



**HAL**  
open science

# Valorisation de la fraction protéique des co-produits de saumon : étude et optimisation

Margot Provost

► **To cite this version:**

Margot Provost. Valorisation de la fraction protéique des co-produits de saumon : étude et optimisation. Biotechnologies. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2016. Français. NNT : 2016BRES0045 . tel-03336553

**HAL Id: tel-03336553**

**<https://theses.hal.science/tel-03336553>**

Submitted on 7 Sep 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



université de bretagne  
occidentale

UNIVERSITE  
BRETAGNE  
LOIRE

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*Mention : biologie marine*

**École Doctorale des Sciences de la Mer**

présentée par

**Margot PROVOST**

Préparée à l'Institut Universitaire Européen  
de la Mer (IUEM), au Laboratoire des  
Sciences de l'Environnement Marin  
(LEMAR – UMR 6539)

# Valorisation de la fraction protéique des co-produits de saumon : Étude et optimisation

**Thèse soutenue le 6 juillet 2016**

devant le jury composé de :

**Patrick BOURSEAU**

Professeur, Université de Bretagne Sud / Rapporteur

**Stéphanie BORDENAVE-JUCHEREAU**

Maître de Conférences HDR, Université de la Rochelle /  
Rapporteur

**José ZAMBONINO**

Directeur de recherche IFREMER, Plouzané / Examineur

**Fabienne GUÉRARD**

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / Directrice de thèse

**Roxane FAGON**

Responsable R&D, SAS YSLAB / Invitée



**CONFIDENTIEL**



## Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier Madame Stéphanie Bordenave-Juchereau et Monsieur Patrick Bourseau qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ce manuscrit de thèse et d'assister à ma soutenance.*

*Je remercie chaleureusement Fabienne Guérard, pour m'avoir confié ce sujet de thèse. Merci pour tes qualités humaines et tes précieux conseils. Merci de m'avoir transmis toutes ces connaissances et ce savoir-faire. J'ai pu acquérir, grâce à toi, une expérience que je n'aurais pas imaginé en commençant ce travail et qui m'aidera au delà de ma carrière professionnelle.*

*Je remercie vivement tous les membres du comité scientifique Peske&Co.*

*Tout d'abord, Vincent Gélamur, qui a coordonné ce projet avec enthousiasme et dynamisme. Merci également à Julie Bernard. Je remercie, Marc Hémon, qui m'a permis de commencer ce travail avant l'heure. Merci à toute l'équipe R&D d'Yslab : Roxane Fagon, Marie Lebesco et Stéphanie Bondu. Merci à chacune pour votre disponibilité, votre gentillesse et nos nombreux échanges. Merci à tous pour votre accueil au sein d'YSLAB. Merci également à Isabelle Guiller. Je vous remercie tous très sincèrement pour ces comités si intéressants et stimulants. C'était toujours un plaisir de vous retrouver et d'échanger.*

*Merci à José Zambonino d'avoir accepté de faire partie du jury. Je vous remercie également toi et David Mazurais pour avoir permis le travail sur les larves de bar. Merci pour votre disponibilité, votre gentillesse et vos précieux conseils. J'ai beaucoup appris au cours de ce travail. Merci également à Joël Gatesoupe pour le travail sur le microbiome. J'adresse aussi un grand merci à Patrick Quazuquiel pour t'être occupé des larves et pour t'être rendu si disponible, ça a été un grand plaisir de te seconder dans tes tâches. Je remercie également toute l'équipe du laboratoire ANR de l'Ifremer de Plouzané pour leur accueil.*

*Je remercie également toutes les personnes qui permettent la poursuite actuelle de ce travail : Sébastien Artigaud, Morgan Perennou et Vianney Pichereau.*

*Une partie des essais pilotes a été réalisée dans l'entreprise SPF-DIANA. Je remercie Gwénola Lafage d'avoir assuré les expérimentations, merci pour ton dynamisme, ta disponibilité et ta gentillesse. Merci également à Vincent Fournier pour sa disponibilité et ses précieux conseils.*

*Je remercie également Marion Ritter, Jean-Michel Facqueur et Julie Moëlle pour leur implication dans le projet.*

*Je remercie très sincèrement l'équipe du LIMATB pour le travail en rhéologie. Merci à vous Thierry Aubry, pour votre disponibilité, votre gentillesse et les échanges si intéressants que nous avons pu avoir. Un grand merci également à Philippe Roquefort, pour ta gentillesse, ta patience et ta disponibilité. Ça a été un véritable plaisir de travailler avec vous.*

*Je remercie également les plateformes analytiques de l'UBO au sein desquelles ont été réalisées les mesures en FTIR, merci à Nathalie Cosquer, en microscopie, merci à Gérard Siquin et Philippe Elies et enfin en RMN, merci à Gaëlle Simon.*

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire des Sciences de l'Environnement MARin (LEMAR). Je remercie donc Olivier Ragueneau, directeur du laboratoire, pour son accueil.*

*Je remercie très chaleureusement Klervi Le Lann. Ça a été un véritable plaisir de travailler avec toi. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ta disponibilité. Merci également à Léo Vic.*

*Je remercie l'École Doctorale des Sciences de la Mer (EDSM) et plus particulièrement Elisabeth Bondu pour sa gentillesse et sa disponibilité, ainsi que Fred Jean.*

*Je remercie également l'ensemble de l'équipe du LEMAR pour leur accueil, leur gentillesse et leur disponibilité. J'adresse particulièrement mes remerciements à Geneviève Cohat et Anne-Sophie Podéur, des secrétaires en or. Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre bonne humeur. Je remercie également l'ensemble du personnel de l'IVEM et en particulier Yannick Taveaud, pour sa gentillesse et sa disponibilité. Un grand merci également à Sébastien Hervé pour ton enthousiasme dans la réalisation de posters, schémas et illustrations. En somme, un superbe labo que je quitte avec regrets.*

*Et un grand merci à tous ceux qui, plus que des collègues de travail, sont devenus de véritables amis : Adèle, Gaëlle, Floriane, Yanouk, Marie, Élodie, Bruno, Sam, Fabien, Laura, Marine, Mélanie, Nina... Vous avez rendu cette thèse si incroyable !*

*Je tiens également à remercier tous mes professeurs de lycée, de fac et mes différents maîtres de stage, en particulier Peter Beninger, Xavier de Montaudouin, Cindy Binias et Patrice Gonzalez qui m'ont accompagnée tout au long de mon cursus, depuis le lycée jusqu'au master, et qui ont su me transmettre le goût pour les sciences et la recherche.*

*Et surtout, un immense merci à Olivier, à ma grande famille et à tous mes amis... qui sont là depuis le début et m'ont permis d'en arriver là.*

# TABLE DES MATIÈRES

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
------------------------------------	----------

## **ÉTAT DE L'ART**

<b>1. LA MOLÉCULE DE COLLAGÈNE: focus sur le collagène de poisson</b> .....	<b>10</b>
1.1 Généralités .....	10
1.1.1 Définition, rôle et structure du collagène.....	10
1.1.2 Biosynthèse du collagène de type I.....	13
1.1.3 Collagène natif, gélatine et hydrolysats de collagène .....	18
1.2 La caractérisation du collagène .....	20
1.2.1 Les spécificités de la molécule de collagène .....	21
1.2.2 Les différentes méthodes de caractérisation du collagène .....	22
1.3 Les différentes sources de collagène .....	33
1.3.1 Du collagène de mammifère vers le collagène marin.....	33
1.3.2 Les sources de collagène marin .....	34
1.3.3 Les particularités du collagène marin .....	34
1.4 Les différentes méthodes d'extraction et les caractéristiques associées du collagène marin de type I.....	38
1.4.1 Les méthodes d'extraction par voie acide et par la pepsine.....	38
1.4.2 Influence des conditions d'extraction sur le poids moléculaire du collagène .....	43
1.5 Les principales voies d'utilisation du collagène.....	45
1.5.1 Utilisation dans l'alimentation.....	45
1.5.2 Utilisation du collagène en nutraceutique et nutricosmétique .....	46
1.5.3 Utilisation du collagène en cosmétique .....	48
1.6 Utilisation en médecine: traitements et dispositifs médicaux .....	49
<b>2. LA RÉTICULATION DU COLLAGÈNE MARIN POUR DES APPLICATIONS EN INGÉNIERIE TISSULAIRE</b> .....	<b>51</b>
2.1 Généralités sur les biomatériaux.....	51
2.2 Le génie tissulaire .....	54
2.2.1 L'utilisation du collagène dans le domaine du génie tissulaire .....	55
2.2.2 Quelques exemples d'application d'ingénierie tissulaire utilisant des hydrogels de collagène .....	60
2.3 La réticulation du collagène .....	65
2.3.1 Procédés de réticulation du collagène marin .....	66

<b>3. LES HYDROLYSATS DE PROTÉINES: focus sur les peptides bioactifs marins... 74</b>	
3.1 Les hydrolysats de protéines: définition et obtention.....	74
3.2 L'hydrolyse enzymatique des biomasses marines.....	75
3.2.1 Principe de la réaction d'hydrolyse enzymatique.....	77
3.2.2 Suivi de l'évolution de l'hydrolyse.....	77
3.2.3 Les enzymes.....	79
3.2.4 Les facteurs limitant de la réaction d'hydrolyse enzymatique.....	88
3.3 Caractérisation des hydrolysats.....	89
3.4 Utilisation des hydrolysats d'origine marine: focus sur les peptides bioactifs.....	93
3.4.1 Les peptides bioactifs.....	93
3.4.2 Utilisation des peptides en alimentation aquacole.....	99
<b>1. MATIÈRE PREMIÈRE.....</b>	<b>110</b>
<b>2. DÉVELOPPEMENT DES PROCÉDÉS D'EXTRACTION DES INGRÉDIENTS.....</b>	<b>111</b>
2.1 Mise au point d'un procédé d'extraction de collagène issu de peaux de saumon.....	111
2.1.1 Infrastructures.....	111
2.1.2 Protocoles d'extraction du collagène.....	112
2.1.3 Transposition d'un protocole d'extraction du collagène à l'échelle pilote.....	115
2.1.4 Calcul du rendement d'extraction du collagène.....	122
2.2 Réticulation enzymatique d'un collagène de saumon.....	122
2.2.1 Matériel : collagène et agents de réticulation.....	122
2.2.2 Préparation d'hydrogels de collagène réticulé.....	124
2.2.3 Préparation d'éponges de collagène réticulé.....	125
2.3 Hydrolyse enzymatique des têtes de saumon en conditions contrôlées.....	126
2.3.1 Matériel enzymatique.....	126
2.3.2 Développement et production des hydrolysats.....	127
2.3.3 Transfert d'échelle de la production des hydrolysats.....	132
<b>3. CARACTÉRISATION DES INGRÉDIENTS DÉVELOPPÉS ET ÉVALUATION DE LEUR PERFORMANCES.....</b>	<b>136</b>
3.1 Méthodes de caractérisation utilisées pour chacun des ingrédients.....	136
3.1.1 Collagène issu des essais pilotes.....	136
3.1.2 Collagène natif vs collagène réticulé.....	137
3.1.3 Caractérisation des hydrolysats.....	137

3.2	Description des méthodes analytiques utilisées.....	138
3.2.1	Analyses chimiques .....	138
3.2.2	Analyses microbiologiques.....	138
3.2.3	Caractérisation des protéines .....	139
3.2.4	Dosage des fonctions amines du collagène par la méthode OPA.....	144
3.2.5	Caractérisation structurale du collagène.....	145
3.2.6	Mesures rhéologiques du collagène.....	146
3.3	Étude de l'impact du DH des hydrolysats sur les performances d'ingrédients fonctionnels testés <i>in vivo</i> sur des larves de bar.....	148
3.3.1	Animaux et dispositif expérimental.....	148
3.3.2	Régimes alimentaires.....	150
3.3.3	Étude phénotypique des larves.....	152
<b><i>CHAPITRE 1: Mise au point d'un procédé industriel d'extraction d'un collagène de haut poids moléculaire à partir de peaux de saumon (<u>Salmo salar</u>)</i></b>		
<b>1.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>158</b>
<b>2.</b>	<b>Conceptualisation de la démarche R&amp;D .....</b>	<b>158</b>
<b>3.</b>	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>160</b>
3.1	Analyse des produits de la concurrence .....	160
3.2	Cahier des charges du collagène à produire .....	166
3.3	Composition proximale de la matière première .....	167
3.4	Comparaison des protocoles A et E d'extraction du collagène en laboratoire.....	168
3.4.1	Aspect visuel des échantillons .....	168
3.4.2	Composition en protéines des échantillons.....	169
3.4.3	Composition en acides aminés.....	170
3.4.4	Chromatographie d'exclusion stérique : SEC-FPLC .....	171
3.4.5	Rendement d'extraction du collagène.....	172
3.4.6	Conclusion : choix du protocole à transposer à l'échelle industrielle .....	172
3.5	Transposition d'un protocole d'extraction de collagène de haut poids moléculaire à l'échelle pilote pour développer un procédé industrialisable.....	173
3.5.1	Étude du changement d'échelle .....	174
3.5.2	Identification des freins et leviers pour l'optimisation du protocole .....	180
3.5.3	Optimisation du protocole.....	183
<b>4.</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>198</b>

**CHAPITRE 2: Characterization of a new commercial preparation of marine collagen (PesKCollagen 3D Pro<sup>®</sup>) from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin**

<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>202</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>203</b>
2.1 Materials.....	203
2.2 Methods.....	204
2.2.1 Proximate analysis.....	204
2.2.2 Amino acid analysis.....	204
2.2.3 Molecular weight distribution.....	204
2.2.4 Sol-gel and gel-sol transition temperature characterization.....	205
2.2.5 Fourier transform infrared spectroscopy.....	205
2.2.6 Scanning electron microscopy.....	206
<b>3. RESULTS</b> .....	<b>206</b>
3.1 Macroscopic appearance.....	206
3.2 Proximate composition.....	206
3.3 Amino acid analysis.....	207
3.4 Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis.....	208
3.5 Size exclusion fast protein liquid chromatography.....	210
3.6 Fourier transform infrared spectroscopy.....	212
3.7 Sol-gel and gel-sol transition temperatures.....	214
3.8 Scanning electron microscopy.....	216
<b>4. CONCLUSION</b> .....	<b>218</b>

**CHAPITRE 3: Études préliminaires de la réticulation enzymatique d'un collagène de saumon de haut poids moléculaire**

<b>1. Introduction</b> .....	<b>222</b>
<b>2. Résultats et discussion</b> .....	<b>224</b>
2.1 Préparations d'hydrogels et d'éponges de collagène réticulés.....	224
2.1.1 Hydrogels.....	224
2.1.2 Éponges.....	227
2.2 Influence de la réticulation sur la structure biochimique du collagène.....	229
2.2.1 Dosage OPA.....	229
2.2.2 Analyses en RMN-HRMAS.....	230
2.2.3 Analyses en FTIR.....	241

2.3	Caractérisation de la microstructure et des propriétés mécaniques des hydrogels de collagène réticulé par la transglutaminase.....	246
2.3.1	Observation de la microstructure des collagènes natif et réticulés en microscopie électronique à balayage (MEB).....	246
2.3.2	Analyses rhéologiques.....	249
<b>3.</b>	<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>256</b>
<b><i>CHAPITRE 4: Fabrication de deux hydrolysats au DH contrasté à partir de têtes de saumon (<i>Salmo salar</i>) et évaluation de leurs performances in vivo</i></b>		
<b>1.</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>260</b>
<b>2.</b>	<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>262</b>
2.1	Production et caractérisation biochimique des hydrolysats.....	262
2.1.1	Production d'hydrolysats en laboratoire.....	262
2.1.2	Transposition des procédés d'hydrolyse à l'échelle pré-pilote.....	271
2.2	Production des deux hydrolysats à l'échelle pilote.....	272
2.2.1	Caractérisation du poids moléculaire des hydrolysats.....	272
2.3	Étude de l'influence du degré d'hydrolyse sur le développement larvaire de bars <i>Dicentrarchus labrax</i> .....	281
2.3.1	Teneurs en di- et tri-peptides des aliments testés.....	281
2.3.2	Étude de la croissance des larves.....	283
2.3.3	Taux de survie des larves.....	286
2.3.4	Étude des malformations du squelette des larves.....	287
<b>3.</b>	<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>293</b>
3.1	Caractérisation des hydrolysats.....	293
3.1.1	Principaux résultats.....	293
3.1.2	Perspectives.....	294
3.2	Évaluation <i>in vivo</i> des performances des hydrolysats.....	294
3.2.1	Principaux résultats.....	294
3.2.2	Perspectives.....	295

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Échelle de valeur ajoutée des co-produits marins (d'après Penven, 2013).....	3
Figure 2. Disponibilité ds co-produits de saumon après transformation (illustration Sébastien Hervé). .....	5
Figure 3. Localisation géographique des différents partenaires du projet pesk&Co au sein de la région Bretagne (illustration Sébastien Hervé). .....	6
Figure 4. Un exemple de chaîne de valeur: la valorisation des peaux issues de la transformation du saumon (illustration Sébastien Hervé). .....	6
Figure 5. Vue schématique de la triple hélice de collagène. À gauche: Modèle de la structure en triple hélice de collagène. À droite: pour des riasons de moindre encombrement, les glycines sont au coeur de la triple hélice (d'après Gobeaux 2008). .....	11
Figure 6. Représentation schématique de la synthèse de collagène depuis la transcription nucléaire des gènes du collagène, le mRNA, la synthèse de protéines ribosomales (translation), les modifications post-traductionnelles, la sécrétion et l'étape final de formation de fibrilles (SP: signal peptidase; GT: hydroxylsyl galactosyltransferase and galactosylhydroxylsyl glucosyltransferase; LH: lysyl hydroxylase; PH: prolyl hydroxylase; OTC: oligosaccharyl transferase complex; PDI: protein disulphide isomerase; PPI: peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase; NP: procollagen N-proteinase; CP: procollagen C-proteinase; LO: lysyl oxidase; HSP47: heat shock protein 47, colligin1) (D'après Gelse et al. 2003). .....	15
Figure 7. Représentation schématique de l'assemblage supramoléculaire des fibrilles de collagène suivant le modèle axial développé par Hodge et Petruska (1963) (d'après Gelse et al. 2003). .....	17
Figure 8. Schématisation de la structure moléculaire de la gélatine. Au-dessus de 20°C, la gélatine se présente sous la forme d'un liquide (phase sol). Quand cette phase est refroidie, il se forme des nœuds réticulation sous la forme de triples hélices et une phase gel est obtenue. (Récupéré via GoogleImage <sup>††</sup> ). .....	19
Figure 9. Profils SDS-PAGE de collagènes ASC et PSC issus de peau (P) et d'os (B) de maquereau espagnol. Colonne 1: marqueurs de taille, colonne 2: ASC-P ; colonne 3 : PSC-P, colonne 4: ASC-B; colonne 5: PSC-P; colonne 6: collagène de peau de veau (tiré de Li et al. 2013). .....	39
Figure 10. Images obtenues en microscopie électronique à balayage pour des collagène ASC (a) et PSC (b) issus de peaux de marlin (tiré de Tamilmozhi et al. 2013). .....	42
Figure 11. Profil SDS-PAGE de gélatine extraite à 45°C pendant 45 min de peau de saumon ( <i>Salmo salar</i> ) (tiré de Kolodziejska et al. 2008). .....	44
Figure 12. Poids moléculaire d'une gélatine de lieu noir ( <i>Pollachius virens</i> ) extraite à 22°C, 45°C et 65°C (tiré de Eysturskard et al. 2009a). .....	44
Figure 13. Représentation des relations qui existent entre les nutraceutiques, les nutricosmétiques et cosméceutiques. ....	46
Figure 14. Hydrolysats de collagènes commercialisés sous forme de boisson, de poudre ou de gélule sur le marché asiatique (photographies Sébastien Hervé). .....	46
Figure 15. Schématisation du processus de réaction à un corps étranger chez les mammifères, qui se déroule lors de l'implantation d'un biomatériau synthétique (tiré de Ratner et Bryant 2004). .....	53
Figure 16. Aperçu des formes de collagène (tiré de Chevallay& Herbage 2000). .....	56
Figure 17. Production <i>in vitro</i> d'une peau reconstruite à partir d'un gel de collagène (tire de Auger et al. 2000). .....	61

Figure 18. Production in vitro d'une peau reconstruite à partir d'une éponge de collagène (tiré de Auger et al. 200).....	62
Figure 19. Isolement puis mise en culture in vitro de cellules souches humaines à partir de moelle osseuse (tiré du site web du projet <a href="#">REBORNE</a> ).....	63
Figure 20. Libération de substance médicamenteuse de la matrice de collagène (tire de Albu et al. 2011).....	64
Figure 21. EZCure™, une membrane de collagène commercialisée .....	65
Figure 22. La réticulation permet de former un ou plusieurs réseaux tridimensionnels par la création de liaisons covalentes entre les chaînes moléculaires (d'après Molecular Biology of the Cell (©Garland Science 2008). .....	66
Figure 23. Réaction de réticulation du collagène par le GTA.....	69
Figure 24. Réaction de transamination catalysée par la mTG (tiré de ( <a href="http://biochim-agro.univ-lille1.fr/proteines/co/ch1_II_e.html">http://biochim-agro.univ-lille1.fr/proteines/co/ch1_II_e.html</a> )). .....	70
Figure 25. Comparaison des observations en microscopie électronique à balayage des éponges de collagène de requin non réticulées (à gauche) et réticulées (à droite) (tiré de Fernandes-Silva et al. 2013). .....	72
Figure 26. Comparaison de la prolifération de cellules humaines de ligament parodontal sur du collagène de saumon Pacifique non réticulé (en haut) et réticulé (en bas) (tiré de Yunoki 2004). .....	73
Figure 27. Protocole d'hydrolyse enzymatique de protéines marines (d'après Guérard et al. 2005). .....	76
Figure 28. Détail de la réaction catalysée d'hydrolyse enzymatique. ....	77
Figure 29. Part respective de l'aquaculture et de la pêche de capture dans la consommation alimentaire de poisson (FAO, 2014). .....	99
Figure 30. Dissection de la larve de bar pour doser les enzymes digestives (tiré de Cahu et Zambonino 2007). .....	102
Figure 31. Évolution de l'activité d'une enzyme de la bordure en brosse, la phosphatase alcaline (AP), et d'une enzyme cytosolique, la leucine alanine peptidase (leu-ala) exprimées en unité internationale/mg de protéines au cours du développement larvaire du bar (tiré de Cahu et Zambonino 2007). .....	103
Figure 32. Bar de phénotype normal (en haut) comparé à un bar malformé (en bas)..	105
Figure 33. Peaux de saumon Atlantique après transformation des poissons (photographie Meralliance). .....	110
Figure 34. Tête de saumon.....	110
Figure 35. Réacteur (VMI, réacteur basculant 10L) dans lequel a été réalisé l'extraction de collagène pour des quantités allant jusqu'à 1,5kg.....	112
Figure 36. Diagramme des protocoles A, adapté de Eysturskard et al. (2009a) et E testés en laboratoire, adapté de Kolodziejska et al. (2008). .....	108
Figure 37. Protocoles d'extraction A et E du collagène testés à l'échelle laboratoire....	108
Figure 38. Schématisation du protocole E adapté de Eysturskard et al. (2009a) en 5 étapes à développer.....	115
Figure 39. Protocoles de pré-traitement acide/base testés sur les peaux de saumon issues de l'AM2C avant l'étape d'extraction. ....	118
Figure 40. Aspect macroscopique du collagène utilisé pour les protocoles de réticulation. ....	123
Figure 41. Synoptique du protocole suivi lors des tests préliminaires de formation d'une éponge de collagène réticulé par le GTA.....	123

Figure 42. Dispositif expérimental pour la réaction d'hydrolyse enzymatique: réacteur enzymatique thermostaté couplé au pH-Stat. ....	129
Figure 43. Diagramme du protocole d'hydrolyse enzymatique de têtes de saumon par l'Alcalase 2.4L. ....	130
Figure 44. Diagramme descriptif des protocoles d'hydrolyses enzymatiques pour les essais pré-pilotes de production des hydrolysats. ....	133
Figure 45. Diagramme descriptif des protocoles d'hydrolyses enzymatiques pour la production des hydrolysats HC et HL.....	134
Figure 46. Courbe de procédé des protocoles HC (en haut) et HL (en bas). Les chiffres correspondent aux légendes suivantes: .....	135
Figure 47. Gamme étalon réalisée avec du BSA pour le dosage de protéines par la méthode de Lowry.....	136
Figure 48. Droite de calibration des marqueurs de taille pour la Superdex™ 200.....	142
Figure 49. Droite de calibration des marqueurs de taille pour la colonne Superdex™ Peptides 10/300 GL. ....	143
Figure 50. Exemple de droite de calibration obtenue en SDS-PAGE. ....	144
Figure 51. Gamme étalon réalisée avec de la leucine pour le dosage des fonctions amines par la méthode OPA. ....	145
Figure 52. Échantillon de collagène métalisé et monté sur support avant d'être observé en MEB.....	146
Figure 53. Mesure des modules viscoélastiques du collagène réticulé sur l'appareil Gemini. ....	148
Figure 54. Salle expérimentale dans laquelle ont été réalisés les essais des ingrédients fonctionnels <i>in vivo</i> sur les larves de bar.....	149
Figure 55. Schéma du dispositif expérimental mis en place pour réaliser les essais des ingrédients fonctionnels <i>in vivo</i> sur les larves de bar.....	149
Figure 56. Démarche R&D pour la production d'un collagène de haut poids moléculaire. ....	160
Figure 57. Collagènes obtenus par le protocole (A) et par le protocole (E) testés en laboratoire.....	160
Figure 58. Élué sur la colonne Superdex 20, répartition des classes de taille et estimation du poids moléculaire des pics majeurs des échantillons obtenus par le protocole A (courbe bleue) et le protocole E (courbe rouge) testés en laboratoire. ....	163
Figure 59. Élué sur la colonne Superdex 200 des échantillons obtenus pour les essais pilotes 1 (courbe bleue), 2 (courbe rouge) et 3 (courbe verte) réalisés pour étudier le changement d'échelle.....	168
Figure 60. Bilan matière réalisé pour l'essai pilote 2 indiquant les quantités de protéines, Hyp, collagène matière grasse et cendres contenues dans les peaux broyées, les eaux de lavage et de rinçage, exprimées en g. ....	179
Figure 61. Freins et leviers identifiés au cours des étapes du procédé d'extraction du collagène afin de le transposer à l'échelle industrielle.....	174
Figure 62. Élué sur la colonne Superdex 200 de l'échantillon obtenu à l'issue de l'essai pilote au cours duquel a été testé l'équipement AM2C. ....	178
Figure 63. Élué sur la colonne Superdex 200 de l'échantillon obtenu à l'issue de l'essai préliminaire de lavage de la matière première par la méthode acide/base. ....	182
Figure 64. Élué sur la colonne Superdex 200 et profils SDS-PAGE des échantillons de collagène issus de protocoles avec (P+) ou sans (P-) pré-traitement par lavage acide/base des peaux.....	191

Figure 65. Comparaison des profils SDS-PAGE des collagènes obtenus au cours des différents essais pilotes.....	192
Figure 66. Éluion sur la colonne Superdex 200 des échantillons obtenus avec les essais de séchage par les techniques Innodry (en vert) et Innov'ia (en rouge) et comparés à la solution de collagène d'origine (en bleu).....	185
Figure 67. Marine collagen PeskCollagen 3D Pro® sponge.....	198
Figure 68. SDS-PAGE pattern of collagens: salmon collagen (SC) with (+) or without (-) $\beta$ -mercaptoethanol. M: Molecular markers, CC: Calf skin collagen, BC: Bovine collagen.....	210
Figure 69. Elution on Superdex 200 column of salmon collagen (SC), calf collagen (CC), bovine collagen (BC). Relative absorbance at 220 nm is given as a function of retention time.....	212
Figure 70. FTIR spectra of freeze-dried PeskCollagen 3D Pro®. Absorbance is given as a function of wavenumbers ( $\text{cm}^{-1}$ ).....	214
Figure 71. Temperature dependence of linear viscoelastic moduli, $G'$ and $G''$ , at 1 Hz and 10% strain amplitude, of PeskCollagen 3D Pro®.....	206
Figure 72. SEM Images of PeskCollagen 3D Pro® sponges (A and B).....	209
Figure 73. Hydrogels obtenus lors des essais préliminaires de réticulation du collagène par la mTG avec les différentes concentrations en enzymes testées (200, 100 et 50 U/g de protéine).....	224
Figure 74. Comparaison de la solution de collagène natif incubée à 40°C (A) avec la solution de collagène + mTG incubée à 40°C (B). ....	216
Figure 75. Hydrogel obtenu après réticulation d'une solution de collagène par du GTA. ....	226
Figure 76. Éponges obtenues par lyophilisation des hydrogels réticulés par la mTG....	227
Figure 77. Comparaison de collagène natif lyophilisé (à gauche) et d'une éponge de collagène réticulé par le GTA (à droite). ....	228
Figure 78. Pourcentages moyens de groupements amine libres avant et après la réticulation du collagène. C natif: collagène natif; GTA: hydrogel réticulé par le GTA 0; mTG: hydrogel réticulé par la mTG.....	229
Figure 79. Spectres $^1\text{H}$ -RMN-HRMAS du collagène natif et de l'éponge de collagène réticulé par la mTG. Les déplacements chimiques des atomes d'hydrogène sont représentés en abscisse et exprimés en parties par million (ppm).....	222
Figure 80. Comparaison des spectres $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -RMN-HRMAS (HSQC – direct C-H) obtenus pour le collagène natif lyophilisé (en haut) et l'éponge réticulée par la mTG (en bas). Les déplacements chimiques des atomes d'hydrogène sont représentés en abscisse et ceux des atomes de carbone en ordonnée, exprimés en parties par million (ppm). Les rectangles rouges indiquent les différences majeures observables entre le collagène natif et l'éponge réticulée. ....	236
Figure 81. Comparaison des spectres $^1\text{H}$ -RMN-HRMAS obtenus pour le collagène natif lyophilisé (en rouge) et l'éponge réticulée par le GTA 0.5% (en bleu). Les déplacements chimiques des atomes d'hydrogène sont représentés en abscisse et exprimés en parties par million (ppm). Les flèches indiquent les deux différences majeures observables entre le collagène natif et l'éponge réticulée.....	227
Figure 82. Comparaison des spectres 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -RMN-HRMAS (HSQC – direct C-H) obtenus pour le collagène natif lyophilisé (en haut) et l'éponge réticulée par le GTA 0.5% (en bas). Les déplacements chimiques des atomes d'hydrogène sont représentés en abscisse et ceux des atomes de carbone en ordonnée, exprimés en	

parties par million (ppm). Les rectangles rouges indiquent les deux différences majeures observables entre le collagène natif et l'éponge réticulée.....	240
Figure 83. Comparaison des spectres FTIR-ATR du collagène natif et des éponges réticulées par le GTA (en haut) et la mTG (en bas).....	242
Figure 84. Comparaison du collagène natif lyophilisé (à gauche) à l'éponge de collagène réticulé par la mTG (à droite) observés en MEB.....	247
Figure 85. Cinétique de la gélification de l'hydrogel de collagène réticulé par la mTG à 20°C.....	250
Figure 86. Evolution du module élastique en fonction de la fréquence et du temps de réaction de la mTG avant congélation de l'hydrogel de collagène réticulé.....	251
Figure 87. Schématisation d'un gel « chimique » (à gauche) et d'un gel « chimique » et « physique » (à droite), obtenus par réticulation de collagène de tilapia par la mTG (illustration Sébastien Hervé).....	244
Figure 88. Éluion sur la colonne Superdex Peptides d'hydrolysats de têtes de saumon obtenus avec l'Alcalase (ratio E/S=3%). La réaction a été réalisée à pH=8 contrôlé, à 50°C et les prélèvements ont été réalisés à T0, T=15min, T=30min, T=60min, T=90min et T=120min.....	263
Figure 89. Éluion sur la colonne Superdex Peptides d'hydrolysats de têtes de saumon obtenus avec l'Alcalase (ratio E/S=3%) à pH=8 contrôlé et 50°C suivie de la Flavourzyme (ratio E/S=5%) à pH=7 contrôlé et 40°C. Les prélèvements ont été réalisés à T0, T=15min, T=30min, T=60min, T=90min, T=120min.....	265
Figure 90. Éluion sur la colonne Superdex Peptides des deux hydrolysats obtenus avec les deux protocoles (Alcalase=A T120: E/S=3%, pH=8, T°C=50°C pendant 2h et alcalase suivi de Flavourzyme=AF T240: E/S=3%, pH=8, T°C=50°C pendant 2h puis E/S=5%, pH7, T°C=40°C pendant 2h) en conditions de pH contrôlées.....	267
Figure 91. Éluion sur la colonne Superdex Peptides des hydrolysats obtenus par hydrolyse à l'Alcalase en conditions de pH contrôlées (A CC: E/S=3%, pH=8, T°C=50°C pendant 2h) et en conditions de pH non contrôlées (A CNC: E/S=3%, pH=5-6,5, T°C=50°C pendant 2h).....	269
Figure 92. Éluion sur la colonne Superdex Peptides des hydrolysats obtenus par hydrolyse à l'Alcalase puis à la Flavourzyme en conditions de pH contrôlées (AF CC: E/S=3%, pH=8, T°C=50°C pendant 2h puis E/S=5%, pH=7, T°C=40°C pendant 2h) et en conditions de pH non contrôlées (AF CNC: E/S=3%, pH=5-6,5, T°C=50°C pendant 2h puis E/S=5%, pH=5-6,5, T°C=40°C pendant 2h).....	270
Figure 93. Comparaison des profils des deux hydrolysats obtenus avec les protocoles HC: Alcalase seule (en bleu) et HL, Alcalase puis Flavourzyme (en rouge) transposés à l'échelle pré-pilote. Les analyses ont été réalisées par le partenaire SPF-DIANA.....	271
Figure 94. Éluion sur la colonne Superdes Peptides des trois hydrolysats qui seront incorporés dans les aliments: HC (hydrolysats obtenu avec l'Alcalase en conditions pilotes), HL (hydrolysats obtenu avec l'Alcalase puis la Flavourzyme en conditions pilotes) et CPSP 90 (hydrolysats commercialisés).....	274
Figure 95. Répartition des poids moléculaires des hydrolysats produits à l'échelle pilote, HC et HL, et de l'hydrolysats témoin, CPSP 90.....	275
Figure 96. Représentation du rôle des acides aminés dans la croissance, le développement et la santé des poissons (tiré de Li et al., 2009b).....	280
Figure 97. Comparaison des poids moyens des larves obtenus pour les trois différents régimes à J-26.....	283

Figure 98. Comparaison des poids moyens des larves obtenus pour les trois différents régimes à J-42 (ANOVA, $p < 0,05$ ).....	284
Figure 99. Comparaison des tailles moyennes des larves obtenues pour les trois différents régimes à J-26.....	285
Figure 100. Comparaison des tailles moyennes des larves obtenues pour les trois différents régimes à J-42 (ANOVA, $p < 0,05$ ). .....	286
Figure 101. Taux de survie moyens des larves pour les trois différents régimes à la fin de l'expérimentation (ANOVA, $p < 0,05$ ). .....	287
Figure 102. Observation après bicoloration d'une larve scannée présentant une morphologie normale.....	288
Figure 103. Observation après bicoloration d'une larve scannée présentant une mâchoire prognathe.....	288
Figure 104. Pourcentage de malformations observées au niveau de la tête des larves pour les trois différents régimes à J-42 (ANOVA, $p < 0,05$ ).....	289
Figure 105. Observation après bicoloration de larves scannées et présentant des déformations de la colonne vertébrale.....	289
Figure 106. Pourcentage de malformations observées au niveau de la colonne vertébrale des larves pour les 3 différents régimes à J-42 (ANOVA, $p < 0,05$ ).....	290
Figure 107. Moyenne entre les pourcentages de malformations observées au niveau de la colonne vertébrale et au niveau de la tête des larves pour les 3 différents régimes à J-42 (ANOVA, $p < 0,05$ ). .....	292
Figure 108. Observation après bicoloration d'une larve scannée présentant une très faible coloration des os.....	292
Figure 109. Pourcentage de perturbations de l'ossification observées des larves pour les 3 différents régimes (ANOVA, $p < 0,05$ ).....	293

