la somme des contributions des pics de dérivées secondes qui, eux, sont repérés vers le bas. Chaque essai a été répété 3 fois.

RESULTATS ET DISCUSSION

5 . RESULTATS ET DISCUSSION

5.1 ANALYSES BIOCHIMIQUES

Les co-produits utilisés dans cette étude sont les œufs de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et du saumon pacifique (*Oncorhynchus keta*) dont la composition physico-chimique est présentée dans le **Tableau V**. La composition des fractions issues de l'hydrolyse enzymatique d'œufs de truite (phase dense et hydrolysate) est également présentée dans ce tableau. En comparant les caractéristiques physico-chimiques des œufs de truite et de saumon à celle du filet, il apparaît une différence de composition entre les tissus. Les œufs de truite et de saumon contiennent moins d'eau (57,0% et 58,0%) que le filet de truite (70,1%). Leur teneur en lipides est plus élevée (respectivement, 9,6% et 10,5%) que celle du filet (4,8%). Quant à la teneur en protéines des œufs (28,5% et 29,8%), elle est également supérieure à celle du filet (23,2%). Le taux de cendres des œufs de truite (1,3%) est un peu inférieur à celui des œufs de saumon et du filet (1,7% et 1,8%). Ces concentrations relativement élevées sont caractéristiques des œufs télolécithes et peuvent s'expliquer par le fait que l'œuf de poisson a besoin de lipides et de protéines pour survivre et résister, notamment au cours de ses stades primaires, aux conditions extérieures de température et de pression. Les résultats de la composition des œufs de truite obtenus ici sont peu différents de ceux trouvés dans la littérature (Kamler, 1992 ; Vuorela *et al.*, 1979 ; Satia *et al.*, 1974) et présentés dans le **Tableau V**. La variation de composition affecte surtout la teneur en lipides et peut être due essentiellement à une différence dans l'alimentation des femelles et à d'autres facteurs liés au milieu et aux conditions de culture.

Par ailleurs, parmi les fractions obtenues après hydrolyse des œufs de truite par l'Alcalase[®], on observe une phase dense contenant une grande quantité de particules macroscopiques et composée de 78,5% d'eau, 14,9% de protéines et 3,7% de lipides. La phase aqueuse intermédiaire (hydrolysate) est composée majoritairement d'eau (90,5%) et de 9,8% de protéines, on n'y décèle aucune trace de lipides.

Tableau V. Composition physicochimique des œufs de truite arc-en-ciel et des différentes fractions obtenues après hydrolyse enzymatique (hydrolysats, phase dense).

Composant	Eau %	Protéines % (NT×6,25)	Lipides %	Cendres %	Poids d'un œuf (g) (n=10)
Œufs de truite	57,0 ± 0,2	28,5 ± 0,1	9,6 ± 0,2**	1,3 ± 0,0	0,072 ± 0,008
Phase dense	78,5 ± 1,6	14,9 ± 0,6	3,7 ± 0,4**	-	-
Hydrolysats	90,5 ± 0,1	9,8 ± 0,4	Tr**	-	-
Œufs de saumon	58,0 ± 0,3	29,8 ± 0,2	10,5 ± 0,2	1,7 ± 0,1	-
Filet de truite	70,1 ± 0,2	23,2 ± 0,1	4,8 ± 0,3	1,8 ± 0,1	-
a	63,7	27,4	7,1	1,5	-
b	66,1	24,1	3,8	1,3	0,045
c	55,6-65,0*	61,6-76,6*	7,3-29,3*	3,3-4,1*	0,010

NT: Azote total

^a Composition approximative des œufs de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*/*O. mykiss*) (Vuorela *et al.*, 1979).^b Caractéristiques des œufs de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*/*O. mykiss*) (Satia *et al.*, 1974).^c Caractéristiques des œufs de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*/*O. mykiss*) (Kamler, 1992).

* Résultats présentés en % sur la matière sèche.

** Lipides extraits selon la méthode de Bligh et Dyer (1959).

Les résultats de la composition en minéraux des œufs de truite présentés dans le **Tableau VI** montrent une teneur élevée en phosphore (245 mg/100 g) et en potassium (314 mg/100 g). La teneur en phosphore est très importante et liée à la composition en phospholipides.

Tableau VI. Quantification des minéraux des œufs de truite arc-en-ciel (mg/100g matière sèche)

	Ca	Mg	Na	K	P
Œufs de truite	81±1	76±1	134±3	314±3	245±4
Zaitsev <i>et al.</i> , (1969)*	40-95	15-40	80-195	125-230	290-370

* Teneur en minéraux d'œufs de poisson (mg% de la matière humide).

5.2 HYDROLYSES ENZYMATIQUES

5.2.1 Cinétique enzymatique des trois protéases utilisées

Les paramètres présentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau VII**) sont les paramètres optimaux recommandés par le fournisseur. Comme on peut le voir, la quantité d'huile libérée après protéolyse est très variable, puisqu'elle va de 18,3% pour la Neutrase® à 38,5% pour l'Alcalase®. En même temps, on observe que le degré d'hydrolyse reste anormalement bas, passant de 2,3% pour la Protamex® à 7,8% seulement pour l'Alcalase®, alors qu'il peut atteindre aisément 17 à 20% dans le cas de l'hydrolyse de filets de saumon (Gbogouri, 2004) (**Figure 22**). On peut notamment observer que la limite d'hydrolyse est atteinte très rapidement pour la Neutrase® et la Protamex®. Cette constatation inattendue est sans doute à relier aux propriétés particulières du chorion qui est, comme nous l'avons décrit abondamment, une structure de résistance aux agressions du milieu extérieur. Quand l'œuf est intact, les protéases n'ont qu'une faible probabilité d'attaquer sa surface. Il s'agit alors d'une protection mécanique. Mais si l'œuf est détruit dans un mixer, par exemple, cette protection ne joue plus et ce sont d'autres facteurs qui doivent intervenir pour inhiber l'action de l'enzyme. Il faut donc envisager la présence d'inhibiteurs non compétitifs probablement liés à la structure isopeptidique du chorion et à la présence de très nombreux ponts disulfures qui pourraient bloquer l'action des protéases. En tout état de cause, cette observation pose d'emblée le problème de la digestibilité des œufs de poisson entiers, malgré leur richesse nutritionnelle potentielle.

Nous avons vu que la quantité d'huile *surnageant* après hydrolyse reste relativement modeste compte tenu de la richesse de l'œuf en huile. Ceci est évidemment à relier à la faiblesse du DH, le réseau protéique plus ou moins intact retenant une grande partie des lipides.

Tableau VII. Paramètres et résultats des trois protéases utilisées dans l'hydrolyse des œufs de la truite arc-en-ciel.

Enzyme	pH	T°/°C	Activité enzymatique (AU/g)	E/S (%)	Huile %*	DH%
Alcalase [®]	8,0	60	2,4	3	38,5	7,8
Neutrase [®]	7,5	50	0,8	3	18,3	3,2
Protamex [®]	7,5	45	1,5	3	29,6	2,3

* Résultats exprimés en pourcentage de lipides totaux.

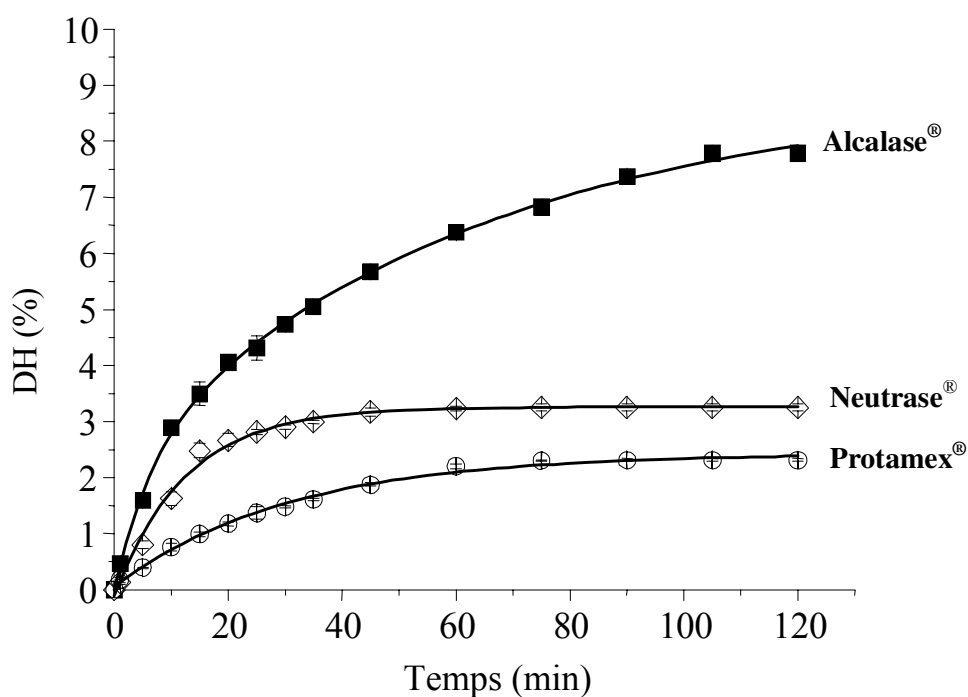


Figure 22. Cinétiques d'hydrolyse des œufs de truite arc-en-ciel par l'Alcalase[®] (60°C, pH=8,0, E/S=3%), la Neutrase[®] (50°C, pH=7,5, E/S=3%) et la Protamex[®] (45°C, pH=7,5, E/S=3%)

5.3 ANALYSE DES LIPIDES

5.3.1 Classes de lipides totaux

La composition en classes des lipides totaux (lipides neutres et lipides polaires) des huiles extraites par solvant et des huiles extraites par voie enzymatique (Alcalase[®] 2,4 L), ainsi que les lipides totaux contenus dans la phase dense, issus de l'hydrolyse enzymatique, a été analysée par chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Iatroscan[®]).

Les résultats montrent que la teneur en lipides polaires est élevée dans la phase dense qui en contient 73% contre 28% pour les lipides neutres (**Tableau VIII**). Il est évident que les lipides polaires restent en forte interaction avec les résidus protéiques de la phase dense. Ceci rend bien entendu leur extraction plus difficile. Il est d'ailleurs significatif d'observer que la phase huileuse surnageant après l'hydrolyse enzymatique des œufs de truite par l'Alcalase[®] est composée quasi-exclusivement de lipides neutres.

Tableau VIII. Détermination par TLC-FID des proportions de lipides neutres et polaires (%) d'œufs de truite (extraction par Bligh et Dyer, Folch *et al.*, traitement par l'Alcalase[®]).

	Bligh et Dyer (1959)		Folch <i>et al.</i> (1957)		Extraction enzymatique			
					Huile surnageante		Phase dense	
Lipides	LN	LP	LN	LP	LN	LP	LN	LP
Œufs de truite	52,6 ± 0,6	47,4 ± 0,6	39,0 ± 0,7	61,0 ± 1,1	97,5 ± 2,9	2,5 ± 0,1	26,7 ± 1,0	73,3 ± 1,9
^a	46,8 ^a	49,7 ^a	-	-	-	-	-	-
^b	-	-	47,1 ^b	10,9 ^b	-	-	-	-
^c	49,0 ^c	51,0 ^c	-	-	-	-	-	-

LN: lipides neutres, LP: lipides polaires,

^a Lipides neutres (triglycérides) et lipides polaires d'œufs de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*), (Kaitaranta et Ackman, 1981),

^b Lipides d'œufs de la perche argentée (*Bidyanus bidyanus*), (Anderson *et al.*, 1990),

^c Composition des classes de lipides d'œufs de saumon Atlantique (*Salmo salar*), (Silversand et Haux, 1997).

Lorsqu'on s'intéresse aux lipides extraits par solvants organiques, on observe que les proportions de lipides neutres et de lipides polaires dans les lipides totaux œufs sont de 52,6% et 47,4% par la méthode de Bligh et Dyer, contre 39,0% et 61,0% par la méthode de Folch *et al.* (La **Figure 23** montre le chromatogramme des deux classes de lipides séparés par la méthode du Iatroscan[®]) Cette différence dans le rendement d'extraction des lipides polaires, notamment, s'explique par le fait que cette dernière méthode est appliquée sur un produit lyophilisé. L'absence d'eau facilite évidemment l'extraction des lipides polaires, alors que ceux-ci sont retenus partiellement dans la phase aqueuse du produit frais traité par la méthode de Bligh et Dyer. On peut souligner la disparité des résultats avec les données extrêmement fragmentaires de la littérature. Cependant, d'après Hiratsuka *et al.* (brevet US 2003), exploitant une technique non enzymatique, il semble qu'il soit très important de veiller à l'inactivation thermique des phospholipases intrinsèques en portant le substrat à la température minimale de 70°C pendant 10 minutes, sous peine de dégradation rapide des phospholipides.

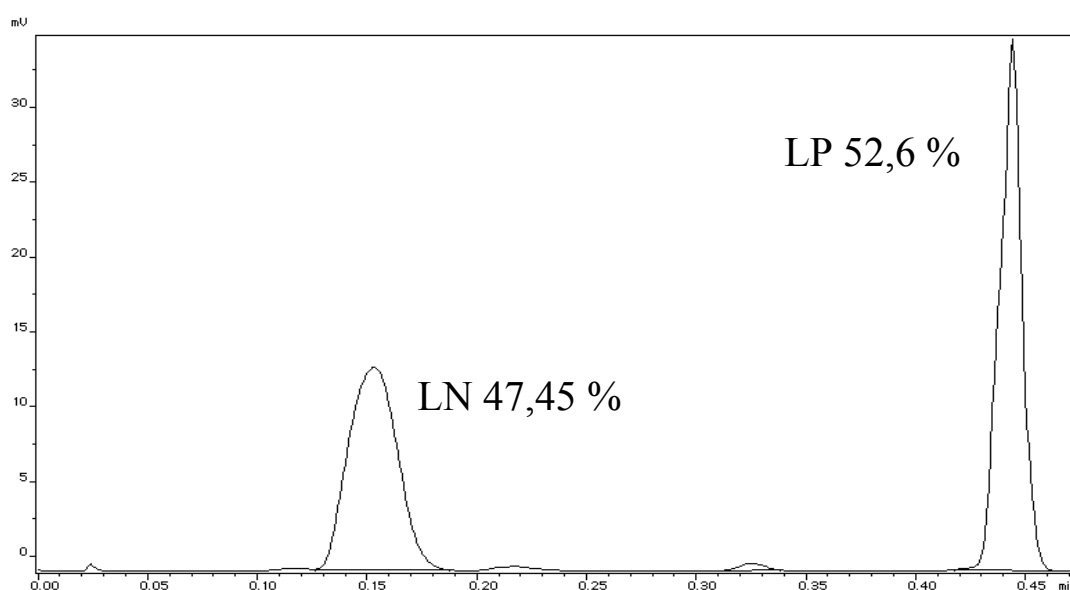


Figure 23. Classes de lipides totaux des œufs de truite arc-en-ciel extraits par la méthode de Bligh et Dyer (1959) et déterminées par Iatroscan[®]. LN : lipides neutres, LP : lipides polaires.

Les classes des lipides polaires des œufs de truite extraits par solvant (Folch *et al.*) ont été déterminées par TLC-FID Iatroscan[®] et sont présentées dans la **Figure 24**.

La phosphatidylcholine (PC) est le composant majeur des phospholipides avec 68,9%. Les PE, PS, Sph et PI représentent respectivement 12,8%, 8,9%, 4,6% et 4,8% des phospholipides totaux.

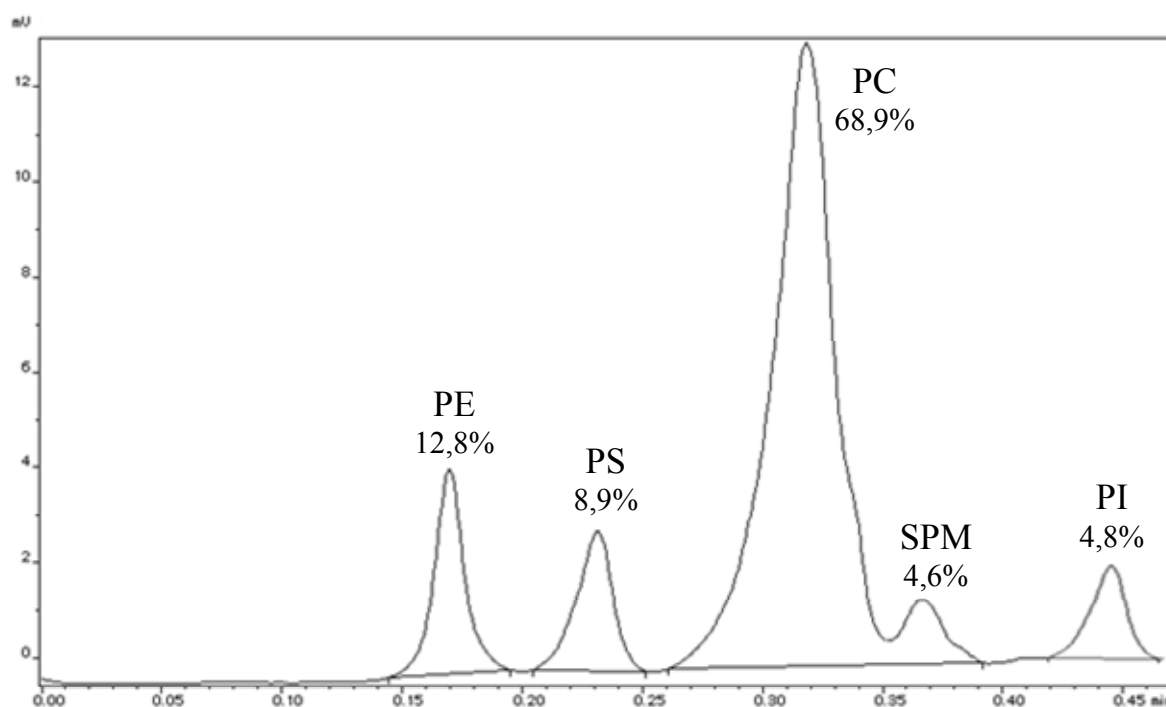


Figure 24. Classes des lipides polaires d'œufs de la truite extraits par la méthode de Bligh et Dyer (1959) déterminées par Iatroscan[®]. Phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), sphingomyéline (SPM) et phosphatidylinositol (PI).

5.3.2 Détermination des phospholipides

La discrimination des phospholipides de l'œuf de truite par la méthode du Iatroscan[®] fait apparaître des caractéristiques intéressantes (**Tableau IX**). On peut observer, comme ci-dessus, que c'est la phosphatidylcholine (PC) qui est le composant principal, suivie par la phosphatidyléthanolamine (PE) et le phosphatidylinositol (PI). Il est surtout particulièrement intéressant de constater que la phase dense contient de la PC en proportion (89%) plus importante que les lipides totaux des œufs initiaux, ce qui vient corroborer les commentaires faits au paragraphe précédent. Dans les méthodes d'extraction par solvant les résultats sont similaires.

Tableau IX. Détermination par TLC-FID des lipides polaires principaux (%) de l'huile d'œuf de truite extraite par la méthode de Bligh et Dyer (1959), de Folch *et al.* (1957) et par hydrolyse en présence d'Alcalase[®]

Phospholipides %	Bligh et Dyer	Folch <i>et al.</i>	Extraction enzymatique	
			Huile	Phase dense
PC	68,9 ± 0,1	74,6 ± 0,1	Tr	89,6 ± 0,2
PE	12,8 ± 0,0	15,7 ± 0,2	-	3,5 ± 0,1
PS	8,9 ± 0,2	2,6 ± 0,1	-	2,5 ± 0,1
SPM	4,6 ± 0,1	1,3 ± 0,0	-	1,4 ± 0,0
PI	4,8 ± 0,1	5,8 ± 0,2	-	3,0 ± 0,1

phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), sphingomyéline (SPM) et phosphatidylinositol (PI).

5.3.3 Analyse des acides gras

La composition totale en acides gras des œufs la truite arc-en-ciel est donnée dans le **Tableau X**. Dans la partie gauche du tableau figure la composition après extraction par la méthode de Bligh et Dyer, tandis que dans la partie droite nous avons représenté la teneur en acides gras dans l'huile extraite par traitement enzymatique (Alcalase[®]). Dans ce tableau figure également la composition détaillée des acides gras contenus dans les triacylglycérols (TAG) et ceux entrant dans la structure des lipides polaires (LP). Ces résultats sont comparés à la littérature, notamment à la teneur en acides gras des lipides totaux de la truite arc-en-ciel selon (Haliloğlu *et al.*, 2003), à ceux des TAG des œufs de saumon (Shirai *et al.*, 2006), ainsi qu'à ceux contenus dans les lipides polaires (LP) des œufs de saumon. D'emblée on peut observer que si la composition globale reste qualitativement identique, des différences importantes de proportions apparaissent. C'est notamment le cas des lipides totaux pour l'acide oléique C18 :1*n*-9 qui est de 15,6% dans le présent travail et de 22,41% selon (Haliloğlu *et al.*, 2003). Une différence très

importante apparaît pour l'EPA (C20 :5*n*-3), qui passe du double au simple entre les deux résultats (11,5 et 4,7%). La différence pour le DHA (C22 :6*n*-3) est beaucoup moins marquée (24,0 contre 20,7%). Globalement, la teneur totale en AGPI ne présente toutefois pas une très grande différence (46,4% contre 41,8%). Ces variations peuvent évidemment s'expliquer par les nombreux paramètres que nous avons évoqués dans les chapitres précédents (environnement, saison, cycle sexuel), mais ils peuvent aussi être la conséquence de défauts dans la manipulation des échantillons. Il faut en effet rappeler l'extrême sensibilité des AGPI à l'oxydation, qui les rend souvent difficiles à analyser.

Si l'on compare maintenant le détail de la composition en acides gras entre les triacylglycérols et les lipides polaires (extraction chimique), il est clair qu'en ce qui concerne l'EPA, la répartition entre les TAG et les LP reste très proche de la valeur observée pour les lipides totaux (9,7 et 10,9%). D'après Shirai *et al.*, 2003, cette répartition est du même type, mais les proportions relatives sont beaucoup plus grandes (14,9 et 16,1%). En revanche, il est important de noter que les lipides polaires contiennent une grande quantité de DHA, qui atteint 29,7% dans cette étude. La teneur globale en AGPI des lipides polaires (50,1%), reste très proche de celle mentionnée par Shirai *et al.*, (2003). Dans l'extraction enzymatique, on peut noter des différences très peu marquées. En effet, si dans la première colonne ("Lipides totaux des œufs de truite"), la teneur globale en AGPI est de 46,4%, alors qu'elle est de 41,8% dans l'extraction enzymatique (colonne "Huile"), c'est parce que cette dernière ne comporte que les résultats propres aux lipides neutres. On notera par ailleurs que l'huile contenue dans la phase dense contient 10,9% d'EPA et 25,6% de DHA, pour un total en AGPI de 48,6%, indiquant que cette phase contient probablement une forte proportion de lipides polaires.

Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux acides gras qui composent les deux phospholipides principaux composant l'œuf de truite, c'est-à-dire la PC et la PE, il apparaît très clairement que la PC est beaucoup moins riche en EPA (7,1%) que la PE (14,3%), alors que le DHA est sensiblement identique dans les deux molécules (27,1% contre 24,1%). Le total des AGS, AGMI et surtout AGPI est par ailleurs remarquablement égal pour les deux phospholipides (**Tableau XI**). La seule différence notable réside dans le rapport DHA/EPA qui est de 1,7 pour la PE et de 3,8 dans la PC.

Tableau X. Composition en acides gras (%) des lipides totaux d'œufs de truite arc-en-ciel extraits par Bligh et Dyer (1959) et Alcalase[®], $n=3$

Acide gras	Extraction par Bligh & Dyer (1959)						Extraction enzymatique	
	Lipides totaux des œufs de truite	Réf. ^a	TAG	Réf. ^b	LP	Réf. ^c	Huile	Huile de la phase dense
14:0	3,0 ± 0,1	3,1	3,8 ± 0,9	5,8	1,8 ± 0,1	2,1	3,8 ± 0,0	2,4 ± 0,0
16:0	16,1 ± 0,0	15,2	15,4 ± 2,2	9,3	14,0 ± 0,2	12,0	13,7 ± 0,0	17,2 ± 0,2
16:1 $n-7$	6,2 ± 0,0	5,9	7,3 ± 1,3	8,0	1,6 ± 0,1	2,3	6,8 ± 0,1	5,2 ± 0,1
18:0	5,1 ± 0,0	3,1	4,1 ± 0,2	2,0	11,2 ± 0,9	8,9	3,4 ± 0,0	6,4 ± 0,0
18:1 $n-9$	15,6 ± 0,1	22,4	20,1 ± 1,1	20,8	7,9 ± 0,3	10,7	16,0 ± 0,1	15,2 ± 0,0
18:1 $n-7$	4,3 ± 0,2	-	5,4 ± 0,1	3,1	6,1 ± 0,0	3,4	3,4 ± 0,2	4,3 ± 0,1
18:2 $n-6$	4,2 ± 0,0	9,6	4,9 ± 0,5	1,3	1,7 ± 0,0	0,5	4,7 ± 0,0	3,4 ± 0,1
20:1 $n-9$	3,4 ± 0,0	0,9	4,0 ± 0,3	1,2	5,6 ± 0,3	0,3	1,1 ± 0,0	0,8 ± 0,0
20:4 $n-6$	1,9 ± 0,0	3,1	1,6 ± 0,1	2,2	3,7 ± 0,4	2,7	2,4 ± 0,0	3,7 ± 0,0
20:5$n-3$	11,5 ± 0,0	4,7	9,7 ± 1,5	14,9	10,9 ± 0,7	16,1	11,3 ± 0,0	10,9 ± 0,1
22:5 $n-3$	4,8 ± 0,0	1,2	4,1 ± 0,1	5,5	4,1 ± 0,1	6,2	4,4 ± 0,0	4,9 ± 0,0
22:6$n-3$	24,0 ± 0,3	20,7	17,4 ± 3,4	14,3	29,7 ± 0,7	27,9	19,0 ± 0,2	25,6 ± 0,1
Total AGS	24,2 ± 0,1	21,9	23,3 ± 2,9	17,1	27,0 ± 1,0	23,0	20,8 ± 0,0	26 ± 0,3
Total AGMI	29,4 ± 0,2	33,9	36,7 ± 2,1	33,1	21,2 ± 0,1	16,7	27,4 ± 0,2	25,5 ± 0,0
Total AGPI	46,4 ± 0,3	41,8	37,7 ± 4,6	38,2	50,1 ± 1,1	53,4	41,8 ± 0,2	48,6 ± 0,2
Total $n-9$	19,0 ± 0,1	-	24,1 ± 0,8	22,0	13,5 ± 0,1	11,0	17,1 ± 0,1	16,0 ± 0,0
Total $n-7$	10,4 ± 0,2	-	12,6 ± 1,4	11,1	7,8 ± 0,1	5,7	10,2 ± 0,3	9,5 ± 0,0
Total $n-6$	6,1 ± 0,0	15,7	6,5 ± 0,4	3,5	5,4 ± 0,3	3,2	7,1 ± 0,0	7,1 ± 0,0
Total $n-3$	40,3 ± 0,3	26,0	31,2 ± 5,0	34,7	44,7 ± 1,5	50,2	34,7 ± 0,2	41,5 ± 0,2
$n-3/n-6$	6,6 ± 0,1	1,6	4,8 ± 1,1	9,9	8,2 ± 0,8	15,6	4,9 ± 0,0	5,9 ± 0,0
DHA/EPA	2,1 ± 0,0	4,4	1,8 ± 0,1	0,9	2,7 ± 0,1	1,7	1,7 ± 0,0	2,3 ± 0,0

TAG: triacylglycérols ; LP: lipides polaires

 Réf.^a : Composition en acides gras des lipides totaux d'œufs non fécondés de la truite arc-en-ciel (Haliloğlu *et al.*, 2003),

 Réf.^b : Composition en acides gras (%) des TAG de l'Ikura (œufs de saumon salés, extraction par Bligh et Dyer, 1959) (Shirai *et al.*, 2006),

^c : Composition en acides gras (%) des LP de l'Ikura (œufs de saumon salés, extraction par Bligh et Dyer, 1959) (Shirai *et al.*, 2006).

Tableau XI. Composition en acides gras (%) de la phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidyléthanolamine (PE) de l'huile d'œufs de truite, $n=2$

Acide gras	PC	PE
14:0	3,0 ± 0,7	1,1 ± 0,0
16:0	23,0 ± 0,7	11,4 ± 0,1
16:1 n -7	1,5 ± 0,4	0,4 ± 0,0
18:0	11,4 ± 0,8	15,3 ± 0,2
18:1 n -9	10,2 ± 1,0	8,9 ± 0,3
18:1 n -7	4,4 ± 0,4	9,4 ± 0,0
18:2 n -6	2,3 ± 0,2	2,8 ± 0,3
20:1 n -9	2,1 ± 0,6	6,0 ± 0,1
20:4 n -6	2,3 ± 0,2	2,9 ± 0,1
20:5n-3	7,1 ± 0,5	14,3 ± 0,2
22:5 n -3	3,3 ± 0,1	2,6 ± 0,1
22:6n-3	27,1 ± 1,1	24,1 ± 0,0
Total AGS	24,2 ± 2,2	24,2 ± 0,3
Total AGMI	29,4 ± 0,4	29,4 ± 0,1
Total AGPI	46,4 ± 1,7	46,4 ± 0,2
Total n -9	19,0 ± 0,4	19,0 ± 0,2
Total n -7	10,4 ± 0,8	10,4 ± 0,1
Total n -6	6,1 ± 0,0	6,1 ± 0,3
Total n -3	40,3 ± 1,7	40,3 ± 0,1
n -3/ n -6	6,6 ± 0,4	6,6 ± 0,3
DHA/EPA	3,8 ± 0,1	1,7 ± 0,0

AGS : acides gras saturés, AGMI : acides gras mono-insaturés, AGPI : acides gras poly-insaturés.

5.3.4 *Insaponifiable et cholestérol*

La teneur en insaponifiable total déterminée par gravimétrie sur 3 essais est de $3,8 \pm 0,4\%$ des lipides totaux. Ce résultat peut apparaître élevé, mais il est courant dans tous les œufs (l'œuf de poule entier en contient 370 mg, soit environ 1000 à 1200 mg pour le jaune isolé). Le cholestérol déterminé par TLC-FID est d'abord calibré au moyen d'une droite d'étalonnage à partir d'échantillons dissous dans le chloroforme. La droite étalon donne une excellente résolution (**Figure 25**). Si l'on considère les résultats comparés entre la méthode chimique d'extraction des lipides totaux et les trois hydrolyses enzymatiques, il apparaît très clairement que la méthode chimique est beaucoup plus efficace, puisque le cholestérol correspond à 3,45% des lipides totaux, soit la quasi-totalité de l'insaponifiable (3,8%). En revanche, l'extraction de l'huile par voie enzymatique montre que l'on extrait seulement la moitié du cholestérol (1,56 à 1,86%

des lipides totaux). Il est probable que, de par ses propriétés tensio-actives, le cholestérol soit retenu dans le réseau protéique non déstructuré par l'enzyme et n'apparaisse donc pas dans l'huile neutre (**Figure 26**). Il s'agit d'une observation intéressante dans la mesure où l'on souhaite utiliser comme complément alimentaire une huile appauvrie en cholestérol.

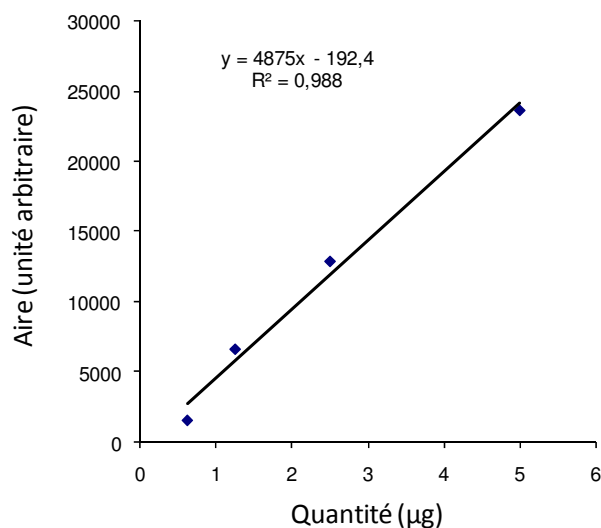


Figure 25. Courbe d'étalonnage du standard de cholestérol par TLC-FID Iatroscan®.

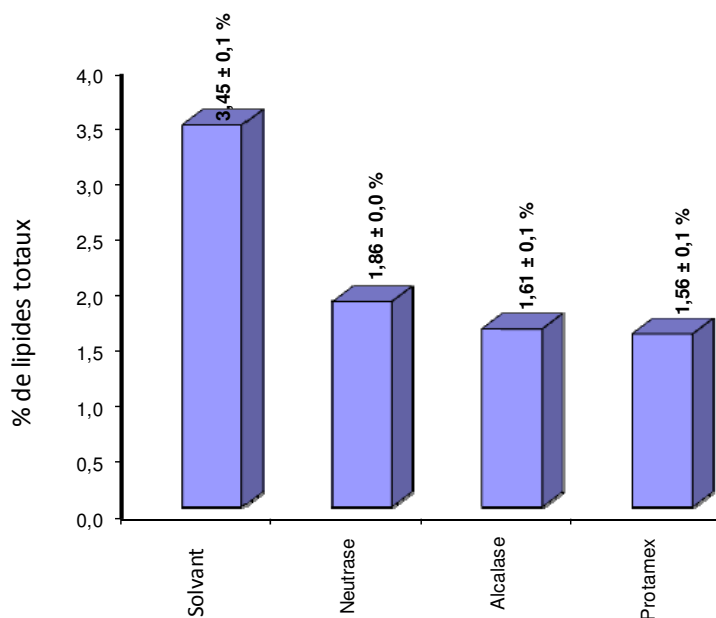


Figure 26. Variation des valeurs de cholestérol dans l'huile totale extraite par solvant (Bligh et Dyer, 1959) et dans les différentes huiles issues d'hydrolysats d'œufs de truite arc-en-ciel par l'Alcalase® (60°C, pH=8,0, E/S=3%), la Neutrase® (50°C, pH=7,5, E/S=3%) et la Protamex® (45°C, pH=7,5, E/S=3%) après 2h d'hydrolyse.

5.3.5 Analyse calorimétrique

Dans le **Tableau XII** sont rassemblés les points et enthalpies de fusion des lipides contenus dans différentes fractions d'huile extraites par une méthode chimique et par voie enzymatique. On peut constater que le point de fusion de l'huile totale extraite par solvant (-16,4°C) se situe sensiblement à la moyenne des points de fusion de l'huile neutre et de l'huile contenue dans la phase dense après extraction enzymatique (**Figure 26 bis**). Ce point de fusion est typique pour une huile de poisson. En effet, on sait que les huiles végétales ont des points de fusion très variables, fonction de leur taux d'insaturation. Par exemple, l'huile de tournesol, très insaturée, fond à -17°C, alors que l'huile d'olive qui l'est beaucoup moins, fond entre 5 et 7°C. En revanche, les huiles de poisson, naturellement riches en AGPI, comportent des fractions qui restent liquides jusqu'à -45°C (voire -50°C pour une fraction particulière), avec des pics à -16°C et -11°C pour l'huile de saumon (Gbogouri, 2005). On note cependant un léger maximum à -35,5°C dans la phase lipidique neutre de l'huile de truite, soulignant la présence d'AGPI. Il faut noter que l'huile de saumon contient près de 57% d'AGPI dans les lipides polaires, tandis que l'huile d'œuf de truite en contient "seulement" 50,1% dans cette fraction. Pour les TAG, les teneurs en AGPI sont relativement proches (39,8% pour l'huile saumon, contre 38,6% pour l'œuf de truite). Cette différence quantitative peut-elle, à elle seule, expliquer un tel écart dans les points de fusion ? Nous n'avons pas été en mesure de conclure, bien que l'on sache qu'une faible différence de régiotribution soit capable de modifier de plusieurs degrés le point de fusion d'une matière grasse solide comme le beurre, par exemple (Bornaz *et al.*, 1995 abc).

Tableau XII. Points de fusion et enthalpies des lipides d'œufs de truite arc-en ciel, par analyse thermique différentielle à balayage.

	Point de fusion (°C)	ΔH (J/g)
Huile d'œufs de truite (extraction par solvant)	-16,4	3,9
Huile neutre d'œufs de truite (extraction enzymatique)	-14,5	6,3
Huile d'œufs de truite, phase dense (extraction enzymatique)	-17,8	4,7

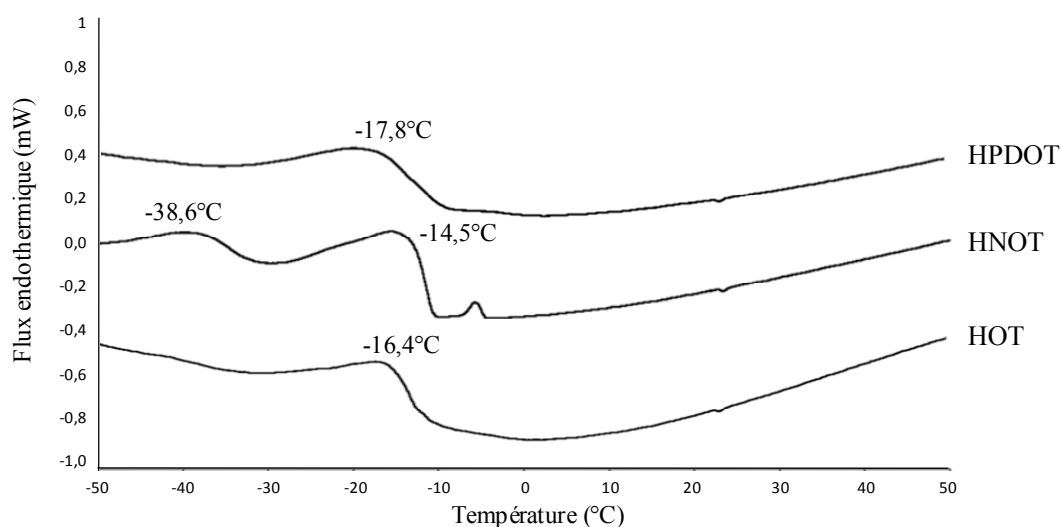


Figure 26 bis. Points de fusion déterminés par analyse thermique différentielle à balayage de l'huile d'œufs de truite arc-en ciel (HOT), de l'huile neutre (HNOT) et de l'huile de la phase dense (HPDOT) extraites après hydrolyse enzymatique par l'Alcalase[®].

Enfin, comme nous l'avons observé, l'huile de la phase dense semble contenir une quantité élevée de phospholipides. Ce sont eux qui, grâce à leur plus forte proportion en AGPI, contribuent à abaisser notablement le point de fusion de cette fraction.

5.3.6 Analyse des protéines, des peptides et des acides aminés

Nous avons vu précédemment que la protéolyse des œufs de truite ou de saumon ne semble affecter que très peu l'intégrité des protéines, puisque le degré d'hydrolyse n'atteint, dans le meilleur des cas, que 7,8% de la fraction totale (Alcalase[®]), voire même 2 à 3% dans le cas de la Protamex[®] et de la Neutrase[®]. Nous avons mis cette faible activité sur le compte de la composition particulière du chorion ou de la présence d'inhibiteurs non compétitifs.

Dans la **Figure 27**, nous avons voulu faire apparaître la quantité d'azote effectivement libérée dans la phase aqueuse au cours de l'hydrolyse. Il est très clair que cette quantité est particulièrement faible, puisqu'elle ne dépasse pas 2,2 g/L pour l'Alcalase[®]. La Neutrase[®] est particulièrement inefficace comme on peut le voir : la quantité d'azote libérée ne passe pas 1,5 g/L et ce maximum est atteint en 30 minutes. Il est donc évident que la protéolyse est très fortement limitée par des facteurs intrinsèques.

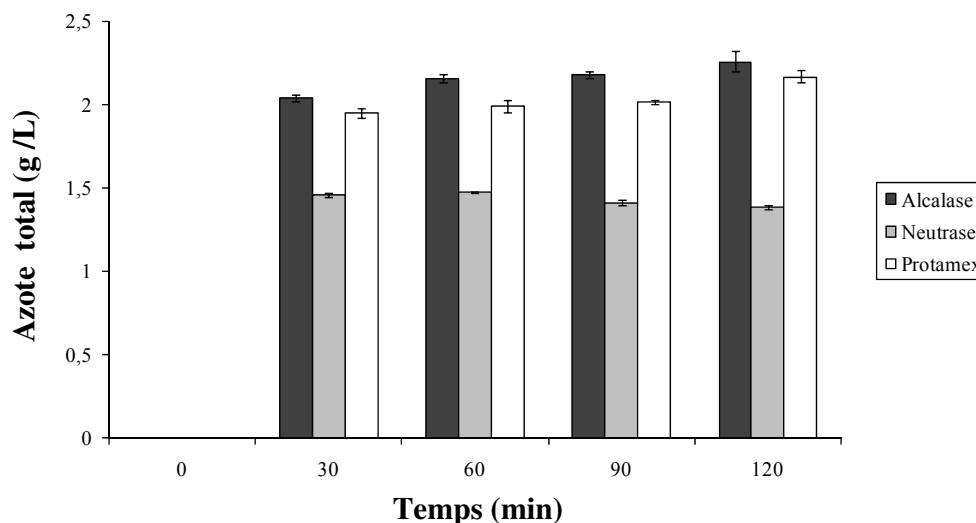


Figure 27. Variation des valeurs d'azote total des différents hydrolysats d'œufs de la truite par l'Alcalase[®] (60°C, pH=8,0, E/S=3%), la Neutrase[®] (50°C, pH=7,5, E/S=3%) et la Protamex[®] (45°C, pH=7,5, E/S=3%).

5.3.7 Classes de peptides dans les hydrolysats

Les hydrolysats de protéines ont été fractionnés par chromatographie liquide d'exclusion de taille sur une colonne Superdex Peptide HR 10/30. La distribution des classes de peptides dans les hydrolysats des œufs de truite arc-en-ciel obtenus par l'Alcalase[®], la Neutrase[®] et la Protamex[®] est présentée dans le **Tableau XIII**. La taille des peptides dépend du degré d'hydrolyse et est en relation avec les propriétés organoleptiques et fonctionnelles des hydrolysats. Il s'agit d'un paramètre important à contrôler en cas d'utilisation ultérieure des hydrolysats en alimentation humaine.

La répartition des profils de poids moléculaires des peptides des hydrolysats générés après 120 min d'hydrolyse enzymatique d'œufs de truite arc-en-ciel par l'Alcalase[®], la Neutrase[®] et la Protamex[®] est représentée sur les **Figures 28 à 30**. On sait que la taille des peptides est en relation avec leurs propriétés organoleptiques et fonctionnelles (Mohr, 1980 ; Gilberg *et al.*, 2002), mais ce paramètre est difficile à prendre en compte dans le cas étudié ici car, en raison du faible degré d'hydrolyse obtenu, des fragments macroscopiques sont encore très visibles à la fin

de l'expérience. En conséquence de quoi, les profils peptidiques obtenus n'ont qu'une valeur relative.

Tableau XIII. Distribution des classes de peptides dans les hydrolysats d'œufs de la truite arc-en-ciel obtenus par l'Alcalase[®], la Neutrase[®] et la Protamex[®].

Masse moléculaire (g/mol)	Aire %		
	Alcalase [®]	Neutrase [®]	Protamex [®]
>3500	7,53	2,59	0
550-3500	63,55	63,37	77,12
350-550	11,11	8,59	5,74
< 350	17,79	24,48	17,12

Cette analyse fait apparaître des fragments d'une taille supérieure à 3000 g/mole entre 10 et 15 minutes d'élution. On peut observer que, dans le cas de l'Alcalase[®], ces fragments sont relativement importants au sein du même profil, alors que ceux-ci diminuent considérablement avec la Neutrase[®] et disparaissent même complètement avec la Protamex[®]. En revanche, on observe un pic situé vers 200g/mole, d'une intensité relativement plus intense dans le cas de la Neutrase[®] et intermédiaire dans la Protamex[®] où ce sont les fragments compris entre 500 et 3000 g/mole qui dominent en proportion relative. On peut souligner que c'est avec l'Alcalase[®] que l'huile est libérée de la matrice protéique en quantité la plus importante. Il est raisonnable de penser qu'un degré d'hydrolyse élevé n'est pas synonyme d'une quantité d'huile libérée plus importante. Cette observation avait été relevée par Gbogouri (2005) et avait été mise sur le compte de l'accroissement du caractère tensio-actif des peptides générés, qui seraient susceptibles de favoriser l'émulsification des lipides neutres dans la phase aqueuse sous-jacente.

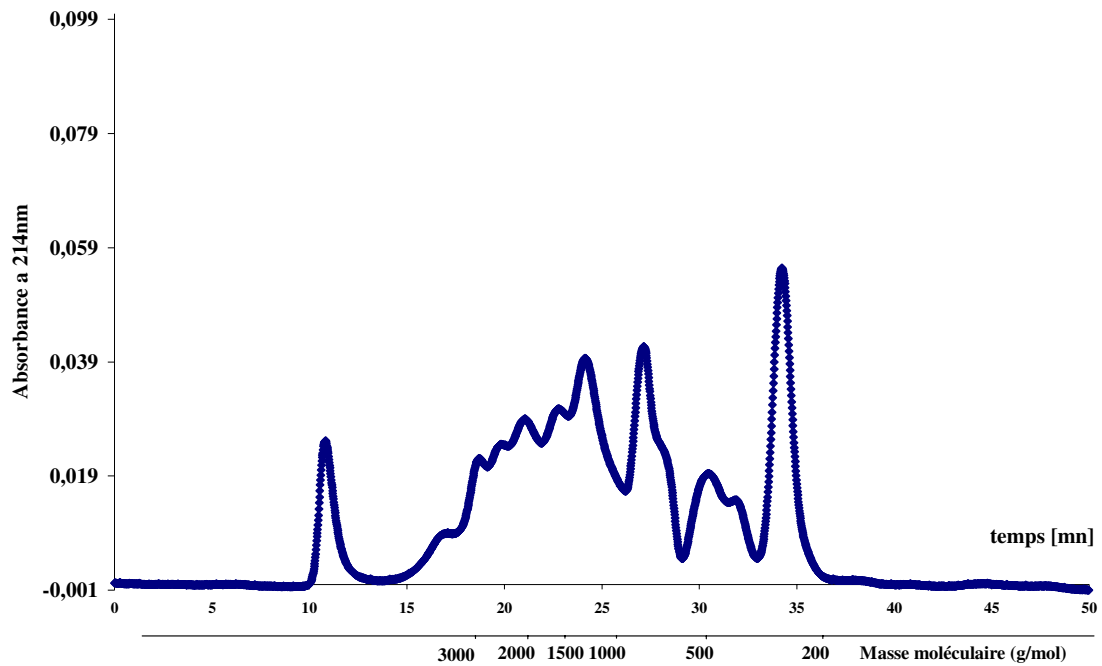


Figure 28. Chromatographie Superdex Peptide HR 10/30 de l'hydrolysat d'œufs de truite arc-en-ciel après 120 min d'hydrolyse par l'Alcalase[®] (60°C, pH=8,0, E/S=3%).

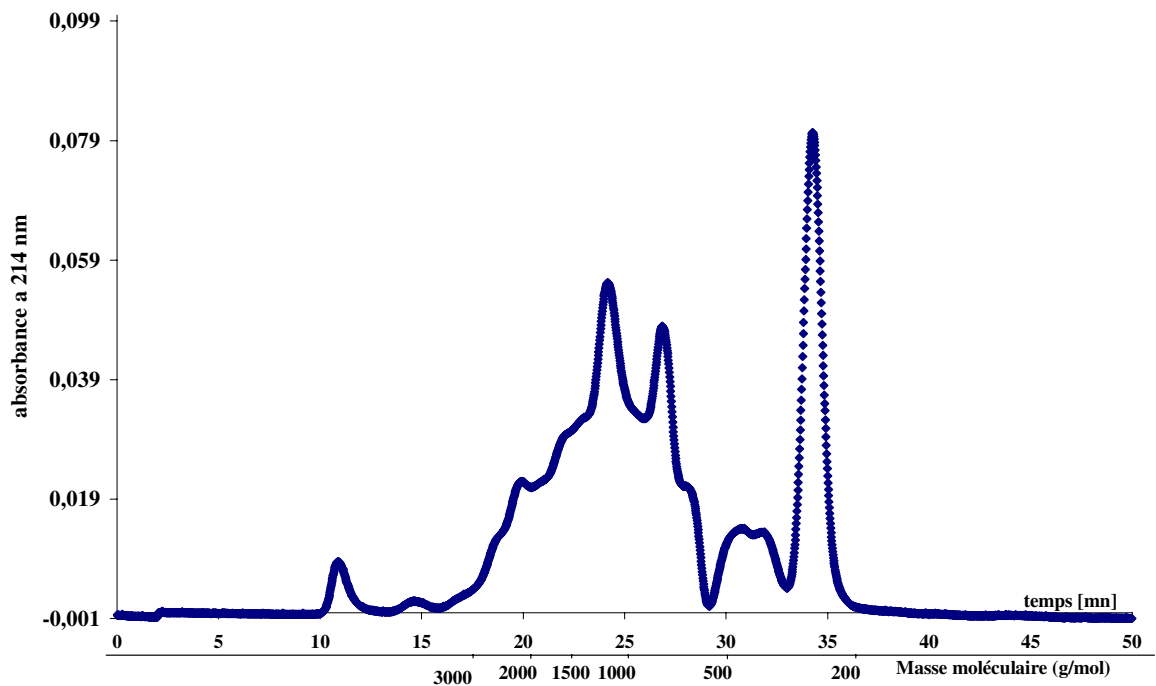


Figure 29. Chromatographie Superdex Peptide HR 10/30 de l'hydrolysat d'œufs de truite arc-en-ciel après 120 min d'hydrolyse par la Neutrase[®] (50°C, pH=7,5, E/S=3%).

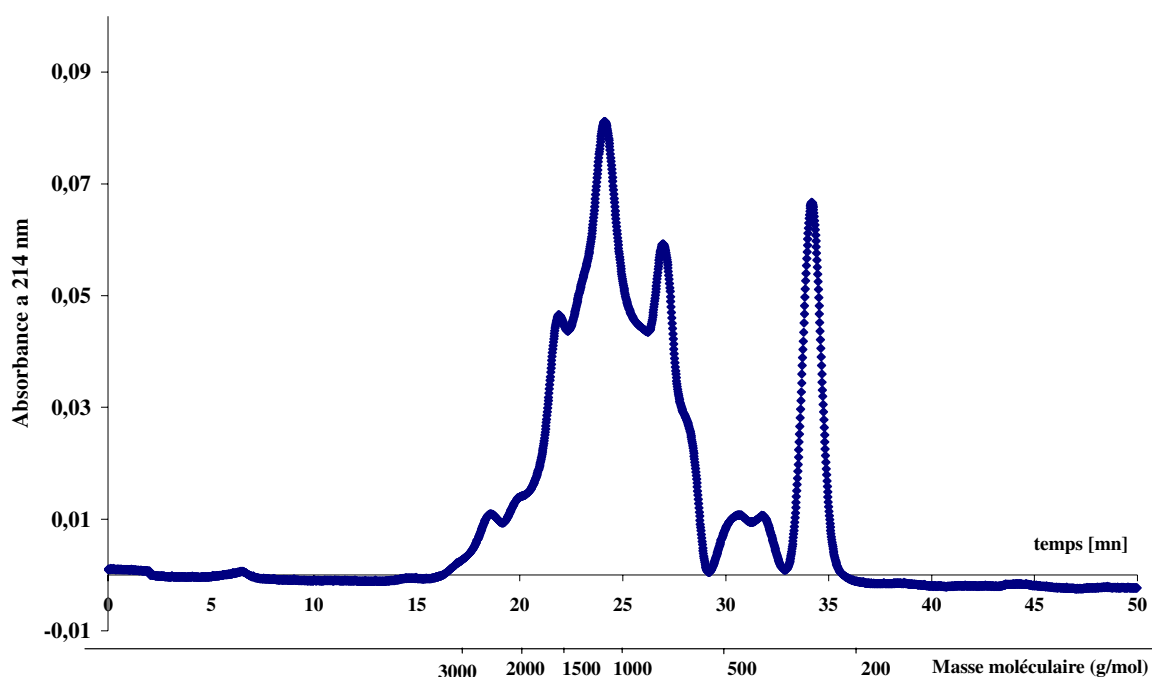


Figure 30. Chromatographie Superdex Peptide HR 10/30 de l'hydrolysât d'œufs de truite arc-en-ciel après 120 min d'hydrolyse par la Protamex[®] (60°C, pH=8,0, E/S=3%).

La composition en acides aminés des protéines d'œufs de truite et de saumon est présentée dans le **Tableau XIV**.

Les aminogrammes des deux échantillons sont semblables et du même ordre de grandeur que ceux des œufs de truite publiés par Kaitaranta *et al.* (1980), avec des valeurs très proches. Cependant, ces résultats montrent que les œufs de truite sont riches en acides Asn+Asp (15,8% des acides aminés totaux), en Gln+Glu (13,9%) et en Ala (12,7%). Ces valeurs sont plus élevées que celles trouvées par Kaitaranta *et al.* (1980), ce qui peut s'expliquer par une différence dans l'alimentation des poissons, probablement plus riche en ces acides aminés dans le cas étudié ici.

Il est particulièrement important de mentionner que les acides aminés Glu, Lys et Arg jouent un rôle important dans l'insolubilité de la membrane de l'œuf dans un milieu aqueux. Cela peut s'expliquer par le fait que l'acide glutamique peut former des liaisons isopeptidiques avec la Lys ou l'Arg (Papadopoulou *et al.*, 1996), ce qui rend le chorion dur et difficile à dégrader par les enzymes ou les bactéries dans le milieu aqueux. Cette observation nous amène à poser la question de la digestibilité des œufs de poisson intacts dans le tube digestif.

Tableau XIV. Composition en acides aminés (% des acides aminés totaux) des œufs de la truite arc-en-ciel et de saumon Pacifique.

Acide aminé	Œufs de truite % d'acides aminés totaux	Réf.	Œufs de saumon % d'acides aminés totaux
Asn + Asp	15,8	6,6	14,0
Gln + Glu	13,9	8,7	13,6
Ser	6,2	4,6	6,31
Gly	6	2,6	5,8
His	2,1	3,1	2,3
Arg	3,9	6,8	5,0
Thr	3,5	4,1	4,5
Ala	12,7	5,6	12,7
Pro	4,8	4,3	5,3
Tyr	2,7	4,4	2,8
Val	6,0	5,4	6,3
Met	2,1	2,7	1,9
Cys	1,7	3,7	0,8
Ile	3,9	5,0	4,0
Leu	8,0	7,7	7,9
Phe	3,5	5,3	3,4
Lys	3,1	6,4	3,1

Réf. : teneur en acides aminés (g/100 g de protéines) des œufs de la truite arc-en-ciel (Kaitaranta *et al.*,1980).

5.4 REGIODISTRIBUTION DES ACIDES GRAS

5.4.1 Triacylglycérols

La distribution des positions de chaque acide gras sur la molécule de glycérol est d'une importance capitale, car elle peut influencer leur métabolisme, mais également la structure et la composition des lipoprotéines (Senanyake et Shahidi, 2002 ; Kubow, 1996). La distribution stéréospécifique des trois positions est aussi, bien entendu, une conséquence directe du processus biosynthétique menant aux acides gras (Senanyake et Shahidi, 2002). D'un point de vue phylogénétique, l'analyse de la régiotribution des acides gras sur la molécule de glycérol peut être une approche intéressante pour identifier des espèces ou bien pour différencier des produits lipidiques d'origine animale (Szabó *et al.*, 2007). Parmi les multiples possibilités d'étude de la distribution des acides gras, qu'elles soient chimiques, enzymatiques ou spectroscopiques, comme la RMN, par exemple (Aursand *et al.*, 1995 ; Ando *et al.*, 2004), nous avons choisi la méthode directe d'analyse publiée par Turon *et al.* (2002) sur l'huile de thon. Elle permet de déterminer la distribution des acides gras en utilisant un réactif de Grignard tel que le bromure d'éthyl-magnésium.

Dans le **Tableau XV** nous avons rassemblé pour comparaison les compositions des acides gras des lipides neutres des œufs de saumon atlantique et de la truite arc-en-ciel. En vis-à-vis, nous avons fait figurer la position de l'acide gras en α sur le glycérol. Les résultats regroupés dans ce tableau donnent des variations relatives par colonne et ne permettent donc pas de visualiser directement la proportion d'acides gras estérifiés en position β . Pour cela, il faut recourir à la méthode de Turon *et al.* (2002), dans laquelle la régiotribution des acides gras dans la position β peut être déterminée par un calcul donnant l'estimation la plus précise et selon laquelle :

$$\beta\text{MAG} = (3\text{TAG}) - (2\alpha\text{MAG}) \text{ en \% molaire}$$

Exemple de calcul pour l'acide palmitique dans l'œuf de saumon:

$\beta\text{MAG} = (3 \times 10,49) - (2 \times 16,03) = -0,59\%$, ce qui signifie, compte tenu de l'erreur expérimentale, que cette valeur est sensiblement égale à 0. Dans ce cas, le calcul du pourcentage de position en

β est de: $0/(3 \times 10,49) = 0$. On peut donc conclure que la totalité de l'acide palmitique dans les triacylglycérols est en α/α , avec un résultat sensiblement identique pour l'œuf de truite.

Si l'on prend le cas de l'acide docosahexaénoïque, le même calcul donne :

$\beta\text{MAG} = (3 \times 13,93) - (2 \times 5,93) = 29,93\%$, ce qui donne pour le pourcentage de position en β égal à $29,93/(3 \times 13,93) = 72\%$. D'où l'on peut conclure que 72% du DHA est en β dans les triacylglycérols de l'œuf de saumon et 79% dans l'œuf de truite.

Nous avons choisi de ne faire figurer dans **Tableau XV bis**, que les acides gras les plus significatifs, c'est-à-dire le C16:0, le C18:1 *n*-9, le C20:5 *n*-3 et le C22:6 *n*-3.

Les résultats font apparaître clairement que jusqu'au C16:0 iso, il n'y a pas de différence significative entre les deux genres. Une différence nette est observée à partir de l'acide palmitique : celui-ci est positionné préférentiellement en α dans les deux cas. Pour l'acide stéarique, dont la quantité relative est faible (2,59% pour le saumon contre 3,32 pour la truite), la position α est également favorisée. En revanche, l'acide oléique (C18:1 *n*-9), en proportions similaires, est positionné à 33 et 34% en β dans les deux cas, soit une distribution aléatoire. Si l'on considère l'EPA, celui-ci se retrouve en proportions relatives très différentes (17,39% chez le saumon, contre 10,58% chez la truite), mais avec 38% et 44% en position β chez le saumon et 84% la truite, sa distribution est plus favorisée en β . Quant au DHA, dont les proportions sont voisines avec 13,93% chez le saumon et 15,66% chez la truite, le positionnement en β est, comme nous l'avons vu plus haut, à 72% chez le premier et 79% chez la seconde. Ce positionnement préférentiel des AGPI en position β est très important du point de vue nutritionnel, car c'est dans cette position privilégiée qu'ils sont métabolisés (Delplanque, 2004 ; Combe et Boué-Vaysse, 2004). La biodisponibilité intestinale d'un acide gras ne dépend pas uniquement de sa teneur sur les triacylglycérols (TAG) ingérés, mais également de sa répartition entre les positions interne (*sn*-2) et externes (*sn*-1 + *sn*-3) du glycérol. Lors de l'hydrolyse digestive des TAG par la lipase pancréatique, l'acide gras situé sur la position *sn*-2 n'est pas libéré, contrairement à ceux situés en *sn*-1 et *sn*-3, pour lesquelles l'enzyme possède une spécificité. Pour un acide gras donné, la structure des TAG détermine sa forme d'absorption (2-monoglycéride s'il est en *sn*-2, acide gras libre s'il est en *sn*-1 ou *sn*-3) et son devenir métabolique. Ainsi, les 2-MAG, dans l'entérocyte, servent d'amorce pour la synthèse des TAG

qui sont ensuite résorbés dans la lymphe, puis le sang (Baron et Champion, 2002). Dans les huiles de poisson, les AGPI-LC sont préférentiellement estérifiés en position *sn*-2 dans les TAG. L'huile de foie de morue et le saumon ont la majorité du DHA en *sn*-2 alors que l'EPA se répartit sur les autres positions. L'absorption et le transport dans les chylomicrons d'EPA et DHA sont augmentés lorsqu'ils sont estérifiés en position *sn*-2 sur un TAG contenant des chaînes moyennes en *sn*-1 et *sn*-3 et non pas en tant qu'acides gras libres.

Tableau XV. Composition et répartition en acides gras des lipides neutres (LN) des œufs de la truite arc-en-ciel et du saumon atlantique (esters méthyliques d'acides gras en moles %). n=2.

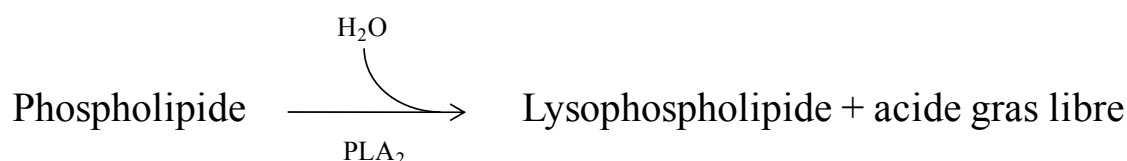
Acide gras	LN œufs de saumon	α LN œufs de saumon	LN œufs de truite	α LN œufs de truite
12:0	0,10 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,00 ± 0,00
14:0	4,41 ± 0,01	5,06 ± 0,01	4,84 ± 0,04	5,75 ± 0,12
15:0 iso	0,25 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,24 ± 0,05	0,22 ± 0,07
15:0	0,55 ± 0,02	0,89 ± 0,01	0,57 ± 0,04	0,88 ± 0,00
16:0 iso	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,15 ± 0,03	0,00 ± 0,00
16:0	10,49 ± 0,02	16,03 ± 0,07	14,88 ± 0,35	22,98 ± 0,07
16:1 trans	0,60 ± 0,01	0,93 ± 0,05	0,53 ± 0,03	0,84 ± 0,00
16:2	0,46 ± 0,04	0,76 ± 0,02	0,35 ± 0,03	0,59 ± 0,02
16:1 (n-7)	8,93 ± 0,06	5,76 ± 0,02	8,03 ± 0,06	6,03 ± 0,07
17:0 iso	0,58 ± 0,00	0,44 ± 0,02	0,59 ± 0,05	0,82 ± 0,02
17:0	0,37 ± 0,03	0,72 ± 0,00	0,36 ± 0,02	0,67 ± 0,04
17:1	0,47 ± 0,01	0,65 ± 0,02	0,33 ± 0,04	0,43 ± 0,00
18:0 iso	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,15 ± 0,06	0,00 ± 0,00
18:0	2,59 ± 0,01	8,79 ± 0,01	3,32 ± 0,05	6,58 ± 0,04
18:1 trans	0,31 ± 0,00	0,98 ± 0,00	0,30 ± 0,03	0,73 ± 0,02
18:1 (n-9)	13,98 ± 0,07	13,83 ± 0,00	14,54 ± 0,35	14,63 ± 0,07
18:1 (n-7)	3,32 ± 0,02	4,59 ± 0,04	3,99 ± 0,03	5,94 ± 0,19
18:2 (n-9)	0,27 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,03	0,00 ± 0,00
18:2 (n-11)	0,20 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,04	0,00 ± 0,00
18:2(n-6)	1,94 ± 0,02	1,90 ± 0,06	4,77 ± 0,07	4,63 ± 0,01
18:3 (n-6)	0,19 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,15 ± 0,04	0,00 ± 0,00
18:3 (n-3)	1,15 ± 0,09	0,97 ± 0,02	1,49 ± 0,07	1,13 ± 0,00
18:4 (n-3)	1,16 ± 0,01	0,92 ± 0,08	0,92 ± 0,04	0,68 ± 0,00
20:1 (n-11,13)	0,00 ± 0,00	1,18 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,38 ± 0,02
20:1 (n-9)	1,22 ± 0,00	1,65 ± 0,01	2,29 ± 0,10	2,85 ± 0,01
20:2 (n-6)	1,36 ± 0,05	1,36 ± 0,00	1,17 ± 0,02	1,35 ± 0,01
20:3 (n-3)	0,31 ± 0,00	0,26 ± 0,09	0,37 ± 0,03	0,50 ± 0,03
20:4 (n-3)	1,67 ± 0,01	1,95 ± 0,01	1,71 ± 0,01	1,87 ± 0,05
20:4 (n-6)	1,47 ± 0,01	1,38 ± 0,05	1,21 ± 0,02	0,96 ± 0,00
20:5 (n-3)	17,39 ± 0,03	16,10 ± 0,10	10,58 ± 0,00	8,87 ± 0,02
22:1 (n-11)	0,38 ± 0,01	0,57 ± 0,01	0,33 ± 0,03	0,50 ± 0,01
22:1 (n-9, 7)	0,39 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,47 ± 0,05	0,74 ± 0,04
22:4 (n-6)	0,37 ± 0,02	0,66 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,53 ± 0,02
22:5 (n-6)	0,27 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,27 ± 0,00	0,00 ± 0,00
22:5 (n-3)	7,17 ± 0,04	4,81 ± 0,04	3,82 ± 0,05	2,17 ± 0,04
22:6 (n-3)	13,93 ± 0,00	5,93 ± 0,01	15,66 ± 0,29	4,98 ± 0,05
Total AGS	18,79 ± 0,03	31,26 ± 0,15	24,69 ± 0,18	37,02 ± 0,07
Total AGMI	29,60 ± 0,07	30,16 ± 0,07	30,82 ± 0,29	33,08 ± 0,19
Total AGPI	48,86 ± 0,04	36,23 ± 0,21	42,61 ± 0,05	27,67 ± 0,09
Total AGI	78,46 ± 0,11	66,39 ± 0,14	73,42 ± 0,24	60,75 ± 0,28
Total n-9	15,20 ± 0,06	15,48 ± 0,01	16,83 ± 0,37	17,48 ± 0,07
Total n-7	12,25 ± 0,07	10,35 ± 0,02	12,02 ± 0,08	11,97 ± 0,10
Total n-6	5,34 ± 0,22	5,30 ± 0,12	7,45 ± 0,13	7,47 ± 0,03
Total n-3	42,79 ± 0,15	30,93 ± 0,34	34,55 ± 0,16	20,20 ± 0,03
n-3/n-6	8,02 ± 0,33	5,83 ± 0,19	4,64 ± 0,10	2,70 ± 0,01
DHA/EPA	0,80 ± 0,00	0,37 ± 0,00	1,48 ± 0,02	0,56 ± 0,01
Total AGS/Total AGI	0,24 ± 0,00	0,47 ± 0,00	0,34 ± 0,00	0,61 ± 0,00

Tableau XV bis. Composition et répartition en acides gras (position β) des lipides neutres (LN) des œufs de la truite arc-en-ciel et du saumon atlantique.

Acide gras	HOT		HOS	
	β (% molaire)	β (% total)	β (% molaire)	β (% total)
C16 :0	-0,59	0	-1,32	0
C18 :1 n -9	14	34	14	33
C20 :5 n -3	20	38	14	44
C22 :6 n -3	30	72	37	79

5.4.2 Lipides polaires

Comme dans les triacylglycérols, dans les phospholipides de tissus animaux, la position α semble être occupée préférentiellement par des acides gras saturés, les AGPI seraient essentiellement situés en position β (Pérez-Palacios *et al.*, 2006 ; Christie, 2003). Les phospholipases A agissent sur ces molécules (**Figure 30 bis**) pour donner, outre des acides gras libres, des lysophospholipides qui sont des médiateurs potentiels de molécules bioactives comme les eicosanoïdes (Ghos *et al.*, 2006 ; Hanahan *et al.*, 1960 ; Sundler *et al.*, 1994).

**Figure 30 bis.** Action de la phospholipase A₂ (PLA₂).

La méthode d'analyse choisie utilisait la phospholipase A₂ qui libère l'acide gras en position β . Comme dans le cas précédent, nous avons rassemblé dans le **Tableau XVI** la composition et la répartition des acides gras sur les phospholipides tirés des œufs de truite arc-en-ciel et de saumon atlantique pour comparaison. Dans la deuxième colonne apparaissent les proportions relatives d'acides gras libérés de la position β par la phospholipase A₂. L'analyse est plus simple que pour les TAG, car l'acide gras libéré est forcément celui qui est en position β .

Ainsi, on peut observer que l'acide palmitique est en proportion élevée, aussi bien chez le saumon (18,26%) que chez la truite (21,0%). Dans l'ensemble des acides gras libérés, le C16:0 est distribué à raison de 15% sur la position β chez le saumon, contre 19% chez la truite, soit sensiblement la totalité de leur teneur relative. Il en est de même pour l'acide stéarique chez les 2 poissons (10% environ). Pour l'acide oléique (n -9), on observe une proportion relative plus

élevée en position β (10,05% chez le saumon, 7,33% chez la truite), alors que cet acide entre pour seulement 7,75 et 5,49% respectivement dans les deux genres. On voit ici que les acides gras insaturés, notamment les AGPI, sont plus fréquents en position β , comme on peut le constater avec l'EPA (15,85% chez le saumon, 8,65% chez la truite) qui occupent l'un et l'autre respectivement 21,62% et 12,64% de cette position et surtout pour le DHA qui est sensiblement positionné à 100% en β .

5.5 VISUALISATION DE L'EFFET DES PROTEASES SUR LE CHORION PAR MICROSCOPIE OPTIQUE ET ELECTRONIQUE

5.5.1 Microscopie optique

La microscopie optique pouvait être un moyen facile et rapide pour avoir une idée préliminaire de la qualité de l'hydrolyse enzymatique et de la capacité d'une protéase à attaquer la membrane de l'œuf, difficile à hydrolyser comme nous l'avons vu plus haut. Ainsi, nous avons pu constater l'action favorable de l'Alcalase[®] sur l'hydrolyse et le rendement de l'huile libérée.

Les photographies dans la **Figure 31** montrent clairement l'attaque du chorion de l'œuf de truite au cours d'un traitement par l'Alcalase[®]. Dans la première image (A), un traitement témoin (sans protéase) de 90 min à 60°C n'a eu aucun effet sur la membrane qui reste intacte. En revanche, celle-ci apparaît très altérée après traitement par l'enzyme. Au cours de la protéolyse, les protéines de la membrane commencent à s'hydrolyser et permettent à l'enzyme d'attaquer les protéines du vitellus. On peut observer, à titre de comparaison, que l'attaque par la Protamex[®] a été beaucoup moins efficace sur la membrane de l'œuf de truite qui reste pratiquement intacte (**Figure 32**). Ces observations confortent les résultats inattendus que nous avons obtenus sur la faiblesse des degrés d'hydrolyse. Les phénomènes conduisant aux variations des teneurs en lipides observées dans les différentes fractions lors de l'utilisation des différentes protéases peuvent être expliqués par l'efficacité de l'enzyme à attaquer le chorion, libérant avec plus ou moins de rendement, les gouttelettes d'huile contenues dans le vitellus.

Tableau XVI. Composition et répartition des acides gras des lipides polaires (LP) des œufs de la truite arc-en-ciel et du saumon atlantique (esters méthyliques d'acides gras en moles %). n=2, AGL : acide gras en position β libéré par la phospholipase A2.

Acide gras	LP œufs de saumon	AGL LP œufs de saumon	LP œufs de truite	AGL LP œufs de truite
12:0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
14:0	1,81 ± 0,08	1,53 ± 0,06	1,66 ± 0,11	1,80 ± 0,05
15:0 iso	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
15:0	0,39 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,50 ± 0,07	0,49 ± 0,03
16:0	18,26 ± 0,11	14,97 ± 0,14	20,99 ± 0,22	19,04 ± 0,06
16:1 trans	0,34 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,42 ± 0,08	0,44 ± 0,05
16:2	0,35 ± 0,11	0,00 ± 0,00	0,38 ± 0,04	0,00 ± 0,00
16:1 (n-7)	2,69 ± 0,16	2,19 ± 0,05	1,64 ± 0,10	1,99 ± 0,06
17:0 iso	0,40 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,53 ± 0,07	0,00 ± 0,00
17:0	0,54 ± 0,04	0,57 ± 0,04	0,52 ± 0,03	0,62 ± 0,07
17:1	0,31 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,15 ± 0,04	0,00 ± 0,00
18:0 iso	0,21 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,06	0,00 ± 0,00
18:0	10,42 ± 0,16	9,43 ± 0,08	9,11 ± 0,11	10,34 ± 0,05
18:1 trans	0,47 ± 0,08	0,45 ± 0,07	0,34 ± 0,04	0,40 ± 0,04
18:1 (n-9)	7,75 ± 0,11	10,05 ± 0,06	5,49 ± 0,09	7,33 ± 0,10
18:1 (n-7)	4,50 ± 0,07	3,69 ± 0,06	4,58 ± 0,06	3,77 ± 0,11
18:2 (n-9)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,27 ± 0,05	0,00 ± 0,00
18:2 (n-11)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18:2(n-6)	0,48 ± 0,01	0,85 ± 0,03	1,20 ± 0,11	1,66 ± 0,07
18:3 (n-6)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18:3 (n-3)	0,45 ± 0,03	0,57 ± 0,02	0,43 ± 0,06	0,48 ± 0,06
18:4 (n-3)	0,32 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,05	0,00 ± 0,00
20:1 (n-11,13)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:1 (n-9)	2,43 ± 0,06	1,55 ± 0,04	3,73 ± 0,05	3,10 ± 0,06
20:2 (n-6)	0,65 ± 0,03	0,70 ± 0,06	1,22 ± 0,02	1,05 ± 0,05
20:3 (n-3)	0,15 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,03	0,00 ± 0,00
20:4 (n-3)	0,66 ± 0,08	0,61 ± 0,06	0,45 ± 0,01	0,37 ± 0,03
20:4 (n-6)	2,21 ± 0,06	2,73 ± 0,02	2,41 ± 0,06	3,37 ± 0,07
20:5 (n-3)	15,85 ± 0,04	21,62 ± 0,08	8,65 ± 0,09	12,64 ± 0,11
22:1 (n-11)	0,19 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,00 ± 0,00
22:1 (n-9, 7)	0,24 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,06	0,00 ± 0,00
22:4 (n-6)	0,09 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,03	0,00 ± 0,00
22:5 (n-6)	0,17 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,34 ± 0,06	0,45 ± 0,06
22:5 (n-3)	6,87 ± 0,04	6,76 ± 0,04	3,15 ± 0,01	2,93 ± 0,07
22:6 (n-3)	20,43 ± 1,06	21,02 ± 0,09	29,68 ± 0,08	27,74 ± 0,08
Total AGS	31,64 ± 0,20	26,49 ± 0,03	33,30 ± 0,23	31,80 ± 0,11
Total AGMI	18,93 ± 0,20	17,94 ± 0,13	16,84 ± 0,19	17,03 ± 0,07
Total AGPI	48,32 ± 0,51	54,86 ± 0,07	48,41 ± 0,08	50,69 ± 0,18
Total AGI	67,25 ± 0,31	72,80 ± 0,06	65,25 ± 0,11	67,71 ± 0,11
Total n-9	10,18 ± 0,03	11,60 ± 0,02	9,22 ± 0,03	10,43 ± 0,03
Total n-7	7,19 ± 0,08	5,89 ± 0,09	6,22 ± 0,03	5,75 ± 0,03
Total n-6	3,43 ± 0,07	4,28 ± 0,09	4,97 ± 0,01	6,08 ± 0,01
Total n-3	44,72 ± 0,66	50,58 ± 0,02	42,83 ± 0,15	44,16 ± 0,17
n-3/n-6	13,02 ± 0,42	11,81 ± 0,25	8,62 ± 0,02	7,26 ± 0,02
DHA/EPA	1,29 ± 0,05	0,97 ± 0,01	3,43 ± 0,02	2,19 ± 0,01
Total AGS/Total AGI	0,47 ± 0,00	0,36 ± 0,00	0,51 ± 0,00	0,47 ± 0,00

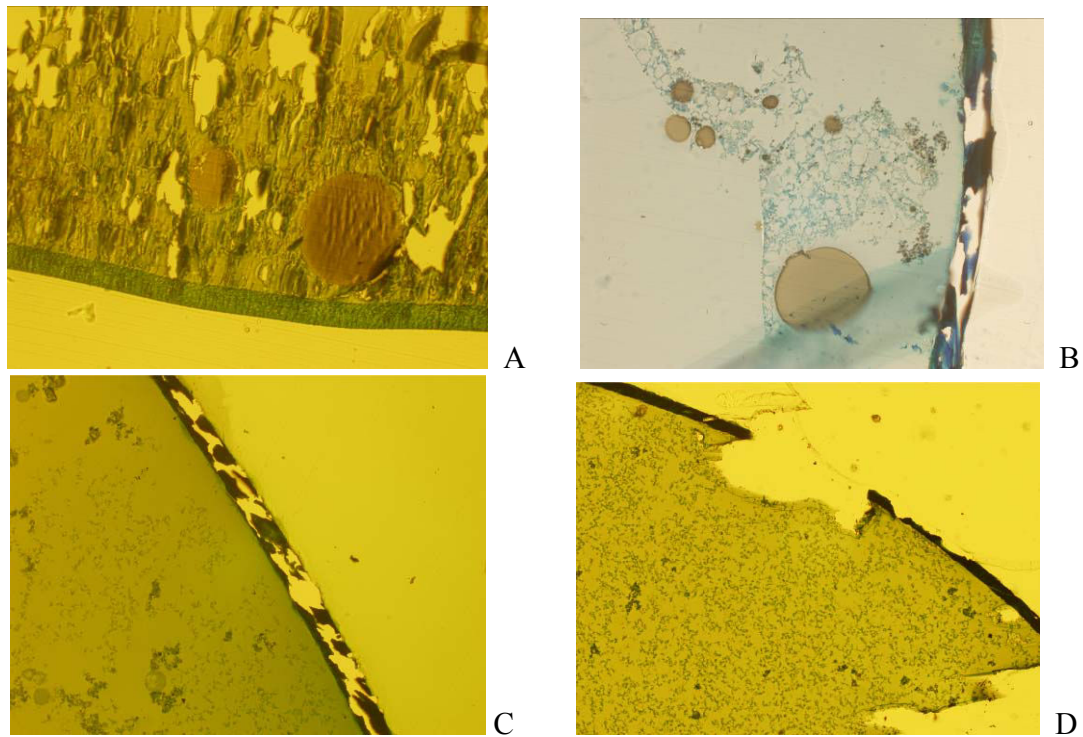


Figure 31. Microphotographies photoniques d'œufs de truite après un traitement à l'Alcalase[®], 120 min, pH 8, 60°C, E/S : 3% A : traitement sans Alcalase[®], 90 min (×40), B : traitement à l'Alcalase[®], 30 min (×40), C : traitement à l'Alcalase[®], 60 min (×40), D : traitement à l'Alcalase[®], 90 min (×20).

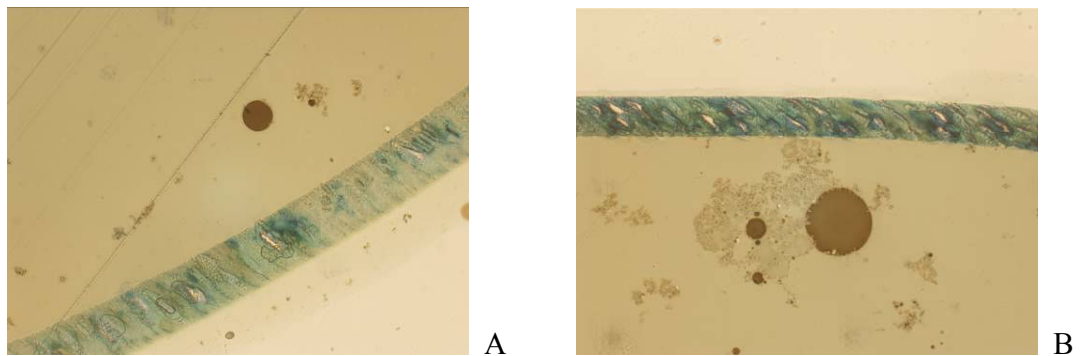


Figure 32. Microphotographies photoniques d'œufs de truite après un traitement à la Protamex[®], 60°C. A : traitement 30 min (×40), B : traitement 90 min (×40).

5.5.2 Microscopie électronique

La microscopie électronique apporte des informations complémentaires intéressantes. En effet, nous avons vu que le chorion est une structure très particulière constituée généralement de trois couches protéiques de haute densité formant une architecture hélicoïdale à liaisons isopeptidiques multiples associées à des ponts disulfures, assurant la défense de l'œuf contre les agressions extérieures (Shabanipour et Heidari, 2004 ; Papadopoulou *et al.*, 1996). Cette structure est schématiquement représentée dans la **Figure 32** ci-dessous :

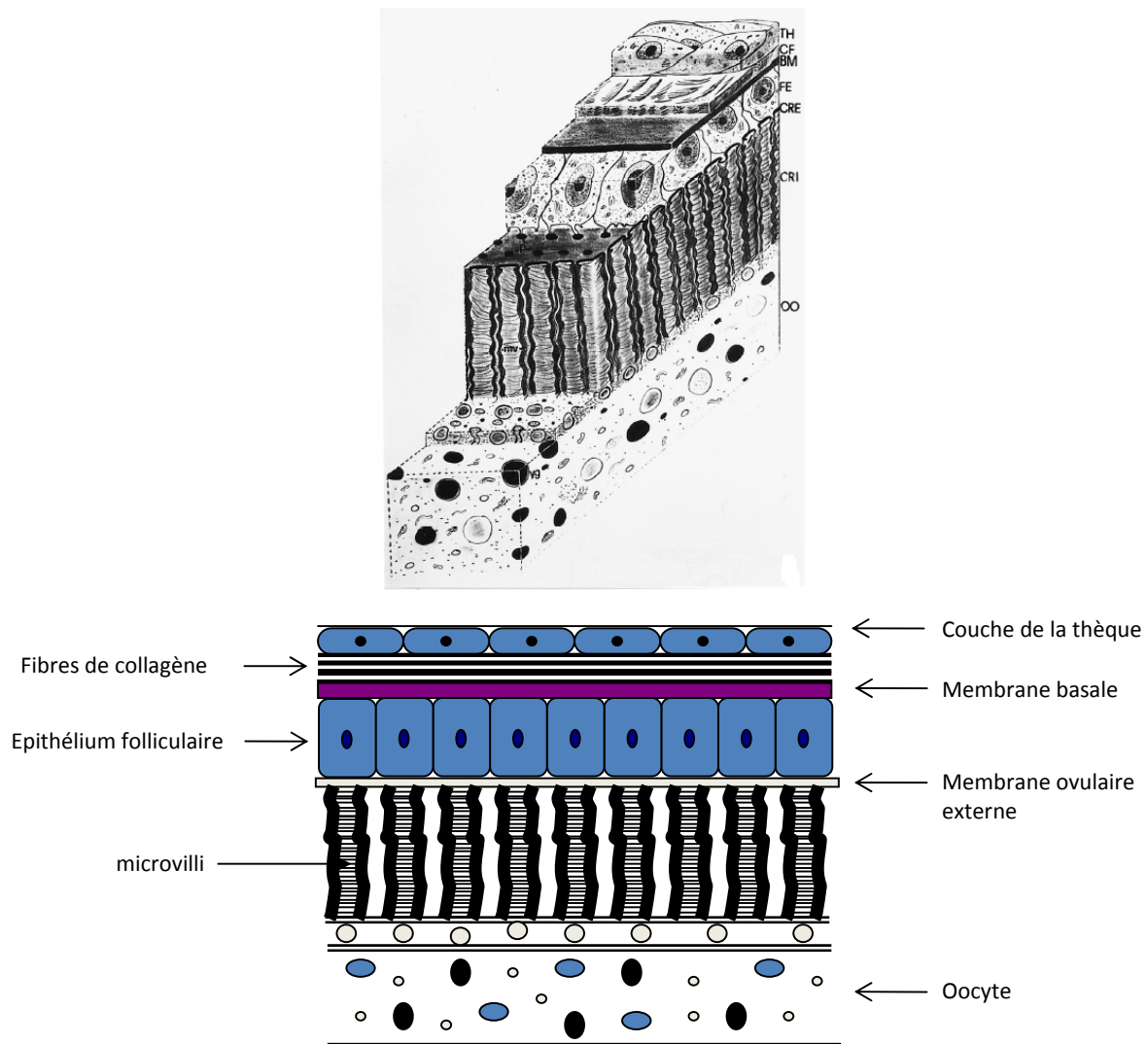


Figure 32. Distribution schématique des couches constituant le chorion d'un œuf de poisson (d'après Papadopoulou *et al.*, 1996).

Cette structure est parfaitement visible dans la **Figure 33 AB** qui montre la membrane intacte. Le vitellus contient des globules lipidiques de taille variable, distribués de façon relativement homogène, notamment dans la région centrale (**Figure 33 BC**).

Après traitement enzymatique, il nous a été impossible de visualiser l'état de la membrane par microscopie électronique, nous n'avons pu observer qu'une modification du vitellus. Cette modification se manifeste par une désorganisation très nette de l'homogénéité initiale qui est fortement perturbée, bien que les globules lipidiques restent intacts (**Figure 34 AB**).

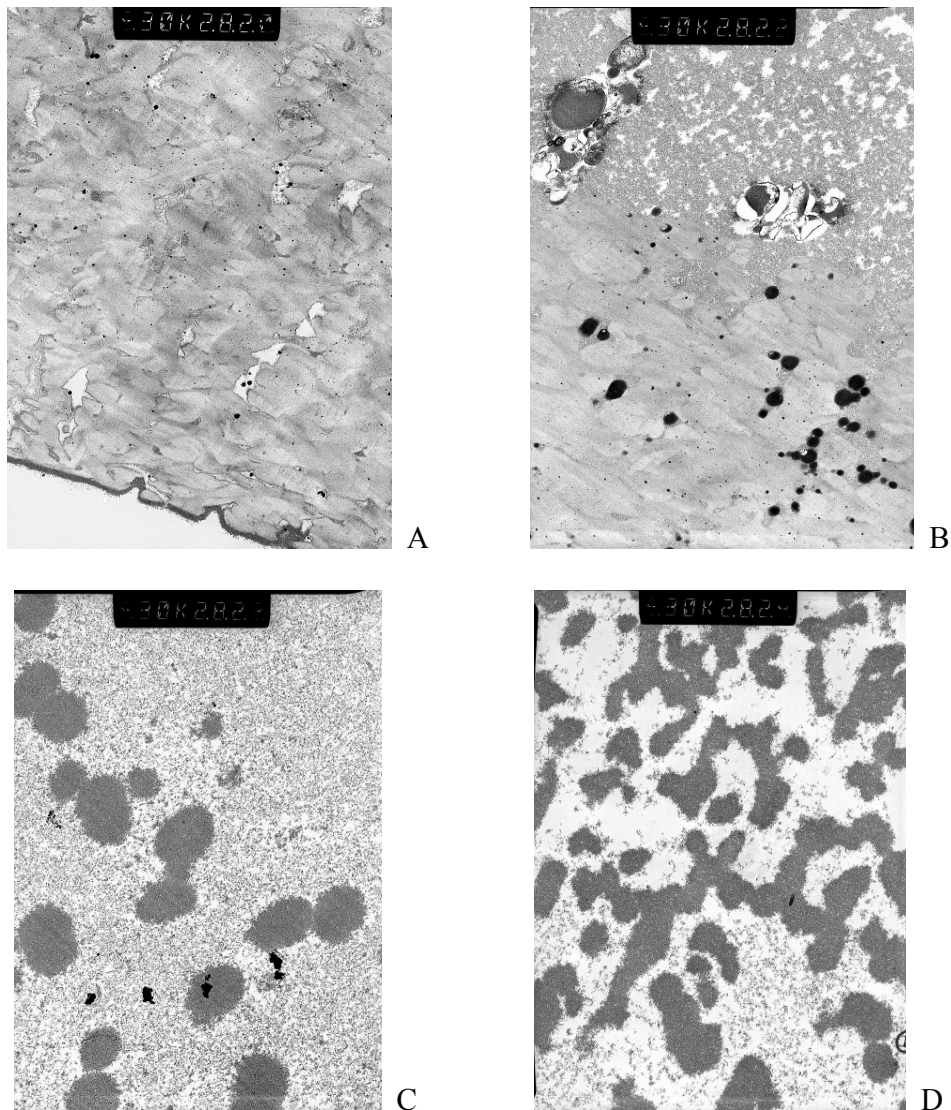


Figure 33. Microstructure de différentes parties d'œufs de truite ($\times 5600$).

A : la membrane, B : entre la membrane et le vitellus, C : le vitellus, D : centre du vitellus.

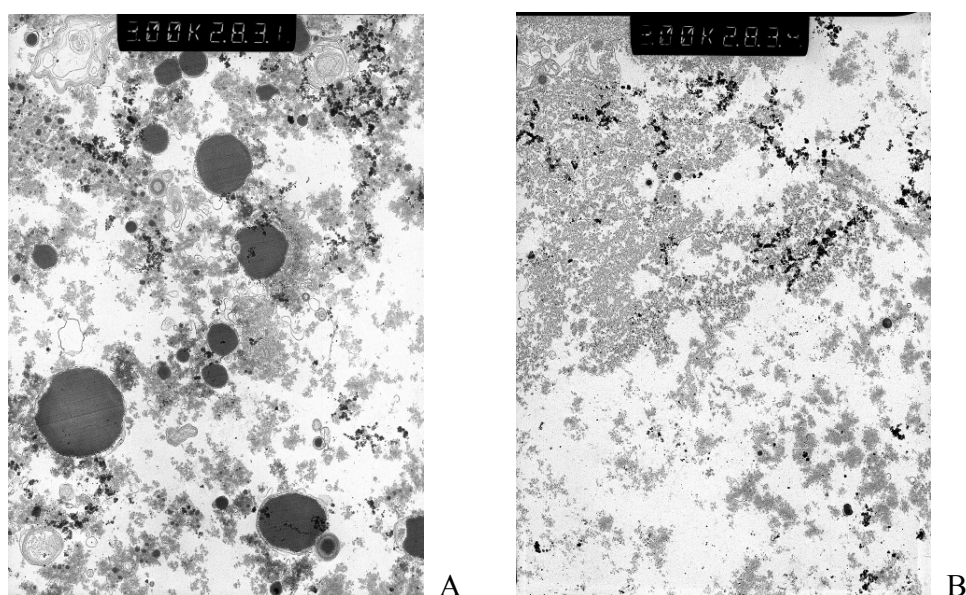


Figure 34. Microstructure d'œufs de truite après traitement enzymatique par l'Alcalase[®] : pH 8, 60°C, ratio E/S 3% ($\times 2650$). A : les gouttelettes d'huiles, B : le vitellus.

5.6 STABILITE A L'OXYDATION

5.6.1 Indice de peroxyde

Dans les **Figures 35** et **36**, nous avons fait figurer l'évolution de l'indice de peroxyde des huiles contenues dans les œufs de truite et de saumon, en fonction de la température. Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction générale, cet indice est très dépendant de la température et, surtout, est marqué par une phase de croissance, puis de décroissance. Avec quelques variantes, le phénomène est similaire dans les deux cas. Ainsi, à 4°C l'indice de peroxyde augmente peu au cours du temps, mais il finit par chuter au bout de 100 jours, ce qui signifie que des composés secondaires se sont formés, même à basse température. La variation est spectaculaire à 20°C, puisqu'elle se traduit par une augmentation très forte de l'indice jusqu'à 80 jours, avec un maximum de 50 méq d'O₂/kg pour les œufs de truite, suivie d'une chute très rapide pour les raisons évoquées ci-dessus. On peut apparemment être surpris de l'évolution à 50°C. En fait, à cette température, la réaction d'oxydation est si rapide que les composés secondaires prennent le pas sur les hydroperoxydes. Le rebond entre 50 et 100 jours n'est pas significatif.

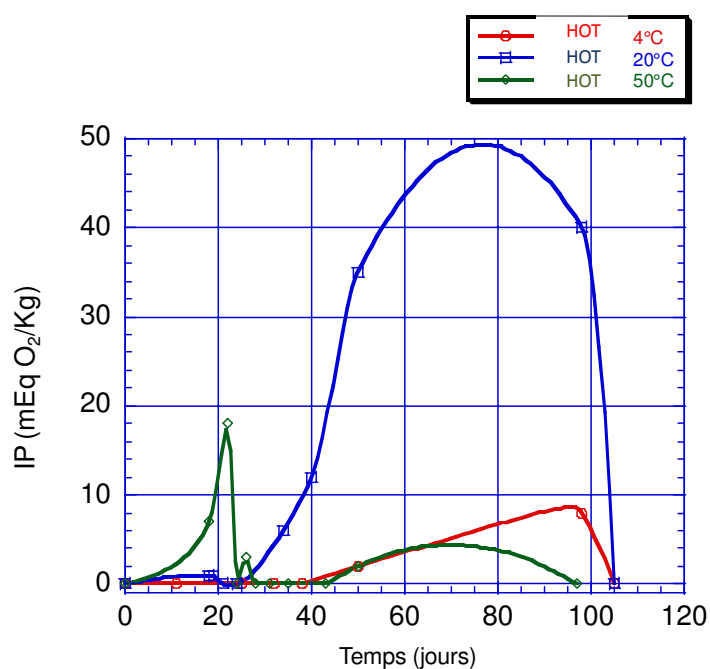


Figure 35. Evolution de l'indice de peroxyde de l'huile d'œufs de truite (HOT) stockée à 4°C, 20°C et 50°C pendant 100 jours.

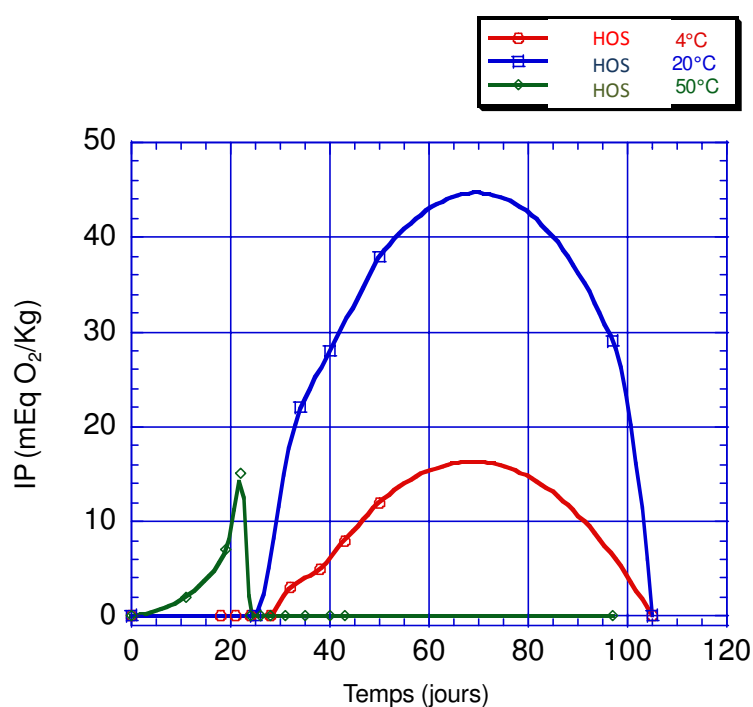


Figure 36. Evolution de l'indice de peroxyde de l'huile d'œufs de saumon (HOS) stockée à 4°C, 20°C et 50°C pendant 100 jours.

5.6.2 Indice de polyènes

L'indice de polyènes a été mesuré dans les mêmes conditions que ci-dessus. Nous n'avons pas fait figurer la variation à 4°C qui est non significative. Nous avons représenté dans chaque graphe (à 20°C et 50°C) une comparaison avec l'huile neutre de saumon (TAG) et l'huile tirée de têtes de saumon (HTS) qui a pour caractéristique de contenir une forte proportion de phospholipides (**Figures 37 et 38**). Cette détermination est assez décevante, dans la mesure où la variation de l'indice reste discrète, sauf pour l'huile de tête de saumon et les TAG de saumon qui semblent diminuer légèrement au cours du temps à 50°C. Cette légère diminution est à mettre sur le compte d'un affaiblissement du contenu en AGPI, avec une augmentation de l'acide palmitique consécutive en tant que produit de dégradation des AGPI-LC.

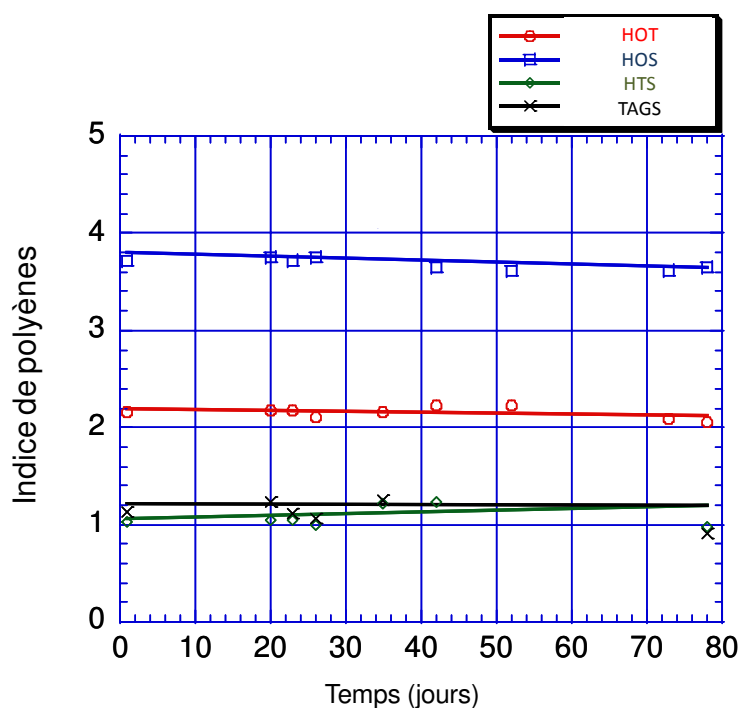


Figure 37. Evolution de l'indice de polyènes d'huiles d'œufs de truite (HOT), d'œufs de saumon (HOS), de têtes de saumon (HTS) et des TAG de saumon stockées à 20°C pendant 90 jours.

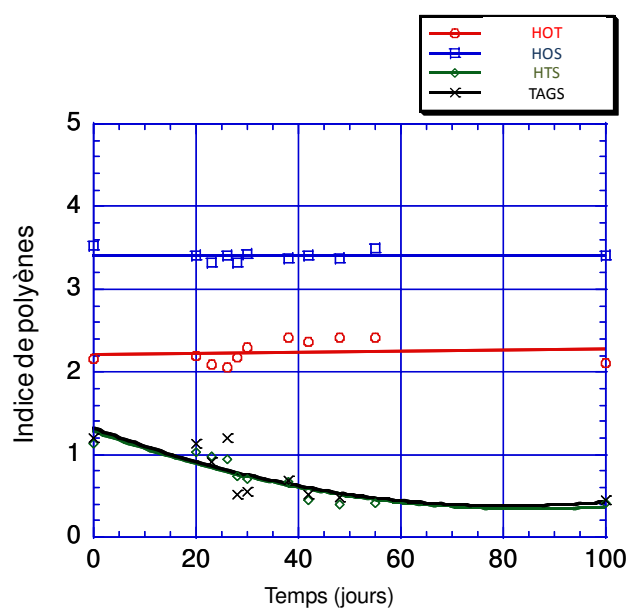


Figure 38. Evolution de l'indice de polyènes d'huiles d'œufs de truite, d'œufs de saumon, de têtes de saumon et des TAG de saumon stockées à 50°C pendant 90 jours.

5.6.3 Indice de diènes

En ce qui concerne cet indice, les variations sont beaucoup plus significatives, sauf à 4°C où l'évolution au cours du temps est quasi-nulle (**Figure 39**).

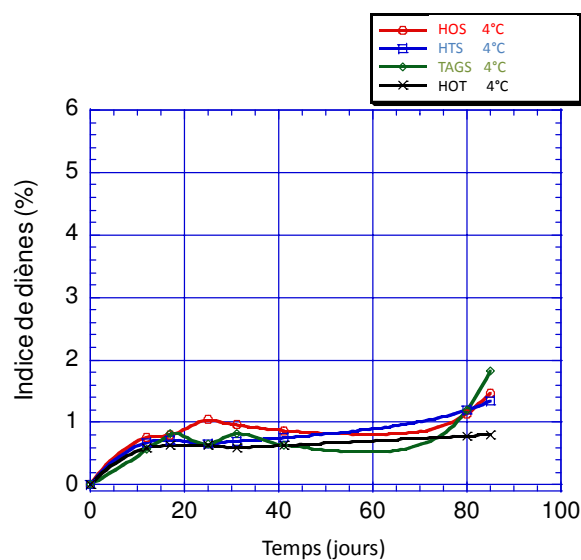


Figure 39. Evolution de l'indice de diènes d'huiles d'œufs de truite, d'œufs de saumon, de têtes de saumon et des TAG de saumon stockées à 4°C pendant 90 jours.

A 20°C et 50°C, l'évolution de l'indice est nette, notamment pour l'huile de têtes de saumon et l'huile neutre de saumon, ce qui semble signifier que ces huiles s'oxydent plus facilement que les huiles d'œuf, malgré la présence de phospholipides dans l'huile de tête, censés protéger les lipides de l'oxydation (Figures 40 et 41).

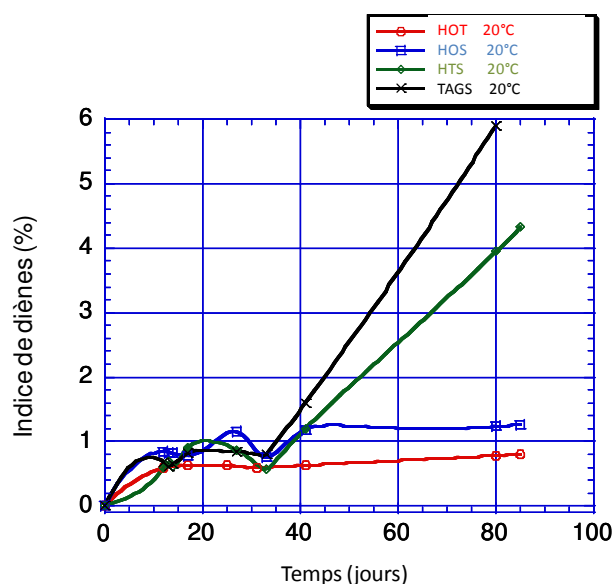


Figure 40. Evolution de l'indice de diènes d'huiles d'œufs de truite, d'œufs de saumon, de têtes de saumon et des TAG de saumon stockées à 20°C pendant 90 jours.

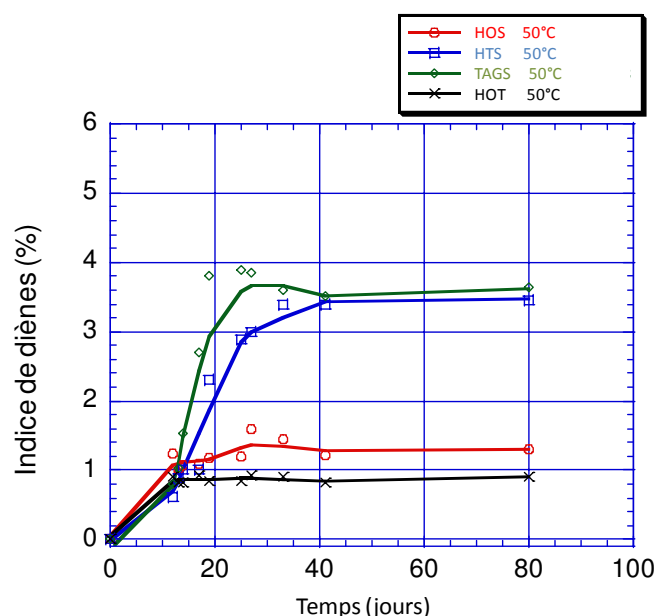


Figure 41. Evolution de l'indice de diènes d'huiles d'œufs de truite, d'œufs de saumon, de têtes de saumon et des TAG de saumon stockées à 50°C pendant 90 jours.

5.6.4 Oxygène

La consommation d'oxygène au cours de ces expériences suit une cinétique en relation avec la formation de peroxydes et de composés secondaires d'oxydation en fonction de la température. On peut noter que cette consommation dépend très fortement de la température. Pour l'huile d'œufs de truite, on peut facilement observer que la consommation est très élevée à 50°C, puis elle se stabilise à partir de 20 jours, faute de substrat, comme nous avons pu le voir lors de la détermination de l'indice de peroxyde, alors que cette consommation reste très faible à 4°C (**Figure 42**). Dans les mêmes conditions, comme on pouvait s'y attendre, la consommation d'oxygène de l'huile d'œufs et des lipides neutres de saumon suit la même cinétique (**Figures 43 et 44**). Toutefois, on observe une différence assez nette à 4°C et à 20°C entre ces 2 figures. On peut noter une assez forte consommation d'oxygène à 4°C et à 20°C pour les œufs, alors que celle-ci reste modérée dans lipides neutres. Cette différence est probablement à mettre sur le compte de la nature même des deux substrats. Sachant que les lipides analysés ici ont été obtenus après un traitement sans solvant et à température modérée, il est probable que l'huile d'œuf contienne encore une partie du matériel métabolique de la cellule œuf. Dans ces conditions, il peut être normal que cette huile consomme encore de l'oxygène, alors que l'huile neutre (TAG) est un substrat inerte du point de vue biologique.

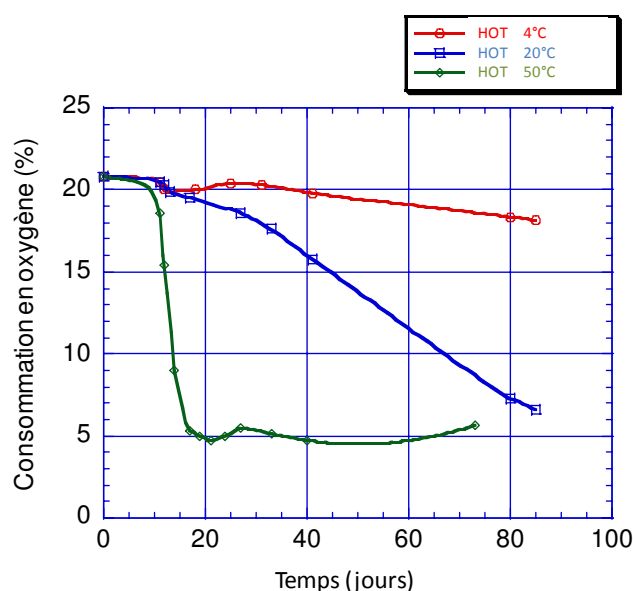


Figure 42. Évolution de la consommation d'oxygène de l'huile d'œufs de truite face à l'oxydation à 4°C, 20°C et 50°C pendant 90 jours.

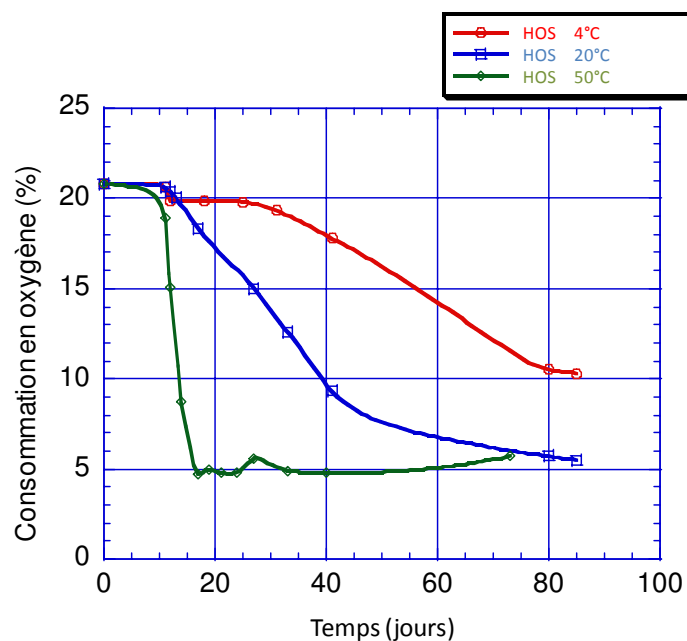


Figure 43. Évolution de la consommation d'oxygène de l'huile d'œufs de saumon face à l'oxydation à 4°C, 20°C et 50°C pendant 90 jours.

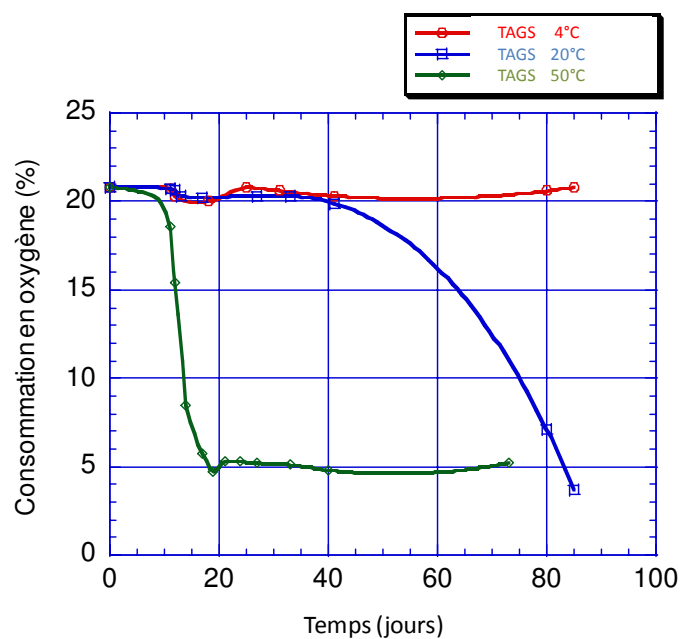


Figure 44. Évolution de la consommation d'oxygène des TAG de saumon face à l'oxydation à 4°C, 20°C et 50°C pendant 90 jours.

5.6.5 Couleur

L'évolution de la couleur de l'huile en fonction de l'oxydation n'apporte pas d'information déterminante. Nous avons porté en ordonnée l'indice de luminance (*L) qui représente d'une certaine façon la "blancheur" du substrat analysé (**Figure 45**). Ainsi, plus celui-ci est "blanc" ou lumineux, plus cet indice est élevé. Les autres paramètres colorimétriques (*a et *b dans le système CIE Lab) ne sont pas significatifs et ne sont pas reportés ici. Nous pouvons toutefois tirer quelques éléments d'information de ces faibles variations. Globalement, l'huile des œufs de truite ou de saumon (HOT et HOS) est plus foncée que celle de tête (HTS) et de l'huile neutre de saumon (TAGs). Cette caractéristique est visible dès le début de l'expérience, ainsi que nous pouvons le voir ci-dessous :



HOT HOS HTS TAG

On peut cependant observer une diminution de la luminance dans tous les cas entre 0 et 20 jours. Cette diminution (l'échantillon devient plus foncé) est probablement lié à la formation de composés primaires d'oxydation. Le léger accroissement que l'on observe ensuite est en relation avec la disparition des pigments caroténoïdes, tels que l'astaxanthine, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant.

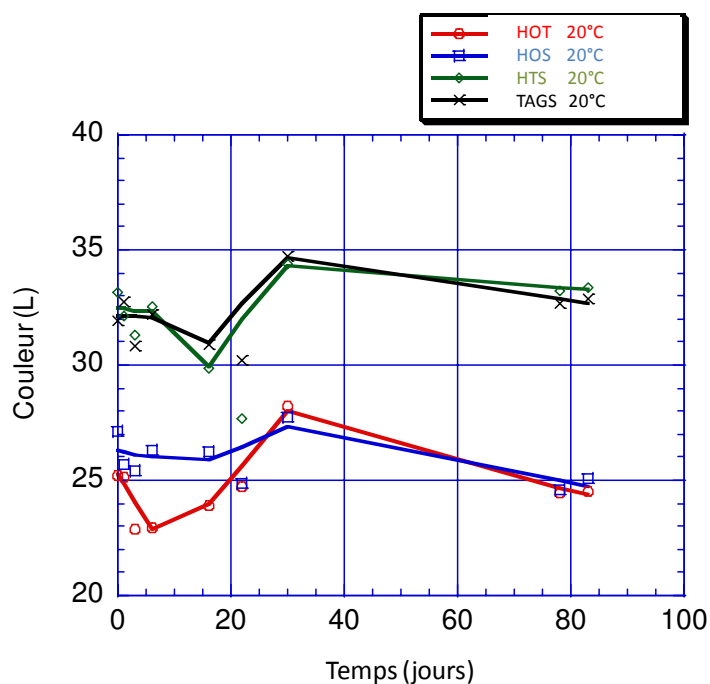


Figure 45. Évolution de la couleur d'huiles d'œufs de truite, d'œufs de saumon, TAG de saumon et de têtes de saumon face à l'oxydation à 20°C pendant 90 jours.

5.6.6 Astaxanthine

L'astaxanthine est l'un des pigments caroténoïdes typiques des crustacés et des poissons à chair colorée comme le saumon ou certaines truites. Les œufs sont toujours de couleur orangée et contiennent une forte proportion de ces pigments qui sont des anti-oxydants naturels. On pouvait donc s'attendre à leur disparition progressive dans les huiles, en fonction de la température. Ce phénomène reste modéré à basse température (**Figure 46**), mais il est très important à 50°C (**Figure 47**), puisque la teneur en astaxanthine s'effondre entre 10 et 15 jours, selon que l'on considère les œufs de truite (HOT), les œufs de saumon (HOS) ou l'huile de têtes de saumon (HTS).

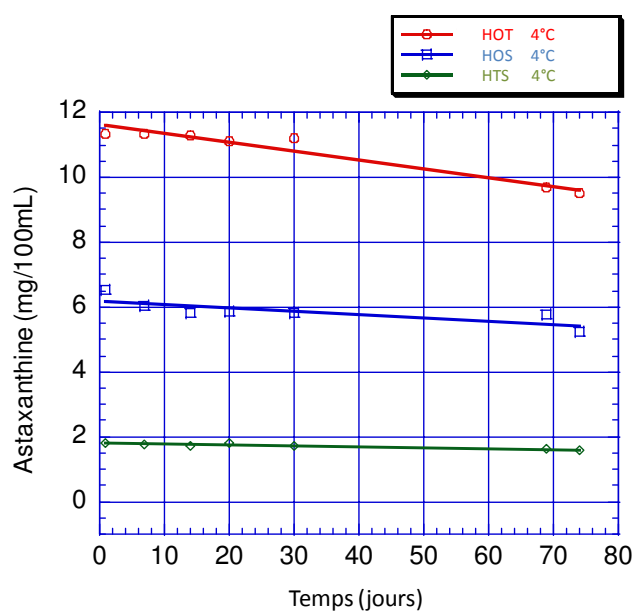


Figure 46. Évolution de la teneur en astaxanthine d’huiles d’œufs de truite, d’œufs de saumon et de têtes de saumon face à l’oxydation à 4°C pendant 90 jours.

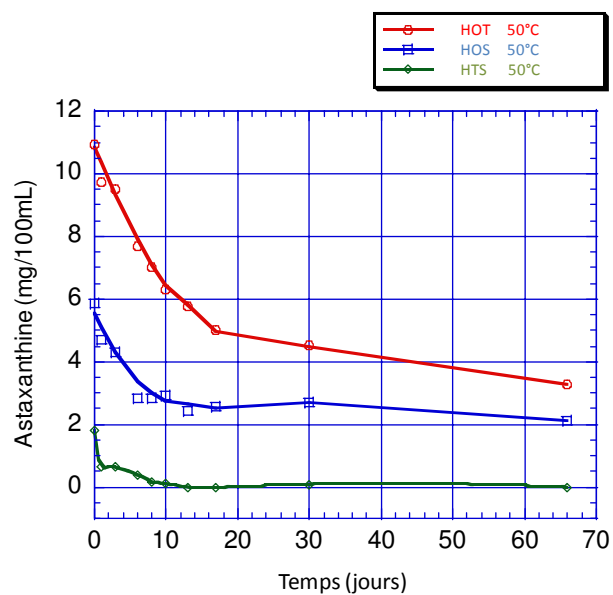


Figure 47. Évolution de la teneur en astaxanthine d’huiles d’œufs de truite, d’œufs de saumon et de têtes de saumon face à l’oxydation à 50°C pendant 90 jours.

5.7 SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

La spectroscopie infrarouge (IR) permet de déterminer d'une façon qualitative les composants organiques d'un échantillon car le mode caractéristique vibrationnel de chaque groupe moléculaire provoque l'apparition de bandes spectrales à une fréquence spécifique. La technique de l'infrarouge a été rarement utilisée dans l'étude des produits alimentaires en raison de la difficulté à obtenir des résultats rapides et reproductibles par les appareils utilisés. Il faut ajouter le coût élevé de ces appareils qui a longtemps limité leur utilisation en routine. Cependant, les applications de l'IR ont fortement augmenté dans tous les domaines, alimentaires ou non, avec l'apparition de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Guillén *et al.*, 1992, 1995 ; Guillén et Manzanos, 1996 ; Guillén et Cabo, 1997a,b).

Les spectromètres à transformée de Fourier présentent un avantage majeur du fait que les bandes d'absorption sont repérées avec précision et sans aucun décalage (Bertrand, 2002). Ainsi, les différentes bandes ou épaulements d'un spectre infrarouge d'huiles alimentaires ont été identifiées et classées (**Tableau XVII**), en fonction de la fréquence, du groupe fonctionnel, selon le mode de vibration et l'intensité des bandes.

La **Figure 48** représente un exemple descriptif du spectre infrarouge de l'huile d'œufs de truite extraite par solvant (Bligh et Dyer, 1959). Dans ce spectre, on peut identifier les différents groupes fonctionnels de l'huile à la température ambiante entre 4000 et 800 cm^{-1} . Globalement, ce spectre est comparable à ceux de différents types d'huiles, comme l'huile d'olive et de tournesol (Guillén et Cabo, 1997a), l'huile de sésame (Guillén et Cabo, 1999) et l'huile de maïs (Vlachos *et al.*, 2006), avec toutefois des différences dans la fréquence et l'intensité de quelques bandes, ainsi que de l'apparition ou l'absence d'autres bandes d'absorption. Ces variations dans les spectres infrarouges peuvent être expliquées par les différences de composition propres à chaque huile (Guillén et Cabo, 1999).

Tableau XVII. Fréquences des bandes (b) ou des épaulements (e) de quelques huiles alimentaires dans un spectre infra-rouge, avec le groupe fonctionnel, le mode de vibration et l'intensité (Guillén et Cabo, 1997a, b).

Numéro	Fréquence (cm ⁻¹)	Groupe fonctionnel	Mode de vibration	Intensité
1	3468 (b)	–C=O (ester)	Harmonique	Faible
2	3025 (e)	=C–H (trans-)	Elongation	Très faible
3	3006 (b)	=C–H (cis-)	Elongation	Moyenne
4	2953 (e)	–C–H (CH ₃)	Elongation (antisymétrique)	Moyenne
5	2924 (b)	–C–H (CH ₂)	Elongation (antisymétrique)	Très forte
6	2853 (b)	–C–H (CH ₂)	Elongation (symétrique)	Très forte
7	2730 (b)	–C=O (ester)	Résonance Fermi	Très faible
8	2677 (b)	–C=O (ester)	Résonance Fermi	Très faible
9	1746 (b)	–C=O (ester)	Elongation	Très forte
10	1711 (e)	–C=O (acid)	Elongation	Très faible
11	1654 (b)	–C=C– (cis-)	Elongation	Très faible
12	1648 (b)	–C=C– (cis-)	Elongation	Très faible
13	1465 (b)	–C–H (CH ₂ , CH ₃)	Déformation (cisaillement)	Moyenne
14	1418 (b)	=C–H (cis-)	Déformation (rotation plane)	Faible
15	1400 (b)		Déformation	Faible
16	1377 (b)	–C–H (CH ₃)	Déformation (symétrique)	Moyenne
17	1319 (b,e)		Déformation	Très faible
18	1238 (b)	–C–O, –CH ₂ –	Elongation, déformation	Moyenne
19	1163 (b)	–C–O, –CH ₂ –	Elongation, déformation	Forte
20	1118 (b)	–C–O	Elongation	Moyenne
21	1097 (b)	–C–O	Elongation	Moyenne
22	1033 (e)	–C–O	Elongation	Très faible
23	968 (b)	–HC=CH– (trans-)	Déformation hors du plan	Faible
24	914 (b)	–HC=CH– (trans-)	Déformation hors du plan	Très faible
25	723 (b)	–(CH ₂) _n –, –HC=CH– (cis-)	Déformation (rotation plane)	Moyenne

L'oxydation de l'huile extraite des oeufs de truite a ainsi été analysée (**Figure 48**). De nombreuses études basées sur cette technique caractérisent le degré d'oxydation d'huiles alimentaires en fonction des conditions de stockage (température, durée, exposition à la lumière). En effet, l'oxydation d'une huile présentant une forte teneur en acides gras polyinsaturés, conduit

à la formation d'hydroperoxydes qui se décomposent en produits secondaires d'oxydation. Une diminution du nombre d'insaturations est alors observée.

Les lipides ont l'avantage de présenter des spectres relativement simples qui sont principalement représentatifs de la longueur de la chaîne hydrocarbonée des acides gras (Bertrand, 2002).

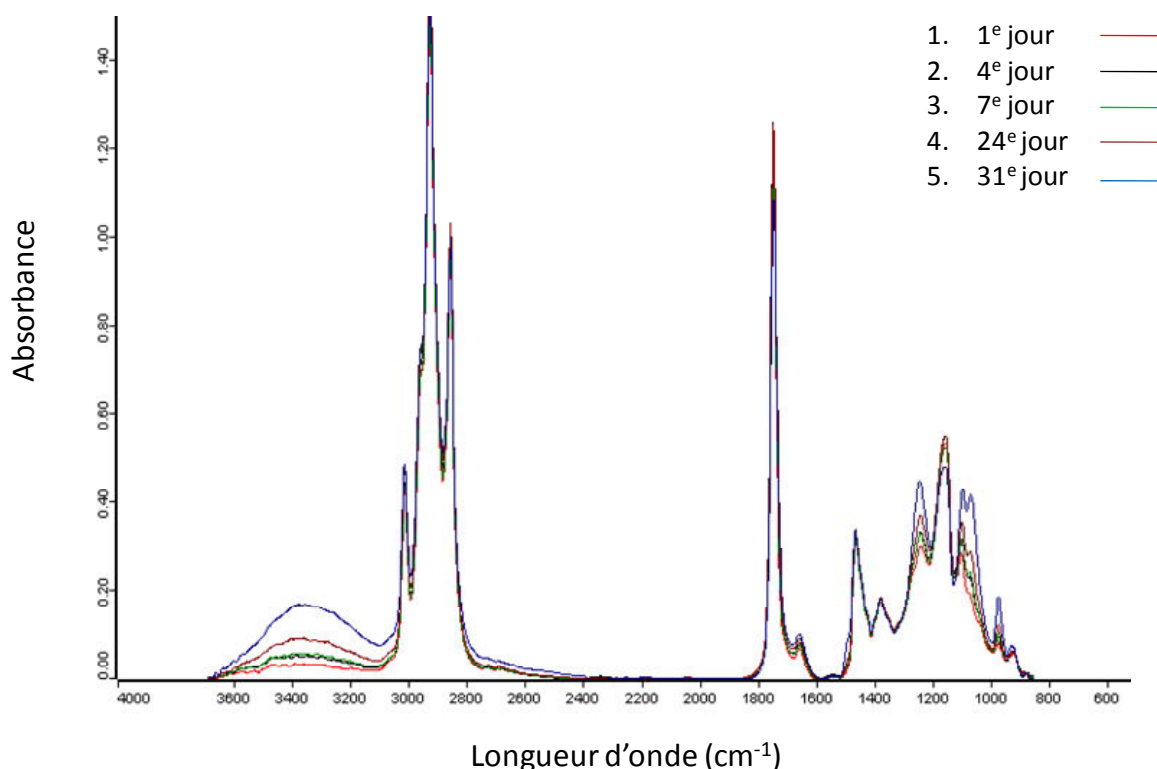


Figure 48. Evolution du spectre infrarouge de l'huile d'oeuf de truite à 50°C sur une période de 31 jours.

Au cours de la période d'oxydation de l'huile, menée sur 85 jours, des variations apparaissent rapidement, notamment à la température de 50°C, dans différentes régions spectrales. Les figures ci-dessous représentent des zooms sur les différentes régions où l'on observe des variations caractéristiques d'intensité de diverses bandes. Des changements significatifs apparaissent au niveau de la bande comprise entre 3650 et 3120 cm^{-1} (**Figure 49**). L'absorption dans cette région spectrale augmente fortement au cours de l'oxydation où une bande très intense apparaît à 3350 cm^{-1} . Celle-ci correspond à des groupements hydroxyles néoformés au cours de l'oxydation. L'élargissement de cette bande devient significatif au cours

de la durée de stockage à 50°C. Des résultats similaires ont été observés lors de la dégradation oxydative de l'huile de lin (Lazzari et Chiantore, 1999). Une bande d'absorption localisée entre 3467 et 3470 cm^{-1} correspondant à la fonction carbonyle des esters est généralement observée lors de la formation des composés primaires d'oxydation, avec un léger déplacement vers les fréquences plus basses autour de 3448, 3437 voire 3458 cm^{-1} (Guillén et Cabo, 1999). Cette bande n'apparaît pas de façon significative dans l'huile d'œuf de truite soumise à l'oxydation à 50°C.

La région spectrale entre 3030 et 2600 cm^{-1} diminue significativement les premiers jours avant d'augmenter après trois semaines d'exposition à une température de 50°C (**Figures 50 et 51**). Une bande située vers 3012 cm^{-1} (maximum d'absorption), est généralement attribuée à une double liaison éthylénique *cis*, qui diminue au cours de la formation des hydroperoxydes avant de croître en raison de réactions de polymérisation. La bande caractéristique à 3008 cm^{-1} est généralement utilisée pour caractériser l'évolution du nombre d'insaturations au cours de la réaction d'oxydation (Moya Moreno *et al.*, 1999b ; Mallécol *et al.*, 2000). Lors des réactions d'oxydation, la modification structurale majeure des huiles polyinsaturées reste la perte des doubles liaisons éthyléniques par attaque de l'oxygène, avec formation de composés de dégradation (Muik *et al.*, 2005).

Certains auteurs s'intéressent en même temps à l'intensité de la bande située à 710 cm^{-1} qui décroît, en relation avec la diminution du nombre de doubles liaisons *cis*, au cours de l'oxydation (Muik *et al.*, 2007). Un épaulement à 2954 cm^{-1} , caractéristique de groupements $-\text{CH}_3$, permet généralement de suivre l'évolution du processus d'oxydation. Une diminution d'intensité au niveau de cette bande par rapport au stade initial semblerait dénoter un stade avancé de l'oxydation. Dans notre cas, aucune évolution significative n'est observée pour l'huile d'œufs de truite dans cette région.

Les bandes caractéristiques des vibrations d'élongation de groupements fonctionnels $-\text{CH}_2$, situées à 2925 et 2854 cm^{-1} , présentent une absorption importante chez les huiles riches en acides gras polyinsaturés à longue chaîne et diminuent au cours de l'oxydation (Valdès et Garcia, 2006).

A 1746 cm^{-1} apparaît une bande intense correspondant à la fonction carbonyle des triacylglycérols (**Figure 52**). Dans des conditions d'oxydation extrêmes, un glissement vers 1743 cm^{-1} s'observe généralement. Ce changement s'observe avec l'apparition de groupements aldéhydes ou des produits secondaires d'oxydation à 1728 cm^{-1} (Moya Moreno *et al.*, 1999a).

Dans la région spectrale comprise entre 1620 et 1670 cm^{-1} , une bande centrée sur 1654 cm^{-1} représente la vibration d'élongation de la double liaison carbone-carbone *cis*. Cette bande diminue au cours de l'oxydation (visible sur la figure) et peut être proportionnelle à l'intensité du phénomène oxydatif. L'épaulement peut disparaître complètement si l'huile se dégrade de façon excessive avec apparition de composés de polymérisation.

Le spectre d'absorption compris entre 1500 et 900 cm^{-1} , dénommé généralement « empreinte digitale », permet de caractériser de façon précise une molécule ou un groupe de molécules (**Figure 53**). Des bandes à 1461 et 1377 cm^{-1} , caractéristiques des vibrations de déformation des groupements $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$ apparaissent, avec un épaulement à 1418 cm^{-1} présent dans toutes les huiles (Guillén et Cado, 1999). On observe une diminution de l'intensité de ces bandes lors de l'oxydation.

Deux bandes significatives à 1241 et 1150 cm^{-1} semblent être en relation avec les groupements acyles saturés présents dans les huiles. On observe une augmentation importante de l'intensité suivie d'une chute brutale au niveau de la bande à 1150 cm^{-1} . L'augmentation de la bande à 970 cm^{-1} peut être attribuée à l'apparition des doubles liaisons *trans* qui augmentent au cours de l'oxydation. L'évolution de cette bande spectrale au cours de l'oxydation est en accord avec les résultats obtenus par Moya Moreno *et al.* (1999c) ainsi que par Muik *et al.* (2007).

Certains auteurs s'intéressent aussi à la bande de résonance d'élongation située à 2144 cm^{-1} relative à la double liaison $\text{C}=\text{C}$ and $\text{C}-\text{H}$ et attribuée aux acides gras insaturés *cis*, pour suivre les phénomènes d'oxydation (Cozzolino *et al.*, 2005). Cependant dans le cas de l'huile d'œufs de truite cette bande est difficilement visible.

L'application de la spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier à l'étude de l'oxydation des huiles, nous a paru à la fois intéressante et extrêmement puissante.

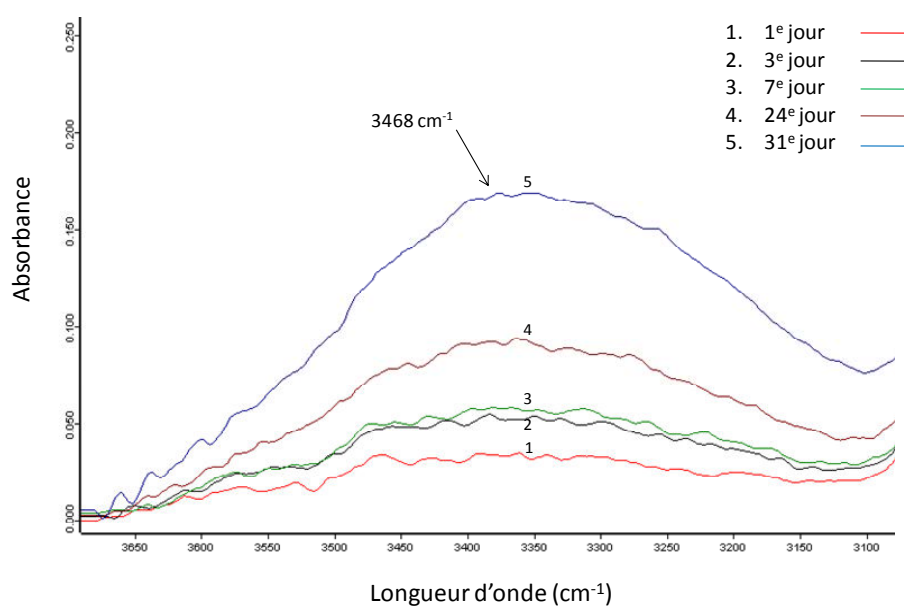


Figure 49. Evolution du spectre infrarouge dans la région spectrale 3650 - 3100 cm⁻¹ de l'huile d'oeuf de truite à 50°C sur une période de 31 jours.

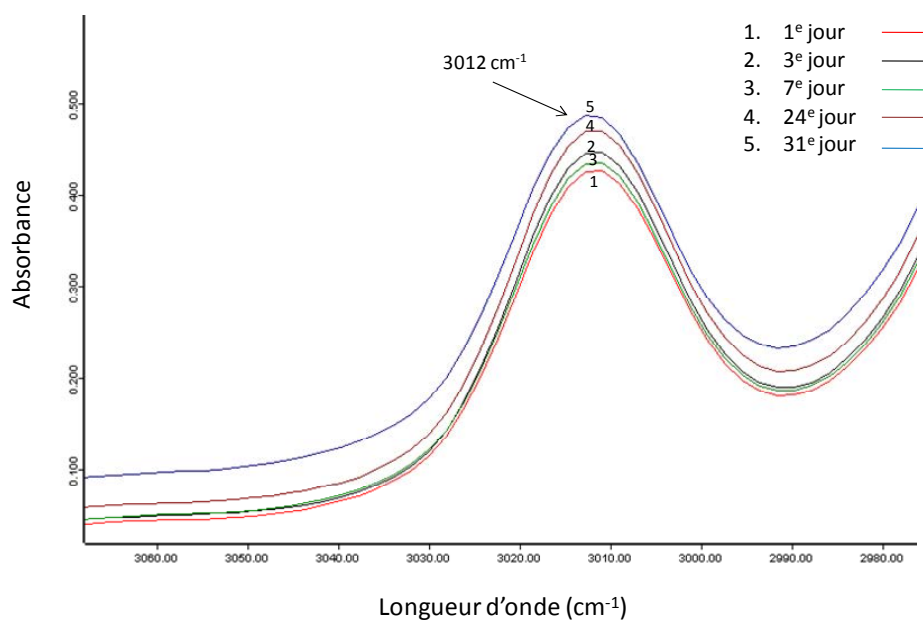


Figure 50. Evolution du spectre infrarouge dans la région spectrale 3050 - 2980 cm⁻¹ de l'huile d'oeuf de truite à 50°C sur une période de 31 jours.

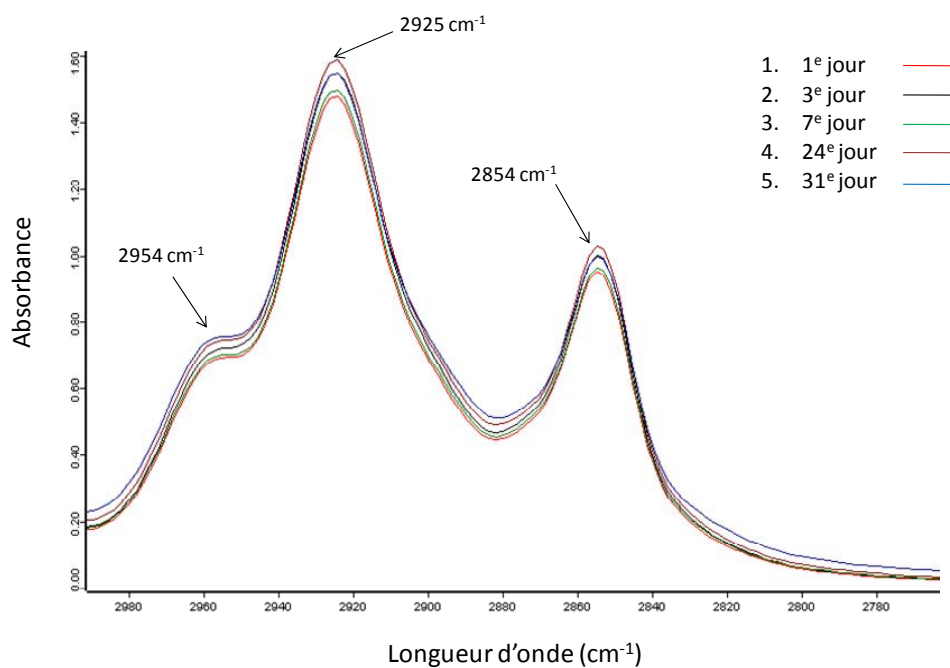


Figure 51. Evolution du spectre infrarouge dans la région spectrale 2980 - 2780 cm^{-1} de l'huile d'oeuf de truite à 50°C sur une période de 31 jours.

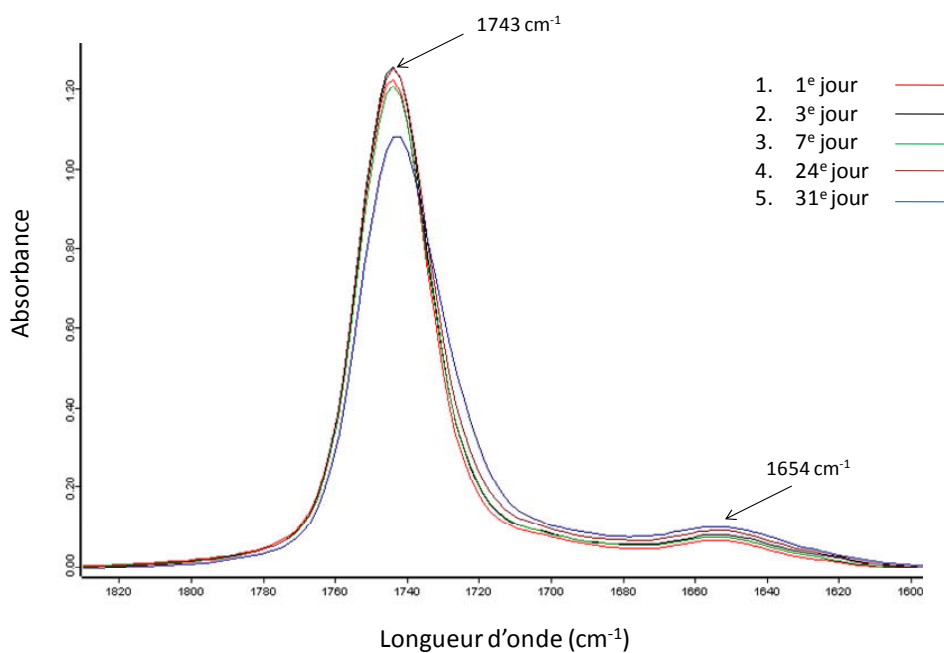


Figure 52. Evolution du spectre infrarouge dans la région spectrale 1820 - 1600 cm^{-1} de l'huile d'oeuf de truite à 50°C sur une période de 31 jours.

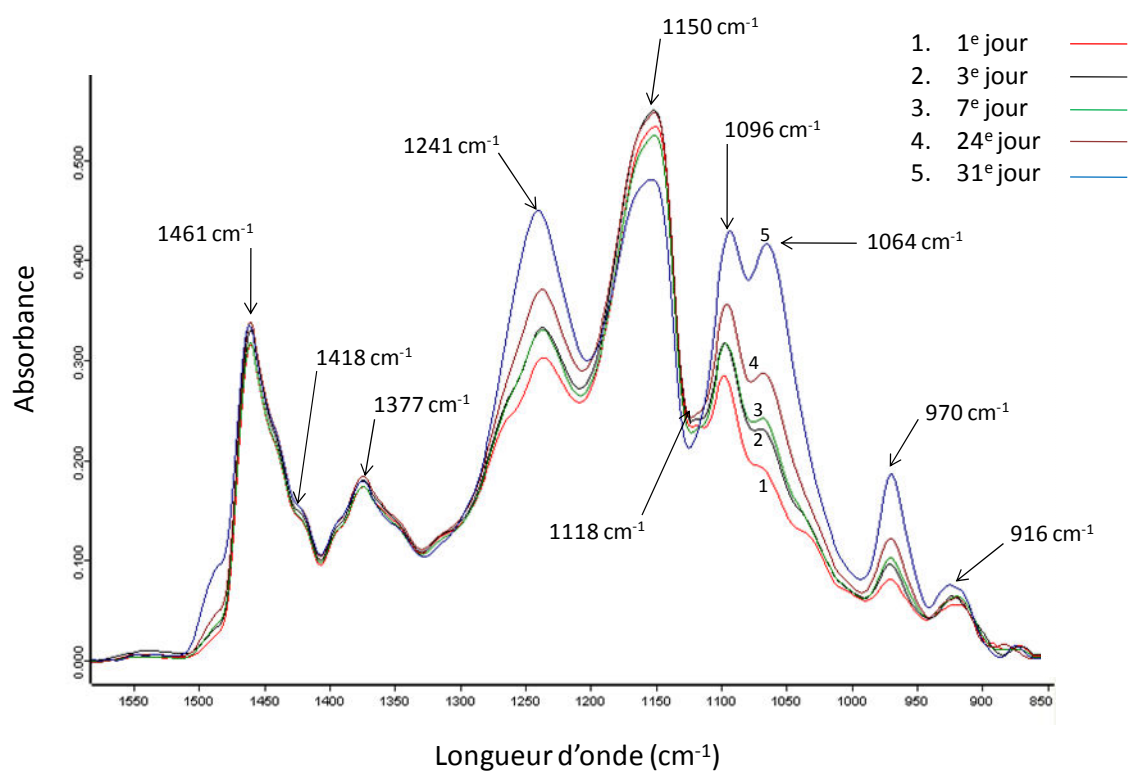


Figure 53. Evolution du spectre infrarouge dans la région spectrale 1550 - 850 cm⁻¹ de l'huile d'oeuf de truite à 50°C sur une période de 31 jours.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

6 . CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au terme de ce travail, nous avons atteint un certain nombre des objectifs que nous nous étions fixés. Les œufs de poisson constituent incontestablement une ressource nutritionnelle intéressante. Ils contiennent une quantité élevée de protéines de haute valeur, une huile riche en acides gras polyinsaturés avec une proportion très importante de phospholipides (53% des lipides totaux), eux-mêmes riches en AGPI. Par ailleurs, ils présentent une capacité élevée d'auto-protection contre les agressions du milieu extérieur. Nous avons constaté que cette propriété leur confère une double particularité. D'une part, ils se conservent, par nature, relativement bien dans des conditions environnementales difficiles, ce qui permet à l'industrie halieutique de leur appliquer des traitements modérés pour assurer leur conservation. Le cas du caviar est typique de cette propriété, car le traitement appliqué est sommaire : le caviar subit une série de lavages suivis d'un simple salage. Bien entendu, cette dernière opération a pour but d'abaisser l'activité de l'eau, mais la quantité de sel incorporé ne semble pas jouer un rôle aussi important que dans certaines salaisons. En effet, dans le cas du caviar "molossol" ("peu salé"), la quantité de sel varie entre 2,8 et 4% du poids humide de caviar, ce qui est relativement faible compte tenu de la teneur en eau des œufs (57%). Il est vrai que le caviar se conserve environ un mois au réfrigérateur, mais il existe peu de produits alimentaires qui supportent sans dommage un traitement aussi modéré. D'autre part, nous avons montré que cette capacité élevée d'auto-protection semble avoir un effet négatif en matière de digestibilité. Il semble, en effet, que les protéases aient une grande difficulté à attaquer les protéines du chorion, comme nous avons pu le voir sur des microphotographies. Mais, cette faiblesse des protéases a été également mise en évidence sur les protéines du vitellus, comme l'attestent les degrés d'hydrolyse atteints dans les conditions optimales de la cinétique de chaque enzyme testée. Ce degré d'hydrolyse varie entre 3 et 7%, ce qui est remarquablement faible, sachant que des valeurs de 20% sont facilement obtenues dans le cas de la majorité des protéines animales. Il faut donc admettre qu'en plus d'une résistance mécanique à l'attaque enzymatique, les œufs de poisson opposent un caractère inhibiteur très marqué aux protéases. Pour l'instant, nous n'avons aucune information sur les éventuels composants qui pourraient inhiber ces enzymes. Il s'agit peut-être d'une inhibition par les produits de la réaction, voire de la présence d'inhibiteurs non compétitifs. En tout état de cause, cette observation pose le problème des qualités nutritionnelles supposées de l'œuf de poisson.

Nous avons mis en évidence que les lipides de l'œuf de truite arc-en-ciel contenaient une teneur élevée en acides gras polyinsaturés, celle-ci est notablement plus faible que dans l'œuf de saumon qui en contient environ 48% contre 42% dans le cas de la truite. Cette différence est liée à de nombreux facteurs que nous avons décrits, elle ne peut donc être prise comme une valeur absolue. Nous avons également montré que les AGPI, notamment le DHA, étaient situés préférentiellement en position β sur la molécule de glycérol. Ce positionnement du DHA est également vrai dans les phospholipides dont la molécule majeure est la phosphatidylcholine. Dans le cas particulier des lipides polaires, nous avons montré que le traitement enzymatique, s'il ne permet de récupérer qu'une partie de l'huile, récupère beaucoup plus de phospholipides, notamment la phosphatidylcholine qui atteint près de 90% des phospholipides totaux par extraction enzymatique, contre seulement 72% par solvant.

Nous avons réalisé une importante étude sur la stabilité à l'oxydation des huiles tirées de l'œuf de la truite arc-en-ciel, en la comparant à celles du saumon. Nous avons montré combien ces molécules sont sensibles à l'oxydation. Les diverses méthodes utilisées ont montré leur potentiel et leurs limites, mais la technique la plus prometteuse semble être la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, qui nous a apporté des informations capitales, non seulement sur l'état d'oxydation de l'huile, mais également sur les modifications structurales des molécules. Les perspectives d'utilisation de cette technique sont nombreuses. Dans le cadre des études futures, elle sera appliquée à l'étude des phospholipides marins qui, dans les mêmes conditions, ne devraient pas avoir le même comportement que les lipides neutres vis-à-vis de l'oxydation. En effet, malgré les données de la littérature sur ce sujet, la lumière n'est pas encore faite et est encore l'objet de discussion, notamment sur le rôle anti-oxydant supposé de la phosphatidyléthanolamine. Il est également envisagé de mettre en œuvre la spectroscopie infrarouge pour une étude approfondie des interactions qui devraient exister entre les AGPI et certains polyphénols, qui sont de puissants anti-oxydants, afin de mettre en évidence le rôle de ces molécules dans la protection des AGPI contre l'oxydation.

En ce qui concerne l'intérêt de l'utilisation de l'huile isolée et des phospholipides des œufs de poisson comme compléments alimentaires à visée nutraceutique, nous avons vu qu'un verrou important semble lié aux protéines du chorion et du vitellus. En effet, la méthodologie appliquée dans ce travail a été de privilégier une technique d'extraction "douce", par le biais de l'utilisation d'enzymes. Or, la libération de l'huile et, notamment, des phospholipides, s'est trouvée fortement

limitée en raison d'interactions fortes avec les protéines faiblement hydrolysées. Cette partie du travail n'a pu encore trouver de réponse et doit nécessiter des investigations approfondies.

BIBLIOGRAPHIE

7 . BIBLIOGRAPHIE

AACC. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 1995; 40:70-71.

Ackman, R. G., 1998. Remarks on official methods employing boron trifluoride in the preparation of methyl esters of fatty acids of fish oils. *J. A. O. C. S.*, 75, 541-546.

Adler-Nissen, J., 1986. In Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers, London et New-York, 1-425.

Anderson AJ, Arthington AH, Anderson S, 1990. Lipid classes and fatty acid composition of the eggs of some Australian fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 96(2):267-270.

Ando S., Mori Y., Nakamura K. and Sugawara A., 1993. Characteristics of lipid accumulation types in five species of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 59, 1559-1564.

Ando Y., Kobayashi S., Sugimoto T., Takamaru N., 2004. Positional distribution of *n*-3 highly unsaturated fatty acids in triacyl-*sn*-glycerols (TAG) of rotifers (*Brachionus plicatilis*) enriched with fish and seal oils TAG. *Aquaculture*, 229:275-288.

Andrieux G., 2004. La filière française des co-produits de la pêche et de l'aquaculture: état des lieux et analyse. *Etudes de l'Ofimer*, 63 pp.

AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC international, 1999. 16th Ed., Association of Official Analytical Chemistry, Washington DC.

AOAC, Official Methods of Analysis, 1997. 15th Ed., Association of Official Analytical Chemistry, Washington DC.

AOCS, 1989. Peroxide value using chloroform. Official method Cd-8-53. In *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist' Society*. 4th ed.

Arnoult D., Petit F., Lelièvre J. D., Akarid K., Ameisen J. C., Estaquier J., 2001. Le récepteur de la phosphatidyl-sérine, un intermédiaire entre apoptose et réponse immunitaire. *Médecine/Sciences*, 17: 385-387.

Aubourg S.P., Vinagre J., Rodríguez A., Losada V., Larraín M.A., Quiral V., Gómez J., Maier L., Wittig E., 2005. Rancidity development during the chilled storage of farmed Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 107:411-417.

Aursand M., Jørgensen L., Grasdalen H., 1995. Positional distribution of ω 3 fatty acids in marine lipid triacylglycerols by high-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *JAACS*, 72(3):293-297.

Bajpai P. et Bajpai P. K., 1993. Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a review. *J. Biotechnology*, 30: 161-83.

- Baker R.T.M., Pfeiffer A.M, Schöner F.J., Smith-Lemmon L., 2002. Pigmenting efficacy of astaxanthin and canthaxanthin in fresh-water reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Animal Feed Science and Technology*. 99, 1-10.
- Barisone, G. A., Albertali, I.E., Sánchez, M., Cabada, M.O., 2003. The envelopes of amphibian oocytes: physiological modifications in *Bufo arenarum*. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1 (1):18.
- Barnerjee I., Saha S., Dutta J., 1992. Comparison of the effect of dietary fish oils with different *n*-3 polyunsaturated fatty acid compositions on plasma and liver lipids in rats. *Lipids*, 27: 425-428.
- Baron, M., Champion, M., 2002. Génomique et nutrition animale : Contributions de la sélection des oléagineux aux attentes de l'alimentation animale. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. 9(2): 139-42.
- Beck, J. C., Fulcher, K. D., Beck, C. F., Cloud J. G., 1992. Sperm surface antigen required for fertility: Identification on spermatozoa of rainbow trout by use of monoclonal antibodies. *Trans. Am. Fish Soc.*; 121: 333-339.
- Behnke, R., 1992. Native trout of western North America. Bethesda, MD, *American Fisheries Society*. 275pp.
- Bergé, J. P., Barnathan, G., 2005. Fatty acids from lipids in marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. In *Marine Biotechnology I*. Le Gal Y. et Ulber R. (eds). *Adv. in Biochem. Engin./Biotechnol., Springer, Berlin*, 96: 49-125.
- Berset C. et Cuvelier M. E., 1996. Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Sciences des Aliments* 16 219-245.
- Bertrand D, 2002. La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. *INRA Prod. Anim.*, 15(3), 209-219.
- Bertrand, D., Dufour, E., 2000. *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*, Techniques et documentation, Paris, 566p.
- Bhattacharya, A., Ghosal, S., Bhattacharya, S. K., 2006. Effect oh fish oil on offensive and defensive factors in gastric ulceration in rats. *Prostag. Leukotr. Ess.*, 74:109-116. *Biophysic Acta* 210 486-489.
- Black, J., 2006. The race to satisfy caviar craving. The New York Times. September 27.
- Blanchet, C., Lucas, M., Dewailly, 2005. E. Analyses des acides gras oméga-3 et des contaminants environnementaux dans les salmonidés. Unité de recherche en santé publique, Centre de recherche du CHUL (CHUQ) et Institut national de santé publique du Québec. 45 pages.

- Bledose, G.E., Bledose, C.D., Rasco, B., 2003. Caviars and fish roe products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43:317-356.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37 : 911-917.
- Boeuf G. L'aquaculture dans le monde – Quel avenir? Cycle de conférences 2001-2002 – Perspectives – Quel avenir pour l'homme?
- Bornaz S., Fanni J., Parmentier M., 1995a. Heat Treatment Of Cream : A Model Of The Butter Texture Response In Relation With Triglyceride Composition. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, (2), 163-169.
- Bornaz S., Fanni J., Parmentier M., 1995b. Filtration In Hydrophobic Media : 1 - Evidence Of A Molecular Selection By Crossflow Filtration Of Butter Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, (10), 1139-1142.
- Bornaz S., Fanni J., Parmentier M., 1995c. Filtration In Hydrophobic Media : 2 - Evidence of a molecular selection and modification of Solid Fat Content by tangential filtration of butter oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, (10), 1143-1148.
- Bourre J. M., 2005. Dietary omega-3 fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging. *J. Nutr. Health Aging*, 9: 31- 38.
- Brouwer I.A., Geelen A., Katan M. B., 2006. *n*-3 Fatty acids, cardiac arrhythmia and fatal coronary heart disease. *Progr. Lipid. Res.*, 45 : 357-367.
- Bruslé J, Quignard, J.P., Imbert, C., 2001. Biologie des poissons d'eau douce européens. Les truites et autres salmoniformes. Tec & Doc Edition. 625 p, 64-107.
- Burat K.M. Bozkurt O., 1996. Improvement of calibration curve for determining peroxide values of food lipids by the modified ferrous oxidation-xylenol orange method. *Journal Of AOAC International*, 79 : 995-997.
- Buttle L.G., Crampton V.O., Williams P.D., 2001. The effect of feed pigment type on flesh pigment deposition and colour in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*, L). *Aquaculture Research*, 32(2) : 103-111.
- Cahu C., Zambonino Infante J. L., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200: 161-180.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J. L., Takeuchi, T., 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 227: 245-258.
- Catarci C., 2004. World markets and industry of selected commercially-exploited aquatic species with an international conservation profile. *FAO Fisheries Circular No. 990*.

- Cattaneo, D., Dell'Orto, V., Varisco, G., Agazzi, A., Savoini, G., 2006. Enrichment in *n*-3 fatty acids of goat's colostrum and milk by maternal fish oil supplementation. *Small Ruminant Res.*, 64: 22-29.
- Chapman, R.A. and Mackay, K., 1949. The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *The Journal of the American Oil Chemists' society* 360- 363. *Chem.*, 48 : 657-666.
- Chen, C.C., Chaung, H. C., Chung, M. Y., Huang, L. T., 2006. Menhaden fish oil improves spatial memory in rat pups following recurrent pentylenetetrazole-induced seizures. *Epilepsy Behav.*, 8: 516-521.
- Cherr, G. N., Clark, W.H., 1982. Fine structure of the envelope and micropyle in the eggs of the white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson. *Dev. Growth Diff.*, 24: 341-352.
- Christie W.W., 2003. Lipid library (<http://www.lipidlibrary.co.uk/>).
- Colakoglu A, 2007. Oxidation kinetics of soybean oil in the presence of monoolein, stearic acid and iron. *Food Chemistry*, 101:724-728.
- Combe N., Boué-Vaysse C., 2004. Face aux besoins et à la réalité des consommations, quelles sont les spécificités des différentes sources d'acides gras oméga 3 disponibles ? *OCL*, 11(2) : 103-105, mars/avril.
- Corongiu, F.P. and Banni, S., 1994. Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods in Enzymology*, 233 : 303-313.
- Corraze, G., 1996. Les lipides des poissons marins et d'eau douce. Journée CHEVREUL de Nantes, « Lipides et qualité des aliments d'origine animale », 38-46.
- Cozzolino, D., Murray, I., Chree, A., Scaife, J.R., 2005. Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-squares regression and near-infrared spectroscopy. *LWT*, 38 : 821-828.
- Delplanque B., 2004. Acides gras de la famille *n*-3 : alphalinolénique (ALA) d'origine végétale et longues chaînes *n*-3 (LC *n*-3). *OCL*, 11(2) : 98-102, mars/avril.
- Demers E., 2001. Les acides gras polyinsaturés oméga-3 en bref. *Emergence*. 5(1) : 3. Bulletin d'information du Centre technologique des produits aquatiques, Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation, Québec.
- Depêche, J., Billard, R., 2004. Embryology in fish: A review. *Société Française d'Ichtyologie*. 123 p.
- Dewailly É, Blanchet C, Lemieux S, Sauvé L, Gingras S, Ayotte P, Holub BJ, 2001. *n*-3 fatty acids and cardiovascular disease risk factors among the Inuit of Nunavik. *Am J Clin Nutr.* 74 (4) : 464-73.

Dobarganes, M.C. and Velasco, J., 2002. Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104 : 420-428.

DSM Nutritional Products., 2000. Manuel Roche sur la qualité des saumons et des truites d'élevage : Influence des micronutriments. Centre for Research in Animal Nutrition. p.15.

Dumay, J., 2003. Contribution à l'analyse de lipides issus de biomasses marines en vue de la recherche de molécules à activité biologique. *Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Sorbonne.*, 102 pp.

Dumont, J.N., Brummett R., 1980. The vitelline envelope, chorion and micropyle of *Fundulus heteroclitus* eggs. *Gamete Res.*, 3: 25-44.

Eurofish International Organisation. Survey of the fish industry in Russia. October 2005.

Eymard, S., 2003. Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. *Thèse Université de Nantes*.

Fanni J., 1977. Importance de la contribution de la flore fongique dans l'accumulation du calcium et du phosphore à la surface d'un fromage à pâte molle de type Camembert. Thèse de Doctorat, INPL, Nancy, France.

FAO Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture. 2007.

FAO, Programme d'Information sur les Espèces Aquatiques Cultivées, 2000-2007.

Fischer, D. J., Liliom, K., Guo, Z., Nusser, N., Virag, T., Murakami-Murofushi, K., Kobayashi, S., Erickson, J. R., Sun, G., Miller, D. D., Tigyi, G., 1998. Naturally occurring analogs of lysophosphatidic acid elicit different cellular responses through selective activation of multiple receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.*, 54: 979-88.

Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226:497-509.

Frankel, E.N., 1998. Lipid oxidation. *The Oily Press (vol. 10)*. Dundee, Scotland. 10, 130.

Gardiner, Y.T., 2000. Preservation of rainbow trout eggs and embryos using a perfluorochemical. Thesis. Department of Health Management. Faculty of Veterinary Medicine. University of Edward Island.

Gbogouri G.A., 2005. Co-valorisation des protéines et des lipides riches en lécithine et en acides gras polyinsaturés oméga 3 à partir de têtes de saumon (*Salmo salar*) par hydrolyse enzymatique. Mémoire de thèse en Procédés Biotechnologiques et Alimentaires-INPL.

- Gbogouri G. A., Linder M., Fanni J., Parmentier M., 2006. Analysis of lipids extracted from salmon (*Salmo salar*) heads by commercial proteolytic enzymes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 108: 766-775
- Gbogouri G.A., Linder M., Fanni J., Parmentier M., 2004. Influence of the hydrolysis degree on the functional properties of salmon by-products hydrolysates. *J. Food Sci.*, 69(8) : 615-622.
- Geurden I., Gondouin E., Rimbach M., Koppe W., Kaushik S., Boujard T., 2006. The evaluation of energy intake adjustments and preferences in juvenile rainbow trout fed increasing amounts of lipid. *Physiol. Behav.*, 88: 325-332.
- Ghos M., Tucker D.E., Burchett S.A., Leslie C.C., 2006. Properties of the group IV phospholipases A₂ family. *Progress in Lipid Research*, 45:487-510.
- Gilberg A., Arnesen J.A., Carlehög M., 2002. Utilization of cod backbone by biochemical fractionation. *Process Biochem.*, 38:475-480.
- Gildberg, A., 1993. Enzymic processing of marine raw materials. *Process Biochem.*, 28: 1-15.
- Gobantes I., Choubert G., Gómez R., 1998. Quality of pigmented (astaxanthin and canthaxanthin) rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets stored under vacuum packaging during chilled storage. *J. Agric. Food Chem.*, 46:4358-462.
- Gray, J.I., 1978. Measurement of lipid oxidation: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55 : 539-545.
- Guillén M.D., Cabo N., 1999. Usefulness of the frequency data of the Fourier transform infrared spectra to evaluate the degree of oxidation of edible oils. *J. Agric. Food Chem.*, 47 : 709-719.
- Guillén M.D., Cabo N., 1997a. Characterization of edible oils and lard Fourier transform infrared spectroscopy. Relationships between composition and frequency of concrete bands of fingerprint region. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74 : 1281-1286.
- Guillén M.D., Cabo N., 1997b. Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. *J. Sci. Food Agric.*, 75 : 1-11.
- Guillén M.D., Manzanos M.J., 1996. Study of the components of a solid smoke preparation. *Food Chemistry*, 55 : 251-257.
- Guillén M.D., Iglesias M.J., Dominguez A., Blanco C.G., 1995. Fourier transform infrared study of coal tar pitches. *Fuel*, 74 : 1595-1598.
- Guillén M.D., Iglesias M.J., Dominguez A., Blanco C.G., 1992. Semiquantitative FTIR analysis of a coal tar pitch and its extracts and residues in several organic solvents. *Energy Fuels*, 6 : 512-525.

- Haliloğlu H.I., Aras N.M., Yanik T., Atamanalap M., Kocaman E.M., 2003. Investigation of changes in fatty acid composition at early development stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 27 : 1105-1109.
- Hanahan D.J., Brockerhoff H., Barron E.J., 1960. The site of attack of phospholipase (lecithinase) A on lecithin: A re-evaluation. *The Journal of Biological Chemistry*, 235(7):1917-1923.
- Hardy R. W., Fornshell G. C., Brannon E. L., 2001. Species Profile: Rainbow Trout. 28th FFNW, Fish Feed and Nutrition Workshop, Louisiana State University Agricultural Center, Aquaculture Research Station, in Baton Rouge, LA, USA..
- Harris W.S., Von Shacky C., 2004. The omega-3 index: a new risk factor for sudden cardiac death? *Prev Med.*, 39: 212-220.
- Hazel J. R., 1979. Influence of thermal acclimation on membrane lipid composition of rainbow trout liver. *Am. J. Physiol.*, 236(1) : R91-R101.
- Hiratsuka S., Suzuki T., Hashidume M., Matsue Y., Kitagawa T., Yokohama M., Tamura M., Fujii T., Muramatsu N., 2003. Method for extracting lipid mixture containing polyunsaturated fatty acids from viscera prior to extraction, and lipid mixture extracted thereby. US patent : US 2003:0190392 A1.
- Hori S.H., Kodama T., Tanahashi K., 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *Gen Comp Endocrinol.*, 37: 306-320.
- Huang C.H., Hultin H.O., Jafar S.S., 1993. Some aspects of Fe²⁺-catalysed oxidation in fish sarcoplasmic reticular lipid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 : 1886-1892.
- Hultin H.O., 1994. Oxidation of lipids in seafoods. In *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality* . Shahidi, F. & Botta, J.R. (Eds), Blackie Academic & Professional, New York, 49-74.
- Ingemansson T., Olsson N. U., Herslöf B. G. and Ekstrand B., 1991. Lipids in light and dark muscle of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Sci. Food Agric.*, 57 : 443-447.
- Inoue S., Kitajima K., Inoue Y., Kudo S., 1987. Localization of polysialoglycoprotein as a major glycoprotein component in cortical alveoli of the unfertilized eggs of *Salmo gairdneri*. *Dev. Biol.*, 123: 442-454.
- Inoue, S., Inoue, Y., 1986. Fertilization (activation)-induced 200 to 9-kDa depolymerization of polysialoglycoprotein, a distinct component of cortical alveoli of rainbow trout eggs. *J. Biol. Chem.*, 261: 5256-5261.
- Inoue S., Iwasaki M., 1978. Isolation of a novel glycoprotein from the eggs of rainbow trout: occurrence of disialosyl groups on all carbohydrate chains. *Biochem Biophys Res Comm.*, 83:1018-1023.

- Inoue S., Kaneda-Hayashi T., Sugiyama H., Ando T., 1971. Studies on phosphoprotein from fish eggs. I. Isolation and characterization of a phosphoprotein from the eggs of Pacific herring. *J. Biochem.*, 69: 1003-1011.
- Iwamatsu T., Ohta T., 1978. Electron microscopic observation on sperm penetration and pronuclear in the fish egg. *J. exp. Zool.*, 205: 157-180.
- Jacobson T.A., 2006. Secondary prevention of coronary heart disease with omega-3 fatty acids. *Am. J. Cardiol.*, 98: 61-70.
- Jiang Z.Y., Hunt J.V., Wolff S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.*, 202:384.
- Josephson D.B., Lindsay R.C., 1986. Enzymic Generation of Volatile Aroma Compounds from Fresh Fish. *Biogenesis of Aromas*, 201-219.
- Kaitaranta J., Ackman R.G., 1981. Total lipids and lipid classes of fish roe. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 69B:725-729.
- Kaitaranta J.K., Lamppu R., Linko R.R., 1980. Amino acid content of Baltic herring and rainbow trout roe. *J. Agric. Food Chem.*, 28: 908-911.
- Kamler E., 1992. Early life history of fish: An energetic approach. Chapman & Hall Editions. 267 p.
- Kanazawa A., Teshima S. I., Ono K., 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63B : 295-298.
- Kim Y. J., Kim H. J., No J. K., Chung H. Y., Fernandes G., 2006. Anti-inflammatory action of dietary fish oil and calorie restriction. *Life Sci.*, 78: 2523-2532.
- Kinsella J.E., 1988. Food lipids and fatty acids: Importance in food quality, nutrition and health. *Food Technol. - Chicago*, 124-45.
- Kirimlioglu V., Kirimlioglu H., Yilmaz S., Ozgor D., Coban S., Karadag N., Yologlu S., 2006. Effect of fish oil, olive oil, and vitamin E on liver pathology, cell proliferation, and antioxydant defense system in rats subjected to partial hepatectomy. *Transplant P.*, 38: 564-567.
- Kitajima K., Inoue Y., Inoue S., 1986. Polysialoglycoproteins of salmonidae fish eggs. Complete structure of 200 kDa polysialoglyco-protein from the unfertilized eggs of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *J Biol Chem.*, 261: 5262-5269.
- Klein R. A., 1970. The detection of oxidation in liposome preparations. *Biochim. Biophys. Acta.*, 210 : 486-489

- Knockaert C. (2006). Salmonidés d'aquaculture, De la production à la consommation. Editions Quae. 327 pages.
- Kobayashi W., 1982. The fine structure and amino acid composition of the envelope of the chum salmon egg. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ.*, 23: 1-11.
- Kolthoff I.M., Medalia A.I., 1951. Determination of organic peroxides by reaction with ferrous iron. *Analytical Chemistry*, 23 : 595-603.
- Kris-Etherton P., Psota T. L., Gebauer S. K., 2006. Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *Am. J. Cardiol.*, 98: 3-18.
- Kubow S., 1996. The influence of positional distribution of fatty acids in nutritive, interesterified and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Nutr. Biochem.*, 7:530-541.
- Larsson S. C., Kumlin M., Ingelman-Sundberg M., Wolk A., 2004. Dietary long-chain *n*-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am. Soc. Clin. Nutr.*, 79: 935-45.
- Lazzari M., Chiantore O., 1999. Drying and oxidative degradation of linseed oil. *Polymer degradation and stability*, 65 : 303-313.
- Lea C.H., 1946. The determination of the peroxide values of edible fats and oils: the iodometric method. *J. Soc. Chem. Ind.*, 65 : 286-291.
- Litscher E. S., Wassarman P. M., 2007. Egg extracellular coat proteins: from fish to mammals. *Histology and Histopathology*, 22: 337-347.
- Mahadik S. P., Evans D., Lal H., 2001. Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acids supplementation on schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 23: 463-493.
- Mallégol J., Lemaire J., Gardette J.-L., 2000. Drier influence on the curing of linseed oil. *Progress in Organic Coatings*, 39 : 107-113.
- Maroon J. C., Bost J. W., 2006. ω -3 Fatty acids (fish oil) as an anti-inflammatoxy: an alternative to non steroidal anti-inflammatory drugs for discogenic pain. *Surg. Neurol.*, 65: 326-331.
- McPhail J. D., Lindsey C. C., 1970. Freshwater fishes of Northwestern Canada and Alaska. *Fisheries Research Board of Canada.*, Bulletin 173.
- Mohr V., 1980. Enzymes Technology in meat and fish industries. *Process Biochem.*, August/September, 32:18-21.
- Mortensen S.H., Børsheim K. Y., Rainuzzo J. R., Knutsen G., 1988. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 122: 173- 85.

- Moya Moreno M. C. M., Mendoza Olivares D., Amezcuita Lopez F. J., Peris Martinez V., Bosch Reig F., 1999b. Study of the formation of carbonyl compounds in edible oils and fats by ^1H -NMR and FTIR. *Journal of Molecular Structure*, 482-483 : 557-561.
- Moya Moreno M. C. M., Mendoza Olivares D., Amezcuita Lopez F. J., Gimeno Adelantado Bosch Reig, F., 1999c. Determination of unsaturation grade and trans isomers generated during thermal oxidation of edible oils and fats by FTIR. *Journal of Molecular Structure* 482-483 : 551-556.
- Moya Moreno M.C.M., Mendoza Olivares D., Amezcuita Lopez J.F., Gimeno Adelantado J.V., Bosch Reig F., 1999a. Analytical evaluation of polyunsaturated fatty acids degradation during thermal oxidation of edible oils by Fourier transform infrared spectroscopy. *Talanta*, 269-275.
- Muik B., Lendl B., Molina-Diaz A, Valcarcel M., Ayora-Canada M.-J., 2007. Two-dimensional correlation spectroscopy and multivariate curve resolution for the study of lipid oxidation in edible oils monitored by FTIR and FT-Raman spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 593 : 54-67.
- Muik B., Lendl B., Molina-Diaz A, Ayora-Canada M.-J., 2005. Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy. *Chemistry and Physics of lipids*, 134 : 173-182.
- Nourooz-Zadeh J., Tajaddini-Sarmadi J., Birlouez-Aragon I., Wolff S.P., 1995. Measurement of hydroperoxides in edible oils using the ferrous oxidation in xylenol orange assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 : 17-21.
- Nudds K., 2002. Fish, Omega-3 fatty acids and you. Aquaculture Centre, University of Guelph.
- Nzai J. M., Proctor A., 1998. Phospholipids determination in vegetable oil by thin layer chromatography and imaging densitometry. *Food Chem.*, 63 (4): 571-576.
- Papadopoulou P., Galanopoulos V. K., Hamodrakas S. J., 1996. Molecular and supramolecular architecture of the *Salmo gairdneri* proteinaceous eggshell during development. *Journal of Structural Biology*, 116: 399-412.
- Peng L., Xu X., Mu H., Høy C. E., Adler-Nissen J., 2002. Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology. *Enzyme and microbial Technol.*, 31: 523-532.
- Pennsylvania Agricultural Statistics Service, 2004. National Agricultural Statistics Service.
- Pérez-Palacios T., Antequera T., Muriel E., Ruiz J., 2006. Stereospecific analysis of phospholipid classes in rat muscle. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 108:835-841.
- Piper R.G., McElwain I.B., Orme L.E., McCraren J.P., Fowler L.G., Leonard J.R., 1982. Fish hatchery management. United States Government Printing Office, Washington, D.C. 131-207.

- Pizato N., Bonatto S., Piconcelli M., de Souza L. M., Sassaki G. L., Naliwaiko K., Nunes E. A., Curi R., Calder P. C., Fernandes L. C., 2006. Fish oil alters T-lymphocyte proliferation and macrophage responses in Walker 256 tumor bearing rats. *Nutrition*, 22: 425-432.
- Price B., 2003. Overview of roe products. Presentation at the 54th Annual PFT (Pacific Fisheries Technologists) Meeting. Reno, Nevada.
- Puglia C., Tropea S., Rizza L., Santagati N. A., Bonina F., 2005. In vitro percutaneous absorption studies and in vivo evaluation of anti-inflammatory activity of essential fatty acids (EFA) from fish oil extracts. *Int. J. Pharmaceutics*, 299: 41-48.
- Rapport de Pêches et Océans Canada, 2005. Industrie canadienne de l'aquaculture. Chiffre Clés. 2004-2005.
- 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 de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale*, 171 pp.
- Reiffel J., McDonald A., 2006. Antiarrhythmic effects of omega-3 fatty acids. *Am. J. Cardiol.*, 98: 50-60.
- Rombough P.J., 1985. The influence of the zona radiata on the toxicities of zinc, lead, mercury, copper and silver ions to embryos of steelhead trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 82 : 115-117.
- Sardet C., Prodon F., Dumollard R., Chang P., Chênevert J., 2002. Structure and function of the egg cortex from oogenesis through fertilization. *Developmental Biology*, 241: 1-23.
- Sargent J., Henderson R.J., and Tocher D.R., 1989. The lipids. In: "Fish Nutrition". Edited by J. E. Halver, Academic Press, pp 153-218.
- Satia B.P., Donaldson L.R., Smith L.S., Nightingale J.N., 1974. Composition of ovarian fluid and eggs of the University of Washington Strain of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Res Board Can.*, 31: 1796-1799.
- Schneider M., 2001. Phospholipids for functional food. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 103: 98-101.
- Senanayake S.P.J.N., Shahidi F., 2002. Positional distribution of FA in TAG of enzymatically modified borage and evening primrose oils. *Lipids*, 37(8):803-810.
- Shabanipour N., Heidari B., 2004. A histological study of the zona radiata during late oocyte developmental stages in the Caspian sea mugilid, *Liza aurata* (RISSO 1810). *Braz. J. morphol. Sci.*, 21(4): 191-195.
- Shantha N.C., Decker E.A., 1994. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77 : 421-424.

Sheridan M. A., 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107B : 495-508.

Sheridan M. A., 1988. Lipid dynamics in fish: Aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B : 679-690.

Shirai N., Higuchi T., Suzuki H., 2006. Analysis of lipid classes and the fatty acid composition of the salted fish roe food products, Ikura, Tarako, Tobiko and Kazunoko. *Food Chemistry*, 94(1):61-67.

Silversand C., Haux C., 1997. Improved high-performance liquid chromatography method for the separation and quantification of lipid classes: application to fish lipids. *Journal of Chromatography B*, 703:7-14.

Staley K., Muel. J., 2000. Fish and wildlife habitat management leaflet number 13 - rainbow trout (order: *Oncorhynchus mykiss*), *ECS – Biology*. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service.

Stehr C.M., Hawkes J.W., 1979. The comparative ultrastructure of the egg membrane and associated pore structures in the starry flounder *Platichthys stellatus* (Pallas) and pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum). *Cell Tissue Res.*, 202 : 347-356.

Stevens Melissa M., 2003. Farmed Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*, Seafood Watch, Seafood Report, Final Report.

Sundler R., Winstedt D., Wijkander J., 1994. Acyl-chain selectivity of the 85 kDa phospholipase A₂ and of the release process in intact macrophages. *Biochem. J.*, 301:455-458.

Suyama M., 1958. Changes in the amino acid composition of protein during the development of rainbow trout eggs. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 23: 789-792.

Szabó A., Fébel H., Sugár L., Romvári R., 2007. Fatty acid regiodistribution analysis of divergent Animal triacylglycerol samples – A possible Approach for species differentiation. *Journal of food lipids*, 14:62–77.

Tamehiro N., Okamoto-Hosoya Y., Okamoto S., Ubukata M., Hamada M., Naganawa H., Ochi K., 2002. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46: 315-320.

Taylor L., 2006. Champagne wishes, but no more caviar dreams. International trade of caviar and other sturgeon products banned. *SEED Magazine*. January 5.

Tocher D.R., Dick J. R., MacGlaughlin P., Bell J. G., 2006. Effect of diets enriched in $\Delta 6$ desaturated fatty acids (18:3n-6 and 18:4n-3), on growth, fatty acid composition and highly unsaturated fatty acid synthesis in two populations of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 144: 245-253.

Toyoshima K., Noguchi R., Hosokawa M., Fukunaga K., Nishiyama T., Takahashi R., Miyashita K., 2004. Separation of sardine oil without heating from surimi waste and its effects on lipids metabolism in rats. *J. Agric. Food. Chem.*, 52: 2372-2375.

Turon F., Bachain P., Caro, Y., Pina M, Graille J., 2002. A direct method for regiodistribution of TAG using α -MAG. *Lipids*, 37 (8):817-821.

Valdés A. F., Garcia A. B., 2006. A study of the evolution of the physicochemical and structural characteristics of olive and sunflower oils after heating at frying temperatures. *Food Chemistry*, 98 : 214-219.

Vlachos N., Skopilitis Y., Psaroudaki M., Konstantinidou V., Chatzilazarou A., Tegou E., 2006. Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica Chimica Acta*, 573-574 : 459-465.

Vuorela R, Kaitaranta J. K., Linko R. R., 1979. Proximate composition of fish roe in relation to maturity. *J Inst Can Sci Technol Aliment*, 12: 186-188.

Walton C.G., Ratnayake W.M.N., Ackman R.G., 1989. Total sterol in seafoods : Iatroscan TLC/FID versus the kovacs GLC/FID method. *Journal of Food Science*, 54(4):793-795.

Washington Agricultural Statistics, 2004.

Weisinger H. S., Armitage J. A., Sinclair A. J., Vingrys A. J., Burns P. L., Weisinger R. S. 2001. Perinatal omega-3 fatty acid deficiency affects blood pressure later in life. *Nature Medecine*, 7: 258-259.

Wolff S.P., 1994. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol.*, 233: 182–189.

Yamagami K., Hamazaki T.S., Yasumasu S., Masuda K., Iuchi I., 1992. Molecular and cellular basis of formation, hardening and breakdown of the egg envelope in fish. *Int. Rev. Cytol.*, 136: 51-92.

Zampolli A., Bysted A., Leth T., Mortensen A., De Caterina R., Falk E., 2006. Contrasting effect of fish oil supplementation on the development of atherosclerosis in murine models. *Atherosclerosis*, 184:78-85.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Pierre VILLENEUVE, Directeur de Recherche, CIRAD, Montpellier

**Madame Marie-Caroline MICHALSKI, Chargé de Recherche, Faculté de Médecine Lyon-Sud,
Oullins**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur AL-SAYED MAHMOUD Kassem

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Extraction, fractionnement et caractérisation des lipides polyinsaturés d'œufs de la
truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANCEUVRE CEDEX

Fait à Vandoeuvre, le 30 octobre 2007

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT