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Exemples de différents types de collagène (Parenteau-Bareil <i>et al.</i> , 2010)... 12	12
Tableau 2. Spécificités des trois méthodes de dosage colorimétriques testées: méthode de Bradford, de Biuret et de Lowry (d'après Noble et Bailey, 2009). .... 23	23
Tableau 3. Colonnes utilisées en chromatographie d'exclusion stérique pour la caractérisation du collagène marin..... 26	26
Tableau 4. Teneurs en acides iminés et température de dénaturation de différentes sources de collagène..... 36	36
Tableau 5. Comparaison des teneurs en Hyp des collagènes marins issus de différentes espèces..... 37	37
Tableau 6. Comparaison des teneurs en Hyp de collagènes issus de mammifères et d'autres espèces terrestres..... 37	37
Tableau 7. Principales caractéristiques des collagènes acido-solubles et pepsino-solubles issus de peaux de poissons. .... 39	39
Tableau 8. Différentes usages faits des biomatériaux (tiré de Ratner et Bryant, 2004)... 54	54
Tableau 9. Avantages et inconvénients du collagène utilisé en tant que biomatériau (tiré de Lee <i>et al.</i> , 2001)..... 56	56
Tableau 10. Aperçu des applications biomédicales des hydrogels à base de collagène (tiré Van Vlierberghe <i>et al.</i> 2011) ..... 58	58
Tableau 11. Comparaison de collagènes réticulés issus d'un même collagène natif de tendon de boeuf (température de fusion 45°C) (Zeugolis, 2008)..... 67	67
Tableau 12. Comparaison de collagènes marins réticulés par voie chimique. .... 69	69
Tableau 13. Comparaison des procédés d'hydrolyse chimique et enzymatique (d'après Guérard <i>et al.</i> , 2005)..... 74	74
Tableau 14. Classification des protéases en fonction de la nature de leur site actif et de leur fonction..... 80	80
Tableau 15. Principales protéases utilisées pour l'hydrolyse de biomasses marines (à partir des années 2000)..... 83	83
Tableau 16. Principaux types de colonnes retrouvées dans la littérature pour caractériser les hydrolysats marins..... 91	91
Tableau 17. Pourcentage de classe de tailles des peptides d'hydrolysats de tête de saumon en fonction du DH (Gbogouri <i>et al.</i> 2006)..... 91	91
Tableau 18. Exemples de bio-activités retrouvées dans les peptides issus d'hydrolysats de biomasses marines..... 95	95
Tableau 19. Quelques exemples de séquences de peptides antioxydants et antihypertensifs identifiées dans des hydrolysats de co-produits d'origine marine. .... 98	98
Tableau 20. Infrastructures utilisées pour les différents essais pilotes en fonction des capacités de traitement. .... 111	111
Tableau 21. Étapes du protocole modifiées et quantité de matière première traitée au cours des différents essais pilotes. .... 116	116
Tableau 22. Composition des huit formulations de conservateurs testées..... 120	120
Tableau 23. Facteurs de dissociation $\alpha$ des groupements aminés obtenus en fonction de la température et du pH (Adler-Nissen, 1986). .... 129	129
Tableau 24. Conditions d'hydrolyse de chacun des deux procédés A et AF réalisés en laboratoire en conditions de pH contrôlées (CC)..... 131	131
Tableau 25. Conditions d'hydrolyse de chacun des deux procédés A et AF réalisés en laboratoire en conditions de pH non contrôlées (CNC). .... 132	132

Tableau 26. Récapitulatif des analyses réalisées sur les échantillons de collagène issu des différents essais pilotes et laboratoire (en bleu les analyses réalisées eu LEMAR et en orange celles qui ont été sous-traitées). .....	137
Tableau 27. Récapitulatif des analyses réalisées sur le collagène reticulé.....	137
Tableau 28. Récapitulatif des analyses réalisées sur les hydrolysats issus des différents essais pilotes et laboratoire (en bleu les analyses réalisées eu LEMAR et en orange celles qui ont été sous-traitées). .....	138
Tableau 29. Traitement des différents échantillons de collagène (reticulé par le GTA, reticulé par la mTG, collagène natif pour réaliser le dosage OPA.....	145
Tableau 30. Composition des trois alimentés testés (Témoin, HC et HL) sur les larves de bar <i>in vivo</i> (d'après Zambonino <i>et al.</i> , 1997).....	151
Tableau 31 Description des produits formulés à base de collagènes marins et commercialisés sur le marché asiatique. ....	160
Tableau 32. Description des collagènes commercialisés en tant qu'ingrédient.....	161
Tableau 33. Répartition des classes de tailles des produits de la concurrence. Pour chacun, la classe de taille présentant le plus fort pourcentage est indiquée en orange (profils SEC-FPLC détaillés en Annexe 3) .....	166
Tableau 34. Spécificités biochimiques attendues pour la préparation de collagène. ....	167
Tableau 35. Composition proximale des peaux de saumon atlantique dont est extrait le collagène. ....	168
Tableau 36. Composition en protéines, Hyp et collagène des échantillons obtenus par les deux procédés d'extraction (A) et (E) testés en laboratoire. ....	169
Tableau 37. Composition en acides aminés caractéristiques du collagène des échantillons obtenus avec les protocole (A) et (E) testés en laboratoire et comparés à des collagènes de saumon, de calamar et de bœuf.....	170
Tableau 38. Teneurs en protéines (Prot.), collagène (Coll.)* des trois essais pilotes réalisés pour étudier le changement d'échelle.....	174
Tableau 39. Teneurs en Hyp, Pro et Gly des trois essais pilotes réalisés pour étudier le changement d'échelle.....	175
Tableau 40. Rendement (Rdt) des trois essais pilotes réalisés pour étudier le changement d'échelle.....	177
Tableau 41. Comparaison de la composition chimique de collagènes issus des essais de filtration/purification. ....	185
Tableau 42. Analyse proximale des peaux issues de l'AM2C après avoir été déulpées (ou non) de différentes manières. ....	188
Tableau 43. Comparaison des flores totales obtenues sur les échantillons de collagène avec l'ajout de différents conservateurs (sorbate de potassium, benzoate de sodium, Iscaguard®+SAP et Iscaguard®PEG). ....	196
Tableau 44. Évolution de la charge microbienne au cours des essais de couplage pré-traitement matière première/conservateur. ....	196
Tableau 45. Évolution de la charge microbienne au cours de l'étude de pré-stabilité du collagène. ....	197
Tableau 46. Proximate composition of commercial marine collagen PeskCollagen 3D Pro® .....	207
Tableau 47. Amino acid content in some fish and squid gelatins compared to bovine and calf gelatins (residues /100 total amino acid residues).....	208
Tableau 48. Pourcentage de fonctions amine liées lors de la réticulation du collagène natif par le GTA et par la mTG sur les hydrogels exprimés en moyenne $\pm$ écart-type. <i>Anova : p &lt; 0.001.</i> ....	230

Tableau 49. Déplacements chimiques des amides pour les échantillons de collagène natif et réticulés analyses.....	243
Tableau 50. Attribution des fonctions chimiques pour chaque amide retrouvée sur les spectres des collagènes natif et réticulés étudiés.....	245
Tableau 51. Comparaison de la taille des pores et des fibres du collagène natif lyophilisé et de l'éponge de collagène réticulé par la mTG, observées en MEB.....	247
Tableau 52. Modules élastiques G' mesuré pour huit d'hydrogels de collagène réticulés par la mTG et après un cycle de congélation/décongélation.....	252
Tableau 53. Comparaison des modules élastique du collagène natif à 4°C et 20°C et du collagène réticulé à 20°C avant et après un cycle de congélation-décongélation..	253
Tableau 54. Comparaison des pourcentages de classes de peptides entre les hydrolysats obtenus avec les protocoles d'hydrolyse réalisés en laboratoire en conditions de pH contrôlées (A Labo: E/S=3%, pH=8, T°C=50°C pendant 2h et AF Labo : E/S=3%, pH=8, T°C=50°C pendant 2h puis E/S=5%, pH=7, T°C=40°C pendant 2h) et les hydrolysats obtenus avec les protocoles d'hydrolyse réalisés en conditions pilotes (HC pilote: hydrolyse à l'Alcalase et HL pilote : hydrolyse à l'Alcalase puis Flavourzyme).....	273
Tableau 55. Composition proximale des hydrolysats CPSP 90, HC et HL.....	277
Tableau 56. Composition en acides aminés totaux des hydrolysats HC et HL obtenus en conditions pilotes.....	279
Tableau 57. Composition en di- et tripeptides de différents aliments testés sur des larves de bars dans la littérature .....	282

## - Valorisation des résultats -

### ✓ **Publication:**

Provost M, Le Lann K., Roquefort P., Aubry T., Guérard F. « Characterization of a new commercial preparation of marine collagen (PeskCollagen 3D Pro®) from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin ». En préparation, soumission à Food Hydrocolloids en juin 2016.

### ✓ **Brevet:**

« Collagène natif extrait de peaux de poisson »

Premier co-déposant : YS LAB

Inventeurs: Gilles Charpentier, Marc Hémon, Fabienne Guérard, Margot Provost, Roxane Fagon

Demande de brevet français en mars 2015 et de brevet international en mars 2016.

### ✓ **Communication orale :**

• **5<sup>ème</sup> Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference (TAFT), 13-15 octobre 2015, Nantes**

#### **An example of French strategy for the production of marine ingredients from salmon by-products: the Pesk&Co project**

Margot Provost <sup>(1)</sup>, Roxane Fagon<sup>(2)</sup>, Marc Hémon<sup>(2)</sup>, Vincent Gélamur<sup>(4)</sup> & Fabienne Guérard <sup>(1)</sup>

(1) University of Bretagne Occidentale, Laboratoire des Sciences de l'Environnement marin, LEMAR UMR6539, Rue Dumont D'Urville, Technopôle Brest Iroise, F-29280 Plouzané, France

(2) Yslab, 2 rue Félix Le Dantec, F-29000 Quimper, France

(3) SPF - DIANA, ZA du Gohélis, F-56250 Elven, France

(4) Meralliance, 55 avenue de Keradenec, F-29000 Quimper, France

Marine biological resources such as fish by-products are sources of valuable ingredients and bioactive molecules. Their exploitation using biotechnological tools is likely to lead to the development of new markets and industries, specifically in the areas of food, petfood, feed, cosmetics, and, in some cases, therapeutic agents.

For the first time in France, four companies located in Brittany on the West coast of France (Meralliance, Yslab, SPF-DIANA and AGH-Socofag, respectively) and the University of Bretagne Occidentale (Laboratory of Marine sciences - LEMAR UMR 6539) gathered their expertise to set up an integrative Research and Development project.

The Pesk&Co project aims to produce marine ingredients from salmon by-products such as structure proteins and functional peptides for food, aquafeed, cosmetics and biomedical applications.

The Pesk&Co strategy is based on:

- (1) The implementation of a sustainable supply chain, fully traceable, and of biotechnological processes to embrace the total salmon by-products, from raw materials available to market.
- (2) The creation of a Research and Development center based on efficient multidisciplinary cooperation between academic researchers and private companies from the 5 partners of Pesk&Co project.

Salmon by-products were chosen to apply this strategy. The first step was to find innovative processes at lab scale to allow, in a second step, a transfer at pilot and industrial scales. Simultaneously, analytical methods were developed in order to control quality and traceability of ingredients derived from production. In the longer term, the objective is to ensure compliance with the rules for commercialization and further developments. In one hand, the project explored the extraction and characterization of a high molecular weight collagen from

skins for several uses in cosmetics and medical devices. On the other hand, hydrolysates were developed and incorporated into fish diet to improve larval development.

Results obtained, competences and technical installations developed within this project, will contribute to position the Brittany Region strategically within the overall market of innovative marine ingredients through a long term outlook.

**Key words:** salmon, by-products, collagen, peptides, marine ingredients, innovative strategy

Partners :

<http://www.iuem.univ-brest.fr/UMR6539/>

<http://www.meralliance.com/>

<http://www.diana-petfood.com/>

<http://www.yslab.fr/>

<http://www.groupe-glon.com/>

### ✓ **Communications affichées :**

- **43<sup>ème</sup> conférence Wefta : 9-11 octobre 2013, Tromso, Norvège**

#### **Production of added-value marine ingredients from salmon by-products: the Pesk&Co project**

Margot Provost <sup>(1)</sup>, Roxane Fagon <sup>(2)</sup>, Isabelle Guiller <sup>(3)</sup>, Julie Bernard <sup>(4)</sup> & Fabienne Guérard <sup>(1)</sup>

(1) University of Bretagne Occidentale, Laboratoire des Sciences de l'Environnement marin, LEMAR UMR6539, Rue Dumont D'Urville, Technopôle Brest Iroise, F-29280 Plouzané, France

(2) Yslab, 2 rue Félix Le Dantec, F-29000 Quimper, France

(3) SPF, ZA du Gohélis, F-56250 Elven, France

(4) Meralliance, 55 avenue de Keradennec, F-29000 Quimper, France

During processing of salmon for production of smoked fillets, fresh by-products rich in proteins such as heads, tails, skins and in some cases brown muscle, represent up to 33% of the raw material. Exploitation of these high quality by-products is likely to lead to the development of new molecules for the areas of food, Pet food, and nutraceuticals.

The aim of the Pesk&Co project gathering four companies located on the West coast of France (Meralliance, Yslab, SPF-DIANA and AGH-Socofag, respectively) and the University of Bretagne Occidentale (Laboratory of Marine sciences - LEMAR UMR 6539), is the setting up of a R&D project based on the identification of value chains from salmon by-products for the production of added value compounds.

The first value chain that was identified focused on the valorisation of salmon skins by the development of a mild "green" process to extract collagen. The process was first realized at laboratory scale, then at pilot scale and resulted in the production of a pure marine collagen with a high level quality on key amino acids, characterization of content, conditions of repeatability of the levels obtained.

Collagen was analysed by FPLC gel filtration using a Superdex 200 10/300 GL column. Chromatograms extracted at 220 nm showed that the native structure of collagen was preserved for both collagens produced at laboratory and pilot scales.

Laboratory and pilot research confirm the sustainable supply chain, full traceability.

The following steps will consist in enzymatic hydrolysis of salmon collagen for the production of peptides with biological activities for Pet Food and Aquafeed applications. Further studies will include challenge assays with proteomic and gene expression studies.

Partners :

<http://www.iuem.univ-brest.fr/UMR6539/>

<http://www.meralliance.com/>

<http://fr.spf-diana.com/>

<http://www.yslab.fr/>

<http://www.groupe-glon.com/>

• *Biocare marine, 16 septembre 2014, Brest*

**Partial characterization of a high molecular weight collagen from Salmon skin before and after enzymatic cross-linking using a microbial transglutaminase**

Klervi Le Lann<sup>1</sup>, Margot Provost<sup>1</sup>, Philippe Roquefort<sup>2</sup>, Thierry Aubry<sup>2</sup>, Fabienne Guérard<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>LEMAR UMR 6539, IUEM Technopôle Brest-Iroise - rue Dumont d'Urville 29280 Plouzané FRANCE

<sup>2</sup>LIMATB, UFR Sciences et Technique Université de Bretagne Occidentale 6, avenue Le Gorgeu - CS93837  
29238 Brest Cedex 3 FRANCE

Collagen, one of the most abundant proteins in the animal kingdom, can be obtained from many sources including mammals and marine vertebrates and invertebrates. The Pesk&Co<sup>1</sup> project explored the extraction of a high molecular weight collagen from salmon skin (*Salmo salar*), followed by an enzymatic cross-linking procedure using a microbial transglutaminase in order to improve mechanical properties of native collagen for use as a tissue-engineering scaffold.

Results from Size Exclusion Chromatography, SDS-PAGE and amino acid pattern of native collagen suggested a type I collagen consisted of two different  $\alpha$  chains, as well as  $\beta$  and  $\gamma$  components, with an amount of imino acids of 213 per 1000 residues.

Scanning electron microscopy showed that the lyophilized cross-linked collagen is a sponge-like scaffold, with pore size between 50 and 100  $\mu\text{m}$ . FTIR spectra of both collagens were quite similar and results suggested that cross-linking procedure did not affect the triple-helical structure.

Additionally, the values of storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) of both native and cross-linked collagens were measured to illustrate the visco-elasticity of hydrogels. Results show that the visco-elasticity properties of collagen hydrogel were ameliorated after cross-linking. Moreover the viscoelastic behavior of native collagen was studied upon a temperature gradient in order to identify the sol-gel transition temperature which is about 13.5°C. For cross-linked collagen, it is above 90°C.

These results suggest that cross-linked salmon collagen using a microbial transglutaminase would be an excellent material for further investigations in biomedical applications as an alternative source of mammals collagen.

**Key-words:** Collagen, Salmon skin, transglutaminase, cross-linking, FTIR, SEM, scaffold

<sup>1</sup>The Brittany Maritime Cluster "Pôle Mer Bretagne Atlantique" has officially recognised the R&D project Pesk&Co (<http://www.pole-mer-bretagne-atlantique.com>). The partial financing by the Région Bretagne, Conseil Général CG29 and Quimper Communauté is gratefully acknowledged.

•Polymerix, 28-29 mai 2015, Rennes

## **Characterization of a High Molecular Weight Collagen from Salmon Skin and its Potential Use for Biomaterial Applications**

M. Provost<sup>1</sup>, K. Le Lann<sup>1</sup>, P. Roquefort<sup>2</sup>, R. Fagon<sup>3</sup>, T. Aubry<sup>2</sup>, F. Guérard<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Bretagne Occidentale, LEMAR UMR 6539, IUEM Technopôle Brest-Iroise, rue Dumont d'Urville 29280 Plouzané FRANCE

<sup>2</sup>Université de Bretagne Occidentale, LIMATB, Equipe Rhéologie, UFR Sciences et Techniques, 6 avenue Le Gorgeu - CS93837 29238 Brest Cedex 3, France

<sup>3</sup>Yslab, Le Forum, 2 rue Félix Le Dantec, F-29000 Quimper, France

Collagen, one of the most abundant proteins in the animal kingdom, can be obtained from many sources including mammals and marine vertebrates and invertebrates. The Pesk&Co<sup>1</sup> project explored the extraction and characterization of a high molecular weight collagen from salmon skin (*Salmo salar*) for several uses in cosmetics and medical devices.

Results from Size Exclusion Chromatography, SDS-PAGE and amino acid pattern of native collagen suggested a type I collagen composed of two different  $\alpha$  chains, as well as  $\beta$  and  $\gamma$  components, with an amount of imino acids of 213 per 1000 residues. Moreover, FTIR spectra showed that the triple-helical secondary structure of the collagen was retained.

Additionally, linear viscoelastic as well as intrinsic viscosity measurements were carried out. The viscoelastic behavior of native collagen was studied upon a temperature gradient in order to identify the sol-gel transition temperature, which was shown to be about 13.5°C.

Together with good elastic properties, highly porous and interconnected pore structure, high versatility, biocompatibility, biodegradability and easy availability, collagen is a promising material for tissue engineering (Yamada et al., 2014)(Parenteau-Bareil et al., 2010). However, marine collagen should be cross-linked by chemical, physical or enzymatic ways to enhance its mechanical properties.

Because of its structural role, collagen is considered like a key biological material in tissue regeneration approaches (Silva et al., 2014) and would be an excellent material for further investigations in biomedical applications as an alternative source of mammals collagen.

**Key-words:** Collagen, Salmon skin, scaffold, biomedical application

<sup>1</sup>The Brittany Maritime Cluster "Pôle Mer Bretagne Atlantique" (<http://www.pole-mer-bretagne-atlantique.com>) and the Foodstuff Cluster "Valorial" (<http://www.pole-valorial.fr>) have officially recognised the R&D project Pesk&Co. The partial financing by the Région Bretagne, Conseil Général CG29 and Quimper Communauté is gratefully acknowledged.

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## Production mondiale de poisson: quelques chiffres

La production aquatique mondiale a régulièrement augmenté au cours des cinq dernières décennies pour atteindre 158 millions de tonnes en 2012. La pêche représente 58% avec une production de 91,3 millions de tonnes et l'aquaculture 42%, avec une production de 66,6 millions de tonnes (FAO, 2014). Concernant l'utilisation de ces ressources, tandis que 21,7 millions de tonnes de la production sont utilisées à des utilisations non alimentaires, 136,2 millions sont destinées à la consommation humaine (FAO, 2014).

## Les co-produits marins et leur valorisation

La tendance est aujourd'hui à la commercialisation de poissons transformés. D'après la FAO (2014), les procédés de traitement comme le filetage, la congélation, l'appertisation ou le séchage, concernent la transformation de près de 70 millions de tonnes de poisson, générant ainsi énormément de co-produits.

Les co-produits sont les parties non utilisées et récupérables lors des opérations de transformation du poisson, comme les têtes, les peaux, les os ou la pulpe. Ils peuvent représenter jusqu'à 70% du poisson (Olsen *et al.*, 2014). Rustad (2003) distingue les co-produits utilisés pour la consommation humaine de ceux considérés comme des « déchets/rejets/viscères ». Ainsi, les co-produits sont définis comme des produits qui ne sont pas considérés comme commercialisables tels quels, mais qui peuvent être recyclés après traitement. Les déchets sont, quant à eux, définis comme des produits qui ne peuvent être utilisés ni en alimentation animale ni sous forme de produit présentant une valeur ajoutée, mais qui doivent être compostés, brûlés ou détruits.

Dans un contexte de politique environnementale de développement durable et de gestion éclairée des bioressources, il est intéressant de valoriser ces co-produits notamment pour améliorer la rentabilité des filières. En effet, ce sont des sources de protéines de haute qualité, de lipides, de micronutriments et de minéraux (FAO, 2014). De nombreuses études ont traité de leur valorisation pour des applications dans divers domaines allant de la cosmétique au biomédical, en passant par l'alimentation humaine et animale (Cudennec *et al.*; 2012 ; Ferraro *et al.*, 2010 ; Gbogouri *et al.*, 2006; Guérard, 2007; Shahidi et Ambigaipalan, 2015). Il existe deux principales voies de valorisation (Penven *et al.*, 2013):

### (1) La valorisation de masse

Les quantités de co-produits traitées sont importantes, les procédés d'extraction utilisés minimisent les coûts et le produit final obtenu présente une faible valeur ajoutée. Les domaines concernés sont les fertilisants, l'énergie ou encore l'alimentation animale

### (2) La valorisation de niche

Les quantités de co-produits traitées sont plus faibles. Les ingrédients produits sont à haute valeur ajoutée et peuvent faire intervenir des procédés biotechnologiques plus coûteux (hydrolyse enzymatique, extraction, purification...). Les domaines concernés sont les marchés de la nutrition, la nutraceutique, la cosmétique, la pharmaceutique ou encore les biomatériaux.

La Figure 1 illustre ces différentes voies de valorisation sous la forme d'une pyramide de Maslow: le profit généré par la transformation des co-produits est fonction des capacités d'absorption du marché, qui dépendent du domaine d'application. Ainsi, les ingrédients fabriqués pour le domaine pharmaceutique génèrent beaucoup de profit, mais sont fabriqués en petites quantités. D'autre part, le tri des co-produits en fonction de leur qualité, évaluée en terme de fraîcheur et de traçabilité, est une pyramide inverse: les ingrédients à forte valeur ajoutée sont produits à partir de co-produits de meilleure qualité.

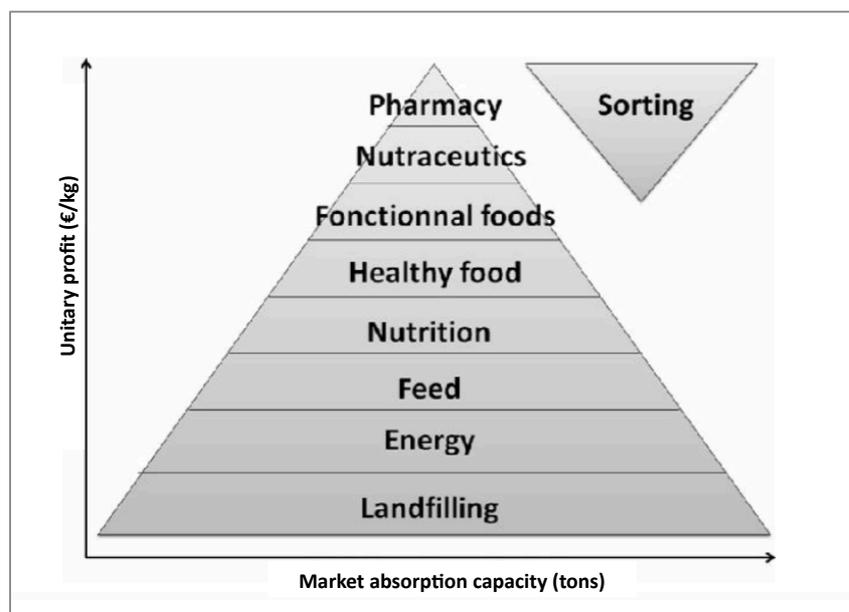


Figure 1. Échelle de valeur ajoutée des co-produits marins (d'après Penven, 2013).

Cependant, les termes de « faible » et « forte » valeur ajoutée sont à nuancer. En effet, on assiste à une augmentation du prix des farines et des huiles qui sont passées d'environ 0,5 à 2\$/kg de protéine au cours de l'année 2013. Cette hausse est due à l'augmentation du prix des protéines de manière générale, du fait d'une demande grandissante au niveau mondial. Ainsi, les farines et les huiles de poisson, utilisées surtout en alimentation aquacole, ne sont plus des produits de faible valeur (FAO, 2014). Il est donc intéressant de travailler sur le marché des protéines, aujourd'hui en plein essor.

Cependant, la valorisation des co-produits de poisson montre de nombreux freins: c'est une matière première fragile dont la quantité et la qualité sont variables d'une espèce à l'autre et en fonction des saisons et qui nécessite alors un tri rigoureux, en fonction du marché visé, grâce à un circuit de collecte adapté. Il est donc primordial d'identifier les leviers à ces problèmes afin de saisir les opportunités qu'offre leur valorisation: il existe de nouvelles voies de valorisation grâce aux avancées scientifiques qui, combinées à la bonne image dont bénéficient les produits de la mer, permettent le développement d'une filière pour la production d'ingrédients à haute valeur ajoutée.

Ce travail de recherche se propose de valoriser une ressource traçable, constante et pérenne: les co-produits générés par la transformation du saumon Atlantique (*Salmo salar*) issu de l'aquaculture.

### **Production et valorisation des co-produits de saumon *Salmo salar***

La production mondiale de saumon Atlantique (*Salmo salar*) est un exemple réussi de développement de l'aquaculture. Dans le commerce mondial des produits halieutiques, sa part dépasse 14% (FAO, 2014).

Avec une production mondiale de 1,93 millions de tonnes en 2011, la transformation du saumon génère des quantités de co-produits importantes. Le rendement du filetage de poisson serait d'environ 55% (FAO, 2014). Ainsi, 45% du poisson transformé sont des co-produits qui peuvent être valorisés de différentes manières: les os sont une source importante de minéraux et de collagène (Venkatesan *et al.*, 2015) tandis que les peaux sont utilisées pour la fabrication du cuir, mais surtout pour l'extraction de collagène et de gélatine destinés à l'alimentation humaine, la cosmétique ou encore les biomatériaux (Arnesen et Gildberg, 2007 ; Hoyer *et al.*, 2012). En 2011, la production de gélatine a atteint 348 900 tonnes dont 98 à 99% provenaient de mammifères comme le porc ou le bœuf (FAO, 2014). La gélatine de poisson ne représente que 1,5% du marché mais son prix est 4 à 5 fois plus élevé que celui de la gélatine de mammifère, ce qui la définit comme un produit de niche. Les têtes de saumon sont une source de sulfate de chondroïtine mais également de protéines (Uchisawa *et al.*, 2001). Celles-ci peuvent être solubilisées par hydrolyse enzymatique afin d'extraire des peptides utilisés en nutraceutique pour leur capacité anti-oxydante (Girgih *et al.*, 2013) ou encore anti-hypertensive (Darewicz *et al.*, 2014). Les peptides trouvent également des applications en alimentation humaine ou animale pour leur forte valeur nutritionnelle (Chalamaiah *et al.*, 2012). À titre d'exemple, aux Etats-Unis, le marché des ingrédients protéiques était estimé à 54-60 millions de dollars en 2010. Les peptides marins issus de la fraction protéique ne représentent à ce jour qu'une faible part du marché qui est principalement occupé par les peptides de lait ou de soja. Dans le cas du saumon,

les deux co-produits majoritaires issus de la transformation en filet sont les peaux (7%) et les têtes (10%) (Figure 2) qui seront étudiés dans ce travail.

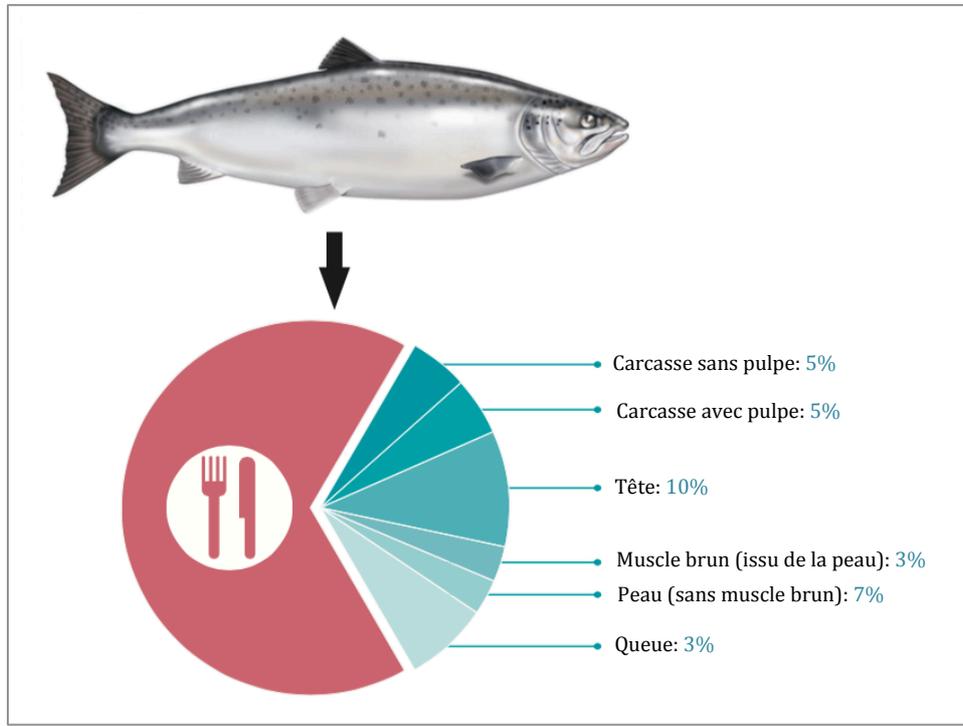


Figure 2. Disponibilité des co-produits de saumon après transformation (Données fournies par M. Gélamur/Meralliance-Thai Union, illustration Sébastien Hervé).

### **Le projet Pesk&Co: production d'ingrédients marins à haute valeur ajoutée issus des co-produits de saumon**

Le projet Pesk&Co est un projet regroupant 4 partenaires industriels bretons (Meralliance-Thai Union, Yslab, SPF-DIANA, AGH-Socofag) et un partenaire académique, le laboratoire des sciences de l'environnement marin (LEMAR UMR 6539, UBO), qui ont partagé leur expertise pour valoriser deux co-produits issus du filetage de saumon Atlantique d'élevage *Salmo salar* afin d'extraire et caractériser des ingrédients à haute valeur ajoutée (Figure 3).

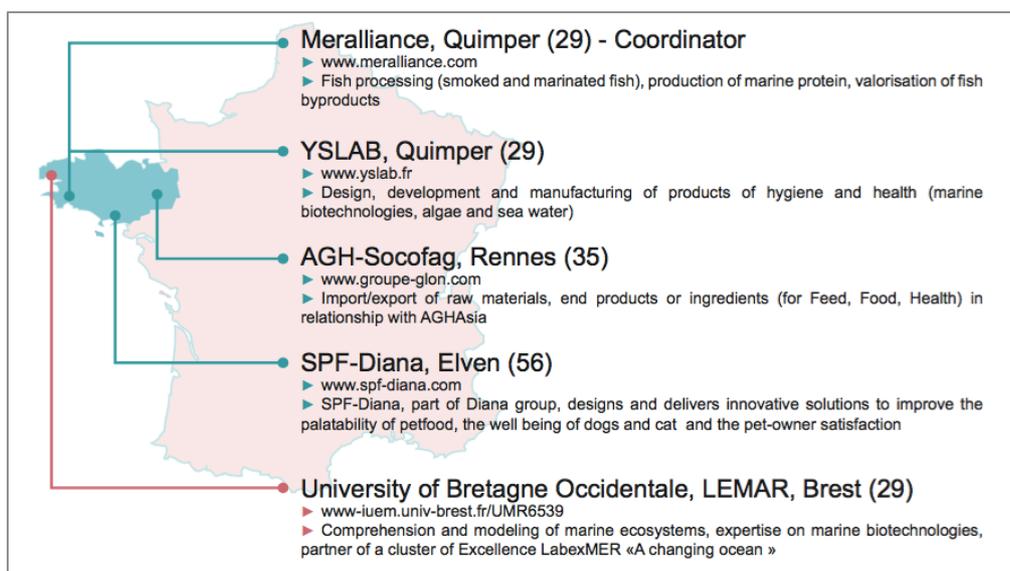


Figure 3. Localisation géographique des différents partenaires du projet pesk&Co au sein de la région Bretagne (illustration Sébastien Hervé).

Le projet s’inscrit dans une démarche qui vise à regrouper le sourcing, la fabrication et l’analyse des ingrédients au sein d’une même région, la Bretagne, notamment par la mise en place d’un circuit court, d’une chaîne de valeur traçable et par une démarche intégrative de valorisation des co-produits de saumon, de la matière première jusqu’à la mise sur le marché des ingrédients obtenus.

La Figure 4 montre un exemple de chaîne de valeur appliqué au co-produit « peau ».

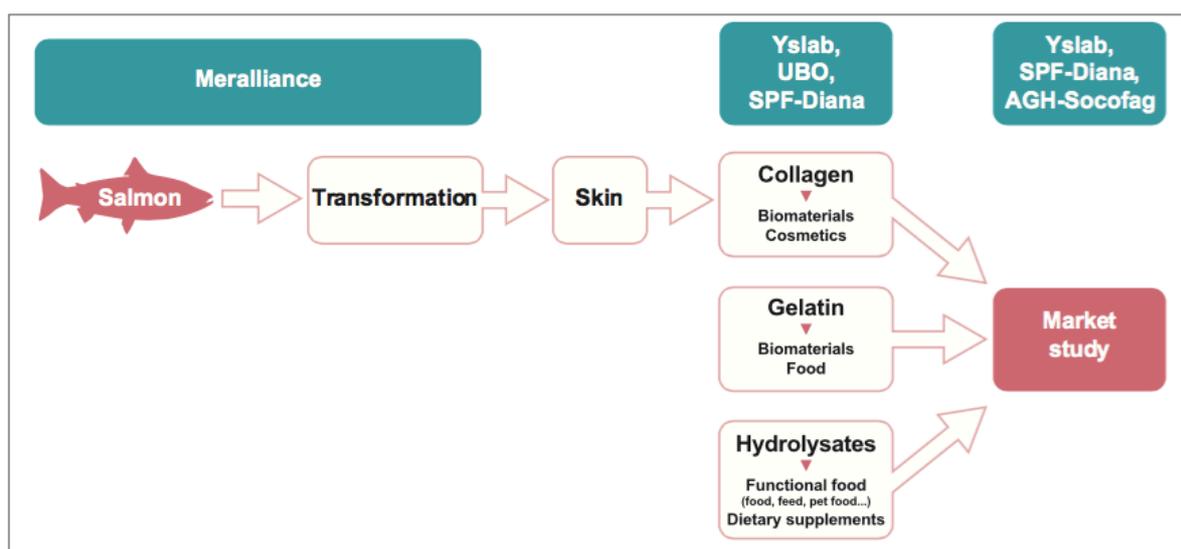


Figure 4. Un exemple de chaîne de valeur: la valorisation des peaux issues de la transformation du saumon (illustration Sébastien Hervé).

Pour répondre à la problématique de la thèse, il fallait trouver des voies de valorisation intégrant la notion de développement durable : mise en œuvre de techniques non agressives pour l'environnement et n'engendrant pas de dépenses énergétiques trop lourdes. Dans un premier temps, le travail de recherche a été mené à l'échelle du laboratoire, puis transposé à l'échelle pilote, pré-industrielle et enfin industrielle. En parallèle de ces développements de procédés, un développement analytique coordonné par l'UBO a été transféré aux industriels, permettant ainsi à terme l'autonomie des partenaires qui assureront, à l'issue du projet, le contrôle qualité des productions de collagène.

### **Objectifs de l'étude**

L'étude vise à obtenir et à caractériser un collagène de haut poids moléculaire, d'une part, et des peptides fonctionnels, d'autre part.

#### (1) Collagène issus des peaux

Le premier objectif de ce travail est de développer un procédé d'extraction d'un collagène de haut poids moléculaire destiné au marché de la cosmétique, à partir de peaux de saumon, puis de le caractériser par différentes méthodes analytiques afin de définir ses propriétés technofonctionnelles. Les procédés ont été développés de la paillasse au stade industriel. Cette étape du travail de thèse intègre l'étude de l'impact de procédés de réticulation par voie chimique et enzymatique sur les propriétés du collagène obtenu et les mécanismes de modifications mis en jeu, afin d'élargir les applications potentielles du collagène de la cosmétique vers le secteur des dispositifs médicaux.

#### (2) Peptides issus des têtes

Le deuxième objectif de l'étude est l'obtention et la caractérisation de deux hydrolysats aux compositions peptidiques différentes puis, l'évaluation de leur potentiel comme aliment fonctionnel en aquaculture pour des larves de bar et plus particulièrement, leur effet sur la croissance et le taux de malformations des poissons.

Dans un premier temps, ce travail présente un état de l'art sur le collagène (structure biochimique, méthodes d'extraction et de caractérisation, exemples d'utilisation, procédés de réticulation) et les hydrolysats de protéines (procédés d'hydrolyse, peptides bioactifs). Puis les matériels et méthodes utilisés sont décrits avant de présenter les résultats sous la forme de 4 chapitres:

(1) Chapitre 1: Mise au point d'un procédé industriel d'extraction d'un collagène de haut poids moléculaire à partir de peaux de saumon (*Salmo salar*)

(2) Chapitre 2: Characterization of a new commercial preparation of marine collagen (PeskCollagen 3D Pro®) from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin

(3) Chapitre 3 : Études préliminaires de la réticulation enzymatique d'un collagène de saumon de haut poids moléculaire

(4) Chapitre 4 : Fabrication de deux hydrolysats au DH contrasté à partir de têtes de seumon et évaluation de leurs performances *in vivo*

Enfin, les conclusions de l'ensemble de ces travaux et les perspectives seront présentées.

# ÉTAT DE L'ART

## 1. LA MOLÉCULE DE COLLAGÈNE: focus sur le collagène de poisson

### 1.1 Généralités

#### 1.1.1 Définition, rôle et structure du collagène

Le collagène est une protéine structurale insoluble du tissu conjonctif. Il représente 30% des protéines totales d'un organisme, ce qui en fait la protéine la plus abondante du règne animal (Muyonga *et al.*, 2004a). Il est présent dans de nombreux organes comme la peau, les os, les tendons ou encore les muscles. Le plus souvent, on le retrouve sous forme fibrillaire dans la matrice extracellulaire. Son rôle structural confère une résistance mécanique à l'étirement, assurant ainsi la bonne élasticité de la peau, ainsi que la robustesse et la souplesse des articulations. Par définition, le terme « collagène » désigne une protéine présentant une structure moléculaire caractéristique en triple hélice, nommée tropocollagène. Cette hélice est formée de 3 chaînes polypeptidiques s'enroulant vers la droite. Chaque chaîne, nommée  $\alpha$ , a un poids moléculaire d'environ 100kDa. Deux chaînes peuvent s'associer pour former une sous-unité  $\beta$  d'environ 200kDa, tandis que trois chaînes associées forment une sous-unité  $\gamma$  d'environ 300kDa. Chacune d'entre elles s'enroule sur elle-même dans le sens gauche et est composée d'environ 1000 acides aminés. L'enchaînement de ces acides aminés suit le modèle Gly-X-Y, où X et Y sont le plus souvent de la Proline (=Pro) ou de l'Hydroxyproline (=Hyp), respectivement. Le collagène est donc caractérisé par un aminogramme riche en acides iminés et présentant environ 1/3 de glycine. Cette composition particulière en acides aminés joue un rôle important dans la conformation et la stabilité de la triple hélice de collagène. D'une part, la glycine est un petit acide aminé, qui ne possède qu'une seule chaîne latérale hydrogénée. Il se place alors au centre de l'hélice de collagène, sans obstacle stérique, permettant aux 3 chaînes  $\alpha$  de s'imbriquer solidement pour former une triple hélice compacte avec un cœur hydrophobe (Alberts *et al.*, 2010 ; Zhou et Regenstein, 2007). D'autre part, l'Hyp et la Pro présentent chacune un cycle pyrrolidine qui contraint les chaînes  $\alpha$  à s'agencer d'une certaine manière (Gómez-Guillén *et al.*, 2009). Enfin, la stabilité de la triple hélice est également renforcée par la présence de liaisons hydrogènes inter-chaînes formées avec le groupe hydroxyl de l'Hyp (Nagai *et al.*, 2008). Ainsi, la structure secondaire de la triple hélice conforte la théorie fondamentale dans le domaine de chimie des protéines, à savoir: l'architecture d'une protéine est déterminée par sa séquence primaire (Liu *et al.*, 2015), comme l'illustre la Figure 5.

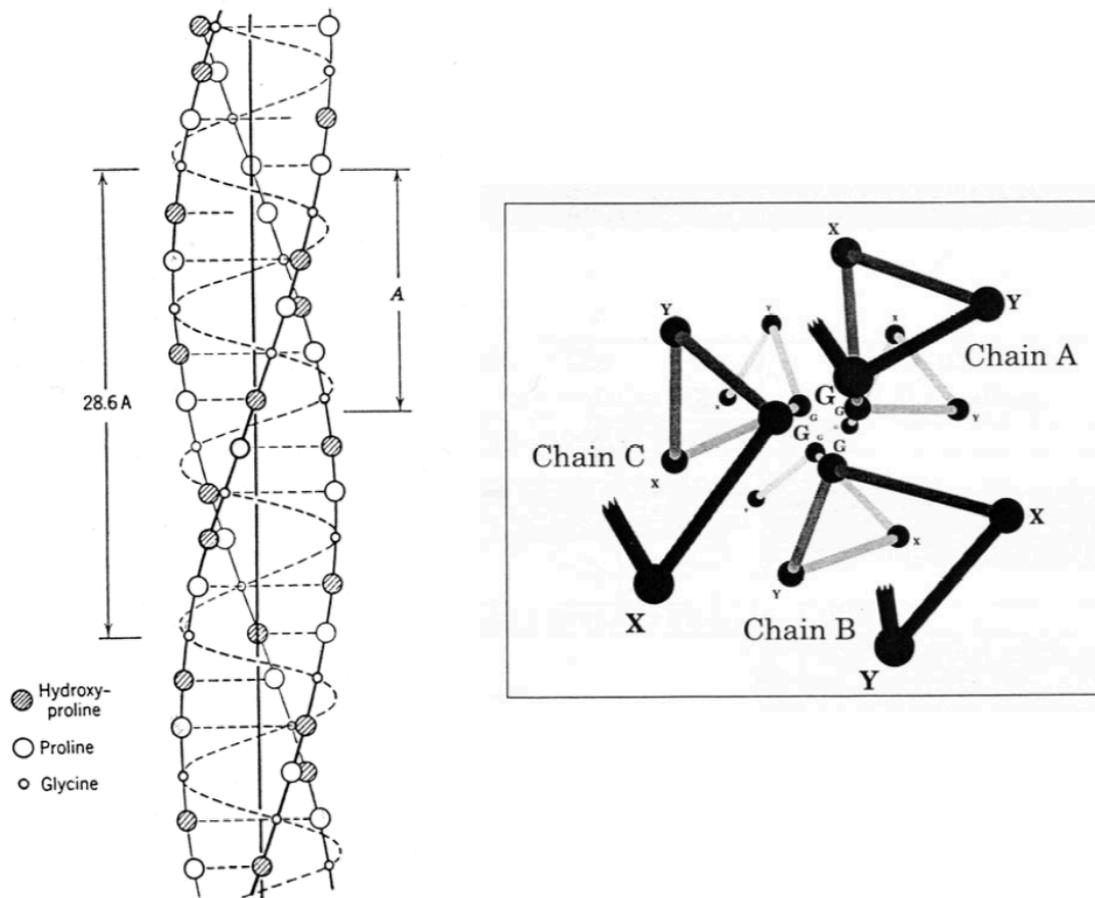


Figure 5. Vue schématique de la triple hélice de collagène. À gauche: Modèle de la structure en triple hélice de collagène. À droite: pour des raisons de moindre encombrement, les glycyne sont au coeur de la triple hélice (d'après Gobeaux, 2008).

En plus de cette structure en triple hélice, le collagène possède des parties terminales nommées télépeptides. Ils sont définis comme les extrémités libres non hélicoïdales de la triple hélice, du fait qu'ils ne présentent pas la répétition du motif Gly-X-Y (George *et al.*, 1999). La séquence en acides aminés des télépeptides varie suivant les espèces, tandis que certains domaines de liaisons impliqués dans la formation de fibrilles de collagène sont hautement conservés : l'extrémité N-terminale et l'extrémité C-terminale de chaque chaîne possèdent deux domaines de liaison (McCormick, 2009). Ils jouent un rôle majeur dans les phénomènes d'assemblage des molécules de collagène, en permettant la formation de liaisons inter-moléculaires covalentes et non covalentes entre les sous-unités de tropocollagène pour former et stabiliser fibres et fibrilles. Ainsi, les capacités d'auto-assemblage et d'auto-organisation de la molécule de collagène lui permettent de former des agrégats et des réseaux tridimensionnels au sein des différents organes. De ce fait, dans les tissus conjonctifs comme la peau, on retrouve principalement des collagènes dit fibrillaires, que sont les collagènes de type I, II, III, V et XI. Ces

collagènes présentent des propriétés similaires qui leur confèrent une capacité d'assemblage en fibres de collagène striées. En effet, il existe, dans le règne animal, différents types de collagène possédant une structure et un rôle propre et se trouvant dans des organes particuliers. Plus précisément, les trois chaînes qui forment la triple hélice peuvent se combiner de différentes manières. Elles peuvent être identiques, on parle dans ce cas d'homotrimère, ou bien, 2 ou 3 d'entre elles peuvent être différentes, on parle alors d'hétérotrimère. Les différents agencements des chaînes  $\alpha$  forment 29 collagènes différents connus à ce jour (Söderhäll *et al.*, 2007). Ils sont classés suivant leur type (fibrillaire, micro fibrillaire, transmembranaire...), leur composition moléculaire en chaîne  $\alpha$ , les gènes qui les codent, ainsi que le tissu dans lequel on les retrouve (peau, os, tendon, cartilage, membranes, fibroblastes...) (Tableau 1).

Tableau 1. Exemples de différents types de collagène (Parenteau-Bareil *et al.*, 2010).

	Type	Molecular formula	Polymerized form	Tissue distribution
Fibril-Forming (fibrillar)	I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	fibril	bone, skin, tendons, ligaments, cornea (represent 90% of total collagen of the human body)
	II	$[\alpha 1(II)]_3$	fibril	cartilage, intervertebrate disc, notochord, vitreous humor in the eye
	III	$[\alpha 1(III)]_3$	fibril	skin, blood vessels
	V	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ and $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	fibril (assemble with type I)	<i>idem</i> as type I
	XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	fibril (assemble with type II)	<i>idem</i> as type II
Fibril-associated	IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	lateral association with type II fibril	cartilage
	XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	lateral association with type I fibril	tendons, ligaments
Network-forming	IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$	Sheet-like network	basal lamina
	VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	anchoring fibrils	beneath stratified squamous epithelia

Dans cette étude, nous nous focaliserons sur l'extraction et la caractérisation de collagène de type I, le collagène le plus présent dans la peau, composé de deux chaînes  $\alpha_1$  et d'une chaîne  $\alpha_2$  (Gelse, 2003). C'est un collagène fibrillaire capable de s'auto-assembler pour former des structures de haut poids moléculaire.

### **1.1.2 Biosynthèse du collagène de type I**

Le collagène de type I est le collagène fibrillaire le plus répandu dans les tissus connectifs. Il est synthétisé dans les fibroblastes en deux étapes : intracellulaire et extracellulaire. C'est un processus complexe comprenant de multiples étapes allant de la transcription des gènes, jusqu'à l'agrégation des hétérotrimères de collagène pour former des fibrilles et fibres de collagène. Ces étapes se succèdent dans différents organites de la cellule, du noyau jusqu'à la matrice extracellulaire (MEC), et le collagène se présente sous différentes formes, des chaînes  $\alpha$  libres jusqu'aux fibres en passant par le précurseur du collagène: le procollagène. Ces étapes sont illustrées sur la Figure 6.

#### *1.1.2.1 Transcription et traduction*

La régulation des activités de transcription dépend principalement du type de cellule, mais est également contrôlée par de nombreux facteurs de croissance ainsi que des cytokines (Rossert et De Crombrughe, 1996). Plusieurs étapes se déroulent, en premier lieu, dans le noyau de la cellule où les gènes COLIA1 et COLIA2 sont d'abord transcrits en ARN pré-messager. Ensuite, celui-ci subit un épissage alternatif pour donner un ARN messager mature qui est alors exporté vers le cytoplasme afin d'être traduit en protéine. Il est également additionné d'une coiffe méthylée en son extrémité 5' et d'une queue poly (A) en son extrémité 3'. Ces deux dernières étapes sont nécessaires au déplacement de l'ARN messager du noyau vers le cytoplasme où il sera traduit par les ribosomes en procollagène  $\alpha_1$ , pour la transcription du gène COLIA1 et en procollagène  $\alpha_2$ , pour la transcription du gène COLIA2. Le procollagène est le précurseur à partir duquel va être synthétisé le collagène, insoluble dans le milieu physiologique, permettant ainsi les étapes de synthèse intracellulaire. Contrairement au collagène, il est constitué de brins beaucoup plus longs, rallongés par des structures polypeptidiques, le propeptide N-terminal et le propeptide C-terminal. Le procollagène dépasse alors dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux et y est amené grâce à un signal peptide reconnu.

#### *1.1.2.2 Modifications post-traductionnelles*

C'est une fois dans le réticulum endoplasmique, après clivage du peptide de signal par une peptidase, que le procollagène subit des modifications post-traductionnelles. Elles se traduisent, d'une part, par l'hydroxylation des résidus proline, catalysée par des prolyl 4-hydroxylase et des prolyl 3-hydroxylase sous la forme de 4-hydroxyprolines et 3-hydroxyprolines. Environ 50% des résidus proline des collagènes fibrillaires présentent un groupe hydroxyl en position 4 et le taux d'hydroxylation est dépendant des espèces. En effet, les organismes vivant dans un environnement dans lequel les températures sont plutôt basses montrent des taux d'hydroxylation plus faibles. La présence d'hydroxyproline en position 4 est essentielle à la

formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires qui contribuent à la stabilité de la triple hélice. En revanche, on ne connaît pas encore le rôle de l'hydroxyproline en position 3 (Bateman *et al.*, 1996). D'autre part, l'hydroxylation des résidus lysines est catalysée par les lysylhydroxylases pour former des hydroxylisines. Cette réaction est dépendante du type de tissu et de collagène. Elle crée des sites de O-glycosylation sur lesquels viendront s'ajouter des carbohydrates (un galactose ou un glucose) permettant de stabiliser les liaisons intermoléculaires au sein de la triple hélice de collagène. En revanche, le rôle des sucres sur les molécules de collagène n'est pas encore très bien connu, même si les hypothèses penchent sur un rôle dans l'interaction avec d'autres protéines ou encore sur les processus de régénération du collagène (Jurgensen *et al.*, 2011). Par ailleurs, les enzymes catalysant les réactions d'hydroxylation requièrent, comme cofacteurs, des ions fers, de la vitamine C ou encore du dioxygène. C'est pourquoi une carence en vitamine C provoque le scorbut, dû à défaut de fabrication du collagène qui se manifeste par une réduction de la résistance des tissus conjonctifs. Cela souligne le rôle clé des modifications post-traductionnelles dans la biosynthèse du collagène. Ensuite, les 2 pro-chaînes  $\alpha_1$  et la pro-chaîne  $\alpha_2$  synthétisées et modifiées peuvent s'associer. Pour se faire, elles forment à leur extrémité C-terminale une structure globulaire stabilisée par des pont disulphures intra- et inter-chaînes et les motifs Gly-X-Y s'organisent pour construire une triple hélice selon un mode d'association en fermeture éclair (*zipper-like*) jusqu'à l'extrémité N-terminale, elle-même globulaire, une réaction catalysée par de nombreuses enzymes (Figure 6).

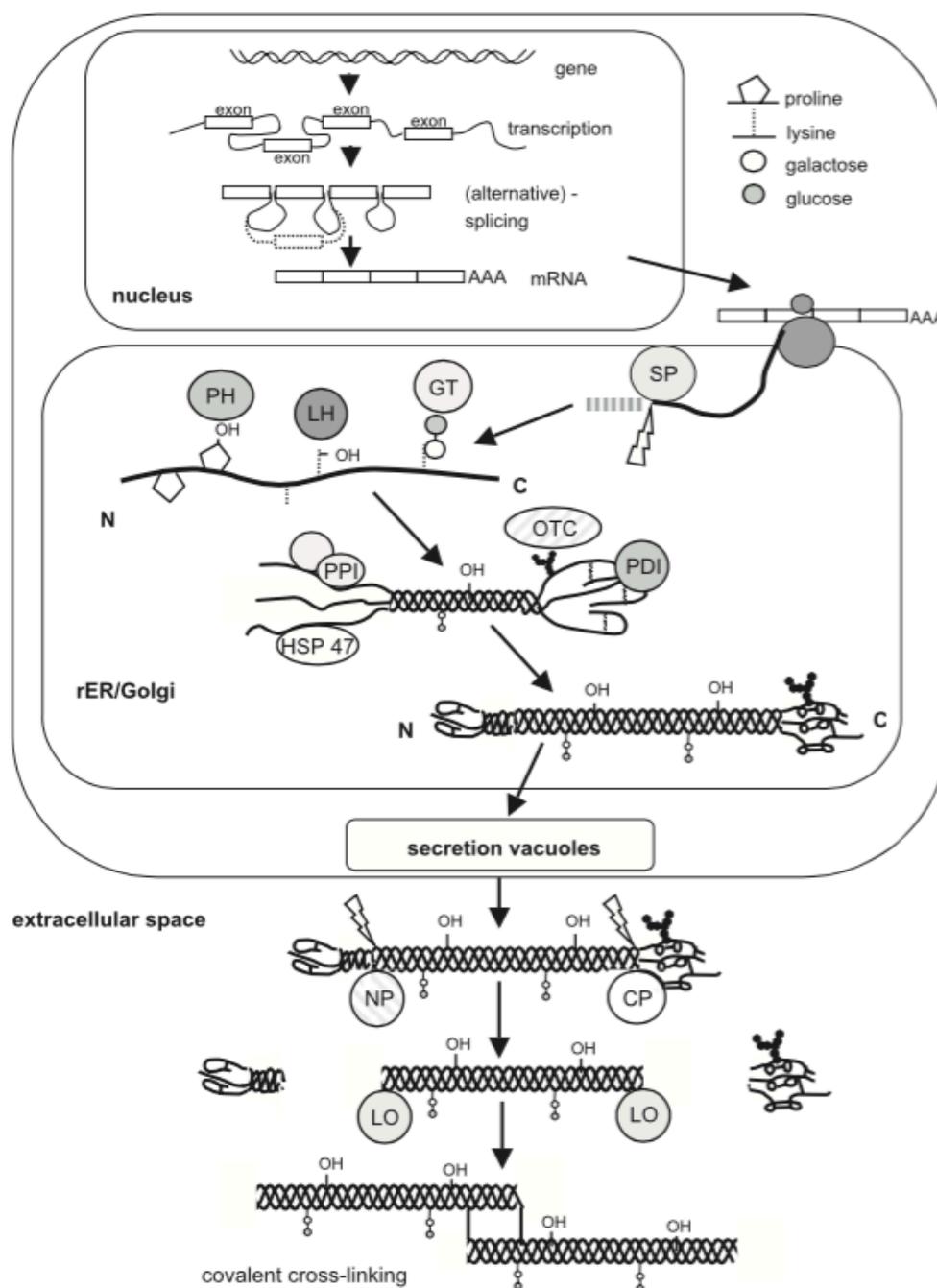


Figure 6. Représentation schématique de la synthèse de collagène depuis la transcription nucléaire des gènes du collagène, le mRNA, la synthèse de protéines ribosomales (translation), les modifications post-traductionnelles, la sécrétion et l'étape finale de formation de fibrilles (SP: signal peptidase; GT: hydroxyllysyl galactosyltransferase and galactosylhydroxyllysyl glucosyltransferase; LH: lysyl hydroxylase; PH: prolyl hydroxylase; OTC: oligosaccharyl transferase complex; PDI: protein disulphide isomerase; PPI: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; NP: procollagen N-proteinase; CP: procollagen C-proteinase; LO: lysyl oxidase; HSP47: heat shock protein 47, colligin1) (d'après Gelse, 2003).

### *1.1.2.3 Sécrétion et fibrillogenèse du collagène*

Dans l'appareil de Golgi, les triples hélices de procollagène sont concentrées dans des vésicules de sécrétion avant d'être exocytées. Le procollagène se retrouve alors dans le milieu extracellulaire, entraînant l'activation des propeptidases N et C, qui vont cliver spécifiquement les propeptides N et C. La molécule de collagène I native, ou encore appelée « tropocollagène », est formée. Cette molécule est, contrairement au procollagène précédemment synthétisé, insoluble dans les conditions et concentrations physiologiques et va s'assembler spontanément sous forme de fibrilles et de fibres organisées qui vont structurer les espaces extracellulaires. Ces édifices sont initialement stabilisés par des interactions polaires, hydrophobes et non covalentes, mais ils peuvent ensuite être renforcées par des réticulations covalentes. Ces dernières sont catalysées par l'enzyme lysyl-oxydase et se forment entre la lysine N-terminale d'une molécule et la lysine C-terminale d'une molécule de collagène adjacente. L'ensemble de ces phénomènes d'agrégation est nommé fibrillogenèse, un processus complexe, encore mal compris, qui semble intimement lié à la synthèse, au transport et aux modifications post-traductionnelles du collagène (Canty et Kadler, 2005). De ce fait, le clivage des propeptides, et plus particulièrement du propeptide C, est une étape cruciale dans ce phénomène. En effet, sa disparition permet de diminuer la concentration limite des molécules de collagène nécessaires pour déclencher le phénomène d'assemblage (Canty et Kadler, 2005). En revanche, le rôle du propeptide N-terminal n'est pas encore bien défini, même si certaines études suggèrent un rôle dans le diamètre et le caractère régulier des fibrilles (Rossert et Crombrughe, 2002 ; Bateman *et al.* 1996). Une fois que les molécules de collagène sont capables de s'agréger, elles s'alignent tête bêche (Figure 7) et de manière décalée de façon à ce que le domaine de liaison d'une molécule soit proche de celui d'une autre. Une hypothèse très probable est que le domaine hélicoïdale de la molécule renferme toute l'information nécessaire (grâce à sa séquence en acides aminés) pour l'organisation intermoléculaire, tandis que les télopeptides joueraient un rôle plus spécifique dans la catalyse du processus et dans la formation des réticulations. Plus précisément, un modèle en deux dimensions d'organisation axiale du collagène a été proposé par Hodge et Petruska (1963). Les triples hélices de collagène sont décalées par des valeurs multiples de D, la période D étant classiquement donnée pour environ 67nm et correspond à  $234 \pm 1$  acides aminés. Il faut un espace résiduel entre deux molécules alignées car la longueur de chacune d'entre elle correspond à une valeur non entière de 4,47 D. Il existe donc des régions distinctes plus ou moins denses régulièrement réparties de long des fibrilles (Figure 7). Ce décalage périodique est la conséquence directe de la structure primaire du collagène. En effet, quand deux triples hélices sont adjacentes, les chaînes latérales des acides aminés les composants sont suffisamment proches pour donner lieu à des interactions de type électrostatique entre résidus chargés et de

type hydrophobe entre résidus non chargés et les maximas d'interaction coïncident aux décalages de périodes  $nD$  (Hulmes *et al.*, 1973). Ce décalage permet également de former des réticulations dans les zones de recouvrement, et plus particulièrement de créer des liaisons covalentes, principalement entre des résidus lysines et hydroxylysines situés sur les télépeptides des hélices de collagène. Cependant, ce modèle proposé, bien qu'il soit tout à fait adapté à l'explication d'un modèle en deux dimensions, est plus difficile à extrapoler en trois dimensions, c'est-à-dire dans l'épaisseur de la fibre. Plus largement, cette capacité d'auto-assemblage est codée dans la structure des collagènes et les fibrilles sont réarrangées de manière différente suivant le type de tissus. Dans la peau par exemple, les arrangements sont plutôt aléatoires et forment un réseau complexe de fibrilles entrelacées (Rossert et Crombrughe, 2002). Notons également que la plupart des fibrilles sont hétérotypiques, c'est-à-dire qu'elles sont constituées de différents types de collagènes. Dans la peau humaine par exemple, les fibrilles de collagène sont faites de molécules de types I, III et V. Par ailleurs, bien que le collagène soit le constituant majoritaire des matrices extracellulaires, d'autres molécules composent ces dernières et joue un rôle dans la fibrillogenèse. C'est le cas des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes, qui influencent la régulation du diamètre des fibrilles et leur interdistance.

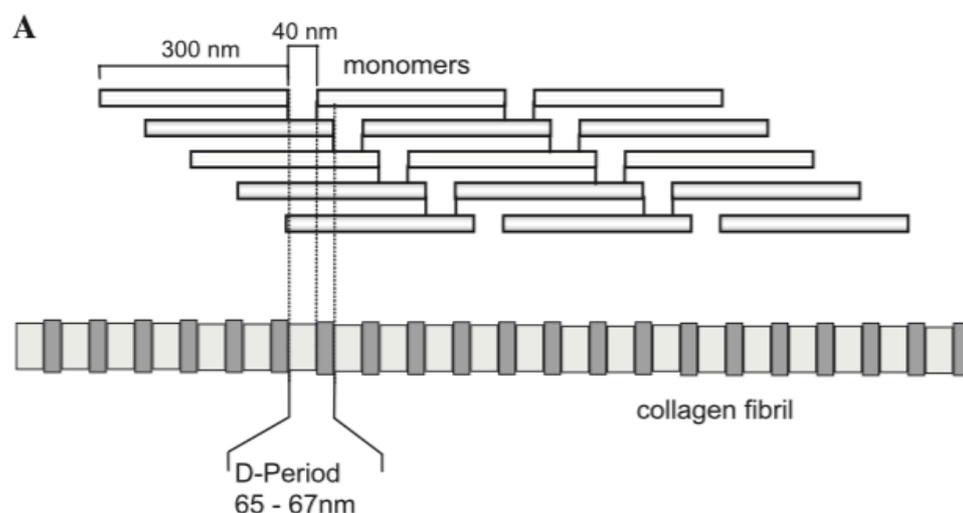


Figure 7. Représentation schématique de l'assemblage supramoléculaire des fibrilles de collagène suivant le modèle axial développé par Hodge et Petruska (1963) (d'après Gelse, 2003).

### **1.1.3 Collagène natif, gélatine et hydrolysate de collagène**

Au delà des différents types de collagène existant, le terme générique de « collagène » désigne l'ensemble des protéines possédant une structure en triple hélice, définie précédemment. Cependant, le tropocollagène peut être partiellement ou totalement hydrolysé et il se présente dans ce cas, sous différentes structures biochimiques. On distingue alors le « collagène natif », la gélatine, et enfin le collagène « hydrolysé ».

#### *1.1.3.1 Le collagène natif*

Le « collagène natif » désigne un mélange insoluble de molécules de tropocollagène ayant conservé leur structure en triple hélice. On y distingue les sous-unités  $\gamma$  et il présente un haut poids moléculaire supérieur à 300kDa, correspondant en fait au poids moléculaire de l'unité fondamentale. Les capacités d'auto-assemblage du collagène natif augmentent encore son poids qui peut atteindre le millier de kDa en solution, dans des conditions optimales. On distingue globalement deux différents types de collagène en fonction de la méthode d'extraction, détaillée plus tard dans la section **(1.4.)** : le collagène acido-soluble et le collagène pepsino-soluble. Des procédés permettant de changer la conformation de la triple hélice en rompant des liaisons hydrogènes et peptidiques ont été développés, afin d'obtenir des mélanges de protéines de plus petites tailles. Cela permet, par exemple, de rendre le collagène plus absorbable au niveau de l'intestin pour des utilisations en agroalimentaire ou encore d'isoler des peptides bioactifs pour des applications en cosmétique ou en pharmaceutique. Selon le degré d'hydrolyse du collagène, on obtient de la gélatine ou un hydrolysate de collagène.

#### *1.1.3.2 La gélatine*

La gélatine est définie comme du collagène dénaturé et/ou hydrolysé avec un poids moléculaire allant de quelques dizaines à plusieurs centaines de milliers de daltons (Li *et al.*, 2005). Contrairement au collagène natif, il est facile d'obtenir de la gélatine en grandes quantités. Pour cela, il est d'abord nécessaire de rompre les liaisons non covalentes et de désorganiser la structure de la protéine native, permettant ainsi de séparer les sous-unités de collagènes assemblées entre elles par des liaisons inter- et intramoléculaires, afin de solubiliser le collagène (Stainsby, 1977). Cette étape de pré-traitement peut être réalisée en conditions acides pour obtenir de la gélatine de type A, en conditions alcalines, pour obtenir de la gélatine de type B ou encore par voie enzymatique grâce à la pepsine. La protéine est ensuite chauffée et les liaisons hydrogènes de la triple hélice se rompent, provoquant l'effondrement de la structure. Cependant, les liaisons peptidiques ne sont pas rompues. Les chaînes  $\alpha$  adoptent alors une conformation de pelote statistique, c'est-à-dire que celles-ci sont orientées de façon aléatoire, en étant néanmoins liées aux unités adjacentes. Il ne s'agit pas d'une forme mais plutôt d'une répartition statistique

de formes pour toutes les chaînes dans une population de macromolécules. Ses propriétés gélifiantes sont intéressantes et ont trouvé de multiples applications dans des domaines aussi divers que la photographie et l'agroalimentaire visant plutôt des marchés de masse. En effet, la gélatine peut former des gels de type physique qui sont maintenus par des liaisons faibles comme des interactions électrostatiques entre charges opposées, de Van der Waals ou encore des liaisons hydrogène. À 40°C, une solution homogène est obtenue, mais lorsque la température est abaissée, les chaînes  $\alpha$  libérées par la dénaturation thermique des triples hélices de collagène peuvent se réassocier localement. Les petits domaines hélicoïdaux ainsi rétablis constituent les nœuds de réticulation d'un réseau élastique. À l'échelle macroscopique, la gélatine est liquide à température ambiante (20-25°C) et forme un gel quand elle est refroidie. Ce comportement s'explique à l'échelle moléculaire par l'existence d'une transition pelote-hélice (Figure 8). Au-dessus de la température de transition, les chaînes  $\alpha$  sont emmêlées mais peuvent facilement glisser les unes par rapport aux autres. En revanche, en dessous, il se reforme localement des triples hélices qui agissent comme autant de points de blocage et il y a alors formation d'un gel physique. Pour autant, les triples hélices se forment de façon aléatoire et uniquement locale, sans jamais reformer de véritables molécules de collagène. La dénaturation du collagène est donc irréversible et toutes ses propriétés d'auto-assemblage sont perdues.

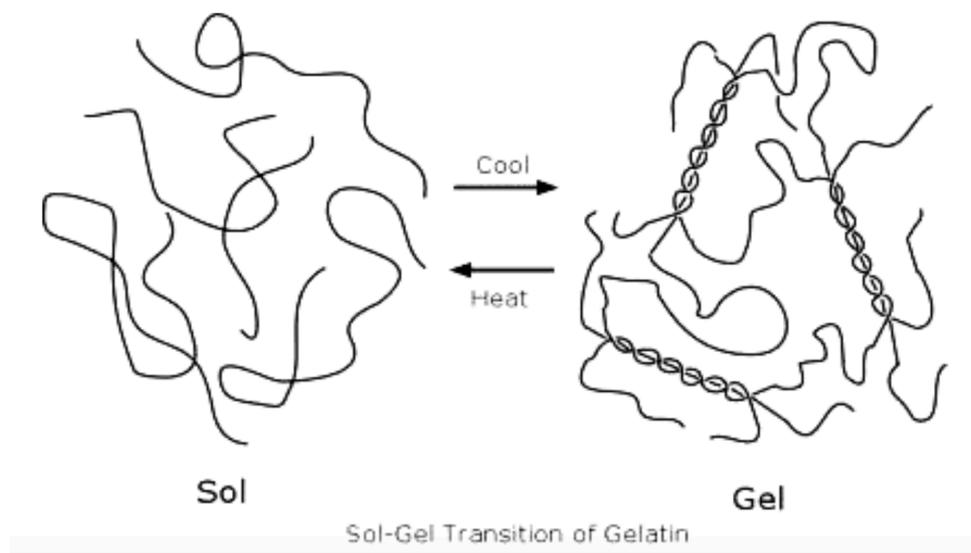


Figure 8. Schématisation de la structure moléculaire de la gélatine. Au-dessus de 20°C, la gélatine se présente sous la forme d'un liquide (phase sol). Quand cette phase est refroidie, il se forme des nœuds réticulation sous la forme de triples hélices et une phase gel est obtenue. (Récupéré via GoogleImage<sup>††</sup>).

Il semble important également d'évoquer que, dans la littérature, la terminologie utilisée pour définir le collagène natif et la gélatine n'est pas toujours précise. Il semblerait que le vocabulaire utilisé soit parfois choisi en fonction de l'application visée plutôt qu'en référence aux définitions exactes décrites plus tôt, qui s'appuient spécifiquement sur le poids moléculaire de la protéine. Ainsi, on retrouve souvent un collagène natif de haut poids moléculaire, défini comme de la « gélatine », alors que l'on distingue la présence de sous-unités  $\gamma$ .

#### *1.1.3.3 L'hydrolysate de collagène*

Le collagène hydrolysé est obtenu par hydrolyse enzymatique du collagène ou de la gélatine. C'est un mélange de peptides dont le poids moléculaire, plus faible encore que celui de la gélatine, est inférieur à quelques dizaines de milliers de daltons. À l'inverse du procédé d'obtention de la gélatine, les liaisons peptidiques sont rompues au cours de l'hydrolyse enzymatique, empêchant la possibilité de former des gels, contrairement au collagène natif et à la gélatine. L'hydrolysate de collagène possède de nombreuses propriétés qui sont liées à sa composition peptidique. Or, celle-ci dépend du degré d'hydrolyse mais aussi des enzymes utilisées au cours du procédé. Ainsi, la maîtrise de l'hydrolyse et sa reproductibilité est essentielle pour produire des peptides d'intérêt qui peuvent ensuite être purifiés par chromatographie. Les peptides peuvent être « fonctionnels », lorsqu'ils ont des propriétés physico-chimiques permettant d'améliorer la transformation, la stabilité, la conservation ou les qualités organoleptiques d'un produit. Les peptides sont dits « bioactifs » lorsqu'ils ont un impact positif sur la santé comme des activités anti-hypertensive, anti-oxydante ou encore immunomodulatrice. Ils agissent comme des régulateurs grâce à leur activité de type hormonal (Meisel, 1997) et leur activité est basée à la fois sur leur séquence en acides aminés (3 à 20 résidus) et sur la composition en acides aminés (Pihlanto-Leppälä, 2000) mais la section **(3.)** concernant les hydrolysats de protéines aborde ces notions de manière plus détaillée.

Dans cette étude, l'objectif est de développer un procédé d'extraction et de décrire un collagène natif de haut poids moléculaire.

## **1.2 La caractérisation du collagène**

Le collagène est une molécule avec une structure particulière, présentant différents types (type I, type V, fibrillaire..) et formes biochimiques (natif, gélatine ou hydrolysate), capable de s'assembler en édifices et réseaux complexes. Cette structure et les capacités d'agrégation qui en résultent dépendent de différents facteurs (génétique, modification post-traductionnelles, biochimie des protéines...). La caractérisation permet donc d'apparenter le collagène étudié à un

type défini et de déterminer ses propriétés associées. En effet, il est essentiel de connaître un certain nombre d'éléments concernant la protéine pour être capable de l'exploiter: quelle est sa composition chimique et biochimique, possède-t-elle une, deux ou trois chaînes  $\alpha$ , est-ce que ces trois chaînes s'assemblent en une triple hélice, est-ce que cette triple hélice s'assemble elle-même en structures de plus haut poids moléculaire et si tel est le cas, de quelle manière. On veut également connaître le poids moléculaire et l'organisation de ces structures. Cette description détaillée du collagène est possible grâce à différentes méthodes de caractérisation. Elles permettront de définir les applications auxquelles se prête le collagène et/ou de trouver des solutions le rendant plus fonctionnel pour des applications déjà visées.

Dans cette section, nous nous proposons de décrire le principe des différentes méthodes ainsi que les informations qu'elles donnent. Ceci est une liste non exhaustive, qui rassemble les techniques d'analyses les plus utilisées dans la littérature. De plus, nous verrons plus tard que les sources de collagènes (mammifère, poisson...) ainsi que les méthodes d'extraction utilisées ont une influence sur les propriétés de la molécule. Cette description vise donc également à donner des éléments de compréhension qui permettront de mieux appréhender les enjeux qui seront décrits dans la section « méthodes d'extraction et caractéristiques ».

### **1.2.1 Les spécificités de la molécule de collagène**

D'après sa définition, le collagène est une protéine complexe qui est principalement caractérisée par sa composition en acides aminés qui lui permet de s'agencer en une structure particulière : la triple hélice. Plus particulièrement, c'est sa teneur en acides iminés, comme la proline et l'hydroxyproline, qui détermine le degré de stabilité de la structure. On sait aussi que cette même teneur et, par conséquent sa capacité à former des liaisons entre les chaînes est dépendante de l'environnement de l'organisme concerné et se joue, non seulement lors de la transcription des gènes, mais aussi lors des modifications post-traductionnelles. Ces mêmes paramètres définiront de manière tissu-dépendante le type de collagène impliqué (type I, V...) et la manière dont les molécules s'agencent les unes par rapport aux autres dans la matrice extracellulaire. En effet, le collagène est une macromolécule tridimensionnelle qui est donc soumise à des phénomènes d'auto-assemblage et d'auto-organisation, comme ce qui est observé lors de la fibrillogenèse. Par ailleurs, la molécule de collagène peut être retrouvée sous forme de collagène natif, de gélatine ou encore d'hydrolysats. Ainsi, pour caractériser un collagène donné, la combinaison de plusieurs méthodes est nécessaire afin de comprendre la composition de la molécule en lien avec sa structure et son comportement, puisqu'ils sont intimement liés. Ces méthodes interviennent à plusieurs échelles (moléculaire, macroscopique...) et sont à l'interface

entre plusieurs disciplines comme la biologie, la chimie, la physique ou encore la science des matériaux.

## **1.2.2 Les différentes méthodes de caractérisation du collagène**

### *1.2.2.1 Détermination de la teneur en protéines*

Une analyse proximale du collagène, et plus particulièrement de sa teneur en protéines, va permettre d'étudier la composition chimique de l'échantillon. Ces données ne sont cependant pas systématiquement publiées dans les études. En revanche, dans le cas d'un produit commercialisé, cette information est systématiquement précisée dans les spécifications. Néanmoins, le dosage des protéines est une analyse couramment pratiquée en laboratoire pour assurer la fiabilité et la reproductibilité d'un protocole. D'autre part, pour des raisons pratiques, elle est incontournable car ce dosage permet de comparer des résultats d'analyses pour des échantillons aux teneurs en protéines similaires, dans le cas de méthodes de caractérisation où la concentration en protéines a une influence sur le résultat final (chromatographie, SDS-PAGE, rhéologie...).

Plusieurs méthodes, basées sur des principes différents, permettent de déterminer la teneur en protéines d'un échantillon de collagène. Tout d'abord, le dosage par la méthode de Kjeldahl détermine l'azote total et permet de déduire la quantité de protéines présente dans le collagène. Il consiste en la minéralisation de l'azote ammoniacal qui est ensuite dosé par acidimétrie ou colorimétrie. Il existe également des méthodes colorimétriques qui sont plus faciles à mettre en place en routine: la méthode du Biuret, la méthode de Bradford et la méthode de Lowry. Le Tableau 2 décrit les spécificités de chacune d'entre elles.

Tableau 2. Spécificités des trois méthodes de dosage colorimétriques testées: méthode de Bradford, de Biuret et de Lowry (d'après Noble et Bailey, 2009).

Méthode	<b>BRADFORD</b>	<b>BIURET</b>	<b>LOWRY</b>
Référence	Bradford (1976)	Gornall <i>et al.</i> (1949)	Lowry <i>et al.</i> (1951)
Réactif	Bleu de Coomassie	Gornall	Gornall et réactif de Folin-Ciocalteu
Groupements réactifs	réaction avec l'Arginine, l'Histidine, la Lysine et les acides aminés aromatiques	formation d'un complexe pourpre avec la liaison peptidique en présence de cuivre à pH basique	réactif de Folin-Ciocalteu: Tyrosine, Tryptophane, Cystéine, Histidine et la liaison peptidique
λ mesuré	595 nm	545 nm (ou 300 nm)	745 nm
Sensibilité	élevée (seuil = 1 µg)	faible (seuil = 100 µg)	élevée (seuil = 1 µg)
Interférence	peu influencé par la présence d'autres molécules (sauf détergents et bases fortes)	influencé par les autres solutés	fortement influencé par les autres solutés
Variation d'une protéine à l'autre	forte	faible	forte

Le collagène présente une composition spécifique en acides aminés ainsi qu'une structure particulière en triple hélice nécessitant une méthode de dosage adaptée (Komsa-Penkova *et al.*, 1996). Dans le cas de la méthode de Bradford, le bleu de Coomassie réagit avec les acides aminés aromatiques, que l'on ne retrouve pas ou peu dans le collagène. Concernant la méthode du Biuret, son faible seuil de sensibilité ne permet pas une mesure précise de la concentration en protéines (Komsa-Penkova *et al.* 1996). Cette faiblesse est par ailleurs soulignée par l'accessibilité difficile des acides aminés en raison de la structure en triple hélice de la molécule. En revanche, le dosage par la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) utilise un réactif réagissant avec la liaison peptidique et une bonne corrélation a été observée avec la méthode de dosage du Kjeldahl (données non présentées). De ce fait, ce dosage est la plus adapté dans le cas de la molécule de collagène pour un dosage des protéines des échantillons de collagène en routine, en accord avec l'étude de (Komsa-Penkova *et al.* 1996). L'intensité de la coloration étant

proportionnelle à la concentration en protéines, la mesure de l'absorbance permet de déduire la quantité de protéines totales contenue dans l'échantillon de collagène.

#### *1.2.2.2 Dosage des acides aminés*

Comme évoqué précédemment, le collagène est une protéine ayant une composition particulière en acides aminés. En effet, les chaînes  $\alpha$  qui composent la molécule suivent un motif Gly-X-Y où X et Y qui sont le plus souvent constitués d'Hyp ou de Pro. On doit donc s'attendre à retrouver dans le collagène une forte proportion d'acides iminés (Hyp et Pro) et environ un tiers de glycine. Le dosage des acides aminés permet alors de confirmer la présence de collagène dans l'échantillon en vérifiant la teneur en acides aminés caractéristiques. D'autre part, les acides iminés sont impliqués dans les liaisons inter-moléculaires qui stabilisent la triple hélice. La connaissance de leur teneur est donc essentielle à la compréhension du comportement de la molécule afin d'évaluer ses propriétés technofonctionnelles. Le dosage des acides aminés est donc une analyse de routine systématiquement réalisée sur le collagène et on le retrouve dans la plupart des études (Fernandes-Silva *et al.*, 2013 ; Haug *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2004 ; Lin *et al.* 2006). Pour réaliser ce dosage, l'échantillon est d'abord hydrolysé en conditions acides (acide chlorhydrique 6N, 24h, 110°C) pour rompre les liaisons peptidiques qui lient les acides aminés entre eux afin de les libérer. Mais dans ces conditions, le Tryptophane est détruit et les acides aminés soufrés (Cystéine et Méthionine) sont oxydés. Ainsi, le Tryptophane est dosé indépendamment, comme dans le protocole décrit par Robert *et al.* (2014) qui consiste à d'abord hydrolyser l'échantillon en milieu basique puis de l'acidifier avant de le séparer en chromatographie. En revanche la Cystéine et la Méthionine subissent simplement un traitement supplémentaire après l'hydrolyse acide qui consiste en une oxydation performique pour les stabiliser. Ensuite, chacun des acides aminés est dosé par séparation en chromatographie sur colonne, associée à un détecteur par fluorimétrie des dérivés OPA. On obtient ainsi la composition en acides aminés du collagène concerné exprimé en mole par mole de peptide. D'autre part, la teneur en Hyp peut également être dosée indépendamment par une méthode colorimétrique suivant une norme ISO (Wang *et al.*, 2008).

#### *1.2.2.3 Teneur en collagène*

La teneur en collagène est estimée grâce à la teneur en Hyp dosée indépendamment par méthode colorimétrique. La L-hydroxyproline est d'abord libérée par hydrolyse en conditions acides puis oxydée par la chloramine T pour former un composé de couleur rouge avec le p-diméthylbenzaldéhyde quantifié grâce à une lecture à 558 nm. On applique alors un facteur de

conversion à la teneur obtenue pour définir la teneur en collagène. Celle-ci, rapportée à la teneur en protéine, permet de calculer la proportion que représente le collagène au sein des protéines totales et par conséquent, d'évaluer la pureté de l'échantillon. Dans cette étude, le facteur utilisé est de 8. Il est adapté au collagène de mammifère et correspond à celui d'une norme AFNOR (NF V04-415). Néanmoins, le taux d'hydroxylation, et donc d'Hyp, étant dépendant de l'organisme concerné dont est extrait le collagène (Gelse *et al.*, 2003), le facteur de conversion utilisé n'est pas toujours adapté au modèle étudié. Nous en discuterons donc plus tard dans la rubrique « 1.3.3. Les particularités du collagène marin ».

#### *1.2.2.4 Le poids moléculaire*

La chromatographie d'exclusion stérique et le SDS-PAGE sont deux méthodes permettant de séparer les protéines, et donc le collagène, suivant leur poids moléculaire (Gómez-Guillén *et al.* 2002, Lin *et al.* 2006). Le SDS-PAGE est presque systématiquement utilisé dans la caractérisation du collagène (Kreger *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2013), contrairement à l'analyse en chromatographie d'exclusion stérique que l'on retrouve plus ponctuellement dans les études (Arnesen et Gildberg, 2007; Eysturskarð *et al.*, 2009a, 2009b; Haug *et al.*, 2004). La première, est une méthode non dénaturante, c'est-à-dire que l'échantillon est dilué dans une solution à des conditions de pH et molarité optimales. Les protéines sont donc sous leur forme native, afin de préserver leur activité biologique (Hong *et al.*, 2012). Dans ces conditions, les molécules de collagène s'assemblent et s'organisent de façon spontanée et autonome en structures de taille plus importante, comme ce qui se passe naturellement dans la matrice extracellulaire. Dans le cas du collagène, la structure native en triple hélice montre un poids moléculaire de 300kDa mais pouvant atteindre des valeurs supérieures du fait des phénomènes d'aggrégation. L'échantillon doit donc être élué sur une colonne possédant un domaine de fractionnement correspondant à cet ordre de grandeur, c'est-à-dire  $\geq$  à 300 kDa. Le Tableau 3 regroupe différents types de colonnes ainsi que les conditions d'élution utilisées dans la littérature pour caractériser le collagène natif ou la gélatine.

Tableau 3. Colonnes utilisées en chromatographie d'exclusion stérique pour la caractérisation du collagène marin.

Colonne	Domaine de fractionnement (Da)	Type de matrice	Phase mobile	Référence
TSKgel 4000 SW <sub>XL</sub> (Tosoh Bioscience)	20 000 - 7 000 000	Silice	0,01M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,01M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1% SDS (pH 5,3)	Arenesen et Gildberg 2006
TSK G6000 + G5000 PW <sub>XL</sub> (Tosoh Bioscience)	40 000 - 8 000 000 4 000 - 800 000	Polyméthacrylate	0,1M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,02M Na <sub>2</sub> EDTA (pH 9)	Eysturskarð <i>et al.</i> , 2009 a,b
TSK G4000 PW <sub>XL</sub> (Tosoh Bioscience)	2 000 - 300 000	Polyméthacrylate	0,05M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,01M Na <sub>2</sub> EDTA, 0,025M tris-base	Haug <i>et al.</i> , 2004

D'autres colonnes présentent également un domaine de fractionnement adéquat comme la colonne Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Bio-Sciences; domaine fractionnement: 10 000 - 600 000 Da), qui a été choisie dans cette étude, ou encore la colonne Yarra Sec 4000 (Phenomenex; domaine fractionnement: 15 000 - 1 500 000 Da). En chromatographie d'exclusion stérique, l'échantillon est alors séparé en fonction de son poids moléculaire, les plus grosses protéines étant éluées en premier. On obtient alors des chromatogrammes avec lesquels, grâce à une courbe de calibration, on peut observer la distribution de l'échantillon en fonction de son poids moléculaire et évaluer les pourcentages de protéine par classe de taille. Le caractère non dénaturant de l'analyse permet d'obtenir le poids moléculaire du collagène sous sa forme native et plus précisément, de juger l'importance des liaisons inter- et intra- moléculaires à l'origine de la formation de structures de plus haut poids moléculaire. Il est important de coupler cette première méthode à la deuxième, le SDS-PAGE qui est, quant à lui, une méthode dite dénaturante, adaptée de la méthode de (Laemmli, 1970). En effet, l'échantillon est d'abord traité au  $\beta$ -mercaptoéthanol, afin de réduire les ponts disulfures. Il est ensuite déposé sur gel de polyacrylamide (mélange d'acrylamide et de bis-acrylamide), dont la taille des mailles est adaptée à la molécule étudiée: les mailles les plus larges permettent une meilleure séparation des plus grosses protéines comme le collagène. Le plus souvent, les gels utilisés pour la caractérisation du collagène présentent un gradient croissant d'acrylamide, du sommet vers la base, permettant une meilleure séparation des protéines sur une vaste gamme de poids moléculaires. Dans le cas du collagène, ces gels permettent d'analyser les structures de haut poids moléculaire et identifier précisément les sous-unités  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha$ , mais également les structures de poids moléculaire inférieur à 100 kDa signalant une éventuelle dégradation de l'échantillon

ou la présence de protéines autres que le collagène. Les gels se décomposent alors en deux parties: le gel de concentration, avec un pourcentage de polyacrylamide compris entre 3 et 5% et le gel de séparation, avec un pourcentage de polyacrylamide compris entre 5 et 8% (Gómez-Guillén *et al.*, 2002 ; Kołodziejaska *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2013 ; Santos *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2014). Dans cette étude, des gels précoulés présentant un gradient 4-20% ont été utilisés. Certains auteurs utilisent également des gels sans gradient et on retrouve alors des pourcentages aux alentours de 7,5% dans tout le gel (Moreno *et al.*, 2012). Après avoir déposé l'échantillon sur le gel, on applique un courant électrique au gel et l'échantillon migre en présence de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), ce qui va empêcher le repliement des protéines, augmentant ainsi le caractère dénaturant de l'analyse, et leur conférer une charge négative. Les protéines de plus grande taille migreront moins rapidement que celles de grande taille et se retrouveront en haut du gel. Celui-ci est coloré au bleu de Coomassie, afin de révéler les bandes correspondant aux protéines présentes dans l'échantillon. Elles sont comparées à des marqueurs de taille, en fonction de leur migration, pour évaluer leur poids moléculaire. Dans le cas du collagène, les chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , qui constituent la structure en triple hélice, se caractérisent par un poids moléculaire d'environ 100, 200 et 300 kDa, respectivement. Il en est de même pour chaque type de chaîne  $\alpha$ , qui présentent chacune un poids moléculaire différent et dont la combinaison est spécifique de chaque type de collagène. De plus, l'interprétation des résultats obtenus en SDS-PAGE donne différents types d'éléments de compréhension au sujet du collagène étudié. Tout d'abord, l'absence de chaînes  $\gamma$ , donc de sous-unités présentant un haut poids moléculaire, indique que le collagène est partiellement dénaturé, on le qualifie alors de gélatine. De ce fait, il est essentiel de coupler la chromatographie d'exclusion stérique et le SDS-PAGE car l'observation de hauts poids moléculaire en conditions non dénaturantes peut être le résultat de phénomènes d'agrégation de chaînes  $\alpha$  libres, qui ne se présentent pas forcément sous la forme de triples hélices, par des liaisons covalentes. D'autre part, le SDS-PAGE permet de distinguer les différents types de chaînes  $\alpha$  en fonction de leur poids moléculaire, permettant de définir le type de collagène. Par exemple, le collagène de type I possède au sein de sa triple hélice deux chaînes  $\alpha_1$  et une chaîne  $\alpha_2$ , visibles en SDS-PAGE. Enfin, on peut retirer des informations qualitatives sur la pureté de l'échantillon car la présence de poids moléculaires en dessous de 100 kDa, indique la présence dans l'échantillons de protéines non collagéniques et/ou de produits de dégradation.

La section **(1.4.)** concernant les méthodes d'extraction permet d'illustrer l'utilisation de ces deux méthodes sur des collagènes issus de différents procédés d'extraction et comment elles permettent d'étudier l'influence de la méthode d'extraction sur les caractéristiques du collagène obtenu.

#### *1.2.2.5 Les mesures spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)*

La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire est une méthode d'analyse structurale de la matière, fondée sur les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques comme le proton, le carbone ou encore le phosphore. L'échantillon à étudier est placé dans un champ magnétique très intense et acquiert une aimantation nucléaire qui est détectée par sa mise en résonance. La résonance est le passage des noyaux d'un état énergétique favorable à un état énergétique défavorable. La réponse de l'échantillon dépend de l'intensité du champ magnétique appliqué, de l'environnement électronique des noyaux et de la dynamique des mouvements atomiques. C'est une technique non-invasive qui permet d'accéder qualitativement aux structures des molécules et à leur environnement physico-chimique sans dégrader l'échantillon étudié. On distingue principalement deux types de spectroscopie RMN: la RMN des liquides, adaptée à l'étude des petites molécules organiques en solution et des macromolécules solubles, et la RMN des solides. Cette dernière, également appelée RMN-HRMAS, est couramment utilisée pour le collagène, car son haut poids moléculaire rend la molécule moins souple pour réaliser une analyse optimale en RMN des liquides (Huster, 2008 ; Saitô, 1986 ; Torchia, 1982 ; Weber *et al.*, 2012). Cette technique empruntée à la H-RMN des solutions (ou RMN du proton), est basée sur la rotation de l'échantillon suivant un axe orienté à l'angle magique ( $54,7^\circ$ ) à une vitesse élevée (de l'ordre du kHz). Elle permet d'obtenir des spectres d'échantillons solides, comme le collagène sous forme lyophilisée, d'une résolution proche de celle rencontrée en RMN haute résolution des solutions.

De manière générale, les mesures en spectroscopie RMN permettent l'étude détaillée de la structure tridimensionnelle du collagène avec une résolution atomique par l'observation de la présence de liaisons peptidiques, des interactions moléculaire entre les molécules ou encore de la composition en acides aminés. Plus spécifiquement, la comparaison des spectres permet d'étudier les changements structuraux des molécules de collagène soumises à différents phénomènes comme la fibrillation, lors d'une réaction de réticulation, d'une dénaturation ou encore d'une hydratation (Acevedo-Jake *et al.*, 2015 ; De Sa Peixoto *et al.*, 2013 ; Fullerton *et al.*, 2006 ; Jelinski *et al.*, 1980 ; Torchia, 1984; Uriarte-Montoya *et al.*, 2010). Cette technique de caractérisation est peu utilisée dans la caractérisation du collagène marin. Dans le cas de cette étude, elle a été sélectionnée dans le but d'étudier les liaisons qui se crée au cours de la réticulation du collagène par des agents chimiques ou enzymatiques. Ainsi, cet outil permet de mieux comprendre la réaction et d'identifier les sites de réticulation impliqués grâce à l'étude des déplacements chimiques des acides aminés. Par la même occasion, l'analyse des spectres permet de vérifier que la réaction de réticulation a bien eu lieu.

#### *1.2.2.6 Les mesures en spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)*

La Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR= Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est une technique permettant d'obtenir le spectre d'absorption dans le rayonnement infrarouge d'un matériau. Le spectre obtenu permet alors l'analyse des fonctions chimiques de l'échantillon, via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques. Le terme « Transformée de Fourier » vient du fait qu'il est nécessaire d'effectuer un traitement par un algorithme commun, la « transformation de Fourier » pour convertir les données brutes (l'interférogramme) en réel résultat spectral ainsi exploitable. Cette mesure presque systématiquement utilisée dans les études de caractérisation du collagène, permet d'analyser sa structure secondaire et plus particulièrement de vérifier si la molécule étudiée présente, ou non, une structure en triple hélice. La comparaison des spectres dévoile également des différences au niveau des groupes fonctionnels et au niveau des interactions inter- et intra- moléculaire (Ahmad *et al.*, 2010 ; Chen *et al.*, 2016 ; Veeruraj *et al.*, 2013). L'ensemble de ces données permet d'évaluer, la stabilité de la triple hélice, si celle-ci est présente. Il est cependant nécessaire de comparer ces résultats à l'aminogramme ou aux mesures de rhéologie, afin de confirmer les résultats obtenus en FTIR. Plus précisément, la structure du collagène étudié peut être comparée à celle d'un collagène de mammifère, comme l'a fait l'équipe de Ahmad *et al.* (2010) en comparant un collagène de poisson (*Aluterus monoceros*) extrait par voie acide, avec un collagène de veau. Également, cette technique permet de comparer des collagènes obtenus par différents procédés d'extraction, comme le montre l'étude de Veeruraj *et al.* (2013) en comparant un collagène acido soluble et un collagène pepsino soluble, tous deux issus de peau d'anguille (*Evenchelys macrura*), permettant ainsi d'étudier l'impact du procédé sur la structure secondaire du collagène. On peut encore citer les travaux de Fernandes-Silva *et al.* (2013) qui ont utilisé les analyses en FTIR pour mettre en évidence les modifications chimiques qui interviennent au cours de la réticulation de collagène de requin par la génipine et ainsi tester différents protocoles.

Dans le cadre du développement d'un procédé d'extraction d'un collagène de haut poids moléculaire pour des applications dans les domaines de la santé, la spectroscopie FTIR est un outil qui permettra d'étudier l'impact du procédé d'extraction, mais également des procédés de réticulation, sur la conservation de la structure en triple hélice du collagène obtenu.

#### *1.2.2.7 Les mesures de rhéologie*

La rhéologie est une branche de la physique qui étudie l'écoulement ou la déformation des corps sous l'effet des contraintes qui leur sont appliquées, en tenant compte de la vitesse d'application

de celles-ci ou plus généralement de leur variation au cours du temps. Les mesures effectuées permettent d'étudier les relations entre le comportement rhéologique et la structure des matériaux. Dans le cas du collagène, l'observation des propriétés viscoélastiques à différentes températures par des mesures rhéologiques fournira des éléments de compréhension sur la structure de la molécule étudiée et sur ses applications potentielles. Par définition, le comportement d'un matériau viscoélastique linéaire est intermédiaire entre celui d'un solide élastique idéal symbolisé par un ressort de module élastique et celui d'un liquide visqueux newtonien symbolisé par un amortisseur de module de viscosité. L'élasticité d'un matériau traduit sa capacité à conserver et restituer de l'énergie après déformation tandis que la viscosité d'un matériau traduit sa capacité à dissiper de l'énergie. En s'appuyant sur ces principes, les mesures de rhéologies vont déterminer les températures de transition du collagène, entre sa forme solide, de gel et sa forme liquide, de solution: ce sont les températures de gélification et de fusion. La température de gélification est définie comme la température à laquelle le collagène passe de l'état de solution à l'état de gel, tandis que la température de fusion est la température correspondant à la transition inverse. Pour expliquer ce phénomène, il faut revenir aux caractéristiques structurales de la molécule de collagène. En solution, les chaînes  $\alpha$  glissent les unes par rapport aux autres, ce qui n'est plus le cas lorsque le collagène est sous forme de gel. La température à laquelle ces mouvements sont possibles dépend du nombre de liaisons non covalentes, sensibles à la chaleur, qui relient les chaînes entre elles. Par conséquent, la présence d'une structure en triple hélice, plus ou moins stabilisée par des liaisons intra-moléculaires ainsi que la capacité d'auto-assemblage des molécules grâce à des liaisons intermoléculaires, jouent sur les températures de dénaturation du collagène étudié. Pour cela, les modules viscoélastiques d'une solution de collagène à une concentration donnée, vont être mesurés suivant un gradient croissant de température, pour déterminer la température de fusion, et suivant un gradient décroissant, pour déterminer la température de gélification. De nombreuses études concernant la caractérisation du collagène, et plus particulièrement de la gélatine, utilisent ce type de mesures (Eysturskarð *et al.*, 2009a, 2009b ; Gilsenan et Ross-Murphy, 2000 ; Haug *et al.*, 2004). D'autres types de mesures sont utilisés pour l'étude de la thermostabilité du collagène. Plus précisément, ces différentes techniques permettent de suivre la dénaturation thermique du collagène afin de définir la température à laquelle la triple hélice de collagène est dissociée. C'est le cas de la calorimétrie différentielle à balayage utilisée dans de nombreuses études (Hoyer *et al.*, 2014 ; Liu *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2014). C'est une technique d'analyse thermique qui mesure les différences des échanges de chaleur entre un échantillon à analyser et une référence, qui peut être l'air. Elle permet de déterminer les transitions de phase, pendant laquelle une certaine quantité de chaleur est échangée avec l'échantillon pour être maintenu à la même

température que la référence. La fusion (le passage de l'état solide à liquide) est une réaction endothermique et le calorimètre mesure la quantité de chaleur absorbée au cours de la transition pour la fusion. Le pic d'absorption endothermique correspond alors à la température de fusion du collagène. Une autre méthode utilisée est la spectroscopie de dichroïsme circulaire qui permet d'observer les modifications de la conformation des protéines en fonction de la température et qui s'applique également au collagène marin (Duan *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2014). Elle est basée sur le fait qu'une molécule comme le collagène, présente un dichroïsme circulaire s'il absorbe différemment la lumière selon que sa polarisation est circulaire droite ou circulaire gauche. En effet, la polarisation de toute onde lumineuse peut se décomposer en deux parties, l'une circulaire droite (PCD) et l'autre circulaire gauche (PCG). En présence de dichroïsme circulaire, l'une des deux composantes sera absorbée plus rapidement que l'autre. Les structures secondaires des protéines n'absorbent pas de façon égale la lumière polarisée circulairement vers la droite et la lumière polarisée circulairement vers la gauche. On raisonne que l'absorption préférentielle de l'une de ces deux polarisations résultera en une déviation de la résultante, cette déviation est le dichroïsme circulaire. Ainsi, la solution de collagène est soumise à une température et la dénaturation thermique est suivie par dichroïsme circulaire. La température de dénaturation correspond à la température à mi-chemin entre la forme native repliée et la forme native complètement dépliée.

Pour en revenir aux mesures de rhéologie, on retrouve également dans certaines études la mesure de la viscosité intrinsèque du collagène (Enrione *et al.*, 2012 ; Kreger *et al.*, 2010). Celle-ci permet d'évaluer le poids moléculaire du collagène, comme les méthodes de chromatographie d'exclusion stérique et de SDS-PAGE. En effet, la viscosité des solutions de polymères peut être reliée aux poids moléculaires de ces derniers par une relation semi-empirique. Pour cela, on mesure la viscosité intrinsèque notée  $[\eta]$  de solutions de collagènes dont la concentration tend vers une valeur nulle, grâce à un viscosimètre. Les différents points de mesures de viscosité en fonction de la concentration en collagène permettent d'obtenir une droite dont l'ordonnée à l'origine correspond à la viscosité intrinsèque de la solution. On utilise alors l'équation de Mark-Houwink, qui décrit la variation de la viscosité intrinsèque d'un polymère avec son poids moléculaire moyenne viscosimétrique pour en déduire le poids moléculaire moyenne de l'échantillon de collagène. Ainsi, les résultats obtenus en chromatographie d'exclusion stérique en SDS-PAGE peuvent être confortés.

#### *1.2.2.8 La microscopie*

Les différentes techniques de microscopie existantes permettent d'étudier la morphologie des molécules de collagènes, ainsi que la microstructure des réseaux qu'elles sont capables de

former au cours des phénomènes d'agrégation. En effet, une fois excrétée dans la matrice extracellulaire, les molécules s'assemblent en fibres et fibrilles qui forment ensuite des édifices supramoléculaires, visibles en microscopie. Ainsi, certaines méthodes de microscopie seront plus propices à l'observation de la morphologie des fibres de collagène, tandis que d'autres permettent l'étude de la microstructure des réseaux tridimensionnels qu'elles forment.

La morphologie des fibres de collagène peut être observée grâce à différents types de microscopie dans les études de caractérisation du collagène (Hoyer *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Y. Li *et al.*, 2009b): la microscopie électronique à transmission, la microscopie à force atomique ou encore la microscopie confocale. La microscopie électronique en transmission (ou MET, en anglais TEM pour Transmission Electron Microscopy) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est « transmis » à travers un échantillon très mince. La microscopie à force atomique (AFM pour atomic force microscope) est un type de microscope à sonde locale permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. Enfin, la microscopie confocale réalise des images de très faible profondeur de champ (environ 400 nm) appelées « sections optiques » et ne peut être réalisée que sur un échantillon en solution. En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet. L'objet n'est donc pas directement observé par l'utilisateur ; celui-ci voit une image recomposée par ordinateur. Le microscope confocal fonctionne en lumière réfléchie ou en fluorescence. La plupart du temps, on utilise un laser comme source de lumière. On parle alors de microscope confocal à balayage laser —MCBL (en anglais CLSM pour confocal laser scanning microscope). Ces différentes analyses permettent d'étudier le diamètre ainsi que la taille des fibres de collagène, et de quelle manière elles s'assemblent.

Lorsque les solutions de collagène sont lyophilisées, on obtient des éponges caractérisées par leur structure poreuse, due à l'assemblage des molécules de collagène en réseau tridimensionnel. Cette microstructure particulière est observable en microscopie électronique à balayage, appelée MEB comme le montre les travaux de Santos *et al.* (2013) ou Hoyer *et al.* (2014). Cette méthode permet d'obtenir des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en se basant sur le principe des interactions électrons-matière. Les échantillons analysés en MEB doivent être déshydratés et préalablement métallisés. Cette analyse permet d'étudier la porosité du collagène grâce à l'observation de la taille des pores, de leur régularité ainsi que de leur interconnectivité.

Les analyses réalisées en microscopie sont très importantes dans la compréhension de la molécule de collagène. En effet, la morphologie des fibres et la microstructure des réseaux formés dépendent de plusieurs paramètres. Ainsi, le réassemblage *in vitro* des molécules peut

être modifié par certains facteurs comme la concentration en collagène ou les réactions de réticulation du collagène. On observe alors des différences au niveau du réassemblage des fibres ce qui influe sur la taille des pores ou encore sur la régularité de la microstructure entre différents échantillons. Ainsi, ces analyses permettent une analyse précise de la microstructure du collagène étudié et sont principalement utilisées dans des études où les applications visées sont de l'ordre du domaine médical.

Cette description montre bien que les différentes méthodes de caractérisation sont indissociables les unes des autres pour une détermination précise du collagène. C'est en recoupant les différentes informations que nous donnent les analyses qu'il est possible de confirmer et/ou d'expliquer certains résultats et obtenir une description solide du collagène étudié. Dans la section suivante, la caractérisation prend tout son sens et apparaît comme une étape primordiale à l'utilisation du collagène.

### **1.3 Les différentes sources de collagène**

#### **1.3.1 Du collagène de mammifère vers le collagène marin**

À l'origine, le collagène et la gélatine commercialisés sont principalement obtenus à partir des peaux, des os et des tendons de mammifères comme le porc, le bœuf et le veau. Les procédés d'extraction suivent globalement le même schéma: un prétraitement de la matière première, l'extraction du collagène ou de la gélatine, sa purification et éventuellement, la lyophilisation du produit, selon la forme sous laquelle il sera vendu. Concernant l'extraction de collagène, nous détaillerons plus tard les différents procédés existants et notamment l'influence qu'ils peuvent avoir sur les caractéristiques finales de la molécule. Pour ce qui est de la gélatine, 2 types différents, présentant des caractéristiques propres, peuvent être obtenus en fonction du prétraitement utilisé. Un prétraitement acide permet d'obtenir une gélatine de type A montrant un point isoélectrique à un pH compris entre 6 et 9, tandis qu'un prétraitement alcalin permettra d'obtenir une gélatine de type B avec un point isoélectrique à un pH d'environ 5 (Stainsby 1987). On peut également citer la méthode d'extraction de la gélatine par voie enzymatique, grâce à la pepsine. Selon la FAO (2014), la production mondiale de gélatine a atteint quelque 348 900 tonnes en 2011, dont 98 à 99 pour cent provenant de peaux et d'os de porcins et de bovins et environ 1,5 pour cent de poisson et d'autres origines. Depuis quelques années, les problèmes sanitaires comme la vache folle, les contre-indications religieuses ou encore la tendance vers un

mode de vie végétarien, suscitent un intérêt pour le collagène d'origine marine. De ce fait, d'importants efforts de recherche et développement sont menés, à la fois par les chercheurs et les industriels pour trouver une alternative au collagène de mammifère.

### **1.3.2 Les sources de collagène marin**

Le potentiel des collagènes et gélatines marins a donc été largement étudié ces dernières années et ils se sont révélés être une alternative intéressante au collagène de mammifère, majoritairement présent sur le marché aujourd'hui. Il peut être issu de poisson, principalement des peaux et des arrêtes (Chandra *et al.*, 2013 ; Duan *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2013 ; Nalinanon *et al.*, 2011 ; Shyni *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2014), qui sont disponibles en grandes quantités car issus de sa transformation, mais également des écailles (Chen *et al.*, 2014 ; Liu *et al.*, 2015 ; Minh Thuy *et al.*, 2014 ; Pati *et al.*, 2010). D'autres sources plus originales ont été décrites comme le collagène extrait de vessie natatoire (Chandra et Shamasundar, 2015 ; Sinthusamran *et al.*, 2013) et d'invertébré marin comme le calamar (Alemán *et al.*, 2013), l'oursin (Sugni *et al.*, 2014), l'éponge (Pallela *et al.*, 2011), la méduse (Hoyer *et al.*, 2014 ; Miura et Kimura, 1985), le bivalve (Choi *et al.*, 2013) ou encore le concombre de mer (Cui *et al.*, 2007). Les matières premières d'origine marine sont le plus souvent des co-produits issus de la transformation industrielle des produits de la mer. L'utilisation optimale des co-produits marins est devenu un enjeu en terme de souci environnemental car il induit moins de gaspillage. Cela permet également de fabriquer des produits à haute valeur ajoutée et ainsi augmenter les bénéfices des industries de transformation et même créer des débouchés en terme d'emploi et de business.

Dans cette étude, nous nous intéresserons au collagène marin de type I, et plus particulièrement celui issu des peaux de poisson.

### **1.3.3 Les particularités du collagène marin**

Le collagène marin présente des propriétés différentes du collagène issu d'animaux terrestres, et plus particulièrement des collagènes de mammifères couramment utilisés. La principale différence réside dans sa composition en acides iminés (Pro et Hyp), plus faible que celle des collagènes de mammifères, qui est déterminée lors des étapes de modifications post-traductionnelles intervenant au cours de sa biosynthèse. Or, le groupe R de ces acides iminés apporte de la rigidité à la triple hélice de collagène. Leur faible teneur rend donc la molécule plus souple et plus facilement dissociable. Cette particularité des collagènes marins se répercute sur leurs températures de dénaturation qui est alors plus faible que celle observée sur les collagènes de mammifères. Du fait que la teneur en Pro et Hyp dépend de l'environnement de l'organisme

étudié, on observe également des différences au sein même des collagènes marins. Les espèces d'eau chaude ont une composition en acides iminés plus importante que les espèces d'eau froide, ce qui a une influence sur la stabilité thermique du collagène. En effet, une espèce vivant dans une eau plus chaude aura besoin d'un collagène stable à des températures plus hautes qu'une espèce vivant en eau froide. La teneur en acides iminés des chaînes  $\alpha$  s'en voit donc modifiée. Cela résulte d'une adaptation physiologique des espèces concernées pour leur survie dans leur milieu. Il semblerait que la composition en acides iminés au sein d'une même espèce peut varier d'un tissu à l'autre. Par exemple, chez la carpe à grosse tête, la teneur en acides iminés des tissus internes (vessie natatoire et os) est légèrement plus élevée que la teneur observée pour les tissus externes (nageoire, peau et écailles) (Liu *et al.*, 2012). Par conséquent, il existe un lien entre la température de dénaturation du collagène et la température de l'organisme dont il est issu, comme le montre le Tableau 4. Ces données montrent que c'est plus spécifiquement la teneur en hydroxyproline qui influe sur la température de dénaturation. En effet, si l'on regarde le collagène de roussette, celui-ci présente une teneur très faible en acides iminés de 17,7 rés./100g rés., en comparaison avec le collagène d'esturgeon (21,28 rés./100g de rés.). Malgré cela, leurs températures de dénaturation sont proches (33,15°C et 32,78°C, respectivement) et cela s'explique par les valeurs des teneurs en Hyp proches (8,7 rés./100g rés. et 9,75 rés./100g de rés., respectivement), et non par les valeurs des teneurs en Pro qui est beaucoup plus importante pour l'esturgeon (11,53 rés./100g rés.) que pour la roussette (9 rés./100g rés.). Par conséquent, la molécule de collagène d'une espèce qui évolue dans des eaux chaudes n'aura pas les mêmes propriétés que celle d'une espèce évoluant dans un milieu plus froid ou tempéré. De la même manière, la composition en acides iminés influe sur les propriétés rhéologiques du collagène, et notamment sur les températures de fusion et de gélification. Ainsi le collagène de poisson, et plus particulièrement des espèces d'eau froide, présente des températures de transition solution-gel plus faibles, que le collagène de mammifère. Cela s'explique par une plus faible abondance de liaisons inter-moléculaires et qui permet aux chaînes  $\alpha$  de glisser les unes par rapport aux autres à des températures moins élevées, cette conformation correspondant à l'état de solution et non plus de gel. A titre d'exemple, les collagènes de morue et de lieu noir présentent des températures de fusion de 16°C (Eysturskarð *et al.*, 2009a) et 12-13°C (Gómez-Guillén *et al.*, 2002) respectivement, contrairement au collagène de bœuf dont la température de fusion monte à 30°C (Haug *et al.*, 2004).

Tableau 4. Teneurs en acides iminés et température de dénaturation de différentes sources de collagène.

	<b>Sources de collagène</b>	<b>Teneur en acides iminés (Rés./100g Rés.)</b>	<b>Température de dénaturation du collagène</b>	<b>Référence bibliographique</b>
<b>Mammifère</b>	Boeuf	Hyp= 10,1 Pro= 11,2 Hyp+Pro= 21,3	37°C	Choi <i>et al.</i> 2013
<b>Espèce tropicale</b>	Esturgeon japonais	Hyp= 9,75 Pro= 11,53 Hyp+Pro= 21,28	32,78°C	Wang <i>et al.</i> 2014
<b>Espèce tempérée</b>	Petite roussette	Hyp= 8,7 Pro= 9 Hyp+Pro= 17,7	33,15°C	Fernandes-Silva <i>et al.</i> 2013

Cette différence de teneur en Hyp entre les organismes marins et les mammifères soulève un problème relatif à la méthode de caractérisation de la teneur en collagène. En effet, cette teneur est déduite de la teneur en Hyp de l'échantillon grâce à un facteur de conversion (cf la section « 1.2.2.3 Teneur en collagène »). Celui-ci a été déterminé à partir des données concernant les collagènes de mammifères et est utilisé en agroalimentaire pour déterminer la teneur en collagène des viandes. Or, la proportion d'Hyp étant plus faible dans le collagène marin, le facteur de conversion appliqué sous-estime la teneur réelle de collagène. Il faut donc être vigilant et tenir compte de ce biais dans sa caractérisation. Par exemple, l'étude de Kołodziejska *et al.* (2008) utilise un facteur de conversion de 14,7 pour déterminer la teneur en collagène dans des peaux de saumon. Pour aller plus loin, les données de la littérature indiquent que les collagènes marins issus d'espèces d'eau froide présentent des teneurs en Hyp comprises entre 5,6 et 9% tandis que les espèces d'eau froide sont comprises entre 8,6 et 10,3% (Tableau 5). Si l'on applique le coefficient de 8, les teneurs totales en collagène ne dépassent pas 72% pour les espèces d'eau froide et 82,4% pour les espèces d'eau chaude.

Tableau 5. Comparaison des teneurs en Hyp des collagènes marins issus de différentes espèces.

Acide aminés (Rés. /100g Rés.)	Espèces eaux froides						Espèces eaux chaudes			
	Saumon Pesk& Co	Saumon (1)	Morue (2)	Sole (2)	Merlu (2)	Calamar <i>Dosidicus gigas</i> (2)	Tilapia (3)	Requin (4)	Méduse <i>Cyanea nozakii</i> (5)	<i>Lutjanus vitta</i> (6)
Hyp	7 - 9	6,0	5,6	6,1	5,9	8	10,3	9,8	3,8	8,1 – 8,6

(1) Arnesen et Gildberg 2007

(2) Gómez-Guillén 2002

(3) Grossman et Bergman, 1992

(4) Lin *et al.* 2006

(5) Zhang *et al.* 2014

(6) Jongjareonrak *et al.* 2005

En revanche, si l'on applique le coefficient de 8 pour les collagènes issus de mammifères ou d'autres espèces terrestres, dont les teneurs varient entre 9 et 13,7% (Tableau 6), on atteint des teneurs en collagènes supérieures à 100%.

Tableau 6. Comparaison des teneurs en Hyp de collagènes issus de mammifères et d'autres espèces terrestres.

Acide aminés (Rés. /100g Rés.)	Veau (1)	Bœuf (2)(4)	Porc (2)(3)	Volaille (2)	Grenouille (2)	Homme (3)
Hyp	9,4	10 - 13	12,5 - 13,5	13,7	11,7	9-11

(1) Fernandes-Silva *et al.* 2013

(2) Lin *et al.* 2006

(3) Eastoe 1955

(4) Choi *et al.* 2013

Ainsi, on peut proposer pour les collagènes marins deux autres coefficients de conversion de la teneur en Hyp en collagène:

(1) un coefficient adapté aux collagènes issus d'espèces d'eaux chaudes: **Hyp x 11**

(2) un coefficient adapté aux collagènes issus d'espèces d'eaux froides: **Hyp x 10**

La composition caractéristique en acides aminés des collagènes marins par rapport aux collagènes plus conventionnels et l'influence qu'elle a sur ses propriétés souligne l'importance d'une analyse précise et systématique du profil en acides aminés des collagènes.

## **1.4 Les différentes méthodes d'extraction et les caractéristiques associées du collagène marin de type I**

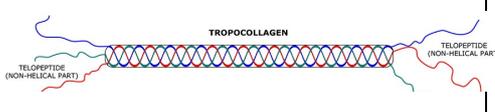
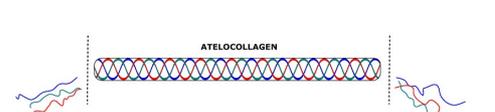
### **1.4.1 Les méthodes d'extraction par voie acide et par la pepsine**

Le collagène marin de type I est principalement extrait de peaux de poisson de différentes espèces (Chen *et al.*, 2015 ; Jongjareonrak *et al.*, 2005 ; Muyonga *et al.*, 2004a; Singh *et al.*, 2011 ; Yata *et al.*, 2001). Il est classé suivant trois catégories, sur la base de la méthode d'extraction selon laquelle il est obtenu: il peut être soluble dans le sel, acido-soluble (ASC, pour acido-soluble collagène) ou bien pepsino-soluble (PSC, pour pepsino-soluble collagène). Par définition, le collagène soluble dans le sel est un collagène nouvellement synthétisé, qui ne s'est pas encore agrégé dans les tissus et qui peut être extrait en utilisant une solution de sel. Cette méthode d'extraction présente un faible rendement en collagène. De plus, le collagène obtenu ne possède pas un fort degré de pureté car d'autres protéines insolubles, des pigments, de la matière grasse et d'autres contaminants sont extraits en même temps. L'ASC est, quant à lui, obtenu grâce à une solution acide qui ne solubilise pas seulement le collagène non-agrégé (collagène soluble dans le sel) mais rompt aussi des liaisons inter-chaînes par réduction des fonctions aldimes de la molécule, provoquant une plus forte solubilisation du collagène, par rapport à la méthode au sel. Enfin, le PSC est obtenu par une protéolyse limitée des télépeptides, au niveau desquels les collagènes sont liés par des liaisons covalentes non réductibles. Cette méthode n'affecte pas la structure en triple hélice du collagène, d'ailleurs, certaines enzymes comme la pepsine sont utilisées afin de faciliter la solubilisation du collagène de certaines matières premières, lorsqu'il est trop difficile d'extraire le collagène uniquement avec un procédé acide.

Dans la littérature, les deux méthodes principalement décrites sont la méthode d'extraction par voie acide (Eysturskarð *et al.*, 2009a ; Minh Thuy *et al.*, 2014; Nagai et Suzuki, 2000) et la méthode d'extraction par la pepsine (Choi *et al.*, 2013 ; Jongjareonrak *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2014). De manière générale, les protocoles suivent la même démarche et la seule différence réside dans l'étape d'extraction. La matière première est d'abord traitée à la soude, afin d'éliminer les protéines non collagéniques ainsi que les pigments. Lorsqu'il s'agit d'une matière première grasse, comme les peaux de poisson, une étape supplémentaire de traitement à l'alcool

butylique s'ajoute pour éliminer les lipides. Le collagène est alors extrait par voie acide ou par la pepsine. Se succèdent ensuite des étapes de purification grâce à des centrifugations, des précipitations par les sel ou encore des dialyses. Cette section se propose de décrire les caractéristiques biochimiques et structurales des collagènes obtenus avec ces deux méthodes différentes. Les principaux résultats sont réunis dans le Tableau 7 et ont été obtenus grâce aux méthodes analytiques détaillées précédemment.

Tableau 7. Principales caractéristiques des collagènes acido-solubles et pepsino-solubles issus de peaux de poissons.

	Collagène acido-soluble	Collagène pepsino-soluble
Schématisation de la molécule	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• présence des télépeptides</li> </ul>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• absence des télépeptides</li> </ul>
Composition en acides aminés	<ul style="list-style-type: none"> <li>• caractéristique des collagène marins: faible teneur en acides imines et 1/3 de Glycine</li> </ul>	
Poids moléculaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sous-unités <math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math></li> <li>• présence de hauts poids moléculaires</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sous-unités <math>\alpha</math></li> <li>• sous-unités <math>\gamma</math> et <math>\beta</math> pas toujours présentes</li> <li>• diminution des composés de haut poids moléculaire</li> </ul>
Stabilité thermique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• caractéristique des collagène marins : faible température de dénaturation</li> </ul>	
Structure secondaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• structure en triple hélice</li> </ul>	
Microstructure	<ul style="list-style-type: none"> <li>• structure poreuse mais irrégulière, formation de fibrilles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• structure poreuse et régulière</li> </ul>

La différence principale entre l'ASC et le PSC réside dans la structure de la molécule et est directement liée au mécanisme chimique d'action des deux procédés d'extraction. En effet, l'extraction par la pepsine clive les télépeptides des triples hélices de collagène, c'est-à-dire les parties terminales de la molécule responsables des liaisons inter-moléculaires et on obtient alors de l'atélocollagène. Parallèlement, la digestion par la pepsine dissocie également une partie

du collagène sous formes  $\gamma$  et  $\beta$  en chaînes  $\alpha$  (Sato *et al.*, 2000). Ces différences sont visibles en SDS-PAGE (Singh *et al.* 2011 ; Huang *et al.* 2011 ; Zeng *et al.* 2012 ; Sato *et al.* 2000 ; Jongjareonrak *et al.* 2005 ; Chen *et al.* 2015) et se manifestent par l'absence des sous-unités  $\gamma$  et  $\beta$  et/ou l'absence de composés de poids moléculaires supérieurs à 300kDa pour le collagène PSC contrairement au collagène ASC, comme l'illustre la Figure 9. Malgré ces modifications au sein des extrémités de la molécule et des liaisons inter-moléculaires et intra-moléculaires, les analyses en FTIR montrent que l'extraction par la pepsine ne modifie pas la structure secondaire en triple hélice du collagène (Tamilmozhi *et al.* 2013 ; Singh *et al.* 2011 ; Ahmad *et al.* 2010 ; Li *et al.* 2013 ; Singh *et al.* 2011), car celle-ci résulte de la composition particulière en acides aminés de la structure primaire des chaînes  $\alpha$  de collagène.

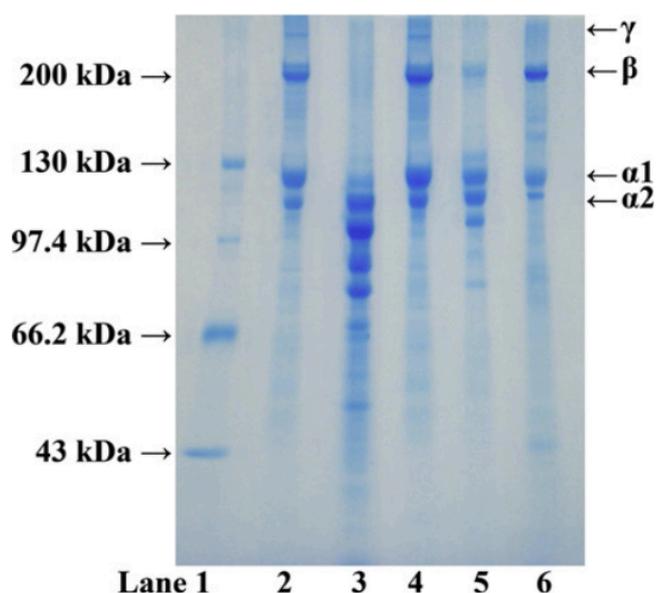


Figure 9. Profils SDS-PAGE de collagènes ASC et PSC issus de peau (P) et d'os (B) de maquereau espagnol. Colonne 1: marqueurs de taille, colonne 2: ASC-P ; colonne 3 : PSC-P, colonne 4: ASC-B; colonne 5: PSC-P; colonne 6: collagène de peau de veau (tiré de Li *et al.* 2013).

D'autre part, les profils SDS-PAGE confirment l'extraction, pour les deux méthodes, de collagène de type I grâce à l'analyse des bandes  $\alpha$ . De ce fait, les études décrivent globalement une composition en acides aminés similaire entre l'ASC et le PSC et caractéristique de ce type de collagène (Huang *et al.* 2011 ; Chen *et al.* 2015 ; Singh *et al.* 2011 ; Li *et al.* 2013 ; Jongjareonrak *et al.* 2005). Plus spécifiquement, les différences observées entre les teneurs en acides iminés Hyp et Pro ne sont pas assez marquées pour remarquer une influence significative sur les valeurs des températures de dénaturation des collagènes. Ces différences sont indépendantes du type de collagène et n'ont donc pas de rapport avec la méthode d'extraction utilisée. Par exemple, la

composition en acides iminés des peaux de vivaneaux est moins importante pour l'ASC que pour le PSC (21,2 et 22,1 rés./100g de rés., respectivement) et pourtant, l'ASC présente une température de dénaturation un peu plus haute (31,52° C) que le PSC (31,02°C) dans l'eau, mais également dans l'acide acétique (30,52°C et 30,46°C, respectivement) (Jongjaeonrak *et al.*, 2005). On constate la même chose pour les collagènes ASC et PSC de la peau du maquereau espagnol (Li *et al.*, 2013) qui pour des teneurs en acides iminés de 17,71 et 18,08 rés./100g rés., respectivement, montrent des températures de dénaturation de 15,12°C et 14,66°C, respectivement. Contrairement à l'étude précédente, qui concluait sur des températures de dénaturation similaires entre les collagènes ASC et PSC, Li *et al.* (2013) attribuent cette différence au plus faible poids moléculaire observé pour le collagène PSC, du fait de l'absence de télépeptides. A l'inverse, bien que le collagène ASC extrait de peau de poisson-hérissou (*Diodon holocanthus*) présente un peu plus d'acides iminés que le collagène PSC (17,9 et 17,4 rés./100g de rés., respectivement), il présente une stabilité thermique un peu plus faible que le collagène PSC (29,01°C et 30,01°C, respectivement) (Huang *et al.*, 2011). Ainsi, la plupart des études ne montrent pas de corrélation entre le contenu en acides iminés et les températures de dénaturations entre les collagènes ASC et PSC. Seule l'étude menée par Zeng *et al.* (2012) détermine un lien entre une teneur en acides iminés plus forte retrouvée dans l'ASC (20,3 rés./100g rés. contre 19,1 rés./100g rés pour le PSC) et qui se traduit par une température de dénaturation plus élevée mesurée en viscosimétrie ( $T_m = 34,62^\circ\text{C}$ ), par rapport au PSC ( $T_m = 33,97^\circ\text{C}$ ). Généralement, les auteurs discutent surtout autour des faibles teneurs en Hyp et Pro par rapport aux collagènes de mammifère et des différences entre les espèces marines d'habitats chauds et d'habitats tempérés ou froids. Ils confirment ainsi les propriétés qui caractérisent le collagène de poisson, qu'il soit ASC ou PSC. D'autre part, si l'on se penche sur la microstructure des collagènes lyophilisés, on observe en microscopie électronique à balayage que l'ASC présente une structure moins régulière que le PSC des peaux de marlin (*Istiophorus platypterus*) et de maquereau espagnol (*Scomberomorous nipponius*) (Figure 10)(Tamilmozhi *et al.* 2013, Li *et al.* 2013) tandis que (Pal *et al.*, 2015) observent une structure similaire entre les collagènes ASC et PSC issus de peaux de catla (*Catla catla*) et de rohu (*Labeo rohita*). Il semblerait également que le PSC ait une meilleure interconnectivité tandis que l'ASC apparaît plus filamenteux (Tamilmozhi *et al.* 2013). En revanche, les collagènes ASC et PSC possèdent une structure poreuse permettant une bonne capacité d'absorption de l'eau (Li *et al.*, 2013; Tamilmozhi *et al.*, 2013).

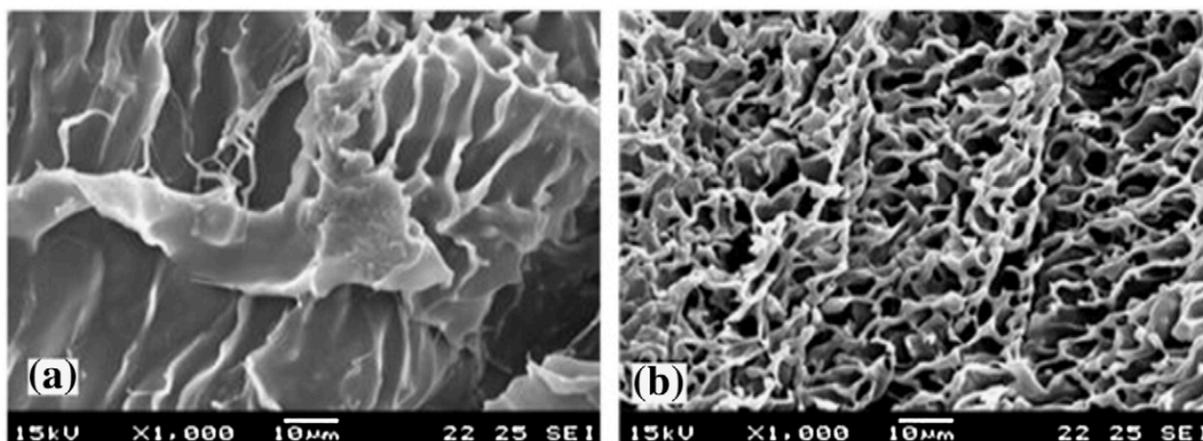


Figure 10. Images obtenues en microscopie électronique à balayage pour des collagène ASC (a) et PSC (b) issus de peaux de marlin (tiré de Tamilmozhi, 2013).

Par ailleurs, l'ACS présente de meilleures capacités à former des fibrilles (Pal *et al.*, 2015), confirmant les résultats observés en microscopie. La présence des télépeptides permet de mimer les conditions *in vivo* pour former des suprastructures de haut poids moléculaire, même si celles-ci sont plus désorganisées que celles résultant de l'agrégation de molécules de PSC.

Pour conclure, il existe principalement deux méthodes d'extraction du collagène de peau de poisson retrouvées dans la littérature. Elles permettent d'obtenir deux types de collagène: le collagène acido-soluble (ASC) et le collagène pepsino-soluble (PSC) qui se distinguent par la présence ou non, de télépeptides à l'extrémité de leur molécule de collagène. Cette différence structurale n'a pas d'influence sur la composition biochimique du collagène et sur son profil en acides aminés caractéristiques. Cependant, l'ASC a un poids moléculaire plus important que le PSC car les sous-unités  $\gamma$  et  $\beta$  sont mieux préservées par le traitement à l'acide. De plus, la présence des télépeptides pour l'ASC permet aux molécules de collagène de former des structures de haut poids moléculaire, comme les fibrilles, mais de manière anarchique, comme le montrent les résultats observés en microscopie. En revanche, l'absence de ces structures non-hélicoïdales et de sous-unités  $\alpha$  de plus petit poids moléculaire pour le PSC induisent la formation de structures plus organisées et interconnectées sur le plan microstructural. Parallèlement, la question du rendement se pose pour le choix d'une méthode. Dans la plupart des études, le rendement en ASC est supérieur au rendement en PSC (Zeng *et al.* 2012 ; Li *et al.* 2013 ; Jongjareonrak *et al.* 2005 ; Tamilmozhi *et al.* 2013). Cependant, certaines études obtiennent le résultat inverse (Singh *et al.* 2011). Il est difficile d'établir des généralités sur ce point car c'est un paramètre qui dépend également de l'espèce concernée et de la fraîcheur des co-produits utilisés. En réalité, ces deux méthodes sont toutes les deux appliquées: d'abord l'extraction acide, suivie de l'extraction par la pepsine qui permet d'augmenter le rendement

d'extraction du collagène en le solubilisant des fractions insolubles restantes de la première extraction. Par ailleurs, l'extraction par voie acide est un traitement drastique nécessaire pour réduire la charge microbienne de la matière première. En effet, les co-produits utilisés pour l'extraction du collagène sont considérés comme des déchets dans la chaîne de transformation et leur conditionnement ne prend pas toujours en compte les risques de contamination. Il en résulte alors une matière première de qualité variable.

Au delà des différences observées entre les collagènes ASC et PSC, l'ensemble de ces résultats montre l'importance de l'utilisation des méthodes de caractérisation du collagène. Elles se posent comme un véritable outil de compréhension de la molécule de collagène et font le lien entre les mécanismes du procédé d'extraction et les propriétés techno-fonctionnelles de la molécule. Dans ce sens, nous nous sommes intéressés de plus près à l'influence des conditions d'extraction, et plus précisément de la température, sur le poids moléculaire de collagènes marins.

#### **1.4.2 Influence des conditions d'extraction sur le poids moléculaire du collagène**

Pour étudier l'influence de la température d'extraction sur le poids moléculaire du collagène, deux études vont être présentées dans cette section: celle de Kolodziejska *et al.* (2008) et celle de (Eysturskarð *et al.*, 2009a).

La première étude de Kolodziejska *et al.* (2008) décrit un procédé d'extraction de la gélatine, dans lequel plusieurs paramètres sont testés afin que celui-ci soit optimal en terme de rendement. Schématiquement, les peaux sont lavées à l'eau salée et la gélatine est extraite à l'eau chaude puis purifiée. Ce qui retient notre attention, c'est la présence d'unités  $\gamma$ , donc de collagène de haut poids moléculaire, obtenu pour une extraction à température modérée, soit 45°C, comme le montre la Figure 11.

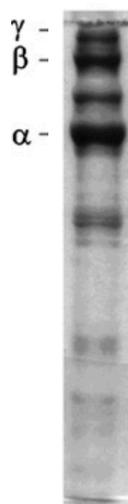


Figure 11. Profil SDS-PAGE de gélatine extraite à 45°C pendant 45 min de peau de saumon (*Salmo salar*) (tiré de Kolodziejska *et al.* 2008).

Ce résultat est corrélé avec l'étude d'Eyturskarð *et al.* (2009a) qui compare un protocole d'extraction acide, effectué à 22°C, à 45°C et à 65°C. Les résultats montrent l'obtention d'un collagène de haut poids moléculaire à 22°C et 45°C, tandis qu'à 65°C la structure en triple hélice s'effondre, comme le montre la Figure 12.

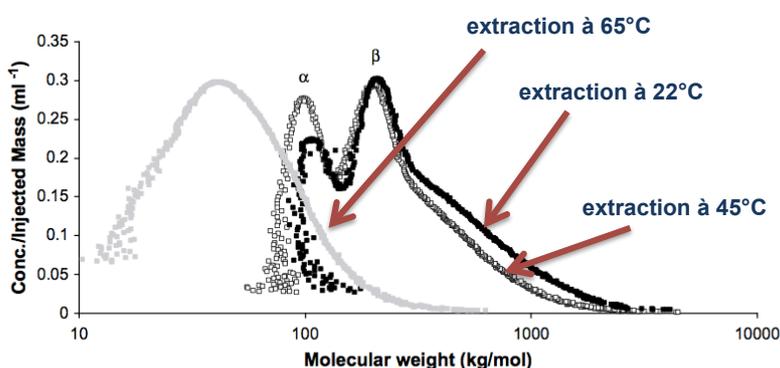


Figure 12. Poids moléculaire d'une gélatine de lieu noir (*Pollachius virens*) extraite à 22°C, 45°C et 65°C (tiré de Eyturskarð *et al.* 2009a).

Ces deux résultats montrent donc qu'au delà de 45°C, le protocole d'extraction rompt les liaisons hydrogènes qui maintiennent la structure en triple hélice, provoquant ainsi l'obtention d'un collagène de plus faible poids moléculaire. Une extraction à température modérée, combinée à une matière première de haute qualité, permettrait ainsi d'obtenir un collagène de haut poids moléculaire tout en mettant en œuvre un procédé éco-respectueux.

Dans le cadre du projet Pesk&Co, la combinaison des résultats de ces deux études a amené à la conceptualisation d'un procédé d'extraction en conditions ménagées qui sera décrit plus précisément dans le **Chapitre 1**.

## **1.5 Les principales voies d'utilisation du collagène**

Aujourd'hui, le collagène est utilisé dans de nombreux domaines, de l'alimentation à la santé humaine, en passant par la cosmétique et la nutraceutique. La diversité des usages de cette protéine s'explique par ses propriétés technofonctionnelles particulières. D'après un rapport de la FAO (2014), la gélatine issue de poissons d'eaux chaudes peut se substituer à la gélatine de bovin dans les enrobages alimentaires et pharmaceutiques. Celle provenant de poissons d'eaux froides est utilisée dans les produits alimentaires congelés et réfrigérés.

Cette section va passer en revue les différentes applications du collagène afin de comprendre comment les activités de recherche et de développement ont su tirer le meilleur profit de la molécule de collagène, et plus particulièrement du collagène marin, depuis l'antiquité jusqu'à aujourd'hui.

### **1.5.1 Utilisation dans l'alimentation**

Dans le domaine alimentaire, le collagène est désigné sous le terme de « gélatine ». Elle est utilisée à des fins plus technologiques et ses qualités dépendent essentiellement de ses propriétés rhéologiques (Stainsby 1987 ; Gómez-Guillén *et al.* 2002). On la retrouve alors de deux manières différentes:

(1) dans la formulation des aliments pour ses capacités émulsifiantes, en tant qu'agent gélifiant ou encore comme stabilisant (Gómez-Guillén *et al.*, 2002)

(2) dans la formulation d'emballage comme les films ou les enrobages de gélules (Hosseini *et al.*, 2016 ; Mellinas *et al.*, 2016 ; Tharanathan, 2003 ; Uriarte-Montoya *et al.*, 2010)

Tandis que la première utilisation est très répandue depuis longtemps dans l'industrie agroalimentaire, l'utilisation des propriétés techno-fonctionnelles de la gélatine pour la mise au point de packaging présente un intérêt grandissant et fait l'objet de nombreuses études depuis ces dernières années. Tout d'abord, les films à base de collagène remplacent le plastique qui pose des problèmes écologiques (Tharanathan et Saroja, 2001). Ensuite, ils permettent la conservation des aliments vis à vis de l'oxydation et de la contamination bactérienne. Pour cela, de nouvelles solutions sont développées en combinant à la gélatine des composés anti-oxydant ou anti-bactériens, comme le chitosan (Hosseini *et al.*, 2016) ou des extraits végétaux (Haddar *et al.*, 2012 ; Nagarajan *et al.*, 2015), qui sont libérés au fur et à mesure, afin d'améliorer la

conservation des produits emballés. Par ailleurs, des efforts de recherche sont également menés sur l'amélioration des propriétés rhéologiques des films en les renforçant par des réactions de réticulation (Benbettaïeb *et al.*, 2016 ; Gómez-Guillén *et al.*, 2009) ou par l'ajout d'agents plastifiants comme le glycérol ou le sorbitol (Ahmad *et al.*, 2015 ; Gómez-Guillén *et al.*, 2009).

Le collagène peut également être utilisé sous forme d'hydrolysate pour ses effets cryoprotecteurs (Cao *et al.*, 2016 ; Damodaran, 2007 ; Nikoo *et al.*, 2014) ou comme antioxydant ; (Nikoo *et al.*, 2014) dans la conservation des aliments, et plus particulièrement celle du poisson.

### 1.5.2 Utilisation du collagène en nutraceutique et nutricosmétique

Aujourd'hui, on observe un intérêt croissant de la demande en aliment possédant des bénéfices pour la santé et le soin personnel sur le marché asiatique, mais également depuis quelques années sur le marché européen. On distingue alors plusieurs types d'aliment. Ces aliments sont appelés « nutraceutiques », « nutricosmétiques » ou encore « cosméceutique » qui sont à l'interface entre la nutrition, le soin personnel cosmétique et la pharmaceutique, comme le montre la Figure 13.

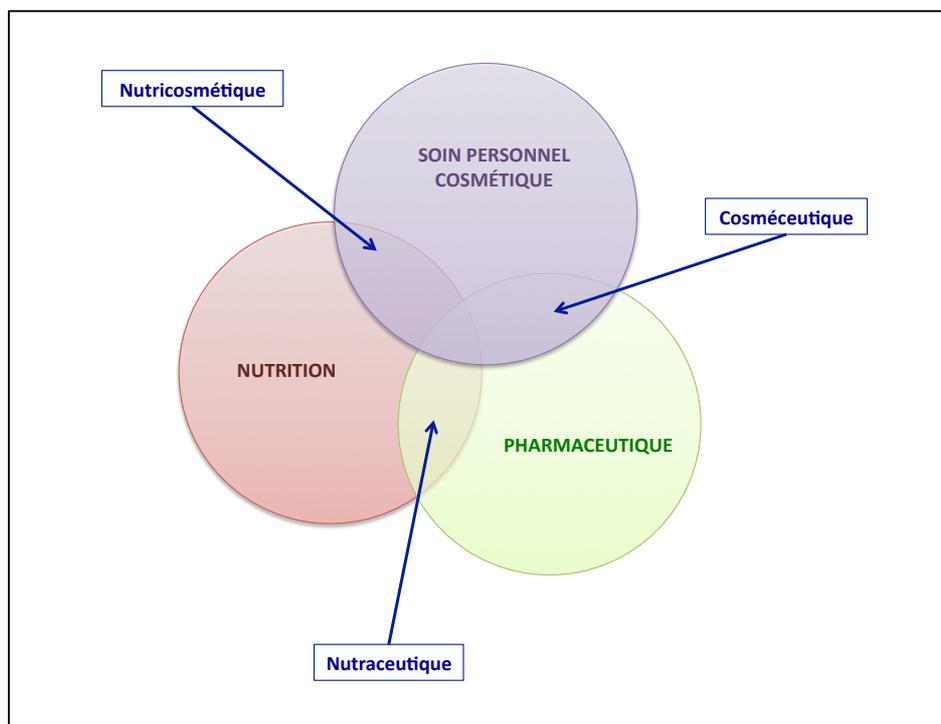


Figure 13. Représentation des relations qui existent entre les nutraceutiques, les nutricosmétiques et cosméceutiques.

Si l'on s'intéresse de plus près aux nutraceutiques, ils sont définis comme un aliment ou une partie seulement, qui procure des avantages pour la santé ou médicaux, y compris la prévention et le traitement de maladies (DeFelice, 1995). Plus largement, ce terme désigne des produits fabriqués à partir de substances alimentaires, mais rendus disponibles sous forme de comprimé, de poudre, de boisson ou d'autres formes médicinales habituellement non associées à des aliments, et qui se sont avérés avoir un effet physiologique bénéfique ou protecteur sur l'organisme.

Le terme de nutricosmétique désigne les compléments alimentaires qui apportent, selon les allégations des fabricants, des « bénéfices santé » à diverses parties externes du corps humain, généralement la peau, les cheveux ou les ongles. La dégradation du collagène est largement considérée comme la principale caractéristique du vieillissement cutané (Zague *et al.*, 2011). La production de collagène diminue naturellement avec l'âge, et plus précisément à partir de 25 ans, laissant ainsi apparaître les premières rides. Le collagène est donc un ingrédient très utilisé en nutricosmétique sous forme de gélule, de poudre ou de boisson pour lutter contre le vieillissement de la peau, comme le montrent les produits commercialisés représentés sur la Figure 14.



Figure 14. Hydrolysats de collagènes commercialisés sous forme de boisson, de poudre ou de gélule disponibles sur le marché asiatique (photographies Sébastien Hervé).

Il y est incorporé sous forme d'hydrolysats de collagène ou de gélatine. Cependant, l'ingestion des protéines hydrolysées pose des questions en terme d'efficacité et beaucoup de produits revendiquent des effets sans les prouver (Proksch *et al.*, 2014a). Par exemple, même si un effet anti-âge est observé *in vitro*, les acides aminés peuvent être dégradés au cours de la digestion et de l'absorption. Une étude de Wang *et al.* (2015) démontre l'absorption de gélatine sous forme de peptides au niveau de l'intestin de rats. Or c'est la séquence peptidique des peptides qui procure la bioactivité, et dans ce cas, on ne sait pas comment les peptides sont découpés lors du passage de la barrière intestinale. Certaines études ont tout de même prouvé l'efficacité de l'ingestion de certains hydrolysats de collagène commercialisés sur l'élasticité et l'hydratation de

la peau (Proksh *et al.* 2014a) ainsi que sur la réduction des rides et sur le renouvellement du derme (Proksch *et al.*, 2014b). Par ailleurs, d'autres études ont prouvé des effets photoprotecteurs *in vivo* sur des rats (Tanaka *et al.*, 2009).

### **1.5.3 Utilisation du collagène en cosmétique**

Les protéines sont utilisées dans les formulations cosmétiques depuis les années 50 pour leurs propriétés hydratantes qui fournissent un environnement favorable à la peau (Secchi, 2008). Leur rôle est d'améliorer l'apparence de la peau et de protéger sa structure et ses fonctions (Li *et al.*, 2005). Le collagène est une protéine, il possède donc toutes les qualités requises pour être incorporé dans des formulations. Il peut être utilisé sous forme de masque, grâce à ses capacités à former des films, en raison de son haut poids moléculaire (Secchi, 2008). Il apporte un effet tenseur et humectant, permettant de réduire les ridules et de maintenir l'hydratation de la peau. Il est également incorporé à la formulation de crème ou de sérum afin d'augmenter l'hydratation de l'épiderme. Les hydrolysats de collagène sont également incorporés dans les formulations cosmétiques, même s'ils semblent moins bénéfiques que le collagène natif (Li *et al.*, 2005).

Par ailleurs, il a été montré que le collagène marin pouvait remplacer le collagène de mammifère, aujourd'hui majoritairement utilisé en cosmétique, sans influencer les propriétés de la formulation sur le pH, l'hydratation et le contenu lipidique de la peau (Swatschek *et al.*, 2002). Il possède également une forte capacité de rétention d'eau, réparation de la peau irritée, pas d'odeur, pas d'effets nocifs sur la peau (Morimura *et al.*, 2002). La marque Mériançe® a d'ailleurs développé une gamme de produit uniquement à partir de collagène marin ([lien vers le site web](#)).

➤ *Conservation microbienne du collagène pour un usage cosmétique*

Un produit cosmétique peut être contaminé par des microorganismes de différentes manières, que ce soit par la matière première utilisée ou bien au cours de sa fabrication (locaux, matériel, personnel...). L'utilisation de matière première, tels que les co-produits de poisson, favorise cette contamination. En effet, ils sont exclus du circuit de transformation, et ne sont donc pas protégés de la contamination comme le sont les denrées alimentaires. Le développement bactérien est d'autant plus important que le poisson est un produit qui se dégrade rapidement, s'il n'est pas conservé au frais. Ainsi, le collagène extrait de peaux de saumon est particulièrement susceptible de présenter une charge microbienne importante à l'issue du procédé d'extraction. De plus, le collagène représente, par sa nature protéique, un milieu de croissance idéal pour les microorganismes d'autant plus si la formulation contient de l'eau, un paramètre favorisant la croissance de toute cellule, y compris les cellules microbiennes.

Or, s'il est destiné au marché des cosmétiques, le produit doit répondre aux réglementations européennes en vigueur qui exigent que le rapport de sécurité du produit précise: les spécifications microbiologiques et les résultats du challenge test\* (Règlement CE 1223 2009). Ce type de produit est dit de catégorie 2 et le nombre total de micro-organismes mésophiles aérobies ne doit pas dépasser  $10^3$  UFC/g ou  $10^3$  UFC/mL dans 0,1g ou 0,1mL de produit, la limite maximale acceptable étant  $5 \times 10^3$  UFC/mL (Porracchia, 2006). L'introduction de conservateurs dans la préparation de collagène va permettre de diminuer la charge microbienne à l'issue de l'extraction mais également de la maintenir faible pour lui garantir une durée de vie suffisante, et également pour assurer une sécurité d'utilisation maximale au consommateur. Par ailleurs, c'est une formulation présentant un milieu riche en milieu nutritif qui devra donc contenir une quantité suffisante de conservateur.

Le conservateur désigne toute substance ou mélange de substance permettant de lutter contre la dégradation chimique ou microbiologique d'un produit. Plus particulièrement, les conservateurs antimicrobiens s'opposent aux dégradations d'origine bactérienne ou fongique (champignons microscopiques ou levures) (Fernandez *et al.*, 2012). Il existe plusieurs catégories de conservateurs antimicrobiens (bactériostatiques, bactéricides, fongistatiques, fongicides) et ils peuvent agir sur la dénaturation des protéines, sur l'altération des systèmes enzymatiques de la cellule bactérienne ou encore modifier son système de reproduction. Ils peuvent être d'origine synthétique, c'est le cas des acides organiques et des parabènes, ou d'origine naturelle, comme huiles essentielles ou les extraits naturels. Les parabènes sont actuellement très controversés en raison de leur toxicité potentielle (Darbre *et al.*, 2004 ; Oishi, 2002) et il semble donc difficile de les intégrer dans la formulation d'un nouvel ingrédient sur le marché.

Plus largement, le séchage du produit peut également, par l'absence d'eau, ralentir le développement bactérien. Cela ne peut remplacer l'ajout de conservateur mais peut, tout du moins, maintenir plus durablement la stabilité du produit.

## **1.6 Utilisation en médecine: traitements et dispositifs médicaux**

Concernant les applications en médecine, les hydrolysats de collagène et de gélatine possèdent de nombreuses activités biologiques qui s'avèrent être des pistes intéressantes dans le traitement de certaines maladies. Par exemple, des études ont démontré leur efficacité dans le traitement de l'ostéoporose, même si le mécanisme d'action est encore mal compris

---

\* le challenge test = test réglementé, défini par différentes normes, permettant d'évaluer l'efficacité du système conservateur

(Guillerminet *et al.*, 2010; Nomura *et al.*, 2005). Également, leur activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I ou également appelée ECA ou ACE en anglais, est intéressante dans le traitement de l'hypertension (Alemán *et al.*, 2011 ; Lassoued *et al.*, 2015 ; Saiga *et al.*, 2008). En effet, cette enzyme catalyse la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, un puissant vasoconstricteur. Elle est également impliquée dans l'inactivation de la bradykinine, un puissant vasodilatateur. Ces deux actions de l'ECA en font la cible idéale du traitement contre des pathologies cardiovasculaires (Lassoued *et al.* 2015). D'autres activités biologiques sont encore à explorer comme les activités anticancer (Aleman *et al.* 2011) ou encore anti diabète (Li-Chan *et al.*, 2012).

Le collagène natif et la gélatine sont utilisés pour des applications médicales en tant que biomatériaux. Ce terme désigne «une substance conçue pour prendre une forme qui, seule ou à l'intérieur d'un système complexe, est utilisée pour diriger, par le contrôle d'interactions avec des composants du système vivant, l'évolution d'une procédure thérapeutique ou de diagnostic, en médecine humaine et vétérinaire» (Williams, 2009). Aujourd'hui la majorité des produits commercialisés sont fabriqués à partir de collagène de mammifère. Or, le collagène marin est, grâce à ses propriétés proches de celles des mammifères, un candidat idéal en tant que source alternative avec l'avantage majeur de ne pas présenter de contre indications religieuses ou sanitaires. Cependant, il est nécessaire d'améliorer ses propriétés technofonctionnelles en le réticulant, c'est-à-dire en formant un réseau tridimensionnel par la création de liaisons covalentes entre les molécules. Cette réaction permet de former des structures, comme des hydrogels ou des éponges, utilisés comme matrice dans les biomatériaux. C'est le sujet de la deuxième partie de cet état de l'art.

## **2. LA RÉTICULATION DU COLLAGÈNE MARIN POUR DES APPLICATIONS EN INGÉNIERIE TISSULAIRE**

### **2.1 Généralités sur les biomatériaux**

Le développement des biomatériaux a débuté dans les années 50. Ce secteur est à l'interface entre de nombreux domaines comme la chimie, l'ingénierie chimique et biologique, la science des matériaux, la mécanique ou encore la biologie et la médecine. Parallèlement, il implique des considérations d'entrepreneurs et d'organismes de réglementation, mais également des considérations éthiques. Depuis son apparition, il n'a cessé d'évoluer et a permis l'introduction d'innovations et le développement de secteurs émergents, comme les champs de l'ingénierie tissulaire, les outils de diagnostic clinique et les méthodes de libération contrôlée de substances actives ou médicamenteuses (Ratner et Bryant, 2004). Williams (2009) définit un biomatériau comme « une substance conçue pour prendre une forme qui, seule ou à l'intérieur d'un système complexe, est utilisée pour diriger, par le contrôle d'interactions avec des composés du système vivant, l'évolution d'une procédure thérapeutique ou de diagnostic, en médecine humaine et vétérinaire. » Ainsi, un biomatériau est incorporé au sein d'un dispositif médical défini par le Code de la santé publique<sup>†</sup> comme « tout instrument, appareil, équipement, matière, produit, à l'exception des produits d'origine humaine, ou autre article utilisé seul ou en association, y compris les accessoires et logiciels nécessaires au bon fonctionnement de celui-ci, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins médicales et dont l'action principale voulue n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens. Constitue également un dispositif médical le logiciel destiné par le fabricant à être utilisé spécifiquement à des fins diagnostiques ou thérapeutiques. Les dispositifs médicaux qui sont conçus pour être implantés en totalité ou en partie dans le corps humain ou placés dans un orifice naturel, et qui dépendent pour leur bon fonctionnement d'une source d'énergie électrique ou de toute source d'énergie autre que celle qui est générée directement par le corps humain ou la pesanteur, sont dénommés dispositifs médicaux implantables actifs». Les dispositifs médicaux constituent ainsi des technologies médicales efficaces qui vont permettre d'améliorer la qualité en santé, mais qui représentent aussi de nombreuses opportunités d'innovation en recherche et développement.

Les biomatériaux sont inspirés des processus se déroulant dans le corps. Ainsi, lorsqu'un dispositif est implanté chez un hôte, il ne se déclenche pas une réaction de cicatrisation comme

---

<sup>†</sup> L. 5211-1 du Code de la santé publique, modifié par ordonnance n°2010-250 du 11 mars 2010 – Art. 2

pour une blessure, mais bien une réaction face à un corps étranger. C'est ce qu'illustre la Figure 15. On voit que, très rapidement, des protéines non spécifiques de l'hôte adsorbent la surface du corps étranger. Ces protéines sont les instigateurs du mécanisme de réaction. Au bout de 30 minutes à quelques heures, de nombreuses cellules de types différents (monocytes, leukocytes et plaquettes), normalement impliquées dans le processus de cicatrisation, adhèrent à la surface du biomatériau. Cela provoque l'activation des cytokines suivie d'un processus proinflammatoire. Quelques jours après, un complexe cellulaire géant est ainsi formé. Sa taille étant beaucoup plus grande que celle des macrophages, cela les empêche de phagocyter le biomatériau. L'inflammation chronique provoque la fusion des macrophages entre eux pour former un corps cellulaire multinucléé étranger géant qui persistera durant toute la vie de l'implant. Enfin, après quelques semaines, il se forme une capsule de collagène, dense et avasculaire de 50 à 200 $\mu$ m d'épaisseur, autour du corps étranger.

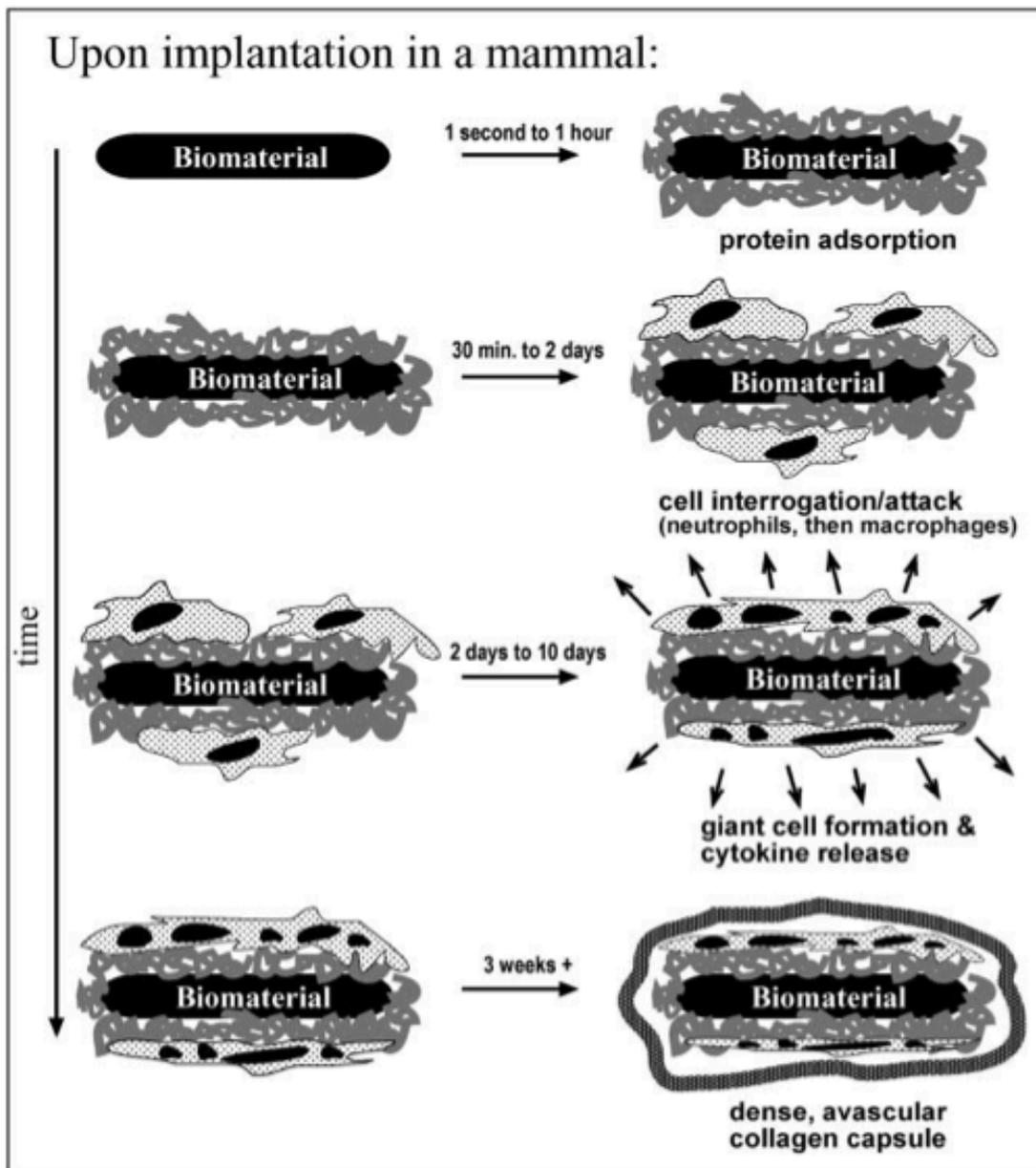


Figure 15. Schématisation du processus de réaction à un corps étranger chez les mammifères, qui se déroule lors de l'implantation d'un biomatériau synthétique (tiré de Ratner et Bryant 2004).

Les biomatériaux sont utilisés dans des domaines très variés, comme le montre le Tableau 8. Les applications sont classées en deux catégories: les usages médicaux et non médicaux. La diversité des dispositifs regroupe des matériaux synthétiques, c'est le cas des pacemakers, et des matériaux naturels modifiés grâce aux connaissances biologiques, comme les cultures cellulaires.

Tableau 8. Différentes usages faits des biomatériaux (tiré de Ratner et Bryant, 2004).

<b>Medical uses</b>	<b>Non-medical uses</b>
Artery graft	Arrays for DNA and diagnostics
Breast implant	Bioremediation materials
Cochlear implant	Biosensors
Ear drainage tube	Bioseparations, chromatography
Dental implant	Biofouling-resistant materials
Feeding tube	Biomimetics for new materials
Glaucoma drainage tube	Cell culture
Hydrocephalous shunt	Controlled release for agriculture
Intraocular lens	Electrophoresis materials
Joints (hip, knee, shoulder)	Fuel cells (biomass)
Keratoprosthesis	MEMS
Left ventricular assist device (LVAD)	Muscles (artificial) and actuators
Mechanical heart valve	Nanofabrication
Nerve guidance tube	NEMS
Ophthalmic drug delivery device	Neural computing/biocomputer
Pacemaker	Smart clothing for biowarfare
Renal dialyzer	Yeast array chip
Stent	
Tissue adhesive	
Urinary catheter	
Valve, heart	
Wound dressing	
X-ray guide	
Zirconium knee joint	

## 2.2 Le génie tissulaire

Le génie tissulaire désigne l'ensemble des technologies utilisant des cellules vivantes ou des biomatériaux (synthétiques ou naturels) dans le but de reconstruire ou régénérer des tissus et organes humains, de remplacer un organe déficient ou de modifier des gènes de l'organisme. Jusqu'à maintenant, les organes étaient remplacés grâce à des transplantations. Cependant, bien que de nombreux patients aient été soignés à travers le monde, la transplantation pose à l'heure actuelle de nombreux problèmes (Auger, 2000). En effet, les listes d'attentes sont trop longues pour des greffes vitales et elles présentent un risque élevé de transmission de virus, même pour les xénotransplantations. De plus, les patients sont contraints de suivre un traitement immunosuppresseur à vie, ce qui est un inconvénient majeur. Enfin, concernant la solution du clonage, il persiste encore des incertitudes techniques et éthiques. Ainsi, le génie tissulaire offre la possibilité de reconstruire des organes détériorés (peau, tendon, os, cartilage, vaisseau

sanguin, ligaments), au travers de cellules autologues transformées génétiquement, ou de tissus et d'organes reconstruits *in vitro*. Le concept-clé est la reproduction, quoique qu'avec des caractéristiques simplifiées de l'architecture tissulaire, qui conduit à une intégration immédiate et interactive de ces tissus dans le corps humain (Auger *et al.* 2000). Langer et Vacanti (1993, 1999) soulignent, dès les années 1990, que : (i) le matériel sélectionné pour servir de matrice doit être biocompatible et il doit pouvoir adopter la configuration et la forme désirées ; (ii) les interactions entre les cellules hôtes et le biomatériau doivent être considérées sur la base des besoins spécifiques des cellules, tant sur le plan métabolique qu'en terme de structure du support 3D. En pratique, des cellules, des gènes et des protéines sont délivrés via un matériau biodégradable dans le but d'obtenir la régénération tissulaire. Pour ce faire, le système requière une matrice 3-D. Ainsi, on construit des échafaudages (*scaffold*) qui vont guider la croissance des cellules et fournir un transport adéquat des nutriments et des facteurs de croissance pour mimer les tissus désirés. Ces échafaudages biocompatibles se détruiront au fur et à mesure de la régénération du tissu.

### **2.2.1 L'utilisation du collagène dans le domaine du génie tissulaire**

#### *2.2.1.1 Le collagène comme biomatériau*

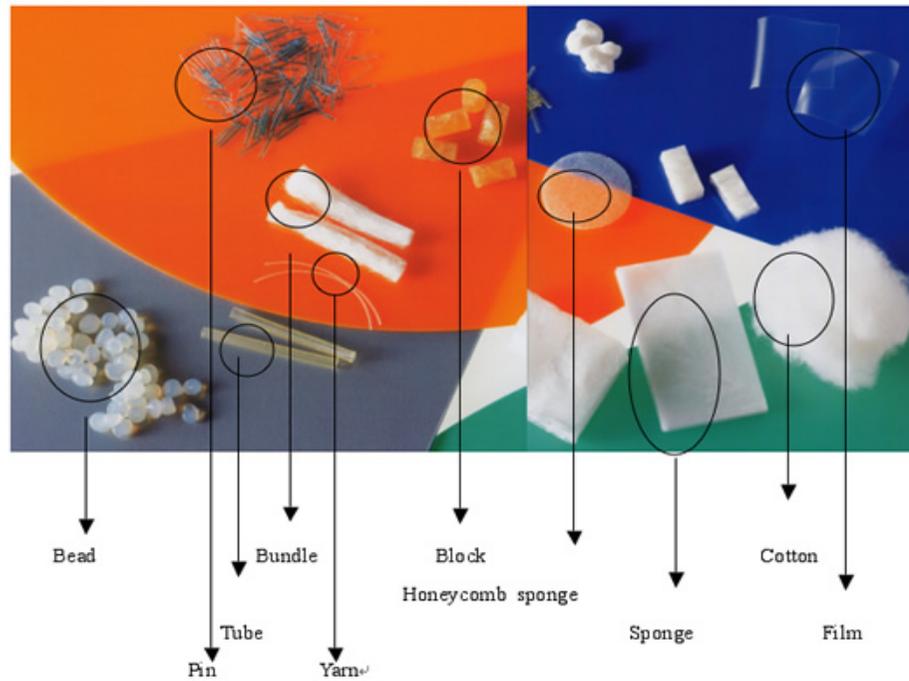
De nombreux polymères d'origine naturelle tels que le collagène, la gélatine, la fibrine, les alginates, la cellulose, le chitosan, l'acide hyaluronique ou des composés synthétiques analogues entrent dans la composition des biomatériaux. Le polymère de collagène naturel est le plus recherché pour des applications dans le domaine de la santé, grâce aux nombreux avantages qu'il présente et qui sont listés dans le Tableau 9. Tout d'abord, il est présent dans de nombreux tissus et organes où il joue un rôle important dans leur formation, mais également dans divers processus d'expression cellulaire (Lee *et al.*, 2001). En plus de cela, on le retrouve dans différents taxons du règne animal, depuis les plus primitifs comme la méduse (Hoyer *et al.* 2014) ou l'éponge (Pallela *et al.* 2011), jusqu'aux plus évolués comme les mammifères, où il représente la protéine la plus abondante de l'organisme (Harkness, 1961). Nous avons d'ailleurs évoqué précédemment les différentes sources, mais également les méthodes d'extraction et de caractérisation utilisées. De plus, l'utilisation du collagène s'est rapidement et largement développée dans les domaines de bioingénierie en raison de sa biocompatibilité, i.e. sa capacité à supporter l'adhésion de cellules et leur prolifération. Il est aussi biodégradable et faiblement antigénique, i.e. il ne provoque pas de rejet. Toutefois, la principale raison de son utilisation est sa capacité à former des superstructures solides et stables, comme les fibres. Ces caractéristiques permettent de le modéliser sous différentes formes en fonction de l'application

recherchée, comme le montre la Figure 16. Il peut être utilisé dans différents procédés techniques et sous différentes structures moléculaires (micro et nanostructures), en poudre, en solutions injectables, en films, en membranes ou en matrices (éponge) qui peuvent par ailleurs être utilisés dans d'autres domaines d'application que le génie tissulaire comme la cosmétique, la chirurgie esthétique, en tant que fil de suture, de pansement ou encore pour réaliser des cultures cellulaires 3D. L'obtention de ces différentes formes « à façon » est permise par des procédés de réticulation, que nous détaillerons plus tard, et par la combinaison du collagène avec des minéraux, des facteurs de croissance ou encore des polymères synthétiques comme l'acide polylactique ou naturels, comme les glycosaminoglycanes, comme le montre le Tableau 10.

Tableau 9. Avantages et inconvénients du collagène utilisé en tant que biomatériau (tiré de Lee *et al.*, 2001).

Avantages	Inconvénients
Biodisponible (30% des tissus des vertébrés)	Variabilité des collagènes isolés (densité, taille des fibres, traces d'impuretés...)
Extraction et purification aisées	Fort coût du collagène pur de type I
Non antigénique, non-toxique, biocompatible	Effets secondaires possibles : encéphalopathie spongiforme bovine, minéralisation...
Biodégradable	Variabilité des taux de dégradation enzymatique
Bioréabsorbable	Hydrophilie qui conduit à un gonflement et à une libération plus rapide de substances
Aisément modifiable pour produire différents types de matériaux (en fonction des fonctionnalités recherchées)	Mise en œuvre complexes
Hémostatique (favorise la coagulation)	
Compatible avec d'autres polymères (naturels ou de synthèse)	
Synergique avec des composés bioactifs	

*État de l'art*  
*La molécule de collagène*



Forme	Utilisations
Gel en solution	cosmétique chirurgie plastique (injection) administration de médicaments pansement remplacement de l'humeur vitrée viscochirurgie revêtement de prothèses culture cellulaire 3D
Eponge/coton	culture cellulaire 3D pansement agent hémostatique équivalent dermique administration de médicaments
Tube	matrice de culture cellulaire substituts de tissus tubulaires régénération nerveuse
Sphère/bille	microsupport pour culture cellulaire administration de médicaments
Membrane/film	pansement régénération tissulaire guidée membrane de dialyse patchs bouclier pour cornée (lentilles) chirurgie du rachis anti-adhérence
Forme rigide	réparation osseuse
Fil	sutures

Figure 16. Aperçu des formes de collagène (tiré de Chevallay et Herbage 2000).

*État de l'art*  
*La molécule de collagène*

Tableau 10. Aperçu des applications biomédicales des hydrogels à base de collagène (tiré Van Vlierberghe *et al.* 2011)

type of collagen	application
glutaraldehyde-cross-linked collagen/chitosan, bFGF/collagen, collagen microbeads	adipose tissue
compressed collagen	bladder
collagen/cell assembly, p(DLLA-co-TMC)/collagen, collagen-chitosan nanofiber, PLGA microsphere/collagen, fibroin/collagen, TMC/DNA-containing collagen, collagen/citric acid derivative, polylactide/silk fibroin/gelatin	blood vessel
collagen/nanohydroxyapatite, dense collagen, polyvinyl alcohol/collagen/hydroxyapatite, collagen microspheres, collagen/nanotube, collagen I/PLGA- $\beta$ -TCP, collagen fiber/PLA, collagen/glycosaminoglycan, nano-HA/collagen/PLLA, collagen/OP-1, PCL/collagen, RhBMP-2 microspheres/chitosan/collagen, adenovirus vectors/collagen/chitosan	bone
collagen/chitosan/GAG, adipic dihydrazide-modified collagen/hyaluronic acid, PLGA/collagen, micronized collagen sponges, type II collagen, collagen propeptides, type II collagen/chondroitin sulfate/hyaluronan, collagen/HA/chondroitin sulfate	cartilage
dendrimer-cross-linked collagen, hydroxypropyl chitosan/gelatin	cornea
CO(3)Ap-collagen	dental
photo-cross-linked collagen, EDC-cross-linked electrospun collagen, poly(lactic-co-glycolic acid)/collagen, PHBV/collagen, collagen/hyaluronan/chitosan, collagen/hyaluronic acid, TPU/collagen, collagen/glycosaminoglycan, poly(lactic acid-co-caprolactone)/collagen, stromal cell-derived factor 1 $\alpha$ -loaded heparinized collagen, collagen/hyaluronan/chitosan, gelatin/alginate	general
type I collagen, collagen/GAG	heart
type I and II collagen/GAG	intervertebral disk
collagen/silk	ligament
poly(lactic-co-glycolic acid)/collagen, collagen/chitosan/heparin	liver
cross-linked atelocollagen	muscle
collagen/microchannels, collagen/hyaluronic acid, collagen/heparan sulfate	nerve
collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-sulfate, collagen	nucleus pulposus
UV-cross-linked collagen	ophthalmology
PLGA/collagen	pancreas
compressed collagen, cross-linked collagen/chondroitin sulfate/hyaluronic acid, $\beta$ -glycerol phosphate/collagen/chitosan, collagen/elastin, electrospun collagen/PCL, poly[(D,L-lactide)-co-glycolide]/collagen	skin
collagen	urological



### 2.2.1.2 Définition des hydrogels et éponges de collagène

Dans notre étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux hydrogels et aux éponges. L'utilisation des hydrogels a débuté dans les années 1960 pour la fabrication des lentilles de contact (Wichterle et Lim, 1960). Le terme d'hydrogel désigne, d'après (Peppas *et al.*, 2000) des réseaux tridimensionnels hydrophiles et polymériques capables de s'imbiber d'une grande quantité d'eau ou de fluides biologiques (jusqu'à 99%). Ils sont composés d'homopolymères ou de copolymères initialement solubles dans l'eau et devenus insolubles après réticulation chimique ou physique, permettant d'apporter une structure en réseau et une intégrité physique. Ces hydrogels présentent une compatibilité thermodynamique avec l'eau qui leur permet de gonfler en milieu aqueux. Par cet important contenu en eau et leur consistance molle, ils imitent parfaitement les tissus naturels de l'organisme. Quant au terme d'éponge, il désigne simplement l'hydrogel déshydraté par un procédé de lyophilisation permettant ainsi l'obtention d'une structure poreuse. Les hydrogels ont une fonction « d'échafaudage » dans le biomatériau final, sur lequel vont être implantés les différents composants à diffuser et qui va servir de support aux nouvelles cellules synthétisées pour se développer. Le terme de « scaffold » est employé dans la littérature. Par ailleurs, la formation d'un nouveau tissu sur cette structure est énormément influencé par sa porosité, et plus précisément par la taille des pores, leur taille, leur interconnectivité et leur nombre. Ainsi, de nombreuses études ont travaillé sur l'obtention de « scaffold » poreuses aux propriétés désirées et Dalton *et al.* (2009) ont recensé des publications qui décrivent ces différentes techniques. Plus récemment, on peut également citer les travaux de Dainiak *et al.* (2010) concernant la préparation de cryogels à base de gélatine et fibrinogène pour une utilisation en tant que matrices dermiques utilisées pour la cicatrisation des plaies.

De manière générale, la découverte des propriétés régénératives du collagène a ouvert le champ vers de nouvelles applications à très haute valeur ajoutée en médecine régénérative (Kawaguchi *et al.*, 2013). Par ailleurs, au-delà de sa simple utilisation comme composant de biomatériau, l'étude du collagène natif dans les systèmes d'ingénierie tissulaire peut conduire à une meilleure compréhension des pathologies à traiter (Lee *et al.* 2001).

### 2.2.2 Quelques exemples d'application d'ingénierie tissulaire utilisant des hydrogels de collagène

Nous allons à présent décrire de quelle manière les « scaffolds » interviennent dans le processus de formation de nouveaux tissus dans des traitements en ingénierie tissulaire.

### 2.2.2.1 Les systèmes de régénération de la peau

Le premier exemple présente un système utilisant un gel de collagène. Cette méthode a été la première à démontrer les vastes possibilités du génie tissulaire (Auger, 2000). En effet, l'incorporation de fibroblastes dans un gel de collagène permet de produire des équivalents dermiques pouvant ensuite être épidermisés par ensemencement de kératinocytes à leur surface. Le résultat permet d'obtenir une peau reconstruite vivante et pouvant atteindre un excellent niveau de différenciation dans des conditions de cultures adéquates. Le protocole est décrit sur la Figure 17. Le gel obtenu par un mélange de collagène bovin et de fibroblastes humain est coulé dans une boîte de Pétri contenant un anneau de papier sur lequel va s'ancrer le gel. Après gélification, les fibroblastes exercent une traction sur le gel mais sa contraction en surface est empêchée grâce à la présence de l'anneau de papier sur lequel il est ancré, et seule son épaisseur diminue. Des kératinocytes sont ensemencés sur le derme ainsi reconstruit et on obtient, dix jours plus tard, une peau reconstruite.

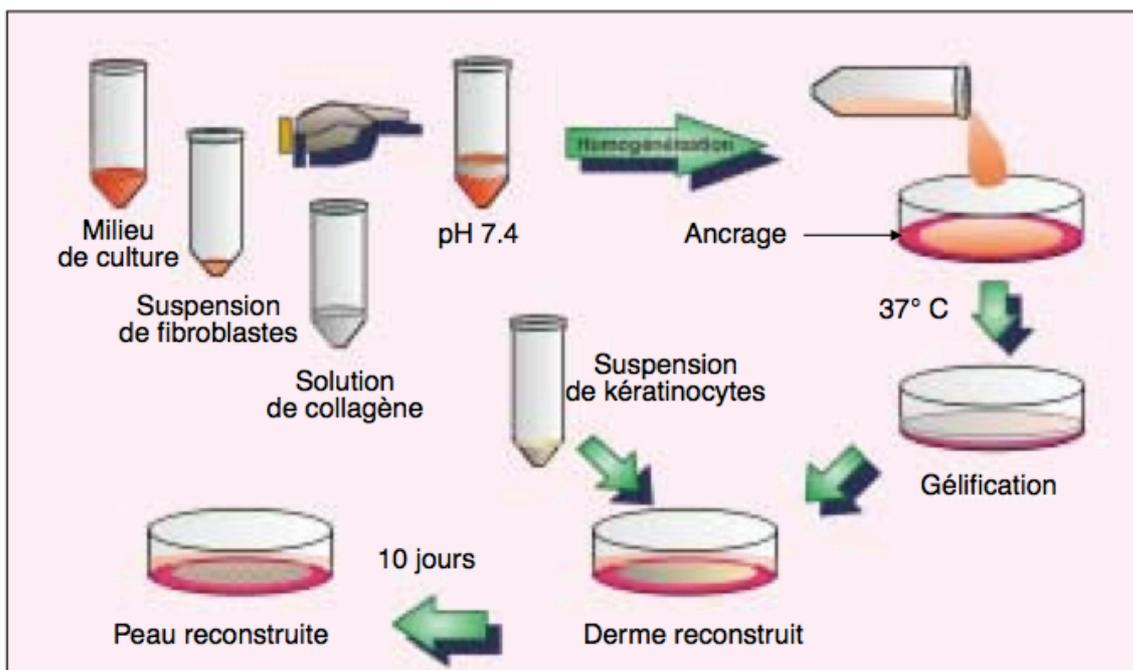


Figure 17. Production *in vitro* d'une peau reconstruite à partir d'un gel de collagène (tiré de Auger *et al.*, 2000).

Cette méthode de reconstruction tissulaire est applicable à d'autres organes comme la cornée (Germain *et al.*, 1999), les ligaments (Goulet *et al.*, 1997), les bronches (Paquette *et al.*, 1998) ou encore le cartilage mais le manque de résistance mécanique du tissu obtenu par cette méthode rend difficile une application clinique. C'est cet aspect qui a conduit au développement d'une nouvelle approche, basée sur l'utilisation de biomatériaux permettant l'implantation de cellules

et leur culture *in vitro*, grâce à une éponge de collagène, comme le montre la Figure 18. Dans cet exemple, le biomatériau est composé de collagène bovin, de chitosan et de chondroïtine sulfate. Le mélange est solubilisé dans l'acide acétique et coulé dans des plaques de cultures qui sont ensuite congelées puis lyophilisées pour obtenir des éponges. Elles sont réhydratées dans du milieu de culture et des fibroblastes humains sont ensemencés à la surface des éponges. Dix jours plus tard, des kératinocytes humains sont ensemencés sur les fibroblastes. Puis, au jour 17, les peaux reconstruites sont transférées sur du papier filtre à l'interface air-liquide dans des boîtes de Petri et subissent une maturation de 15 à 21 jours. Les cellules une fois incorporées sur le support sécrètent des quantités variables de matrice extracellulaire conduisant à la reconstruction d'une structure tissulaire proche du tissu d'origine, mais comprenant également la trame biodégradable du biomatériau (Auger, 2000).

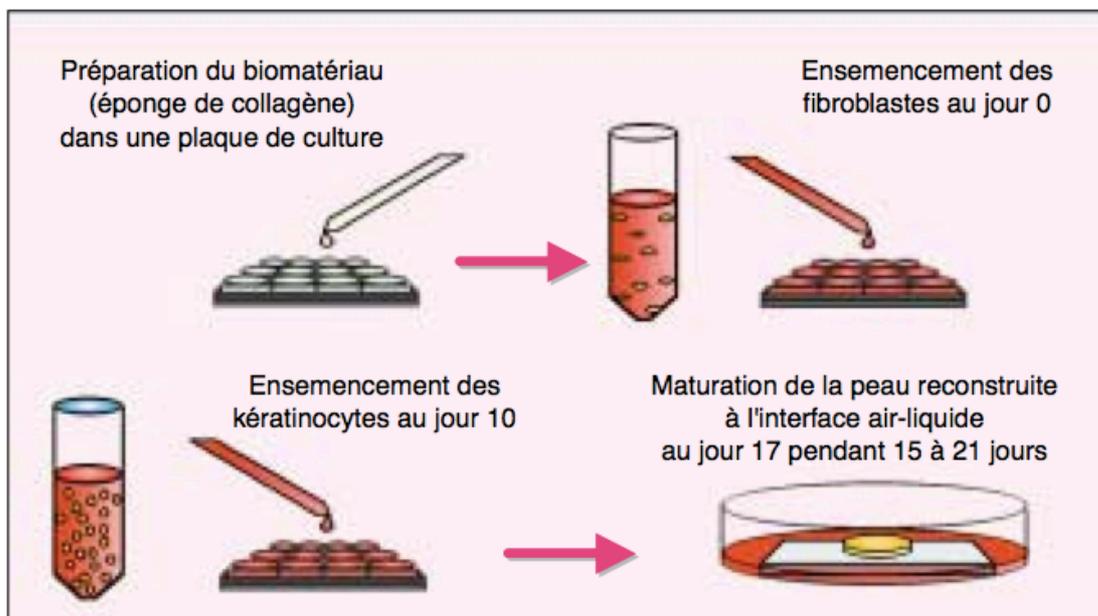


Figure 18. Production *in vitro* d'une peau reconstruite à partir d'une éponge de collagène (tiré de Auger *et al.*, 2000).

#### 2.2.2.2 Les systèmes de régénération des os

La Figure 19 schématise le protocole utilisé pour un système de régénération osseuse. Tout d'abord, un prélèvement de moelle osseuse est réalisé afin d'isoler et de mettre en cultures *in vitro* les cellules souches. Une fois cultivées, elles sont ensemencées sur un support poreux, comme une éponge de collagène.

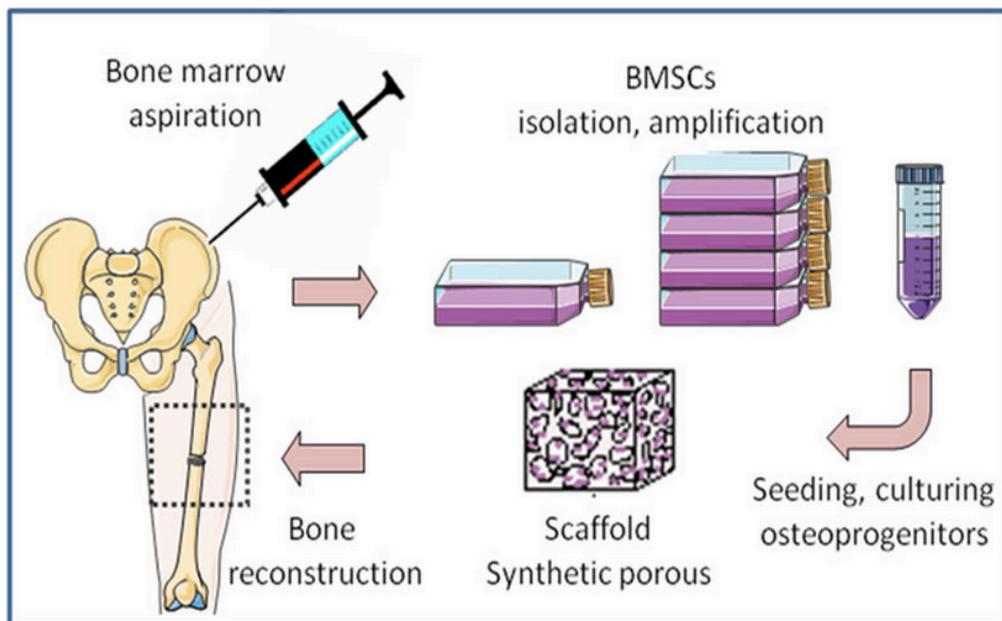


Figure 19. Isolement puis mise en culture in vitro de cellules souches humaines à partir de moelle osseuse (tiré du site web du projet [REBORNE](#)).

### 2.2.2.3 Les systèmes de libération de substances médicamenteuses

Le système de libération de substances médicamenteuses présenté dans la Figure 20 est un peu à part de l'ingénierie tissulaire ; on pourrait plutôt le considérer comme une aide à la régénération tissulaire. Comme pour les deux autres systèmes décrits, le médicament est intégré à la matrice de collagène. Une fois en conditions physiologique, il déclenche les phénomènes de désorption et de diffusion rapide des substances. Ensuite, la matrice de collagène s'hydrate et se gonfle et se présentent alors deux possibilités :

- (1) une diffusion lente; la matrice de collagène reste intacte et poursuit une diffusion lente des substances pour n'en contenir plus qu'une très faible quantité
- (2) une érosion; la matrice de collagène se dégrade et libère la totalité des substances qu'elle contenait

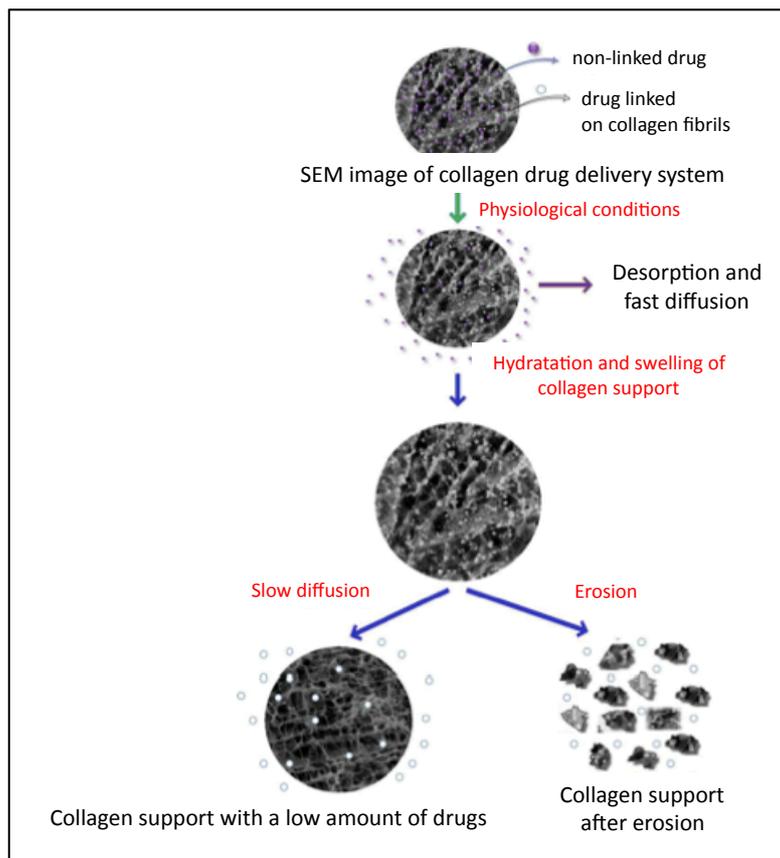


Figure 20. Libération de substance médicamenteuse de la matirce de collagène (tirée de Albu *et al.*, 2011).

L'entreprise Biomatlante, située à Vigneux-de-Bretagne (44), commercialise ce type de produit. Le produit EZCure™ (Figure 21) est une membrane de collagène porcin réticulé qui favorise la prolifération des cellules ostéogéniques dans les processus de régénération tissulaire guidée.



Figure 21. EZCure™, une membrane de collagène commercialisée .

### **2.3 La réticulation du collagène**

Malgré les nombreux avantages que possède le collagène par rapport à d'autres polymères naturels, il a l'inconvénient de présenter des propriétés mécaniques faibles, une fois extrait du matériel d'origine. Il est également instable sur le plan thermique et il est sensible à la dégradation par des protéases. Pour surmonter ces inconvénients, il est possible de créer des liaisons croisées par des procédés de réticulation dans le but d'en améliorer les caractéristiques physiques telles que la résistance mécanique, la stabilité thermique et la résistance à la protéolyse, tous ces éléments contribuant à accroître sa biocompatibilité.

La médecine régénérative nécessite des propriétés rhéologiques spécifiques que ne possèdent pas naturellement les collagènes de mammifères ou les collagènes de poisson. Pour ces applications très spécifiques, la structure du collagène doit être renforcée par un procédé de réticulation. Celui-ci consiste à former des liaisons croisées covalentes entre les chaînes de collagène, comme le montre la Figure 22. Ce procédé va permettre d'augmenter les propriétés mécaniques du collagène, sa stabilité thermique, réduire sa vulnérabilité vis à vis de la dégradation enzymatique et enfin, prévenir une absorption ou dégradation rapide par l'organisme de l'hôte.

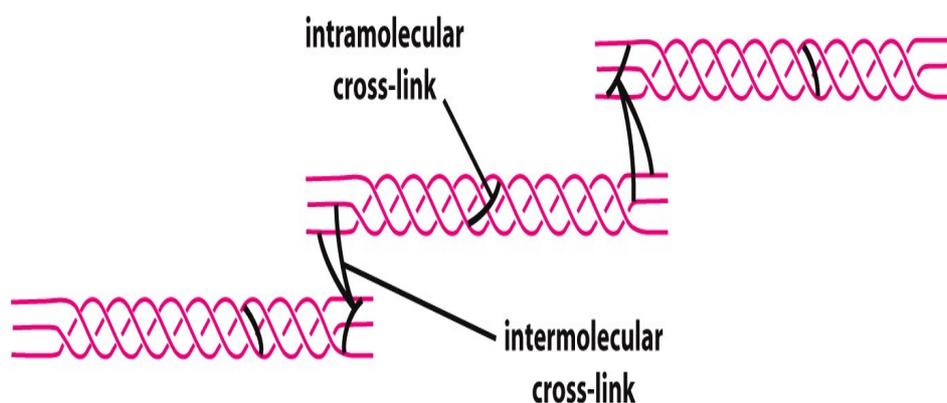


Figure 19-65 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figure 22. La réticulation permet de former un ou plusieurs réseaux tridimensionnels par la création de liaisons covalentes entre les chaînes moléculaires (d'après Molecular Biology of the Cell (©Garland Science 2008)).

### 2.3.1 Procédés de réticulation du collagène marin

#### 2.3.1.1 Les différents types de réticulation

Le collagène de type I a été réticulé par de nombreuses méthodes incluant l'utilisation d'agents chimiques, tels que le glutaraldéhyde (Chiou *et al.*, 2008 ; Englert *et al.*, 2007), les carbodiimides (Chandika *et al.*, 2015 ; Hoyer *et al.*, 2012 ; Song *et al.*, 2006 ; Yunoki *et al.*, 2004) ou encore le génipine (Fernandes-Silva *et al.*, 2013). Le Tableau 11 compare le gain en stabilité thermique de différents collagènes réticulés par voie chimique, il précise également le degré de toxicité des agents ainsi que le changement de couleur observé. Il existe également de nombreuses méthodes physiques pour la réticulation du collagène, comme par exemple le séchage par déshydratation, les rayonnements UV, la photo-réticulation et l'exposition aux micro-ondes. Mais ces traitements produisent des liaisons de plus faible énergie par rapport à la réticulation chimique et ils impliquent généralement un temps de pose long, ce qui augmente le risque de dégradation du collagène. Toutefois, en raison de la toxicité des agents de réticulation chimique, ou de la difficulté de réaliser une réticulation à grande échelle, le développement de méthodes alternatives mettant en œuvre des catalyseurs enzymatiques présente un intérêt majeur.

Tableau 11. Comparaison de collagènes réticulés issus d'un même collagène natif de tendon de boeuf (température de fusion 45°C) (Zeugolis, 2008).

Agent de réticulation	Toxicité des agents	Couleur des fibres de collagène après réticulation	$\Delta T_p$ (°C) *
BSC (Basic Chromium Sulfate)	+	verte	61
Glycerol doglycidyl éther (Epoxyde)	+	Jaune-orangée	41
GTA (Glutaraldéhyde)	++	Jaune-orangée	30
Génipine	+	Bleue	22
Quinones	+	Brune	21
Isocyanates	+	-	21
DPPA : Azoture de diphénylphosphoryle (Acyl azide)	+	-	19

\* $\Delta T_p$  = température de fusion du collagène réticulé – température de fusion du collagène natif (=45°C)

#### 2.3.1.1.1 *La réticulation du collagène par voie enzymatique*

L'utilisation d'enzymes pour la réticulation présente un potentiel considérable comme traitement alternatif pour la stabilisation de matériaux à base de collagène. En effet, il a été prouvé que la réticulation par voie enzymatique était non cytotoxique et parfaitement biocompatible (Chen *et al.*, 2005). Par ailleurs, le collagène modifié par voie enzymatique a montré une plus grande résistance à la dégradation par des protéases endogènes. Il a été également constaté une amélioration dans la fixation des cellules, la diffusion et la prolifération des ostéoblastes et des fibroblastes humains sur des substrats de collagène réticulés par voie enzymatique (par rapport à la culture de cellules sur du collagène non réticulé) (Chau *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2005 ; Nomura *et al.*, 2001a,b ; Spurlin *et al.*, 2009 ; Stachel *et al.*, 2010 ; Zhu et Tramper, 2008).

Plusieurs groupes d'enzymes ont la capacité de réaliser les réactions de réticulation : le premier groupe est constitué des transglutaminases (EC 2.3.2.13) d'origine microbienne (mTG). La mTG est utilisée en agroalimentaire pour améliorer la solidité, l'élasticité et la rétention d'eau des produits carnés finis (saucisses, viandes hachés, produits reconstitués...), mais également pour les produits de la mer (filets de poissons reconstitués, surimi...) et les produits laitiers allégés où la mTG joue un rôle de texturant et de stabilisant (www.ajinomoto.de). Le potentiel d'application des TG notamment en ingénierie tissulaire mais également dans le traitement des

textiles et du cuir est discuté par Zhu et Tramper (2008). Le second groupe est constitué des oxydoréductases (phénoloxydases) dont les tyrosinases (EC 1.14.18.1), les laccases (EC 1.10.3.2), les peroxydases (EC 1.11.1.x) et les lysil oxydases (EC 1.4.3.13). La revue de littérature de Heck *et al.* (2013) décrit les spécificités et modes d'actions de ces différentes enzymes.

Dans la littérature, les exemples de travaux sur la réticulation enzymatique concernent majoritairement les collagènes issus de mammifères terrestres et impliquent les TG de diverses origines. Jus *et al.* (2011) ont travaillé sur l'effet des tyrosinases et des laccases sur la réticulation de collagène non marin. Les travaux de réticulation enzymatique sur le collagène marin sont beaucoup plus rares et la plupart des études portent sur la réticulation par voie chimique (Tableau 12). A titre d'exemple, on peut citer une étude de Nomura *et al.* (2001b) qui porte sur la réticulation du collagène de type I de requin par la mTG en présence d'urée, ainsi que celle de (Gómez-Guillén *et al.*, 2001) qui étudie l'effet de la mTG sur les propriétés rhéologiques de la gélatine issue de peau de cardine. Plus récemment, Da Silva *et al.* (2014) ont étudié les propriétés et la réponse cellulaire d'un hydrogel combiné de gélatine de tilapia et de chitosan réticulé par la mTG. De ce fait, l'ensemble des résultats obtenus pour la réticulation du collagène marin par voie chimique sert de référence pour étudier l'impact de la réticulation enzymatique. Dans le cadre du projet Pesk&Co, nous nous intéresserons à la réticulation du collagène de peau de saumon par la mTG, en comparant avec une réticulation au glutaraldéhyde.

Tableau 12. Comparaison de collagènes marins réticulés par voie chimique.

Travaux	Origine	Agent de réticulation chimique	$\Delta T_p$ (°C)*	Force de compression
Yunoki <i>et al.</i> , 2004	Peau de saumon du Pacifique ( <i>Oncorhynchus keta</i> )	Carbodiimide (EDC)	28	nd
Song <i>et al.</i> , 2006	Méduse ( <i>Stomolophus nomurai meleagris</i> )	Carbodiimide (EDC)	nd	nd
Fernandes-Silva <i>et al.</i> , 2013	Peau de petite roussette ( <i>Scyliorhinus canicula</i> )	Genipin	nd	+ 11 kPa
Hoyer <i>et al.</i> , 2012	Peau de saumon Atlantique ( <i>Salmo salar</i> )	Carbodiimide	nd	+ 28 kPa
Hoyer <i>et al.</i> , 2014	Méduse ( <i>Rhopilema esculentum</i> )	(EDC)	nd	nd

#### 2.3.1.1.2 Mécanisme d'action du glutaraldéhyde

Le glutaraldéhyde (= GTA) est un intermédiaire de synthèse organique et un composant de solution de développement de films de rayons X. Il est également utilisé comme substance active dans certains produits biocides ([www.inrs.fr](http://www.inrs.fr)). C'est également un agent de réticulation des protéines et de composés polyhydroxylés. C'est en effet un agent chimique bifonctionnel. Au niveau du collagène, il va pouvoir réagir avec deux sites réactionnels et former des liaisons covalentes entre deux terminaisons amines, comme l'illustre la Figure 23 (Englert *et al.*, 2007).



Figure 23. Réaction de réticulation du collagène par le GTA.

2.3.1.1.3 Mécanisme d'action de la transglutaminase microbienne

Le rôle de la mTG est d'incorporer des groupes amines sur des chaînes latérales glutaminyl des protéines (Figure 24). La fonction carboxamide de la glutamine s'échange avec une fonction amine d'un acide aminé (transfert de radicaux acylés), la fonction  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> d'une lysine ou une amine biogène provenant des réactions de décarboxylation (réaction de réticulation). Cette réaction n'est possible que dans la mesure où la fonction  $\alpha$ -carboxylique est bloquée sous la forme ester ou amide de façon à éliminer la charge négative exprimée par la fonction acide. La fonction carboxamide de la glutamine réagit avec une molécule d'eau pour donner une réaction de désamination en générant le glutamate ([biochim-agro.univ-lille1.fr](http://biochim-agro.univ-lille1.fr)). Mais la transglutaminase permet de catalyser d'autres réactions comme l'estérification et l'hydrolyse (Lorand et Graham, 2003).

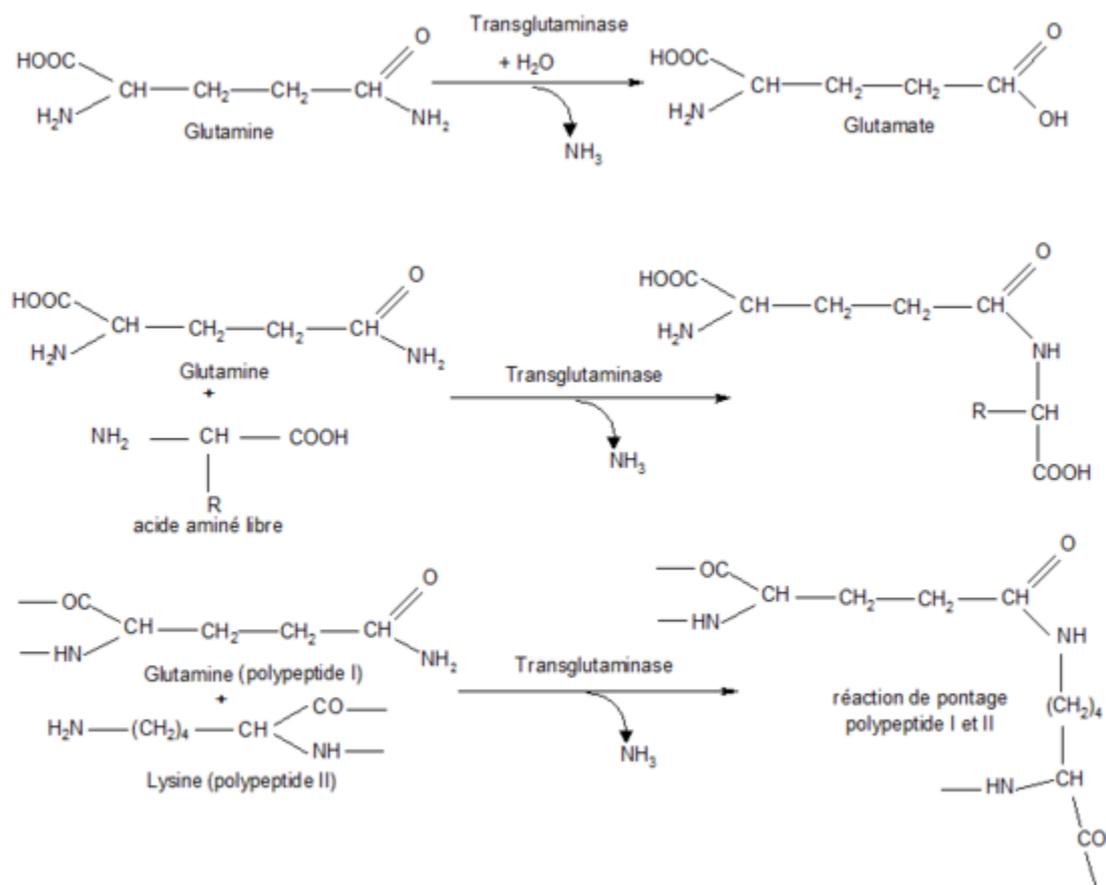


Figure 24. Réaction de transamination catalysée par la mTG (tiré de ([http://biochim-agro.univ-lille1.fr/proteines/co/ch1\\_II\\_e.html](http://biochim-agro.univ-lille1.fr/proteines/co/ch1_II_e.html))).

### 2.3.1.2 Caractérisation des hydrogels de collagène marin réticulé

Le potentiel des hydrogels de collagène réticulé utilisés comme biomatériaux et leur performance pour une application particulière dépend principalement de leur morphologie (Fernandes-Silva *et al.*, 2013 ; Van Vlierberghe *et al.*, 2011), mais également de leur stabilité thermique (Yaylaoglu *et al.*, 1999 ; Yunoki *et al.*, 2004) et de leur résistance mécanique (Chiou *et al.*, 2008). Ainsi, les différentes méthodes d'analyses décrites précédemment pour la caractérisation du collagène marin sont également utilisées pour étudier l'impact de la réticulation, permettant ainsi la fabrication d'un hydrogel « à façon » pour une application particulière, en jouant sur les différents paramètres de la réaction.

La rhéologie permet de mesurer les propriétés mécaniques et les températures de fusion et de dénaturation du collagène réticulé. Yunoki *et al.* (2004) ont montré que la réticulation de collagène de saumon Pacifique au carbodiimide augmentait la température de fusion du collagène, passant de 28°C à 47°C, rendant ainsi comparable sa stabilité thermique avec celle observée pour le collagène porcine. Gómez-Guillén *et al.* (2001) ont également observé une augmentation des températures de fusion de la gélatine de cardine réticulée avec différentes concentrations de mTG. Concernant les propriétés mécaniques, les résultats de Chiou *et al.* (2008) ont montré que la réticulation au GTA de gélatine de lieu et de saumon pouvait légèrement augmenter leurs propriétés mécaniques ainsi que leur température de dénaturation. En revanche, Fernandes-Silva *et al.* (2013) ont montré une nette augmentation de l'élasticité du collagène réticulé, avec un module de compression passant de 46,3 KPa à 57,3 Kpa. Par ailleurs, l'évaluation des propriétés mécaniques comme le module de compression donne des informations précieuses sur le potentiel du collagène. En effet, pour des applications en régénération osseuse, les propriétés requises sont de l'ordre du Kpa (Fernandes-Silva *et al.*, 2013), tandis qu'en régénération neuronale, une très faible résistance, de l'ordre de 10 à 4000Pa, est nécessaire (Palazzolo *et al.*, 2015).

La microscopie permet d'étudier la microstructure des hydrogels et d'en évaluer la porosité. Des paramètres comme la taille des pores, leur nombre, leur forme, leur interconnectivité et également leur régularité, sont mesurés. Les implants destinés à être utilisés dans des applications d'ingénierie tissulaire doivent avoir une porosité suffisamment élevée et des tailles de pores adéquates pour la croissance cellulaire. Par exemple, des pores de taille comprise entre 50 et 150  $\mu\text{m}$ , sont jugés optimaux pour l'amélioration de la production des matrices extracellulaires (Ma, 2003; Muthukumar *et al.*, 2014), tandis qu'entre 100 et 500 $\mu\text{m}$ , ils conviennent à la croissance des cellules (Yaylaoglu *et al.*, 1999), enfin entre 300 et 400  $\mu\text{m}$ , ils sont plutôt adaptés à la croissance des ostéoblastes et à la vascularisation (Yaylaoglu *et al.*, 1999). De plus, la porosité permet de répondre aux stress mécaniques comme la compression, la

tension ou la torsion (Yunoki *et al.*, 2007). La régularité du réseau permet également une bonne distribution des substances incorporées dans l'éponge (Veeruraj *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2007). L'étude de Fernandes-Silva *et al.* (2013) a travaillé sur la réticulation d'un collagène de requin par la génipine. Les résultats obtenus en microscopie (Figure 25) ont montré que le processus de réticulation a permis d'améliorer un certain nombre de paramètres :

- (1) la taille des pores a été augmentée passant de 50 $\mu$ m de diamètre pour le collagène non réticulé à 98 $\mu$ m pour le collagène réticulé
- (2) la porosité est passée de 45% pour le collagène non réticulé contre 79% pour le collagène réticulé
- (3) l'interconnectivité<sup>‡</sup> est passée de 45% pour le collagène non réticulé contre 76% pour le collagène réticulé

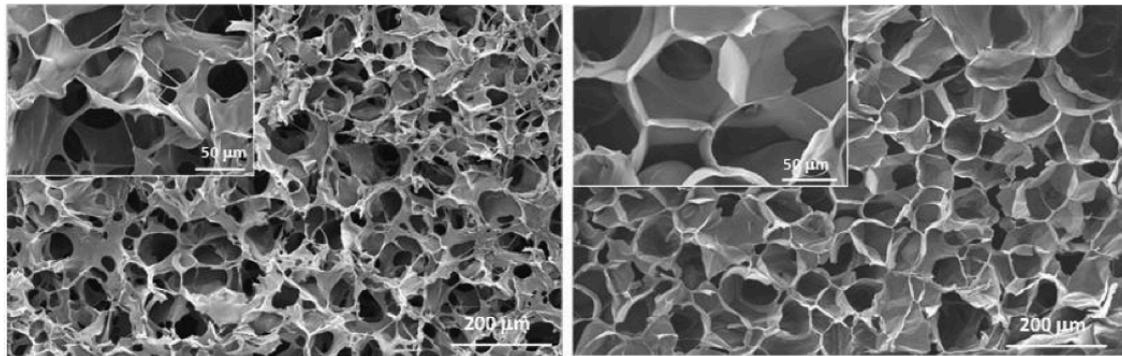


Figure 25. Comparaison des observations en microscopie électronique à balayage des éponges de collagène de requin non réticulées (à gauche) et réticulées (à droite) (tiré de Fernandes-Silva, 2013).

Les techniques de microscopie permettent également d'observer la viabilité des cultures de cellules testées *in vitro* sur les supports étudiés, comme le montre la Figure 26 (Fernandes-Silva *et al.*, 2013 ; Yunoki *et al.*, 2004 ; Hoyer *et al.*, 2012, 2014). L'étude de ces performances biologiques permet d'évaluer le bon fonctionnement du biomatériau et ainsi vérifier que l'association de la microstructure et des propriétés mécaniques observées, est adaptée à l'application visée.

---

<sup>‡</sup> L'interconnectivité est mesurée par tomographie axiale calculée aux rayons X : c'est une technique d'imagerie qui permet de reconstruire le volume d'un objet à partir d'une série de mesures effectuées par tranche depuis l'extérieur de cet objet

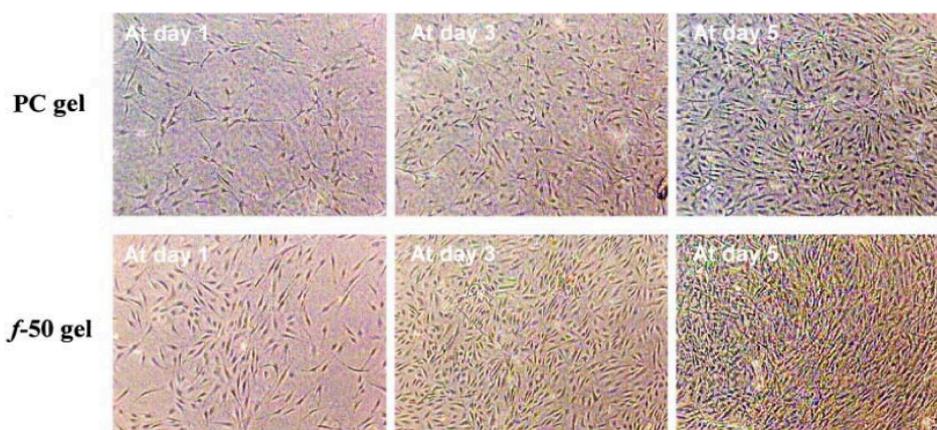


Figure 26. Comparaison de la prolifération de cellules humaines de ligament parodontal sur du collagène de saumon Pacifique non réticulé (en haut) et réticulé (en bas) (tiré de Yunoki, 2004).

L'objectif est d'agir sur les paramètres de réticulation afin d'obtenir un matériau qui mime au mieux la matrice extracellulaire naturelle en terme de composition, de caractéristiques structurales ainsi que de propriétés mécaniques (Van Vlierberghe *et al.*, 2011).

Ainsi, les méthodes de caractérisation permettent de définir l'influence des différents paramètres sur le collagène réticulé et d'ajuster le protocole de réticulation en fonction des propriétés attendues pour une application donnée. Dans cette étude, ces méthodes analytiques seront utilisées à la fois sur le collagène natif, issu du procédé d'extraction développé, et sur le collagène réticulé, afin d'évaluer de quelle manière la réaction de réticulation agit sur les caractéristiques du collagène.

### 3. LES HYDROLYSATS DE PROTÉINES: focus sur les peptides bioactifs marins

#### 3.1 Les hydrolysats de protéines: définition et obtention

Les hydrolysats protéiques résultent d'une digestion partielle des protéines en molécules de plus petite taille comme des peptides et/ou des acides aminés. Les hydrolysats peuvent être obtenus de différentes manières: par hydrolyse chimique, ou par hydrolyse enzymatique au sein de laquelle on distingue l'autolyse, opérée par des enzymes endogènes, de l'hétérolyse, opérée par des enzymes exogènes. Tandis que l'utilisation du procédé d'autolyse remonte à l'Antiquité pour la fabrication de produits fermentés, les hydrolyses chimiques et enzymatiques sont des procédés plus récents. Plus précisément, pour le procédé chimique, le réactif est un acide ou une base tandis que pour le procédé enzymatique, une certaine quantité d'une ou plusieurs enzymes est ajoutée, à des conditions de pH et de température optimales pour leur activité. Les différences entre ces deux procédés sont décrites dans le Tableau 13.

Tableau 13. Comparaison des procédés d'hydrolyse chimique et enzymatique (d'après Guérard *et al.*, 2005).

	Spécificités	Avantages	Inconvénients
<b>Hydrolyse chimique</b>	- Procédé aléatoire	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réaction rapide</li> <li>- Hydrolyse complète</li> <li>- Faible coût</li> <li>- Forte solubilité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fortes températures</li> <li>- Pas de contrôle du poids moléculaire</li> <li>- Grandes quantités de sel</li> <li>- Réactions secondaires indésirables (destruction du tryptophane, etc)</li> </ul>
<b>Hydrolyse enzymatique</b>	- Procédé spécifique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contrôle du poids moléculaire</li> <li>- Digestion en conditions douces</li> <li>- Produit aux caractéristiques fonctionnelles intéressantes</li> <li>- Peu de réactions secondaires</li> <li>- Préservation des acides aminés</li> <li>- Augmentation de la valeur nutritionnelle</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coût élevé</li> <li>- Désactivation ultérieure de l'enzyme</li> </ul>

Le procédé d'hydrolyse enzymatique présente de nombreux avantages, en comparaison avec le procédé chimique. Il permet notamment de contrôler la réaction et d'augmenter la qualité nutritionnelle du produit obtenu, tout en utilisant des conditions douces et peu dénaturantes. Dans le cas de la production d'hydrolysats à partir de protéines marines, les procédés d'hydrolyse chimique sont plutôt utilisés pour la fabrication de produits à faible valeur ajoutée

comme les fertilisants (Kristinsson et Rasco, 2000a) ou les nutriments utilisés comme source d'azote pour des milieux de culture de microorganismes (Gao et al., 2006). En revanche, le procédé d'hydrolyse enzymatique permet la production de composés à haute valeur ajoutée comme les peptides bioactifs (Blanco *et al.*, 2015 ; Guérard *et al.*, 2005 ; He et al., 2013). Ainsi, cette étude a pour objectif l'obtention d'hydrolysats par des procédés d'hydrolyse enzymatique.

### **3.2 L'hydrolyse enzymatique des biomasses marines**

L'hydrolyse enzymatique représente une voie de valorisation d'intérêt pour les biomasses marines, et plus particulièrement les co-produits de poisson (Blanco *et al.*, 2015 ; Guérard *et al.*, 2005; He *et al.*, 2013; Kim et Mendis, 2006). Le protocole comprend plusieurs étapes, détaillées dans la Figure 27. Tout d'abord, la matière première est homogénéisée, avant d'ajouter l'eau et l'enzyme. Ensuite, l'hydrolyse enzymatique se déroule à des conditions expérimentales de pH, de température, de temps et de ratio enzyme/substrat définies au préalable. À la fin de la réaction, l'enzyme est inactivée afin de stopper l'hydrolyse. On obtient alors un mélange de protéines, lipides et minéraux dont les différentes fractions vont ensuite être séparées par centrifugation. On obtient alors quatre phases: la matière grasse en surface, sous laquelle on retrouve une émulsion, puis les protéines solubles au milieu et le culot qui contient les arrêtes et autres composés insolubles. Ainsi, on peut récupérer l'hydrolysat protéique, qui est la partie intermédiaire, et enfin le sécher pour le conserver.

L'étape de centrifugation est essentielle pour séparer la partie protéique de la partie lipidique et prévenir les phénomènes d'oxydation des lipides qui pourraient endommager les protéines et plus particulièrement dans le cas des espèces de poisson gras, comme le saumon (Nolsøe et Undeland, 2009). Par ailleurs, ces phénomènes d'oxydation peuvent également provoquer la libération de pigments bruns présents dans la matière première et alors donner une couleur foncée aux hydrolysats (Kristinsson et Rasco, 2000a). Ainsi, on retrouve dans certains procédés d'hydrolyse une étape de pré-traitement de la matière première permettant d'éliminer la matière grasse par l'utilisation de solvants organiques (Hoyle et Merrit, 1994 ; Quaglia et Orban, 1987).

Pour certaines espèces de poisson comme la sardine ou le maquereau, la matière grasse présente un intérêt et l'hydrolyse enzymatique permet de l'extraire, offrant ainsi une alternative aux procédés d'extraction par solvants (Batista *et al.*, 2010 ; Dumay et al., 2006 ; Morales-Medina *et al.*, 2016). En effet, les lipides contenus dans le poisson sont riches en acides gras insaturés  $\omega$ 3. Plus précisément, les acides eicosapentaénoïques (EPA), docosahexaénoïque (DHA) et

docosapentaénoïque (DPA) sont recherchés pour leurs propriétés nutritionnelles qui trouvent des applications dans les domaines de la nutrition et de la santé (Shahidi et Ambigaipalan, 2015).

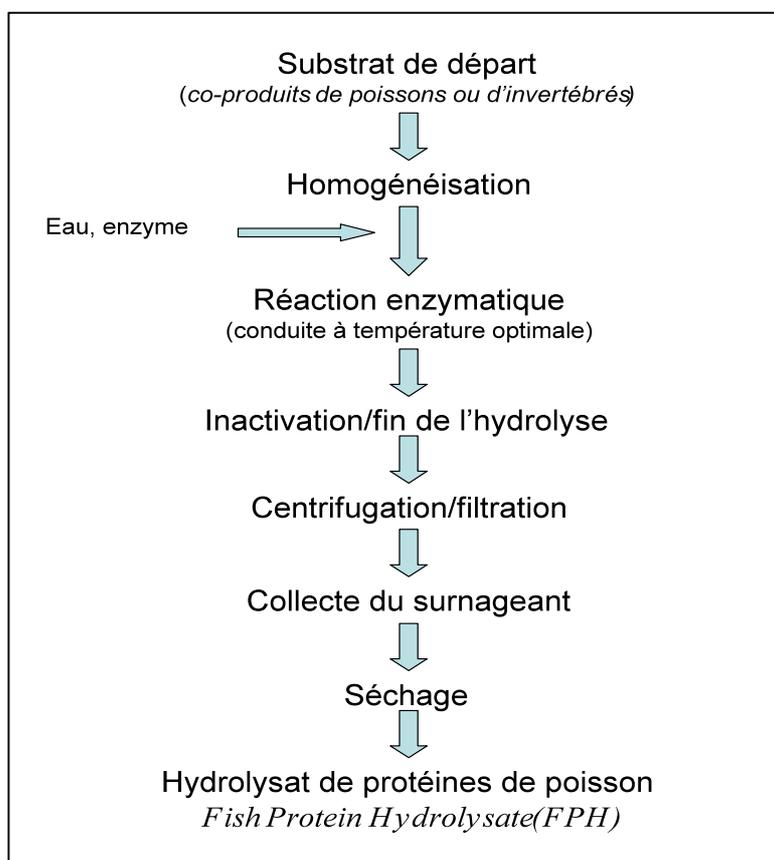


Figure 27. Protocole d'hydrolyse enzymatique de protéines marines (d'après Guérard *et al.*, 2005).

Dans ce projet, l'étude de la valorisation des têtes de saumon est orientée vers l'utilisation de la fraction protéique. En effet, on retrouve déjà dans la littérature de nombreuses études concernant l'utilisation de la fraction lipidique des co-produits de saumon (Gbogouri *et al.*, 2006 ; He *et al.*, 2011 ; Linder *et al.*, 2005; Mbatia *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'utilisation des huiles de poissons issus d'élevage est de plus en plus controversée du fait de leur forte teneur en contaminants, comme les polluants organiques persistants (Hamilton *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2015; Ruzzin *et al.*, 2009). Dans une démarche d'innovation, la piste des hydrolysats de protéines semble donc plus appropriée.

### 3.2.1 Principe de la réaction d'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique est une réaction au cours de laquelle l'enzyme va cliver les liaisons peptidiques entre deux acides aminés adjacents dans la séquence primaire d'une protéine, générant ainsi au moins deux peptides. La Figure 28 représente cette réaction.

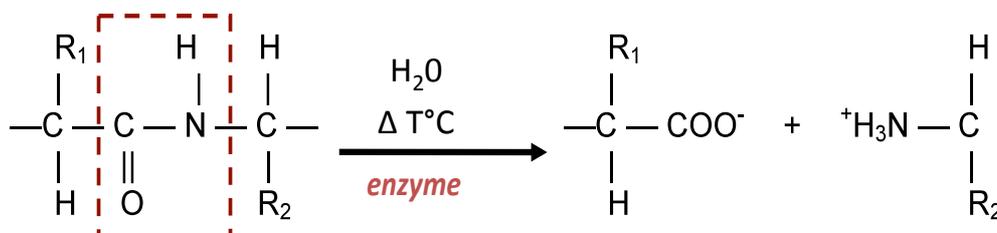


Figure 28. Détail de la réaction catalysée d'hydrolyse enzymatique.

C'est cette réaction qui provoque une déstructuration de la matrice et entraîne une solubilisation du substrat solide. Plus précisément, le poids moléculaire des protéines est alors diminué tandis que l'on observe une augmentation du nombre de groupement polaires ( $NH_3^+$ ,  $COO^-$ ) rendant la matrice de départ plus hydrophile. Aussi, la charge et la structure des protéines est alors modifiée ce qui influe sur les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des protéines et permet ainsi d'augmenter leur digestibilité et leur solubilité, de réduire le risque d'allergie ou encore de libérer des peptides bioactifs.

L'hydrolyse des liaisons peptidiques va générer la libération de protons  $H^+$ , ce qui provoque une acidification du milieu. Cependant, ce phénomène n'est observé que pour les hydrolyses se déroulant à un pH supérieur à 6,5, car le degré de dissociation des ions  $NH_3^+$  doit être suffisant (Adler-Nissen, 1986). C'est ce principe qui permet de suivre l'évolution de la réaction d'hydrolyse par la méthode du pH-Stat. Des méthodes alternatives à celle du pH-Stat sont alors utilisées pour suivre la réaction.

### 3.2.2 Suivi de l'évolution de l'hydrolyse

Le suivi de l'hydrolyse est important pour contrôler la réaction et obtenir le produit désiré. En effet, l'activité des enzymes ne s'arrête que lorsqu'il n'y a plus de substrat disponible ou que les conditions du milieu ne sont plus adaptées. Plus précisément, ce suivi va permettre de vérifier que les paramètres de la réaction choisis, comme le pH, la température, le ratio enzyme/substrat, ou le temps sont adaptés et permettent d'obtenir un hydrolysats aux caractéristiques recherchées. Ce suivi permet également de comparer plusieurs réactions et étudier l'influence du substrat, des enzymes ou des conditions expérimentales. Il existe différentes méthodes permettant de

suivre la réaction d'hydrolyse enzymatique. Elles permettent de déterminer le degré d'hydrolyse (DH) qui est défini soit comme (1) le ratio entre l'azote non protéique et l'azote total ou (2) le pourcentage du nombre de liaisons peptidiques clivées sur le nombre de liaisons peptidiques totales.

#### *3.2.2.1 Calcul du DH par la méthode du pH-Stat (Adler-Nissen, 1986, 1982)*

La quantification du DH par la méthode du pH-Stat est la plus simple et la plus utilisée (Alemán *et al.*, 2011 ; Dey et Dora, 2014; Gbogouri *et al.*, 2006; Guérard *et al.*, 2001). Elle s'applique dans le cas d'hydrolyses où le pH de la réaction est supérieur à 6,5 car elle fait appel au principe énoncé précédemment: la réaction d'hydrolyse enzymatique génère la libération du protons qui acidifient le milieu réactionnel. Pour quantifier le DH, le pH-Stat maintient un pH constant au cours de la réaction par ajout de base, qui réagit avec les groupes  $\alpha\text{-NH}_3^+$  et permet de les titrer. Il existe alors une relation entre le volume de soude consommé et le DH(%), détaillée dans la section « 2.3.2. » du Matériel et méthodes.

Cette méthode permet d'assurer la reproductibilité des hydrolyses enzymatiques, grâce à un contrôle précis du pH par le pH-Stat et de la température par le réacteur enzymatique. Également, le choix en amont des conditions expérimentales permet d'optimiser la réaction et d'obtenir un rendement maximal. Par ailleurs, ce système permet un gain de temps grâce au logiciel de contrôle autonome qui calcule le DH.

#### *3.2.2.2 Autres méthodes*

D'autres méthodes existent pour estimer l'évolution de l'hydrolyse et le DH peut alors être déterminé de différentes manières qui sont les suivantes:

(1) la quantification de l'azote non-protéique, grâce à la méthode de dosage à l'acide trichloroacétique (TCA). Le TCA permet de précipiter les protéines (azote protéique) et les peptides (azote non-protéique) se retrouvent solubilisés dans la solution: le DH est alors calculé avec la formule suivante (Margot *et al.*, 1998):

$$DH (\%) = (Dt - D0) / (Dmax - D0)$$

avec *Dt* : azote soluble dans le TCA au temps *t*

*D0*: azote soluble dans le TCA du substrat non hydrolysé

*Dmax*: azote soluble dans le TCA après hydrolyse

(2) le dosage colorimétrique des groupements  $\alpha\text{-NH}_2$  ou  $\alpha\text{-COOH}$  libérés au cours de la réaction par le clivage de la liaison peptidique. C'est le cas des méthodes de dosage à l'acide trinitro benzène sulfonide (TNBS) (Adler-Nissen, 1979), à la ninhydrine (Panasiuk *et al.*, 1998) et à l'orthophtaldialdéhyde (OPA) (Nielsen *et al.*, 2001). Les réactifs utilisés réagissent avec les

fonctions amines terminales libres pour former des chromophores quantifiables en spectrométrie à une longueur d'onde spécifique et grâce à une courbe d'étalonnage réalisée à partir d'un acide aminé libre comme la leucine ou la sérine. Le résultat du dosage est alors exprimé en équivalent leucine ou sérine où une mole d'amine dosée correspond à une liaison peptidique coupée. Le DH est alors calculé de la manière suivant :

$DH(\%) = (\text{nombre de liaisons peptidiques coupées} / \text{nombre de liaisons peptidiques totales}) \times 100$   
Également, les fonctions amines libérées au cours de l'hydrolyse peuvent également être dosées directement par du formol (Taylor, 1957).

### **3.2.3 Les enzymes**

Par définition, une enzyme est une protéine permettant de catalyser une réaction chimique. Elle n'intervient donc pas dans le processus réactionnel et est retrouvée intacte à la fin de la réaction. Une enzyme, par son mécanisme d'action, est spécifique d'une réaction. Ainsi, pour un même substrat, chaque enzyme utilisé permettra d'obtenir un hydrolysats différent présentant des propriétés biologiques spécifiques.

#### *3.2.3.1 Les différentes catégories d'enzymes*

Les enzymes sont classées en fonction de leurs spécificités selon une nomenclature numérique internationale EC, pour Enzyme Classification. Afin d'identifier chaque enzyme, chaque code consiste en les lettres majuscules « EC » suivies de 4 nombres séparés par des points et désignant respectivement:

- (1) Le type de réaction catalysée
- (2) Le substrat général impliqué lors de la réaction
- (3) le substrat spécifique impliqué
- (4) le numéro de série de l'enzyme

Les six principales classes d'enzymes sont les suivantes:

- EC 1: les oxydoréductases, catalysent les réactions d'oxydoréduction
- EC 2: les transférases, transfèrent un groupement fonctionnel
- EC 3: les hydrolases, clivent des liaisons peptidique, ester, éther, glycosique, anhydrique ou C-C par hydrolyse (utilisation d'eau donc)
- EC 4: les lyases, brisent diverses liaisons par d'autres procédés que l'hydrolyse et l'oxydation
- EC 5: les isomérases, catalysent les réaction d'isomérisation dans une simple molécule
- EC 6: les ligases, joignent deux molécules par des liaisons covalentes

Dans le cas de l'utilisation d'enzymes pour des réactions d'hydrolyse enzymatique, la classe des hydrolases (EC 3) sera la plus intéressante, et plus précisément le groupe des protéases (EC 3.4.XX) qui hydrolysent les liaisons peptidiques.

### 3.2.3.2 Les protéases

Les protéases peuvent être d'origine végétale, c'est le cas de la papaïne (EC 3.4.22.2) ou de la bromélaïne (EC 3.4.22.33), d'origine animale, comme la trypsine (EC 3.4.21.4), la chymotrypsine (EC 3.4.21.1) ou encore la pepsine (EC 3.4.23.1-2), ou d'origine microbienne comme l'Alcalase® (EC 3.4.21.62) ou la Flavourzyme® (EC 3.4.11.1). Ces dernières sont extraites de bactéries, de levures ou de moisissures et sont de plus en plus commune du fait de leur faible coût de production et de leur diversité (Gupta *et al.*, 2002). Bien qu'elles agissent toutes sur les liaisons (C-N), elles peuvent être classées en fonction de la nature de leur site actif, comme détaillé dans le Tableau 14. Plus généralement, on retrouve deux grandes familles fonctionnelles. D'une part, les enzymes EC 3.4.11-19, qui sont des exopeptidases agissant à partir de l'extrémité N ou C terminale de la chaîne polypeptidique. Elles peuvent être de type aminopeptidases, et coupent entre le premier acide aminé et le second de la chaîne libérant l'acide aminé N-terminal, ou de type carboxypeptidase, coupent entre l'avant dernier et le dernier acide aminé de la chaîne et libérant l'acide aminé C-terminal. D'autre part, les enzymes EC 3.4.21-25 et EC 3.4.99 sont des endopeptidases qui coupent à l'intérieur de la chaîne peptidique.

Tableau 14. Classification des protéases en fonction de la nature de leur site actif et de leur fonction.

Numéro	Substrat spécifique	Famille fonctionnelle
3.4.11	aminopeptidases	exopeptidase
3.4.13	dipeptidases	
3.4.14	dipeptidyl- et tripeptidyl-peptidases	
3.4.15	peptidyl-dipeptidase	
3.4.16	sérine carboxypeptidase	
3.4.17	métallo carboxypeptidase	
3.4.18	cystéine carboxypeptidase	
3.4.19	oméga peptidase	
3.4.21	sérine endopeptidase	
3.4.22	cystéine endopeptidase	
3.4.23	aspartique endopeptidase	
3.4.24	métallo endopeptidase	
3.4.25	thréonine endopeptidase	
3.4.26 à 3.4.99	endopeptidase au mécanisme inconnu	

### *3.2.3.3 Les protéases utilisées pour l'hydrolyse de biomasses marines*

L'utilisation d'enzyme pour l'hydrolyse de protéines de poisson date de d'après la seconde guerre mondiale (Gildberg, 1993). L'action des enzymes va jouer sur la taille et la fonction des peptides générés et les modifications apportées vont permettre de produire des composés aux propriétés désirées. De ce fait, de nombreuses voies de valorisation des hydrolysats d'origine marine sont citées dans la littérature. Ils peuvent être utilisés comme source de nutriments azotés pour la culture d'organismes microbiologiques (bactéries, champignons, levure). D'autre part, leur composition en acides aminés essentiels et leur digestibilité leur confère des qualités nutritionnelles intéressantes pour des utilisations en alimentation humaine et animale. Également, ils peuvent être incorporés dans des préparations afin d'en augmenter le goût, du fait de leur forte concentration en arômes. D'autres utilisations concernent leurs propriétés technofonctionnelles qui permettent d'apporter des caractéristiques intéressantes aux formulations auxquelles ils sont incorporés, trouvant de nombreuses applications dans le domaine agroalimentaire. En effet, les hydrolysats possèdent, selon les conditions d'hydrolyse, des capacités hydrophobes et émulsifiantes, permettant la formation de mousse, et également, la capacité de retenir l'eau, diminuant ainsi les pertes en eau d'un aliment après congélation. Enfin, les hydrolysats possèdent des peptides présentant des activités biologiques variées, que nous détaillerons plus loin dans la section (3.4.1.). Ainsi, le Tableau 15 recense les principales protéases utilisées dans les procédés d'hydrolyse de biomasses marines, permettant également de dresser un aperçu des principales espèces marines hydrolysées ainsi que les applications visées décrites précédemment.

---

*État de l'art*  
*Les hydrolysats de protéines*

---

Tableau 15. Principales protéases utilisées pour l'hydrolyse de biomasses marines (à partir des années 2000).

Enzyme	Fonction	Espèce	Utilisation	Référence
<b>Alcalase</b> (bactérie) EC.3.4.21.62 EC.3.4.21.19 EC.3.4.22.31	endopeptidase	thon ( <i>Thunnus albacares</i> )	source azotée	Guérard <i>et al.</i> , 2001
		esturgeon ( <i>Acipenser persicus</i> )	intérêt nutritionnel	Ovissipour <i>et al.</i> , 2009
		carpe ( <i>Ctenopharyngodon idella</i> )	intérêt techno-fonctionnel	Wasswa <i>et al.</i> , 2007
		morue ( <i>Gadus morhua</i> )	activité biologique	Ravallec-Plé et Van Wormhoudt, 2003
			intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> , 2000
			source azotée	Aspmo <i>et al.</i> , 2005a, 2005b
			libération des lipides	Šližytė <i>et al.</i> , 2005b
		saumon ( <i>Salmo salar</i> )	intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> , 2000 ; Kristinsson et Rasco 2000b,c
			intérêt techno-fonctionnel	He <i>et al.</i> , 2012 ; Gbogouri <i>et al.</i> , 2006
		saumon pacifique	activité biologique	Ahn <i>et al.</i> , 2012
		sole ( <i>Limanda aspera</i> )	activité biologique	Jun <i>et al.</i> , 2004; Rajapakse <i>et al.</i> , 2005a
		tilapia noir ( <i>Oreochromis mossambicus</i> )	intérêt nutritionnel	Abdul-Hamid <i>et al.</i> , 2002
		crevette ( <i>Penaeus aztecus</i> ), ( <i>Pandalus borealis</i> )	activité biologique	Ravallec-Plé <i>et al.</i> , 2001 ; Rousseau <i>et al.</i> , 2001
			intérêt nutritionnel	Gildberg et Stenberg, 2001
		sardine ( <i>Sardina pilchardus</i> )	activité biologique	Ravallec-Plé <i>et al.</i> , 2001 ; Rousseau <i>et al.</i> , 2001
			libération des lipides	Dumay <i>et al.</i> , 2006
		roussette ( <i>Scyliohinus canicula</i> ) cochon de mer ( <i>Capros aper</i> )	intérêt techno-fonctionnel	Blanco <i>et al.</i> , 2015
			activité biologique	
		huître ( <i>Crassostrea gigas</i> )	activité biologique	Liu <i>et al.</i> , 2008 ; Zhang <i>et al.</i> , 2015
		calmar géant ( <i>Dosidicus gigas</i> )	activité biologique	Aleman <i>et al.</i> , 2011
		carpe argentée ( <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> )	source azotée	Fallah <i>et al.</i> , 2015
		tambour ( <i>Collichthys niveatus</i> )	intérêt techno-fonctionnel	Shen <i>et al.</i> , 2012
		échinoderme ( <i>Cucumaria frondosa</i> ), ( <i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> )	intérêt nutritionnel	Mamelona <i>et al.</i> , 2009
activité biologique				
sériole ( <i>Seriola lalandi</i> )	intérêt fonctionnel	He <i>et al.</i> , 2012		
palourde ( <i>Ruditapes Phlippinarum</i> )	activité biologique	Kim <i>et al.</i> , 2013		
hoki ( <i>Johnius belengerii</i> )	activité biologique	Kim <i>et al.</i> , 2007		
crevette ( <i>Penaeus monodon</i> )	intérêt nutritionnel	Dey et Dora, 2014		
<b>Neutrase</b>	endopeptidase	morue ( <i>Gadus morhua</i> )	intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> , 2000 ; Šližytė <i>et al.</i> , 2005a

État de l'art  
Les hydrolysats de protéines

(bactérie) EC.3.4.24.28			libération des lipides	Daukšas <i>et al.</i> , 2005
			source azotée	Aspmo <i>et al.</i> , 2005a,b
		saumon ( <i>Salmo salar</i> )	intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> , 2000
		saumon pacifique	intérêt techno-fonctionnel	He <i>et al.</i> , 2012
			activité biologique	Ahn <i>et al.</i> , 2012
		sole ( <i>Limanda aspera</i> )	activité biologique	Jun <i>et al.</i> , 2004 ; Rajapakse <i>et al.</i> , 2005a
		tambour ( <i>Collichthys niveatus</i> )	intérêt techno-fonctionnel	Shen <i>et al.</i> , 2012
		calmar géant ( <i>Dosidicus gigas</i> )	activité biologique	Aleman <i>et al.</i> , 2011
		crabe ( <i>Portunus trituberculatus</i> ), ( <i>Portunus sanguinolentus</i> )	intérêt nutritionnel	Liu <i>et al.</i> , 2010
		sériole ( <i>Seriola lalandi</i> )	intérêt techno-fonctionnel	He <i>et al.</i> , 2012
		huître ( <i>Crassostrea gigas</i> )	activité biologique	Zhang <i>et al.</i> , 2015
		palourde ( <i>Ruditapes Phlippinarum</i> )	activité biologique	Kim <i>et al.</i> , 2013
		hoki ( <i>Johnius belengerii</i> )	activité biologique	Kim <i>et al.</i> , 2007
		crevette ( <i>Penaeus monodon</i> )	intérêt nutritionnel	Dey et Dora 2014
raie ( <i>Raja clavata</i> )	activité biologique	Lassoued <i>et al.</i> , 2015		
<b>Corolase 7089</b> (bactérie)	-	saumon ( <i>Salmo salar</i> )	intérêt nutritionnel	Kristinsson et Rasco 200b,c
<b>Flavourzyme</b> (champignon) EC.3.4.11.1	endo et exo-peptidase	morue ( <i>Gadus morhua</i> )	intérêt nutritionnel	Slizyte <i>et al.</i> , 2005a
			libération des lipides	Daukšas <i>et al.</i> , 2005; Dumay <i>et al.</i> , 2004
		sardine ( <i>Sardina pilchardus</i> )	libération des lipides	Dumay <i>et al.</i> , 2006
		saumon ( <i>Salmo salar</i> )	intérêt nutritionnel	Kristinsson et Rasco 2000b,c
			intérêt techno-fonctionnel	He <i>et al.</i> , 2012
		saumon pacifique	activité biologique	Ahn <i>et al.</i> , 2012
		tambour ( <i>Collichthys niveatus</i> )	intérêt techno-fonctionnel	Shen <i>et al.</i> , 2012
		sériole ( <i>Seriola lalandi</i> )	intérêt techno-fonctionnel	He <i>et al.</i> , 2012
		palourde ( <i>Ruditapes Phlippinarum</i> )	activité biologique	Kim <i>et al.</i> , 2013
crevette ( <i>Penaeus monodon</i> )	intérêt nutritionnel	Dey et Dora 2014		
<b>Protamex</b> (bactérie) EC.3.4.21.62	endopeptidase	morue ( <i>Gadus morhua</i> )	libération des lipides	Dumay <i>et al.</i> , 2004
			source azotée	Aspmo <i>et al.</i> , 2005a,b
		sardine ( <i>Sardina pilchardus</i> )	libération des lipides	Dumay <i>et al.</i> , 2006

État de l'art  
Les hydrolysats de protéines

EC.3.4.24.28		saumon ( <i>Salmo salar</i> )	intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> , 2003
		saumon pacifique	activité biologique	Opheim <i>et al.</i> , 2015 Ahn <i>et al.</i> , 2012
		calmar géant ( <i>Dosidicus gigas</i> )	activité biologique	Aleman <i>et al.</i> , 2011
		tambour ( <i>Collichthys niveatus</i> )	intérêt techno-fonctionnel	Shen <i>et al.</i> , 2012
		palourde ( <i>Ruditapes Phlippinarum</i> )	activité biologique	Kim <i>et al.</i> , 2013
		crevette ( <i>Penaeus monodon</i> )	intérêt nutritionnel	Dey et Dora 2014
<b>Kojizyme</b> (champignon) EC.3.4.11.1	exopeptidase	morue ( <i>Gadus morhua</i> )	intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> , 2003
		saumon ( <i>Salmo salar</i> )		
<b>Umamizine</b> (champignon) EC.3.4.21.63 EC.3.4.24.39	endopeptidase	thon ( <i>Thunnus albacares</i> )	activité biologique	Guérard <i>et al.</i> , 2002, 2001
			source azotée	
<b>Corolase PN-L</b> (champignon)	-	saumon ( <i>Salmo salar</i> )	intérêt nutritionnel	Kristinsson et Rasco 200b,c
<b>Pepsine</b> (viscères) EC.3.4.23.1	endopeptidase	morue ( <i>Gadus morhua</i> )	intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> 2000
		saumon ( <i>Salmo salar</i> )		
		saumon pacifique	activité biologique	Ahn <i>et al.</i> , 2012
		sole ( <i>Limanda aspera</i> )	activité biologique	Jun <i>et al.</i> , 2004 ; Rajapakse <i>et al.</i> , 2005a
		calmar géant ( <i>Dosidicus gigas</i> )	activité biologique	Mendis <i>et al.</i> , 2005
		hoki ( <i>Johnius belengerii</i> )	activité biologique	Kim <i>et al.</i> , 2007
<b>Trypsine</b> (viscères) EC.3.4.21.4	endopeptidase	roussette ( <i>Scyliohinus canicula</i> )	intérêt techno-fonctionnel	Blanco <i>et al.</i> , 2015
		cochon de mer ( <i>Capros aper</i> )	activité biologique	
		calmar géant ( <i>Dosidicus gigas</i> )	activité biologique	Mendis <i>et al.</i> , 2005 ; Aleman <i>et al.</i> , 2011
		carpe argentée ( <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> )	source azotée	Fallah <i>et al.</i> , 2015
		saumon pacifique	activité biologique	Ahn <i>et al.</i> , 2012
		hoki ( <i>Johnius belengerii</i> )	activité biologique	Kim <i>et al.</i> , 2007
<b>Bromelaïne</b> (végétale) EC.3.4.22.32	endopeptidase	saumon ( <i>Salmo salar</i> )	activité biologique	Opheim <i>et al.</i> , 2015
		morue ( <i>Gadus morhua</i> )	source azotée	Aspmo <i>et al.</i> , 2005a, b
		huître ( <i>Crassostrea gigas</i> )	activité biologique	Liu <i>et al.</i> , 2008, Zhang <i>et al.</i> , 2015

*État de l'art*  
*Les hydrolysats de protéines*

<b>Papaïne</b> (végétale) EC.3.4.22.2 EC.3.4.22.6 EC.3.4.22.30 EC.3.4.22.25	endopeptidase	saumon ( <i>Salmo salar</i> )	activité biologique	Opheim <i>et al.</i> , 2015
		morue ( <i>Gadus morhua</i> )	libération des lipides	Dumay <i>et al.</i> , 2004
			source azotée	Aspmo <i>et al.</i> 2005a, b
		poisson lézard ( <i>Saurida elongata</i> )	activité biologique	Dong <i>et al.</i> , 2005
		sole ( <i>Limanda aspera</i> )	activité biologique	Jun <i>et al.</i> , 2004 ; Rajapakse <i>et al.</i> , 2005a
		hoki ( <i>Johnius belengerii</i> )	activité biologique	Kim <i>et al.</i> 2007



Les enzymes les plus répandues sont d'origine microbienne, comme l'Alcalase, la Neutralse ou encore Protamex. Elles ont l'avantage de permettre une variété d'activités catalytiques et de présenter une forte stabilité au pH et à la température (He *et al.*, 2013). D'autre part, on retrouve principalement parmi les enzymes utilisées des endopeptidases, à l'exception de Kojizyme qui est une exopeptidase, et de Flavourzyme qui présente une activité à la fois endo et exopeptidase, selon le pH de la réaction. Cette dernière est souvent choisie pour des applications en nutrition humaine car elle permet de diminuer l'amertume des hydrolysats. En effet, l'utilisation de la préparation enzymatique Flavourzyme présente cet avantage lorsqu'elle est utilisée en fin de réaction car elle clive les peptides hydrophobes responsables du goût amer, en di- et tripeptides. Plus particulièrement, l'Alcalase est l'enzyme la plus largement utilisée. En effet, elle possède, en plus des avantages des protéases microbiennes, la capacité de conduire une hydrolyse productive avec un rendement élevé (Gildberg, 1993). Son efficacité a d'ailleurs souvent été démontrée sur l'hydrolyse des protéines de poisson (Guérard *et al.*, 2001; Herpandi *et al.*, 2011 ; Pacheco-Aguilar *et al.*, 2008 ; Wasswa *et al.*, 2007). L'étude de Kristinsson et Rasco (2000c) a également souligné son rapport coût/activité intéressant, par rapport à d'autres enzymes microbiennes.

#### **3.2.4 Les facteurs limitant de la réaction d'hydrolyse enzymatique**

L'hydrolyse enzymatique est une réaction qui permet de solubiliser une matrice protéique initialement insoluble, par l'action d'enzymes qui clivent les liaisons peptidiques. De manière générale, on peut citer trois principaux facteurs susceptibles de limiter cette réaction: (1) le nombre de liaisons peptidiques disponibles, (2) la désactivation de l'enzyme et (3) la libération de substances inhibitrices (Moreno et Cuadrado, 1993). Ces mêmes auteurs ont observés, au cours de la réaction d'hydrolyse des protéines de pois chiche par l'Alcalase, la libération de substances inhibitrices de la subtilisine, le composant principal de la préparation enzymatique utilisée. Guérard *et al.* (2001) ont également étudié l'influence de ces trois facteurs sur l'hydrolyse de co-produits de thon par l'Alcalase. Les résultats ont permis de conclure que dans ce cas, le principal facteur limitant était le nombre de liaisons peptidiques disponibles pour la réaction. D'après ces résultats, l'Alcalase est donc une enzyme dont l'activité reste stable malgré les conditions de température et de pH auxquelles elle est soumise au cours de la réaction, et permet d'obtenir des peptides de petite de taille inférieure à 6500 Da jusqu'à des dipeptides et des acides aminés libres. Elle se présente donc comme une candidate intéressante pour l'hydrolyse de co-produits de poisson, dans le but d'obtenir des peptides de poids moléculaire relativement faible.

Dans cette étude, nous nous intéresserons donc à l'utilisation des préparations enzymatiques Alcalase et Flavourzyme pour l'hydrolyse de têtes de saumon. En effet, l'analyse de la littérature a orienté ce choix car elle montre, d'une part, que l'Alcalase présente une activité peu dégradée par les conditions de pH et de température de la réaction et permet ainsi d'obtenir des peptides de taille relativement faible (inférieure à 6500 Da, dont des dipeptides et des acides aminés libres). D'autre part, Flavourzyme permet de cliver les peptides hydrophobes, libérés au cours d'une hydrolyse préalable, en di- et tripeptides. L'utilisation de l'Alcalase seule, et combinée à la Flavourzyme, permettrait alors d'obtenir deux hydrolysats avec des compositions peptidiques différentes mais toutes les deux avec des poids moléculaire relativement faible, plus particulièrement dans le cas de la combinaison des deux préparations.

### **3.3 Caractérisation des hydrolysats**

La caractérisation des hydrolysats permet de faire un lien entre la composition peptidique et les performances nutritionnelles, la bioactivité ou encore les propriétés techno-fonctionnelles des hydrolysats. Ensuite, dans le cas de la commercialisation d'un produit, elle va permettre de le standardiser et de comparer différents produits entre eux.

Un hydrolysat est caractérisé par une forte teneur en azote total comprise entre 60 et 90% (Chalamaiah *et al.*, 2012). Cette forte proportion est due au procédé d'hydrolyse qui solubilise les protéines de la matrice qui sont ensuite concentrées dans la fraction protéique après l'étape de centrifugation. Grâce à cette étape, l'hydrolysat est débarrassé d'une grande partie de la matière grasse présente initialement dans la matière première. D'autre part, la FAO a établi un standard concernant la teneur en matière grasse des hydrolysats destinés à la consommation humaine, qui doivent alors présenter une teneur en dessous de 0,5% (w/w). Il est d'ailleurs important que l'hydrolysat contienne peu de lipides afin de prévenir leur oxydation qui peut alors dégrader les protéines. Si l'on en revient à la teneur en azote d'un hydrolysat, celle-ci peut être déterminée grâce à la méthode de Kjeldahl (Sáez-Plaza *et al.*, 2013) ou par des méthodes de quantification colorimétriques, comme la méthode de Lowry ou à l'acide bicinchoninique (BCA) (Amado *et al.*, 2013 ; Kapel *et al.*, 2011 ; Silvestre, 1997). Cependant, ces méthodes présentent des limites. En effet, la première est chronophage et demande une quantité relativement importante d'échantillon. Concernant la deuxième option, l'ensemble de ces méthodes sont plus rapides que le Kjeldahl et nécessitent une moindre quantité d'échantillon mais leur précision dépend de la calibration qui est le plus souvent réalisée sur l'hydrolysat initial, pouvant alors introduire un biais dû à la modification de la composition en peptides ou de leur environnement

(sels, solvants etc). Ainsi, une récente étude menée par l'équipe de Bodin *et al.* (2015) a mis au point une nouvelle méthode de quantification d'un hydrolysate en utilisant la chromatographie d'exclusion stérique. La méthodologie est basée sur l'estimation du coefficient d'extinction molaire de chaque point du chromatogramme à partir de l'aminogramme du mélange. À partir de là, les profils d'absorbance sont convertis en profils de concentration en utilisant la loi de Beer Lambert. La méthode développée est rapide, précise et ne nécessite pas une calibration pour chaque type d'hydrolysate.

Les hydrolysats sont également composés d'acides aminés libres et de peptides à chaîne courte présentant de nombreux avantages en tant que nutraceutiques ou aliments fonctionnels, grâce à leur profil en acides aminés. En effet, les acides aminés jouent un rôle significatif dans de nombreuses activités physiologiques du corps humain et affecte directement, ou indirectement, le maintien d'une bonne santé. Ils sont essentiels à la synthèse d'une grande variété de protéines impliquées dans d'importantes fonctions physiologiques. Il est donc important de caractériser le profil en acides aminés des hydrolysats afin d'évaluer leur valeur nutritionnelle et leurs propriétés fonctionnelles (dos Santos *et al.*, 2011). Par exemple, pour des applications en nutrition, la teneur en acides aminés essentiels sera un facteur clé dans l'appréciation des propriétés d'un hydrolysate. Elle est déterminée grâce à des techniques de chromatographie et à des protocoles standardisés comme celui décrit dans l'étude de Robert *et al.* (2014).

Enfin, la détermination du profil de poids moléculaires par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) (Guérard *et al.* 2001, Gbogouri *et al.* 2006, Robert *et al.* 2014). Cette méthode analytique permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire et ainsi connaître la distribution des classes de taille dans l'échantillon. Elle est largement utilisée car elle présente l'avantage d'être une méthode sensible, reproductible et permettant d'analyser de manière relativement rapide un grand nombre d'échantillons (Bouvier et Koza, 2014). Le Tableau 16 représente les principaux types de colonnes utilisées dans la littérature pour la caractérisation des hydrolysats marins.

*État de l'art*  
*Les hydrolysats de protéines*

Tableau 16. Principaux types de colonnes retrouvées dans la littérature pour caractériser les hydrolysats marins.

Colonne	Domaine de fractionnement (Da)	Type de matrice	Phase mobile	Référence
TSK-Gel G2000SW <sup>XL</sup> (Tosoh Bioscience)	1500-30000 Da	Silice	Sulfate de sodium 0,1M dans tampon phosphate 0,7M	Kotzamanis <i>et al.</i> , 2007 et adapté de Boza <i>et al.</i> , 1994
Sephadex® G50 Fine (GE Healthcare Bio-Sciences)	5000-150000 Da	Dextran réticulé à l'épichlorohydrine	Tris-HCl 50 mM, pH = 7,5	Gbogouri <i>et al.</i> , 2006
ReproSil® 50 SEC (Dr. Maisch-GmbH)	500-10000 Da	Silice	MeOH/eau/acide trifluoroacétique (10/89,9/0,1 ; v/v/v), pH acide	Robert <i>et al.</i> , 2014
Superdex™ peptide 10/300 GL (GE Healthcare Bio-Sciences)	100-7000 Da	Composite d'agarose et dextran réticulé	Eau + TFA 0,1% / ACN (70/30 , v/v), pH acide	Guérard <i>et al.</i> , 2001, Opheim <i>et al.</i> , 2015, Bodin <i>et al.</i> , 2015, Pesk&Co

Les hydrolysats de faible poids moléculaire, riches en acides aminés libres et en di- et tripeptides, procurent des bénéfices pour la santé, du fait de leur forte digestibilité et de leur teneur en peptides bioactifs (Espe *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Raspe *et al.*, 2013). Ces derniers seront décrits plus en détails dans la section suivante. Ces hydrolysats trouveront donc des applications dans les domaines de la nutrition ou des nutraceutiques (Mine *et al.*, 2010). En revanche, les propriétés fonctionnelles des hydrolysats (émulsion, solubilité, faible amertume...) diminuent avec le poids moléculaire (Gildberg, 1993). Ces observations ont été confirmées par l'étude de Gbogouri *et al.* (2006). En effet, les auteurs ont montré que les hydrolysats présentant les plus hauts poids moléculaires présentent de meilleures capacités d'émulsion et stabilité d'émulsion ainsi qu'une meilleure capacité d'absorption de la matière grasse, contrairement aux composés de plus petit poids moléculaire qui eux, ont l'avantage de présenter une plus forte solubilité. Cette étude confirme également l'impact du degré d'hydrolyse sur la composition peptidique comme l'avait montré Guérard *et al.* (2001). En effet, comme le montre le Tableau 17 plus le DH est fort et plus la proportion de peptides de petits poids moléculaire sera importante. Cela s'explique par le fait que plus la réaction avance, et plus l'enzyme clive des liaisons peptidiques, entraînant la libération de composés de petit poids moléculaire.

Tableau 17. Pourcentage de classe de tailles des peptides d'hydrolysats de tête de saumon en fonction du DH (Gbogouri *et al.* 2006).

Poids moléculaire (Da)	DH = 11,5%	DH = 12,5%	DH = 14,3%	DH = 17,3%
1382 à 2430	13,7%	29,1%	30,3%	30,4%
2430 à 4272	38,9%	44,6%	42,6%	42,2%
4272 à 13200	47,4%	26,3%	27,3%	27,4%

Ainsi, l'action des enzymes va jouer sur le DH et par conséquent sur la taille et la fonction des peptides générés au cours de l'hydrolyse. En contrôlant les conditions d'hydrolyse, il est possible d'obtenir des hydrolysats aux propriétés voulues et il est alors important de choisir entre activité biologique et propriété fonctionnelle. La relation qui existe entre la chromatographie d'exclusion stérique et l'étude du DH permet alors de mettre en place un outil pour définir les paramètres d'hydrolyse dans le but d'orienter la réaction et d'obtenir l'hydrolysat aux propriétés souhaitées (Guérard *et al.*, 2010). Plus précisément, la chromatographie va permettre de vérifier l'adéquation du profil peptidique de l'hydrolysat avec les résultats attendus (une taille précise par exemple). Par ailleurs, cette technique analytique s'avère également utile pour la mise au point de procédés d'hydrolyse enzymatique ou pour la production industrielle d'hydrolysats. En effet, elle permet de vérifier la reproductibilité des protocoles par l'étude de la conformité, par rapport au cahier des charges défini en amont, des échantillons issus de chaque batch de production (Guérard *et al.* 2010). Elle va également permettre de réaliser des études comparées de produits dans le cadre d'études de marché.

Plus largement, la chromatographie d'exclusion stérique, couplée à la méthode de quantification des peptides développée par Bodin *et al.* (2015), permet non seulement de donner le profil de poids moléculaire de l'échantillon mais également d'évaluer la teneur en peptides du mélange. Cependant, malgré les nombreux avantages qu'elle présente, la SEC est une méthode qui montre certaines limites (Lambrecht *et al.*, 2015; Siemensma *et al.*, 1993; Zwietering *et al.*, 1990). En effet, l'analyse des chromatogrammes obtenus peut révéler des retards à l'éluion et des inversions, ainsi que des interférences des échantillons avec des composés non protéiques. De plus, cette méthode sous-estime les petits peptides et les acides aminés libres. On peut également ajouter l'observation de variations dans la réponse d'absorption UV des acides aminés. D'autre part, les techniques de séparation des composés ne permettent pas la caractérisation structurale des peptides composant un hydrolysat. Pour toutes ces raisons, de nouvelles méthodes sont alors explorées pour caractériser les mélanges complexes que constituent les hydrolysats. Par exemple, l'étude de Robert *et al.* (2014) présente une méthodologie pour déterminer la composition peptidique d'hydrolysats de co-produits de crevettes (*Penaeus vannamei*). Globalement, la caractérisation repose sur la combinaison de deux approches -omiques: la transcriptomique et la peptidomique. Dans un premier temps, le mélange peptidique est séparé par électrophorèse puis par chromatographie de phase inversée, avant d'analyser chaque fraction en spectrométrie de masse. Par cette approche, la détermination des peptides présents dans un mélange complexe est améliorée.

### **3.4 Utilisation des hydrolysats d'origine marine: focus sur les peptides bioactifs**

#### **3.4.1 Les peptides bioactifs**

Les hydrolysats présentant de petits poids moléculaires possèdent des teneurs intéressantes en peptides bioactifs. Ceux-ci ont été décrits pour la première fois en 1950 par Mellander et les connaissances à leur sujet n'ont cessées d'augmenter depuis 1979. Aujourd'hui, on leur attribue de nombreuses activités (anti-bactérien, anti-oxydant, anti-hypertensif...). Ces peptides sont présents au sein de la protéine native sous leur forme inactive mais peuvent être libérés par protéolyse enzymatique, c'est le cas lors des phénomènes de transformation des aliments au cours de la digestion ou bien lors de l'hydrolyse enzymatique de matrices protéiques. Une fois libérés dans l'organisme, les peptides bioactifs ont un impact positif sur la santé car ils agissent comme des régulateurs grâce à leur activité de type hormonal. Ainsi, ils présentent un potentiel d'application dans les domaines de la nutrition et de la santé (Meisel, 1997). Leur séquence en acides aminés varie de 3 à 20 résidus et leur activité est basée à la fois sur cette séquence et sur la composition en acides aminés (Pihlanto-Leppälä, 2000). Il existe de nombreux peptides bioactifs dans le lait (He *et al.*, 2013 ; Meisel, 1997 ; Pihlanto-Leppälä, 2000) mais les biomasses marines, et en particulier les co-produits de poisson (He *et al.*, 2013 ; Kim et Mendis, 2006) représentent également des sources intéressantes, comme le montre le Tableau 18.

---

*État de l'art*  
*Les hydrolysats de protéines*

---

Tableau 18. Exemples de bio-activités retrouvées dans les peptides issus d'hydrolysats de biomasses marines.

Activité	Espèce	Référence
anti-oxydante	sole ( <i>Limanda aspera</i> )	Rajapakse <i>et al.</i> , 2005 ; Jun <i>et al.</i> , 2004
	maquereau ( <i>Scomber austriasicus</i> )	Wu <i>et al.</i> , 2003
	lieu ( <i>Theragra chalcogramma</i> )	Je <i>et al.</i> , 2005
	thon	Je <i>et al.</i> , 2007
	moule ( <i>Mytilus edulis</i> )	Rajapakse <i>et al.</i> , 2005c
	calmar géant ( <i>Dosidicus gigas</i> )	Mendis <i>et al.</i> , 2005 ; Rajapakse <i>et al.</i> , 2005b ; Aleman <i>et al.</i> , 2011
	saumon ( <i>Salmo salar</i> )	Ahn <i>et al.</i> , 2012
	raie ( <i>Raja clavata</i> )	Lassoued <i>et al.</i> , 2015
	patelle ( <i>Patella rustiqua</i> )	Borquaye <i>et al.</i> , 2015
	bivalve ( <i>Galatea paradoxa</i> )	
	palourde japonaise ( <i>Ruditapes philippinarum</i> )	Kim <i>et al.</i> , 2013
huître creuse ( <i>Crassostrea gigas</i> )	Zhang <i>et al.</i> , 2015	
secrétagogue	sardine ( <i>Sardina pilchardus</i> )	Rousseau <i>et al.</i> , 2001 ; Ravallec-Plé <i>et al.</i> , 2001
	morue ( <i>Gadus morhua</i> )	Ravallec-Plé et Van Wormhoudt, 2003
	crevette ( <i>Penaeus aztecus</i> )	
	crevette ( <i>Penaeus aztecus</i> )	Cudennec <i>et al.</i> , 2008
merlan ( <i>Micromesistius poutassou</i> )		
anti-proliférative	morue ( <i>Gadus morhua</i> )	Picot <i>et al.</i> , 2006
	carrelet ( <i>Pleuronectes platessa</i> )	
	merlan ( <i>Micromesistius poutassou</i> )	
	saumon ( <i>Salmo salar</i> )	
	calmar géant ( <i>Dosidicus gigas</i> )	Aleman <i>et al.</i> , 2011
anti-hypertensive (ou anti-ECA pour Enzyme de Conversion de l'Angiotensine I)	sole ( <i>Limanda aspera</i> )	Jung <i>et al.</i> , 2006
	colin d'Alaska ( <i>Theragra chalcogramma</i> )	Byun et Kim, 2001 ; Je <i>et al.</i> , 2005
	daurade	Fahmi <i>et al.</i> , 2004
	praire ( <i>Meretrix lusoria</i> )	Tsai <i>et al.</i> , 2008
	Huître ( <i>Pinctada fucata martencii</i> ) Crassostrea talienwhanensis Crosse	Katano <i>et al.</i> , 2003 ; Wang <i>et al.</i> , 2008

*État de l'art*  
*Les hydrolysats de protéines*

	crevette ( <i>Acetes chinensis</i> )	Hai-Lun <i>et al.</i> , 2006
	thon ( <i>Thunnus thynnus</i> )	Lee <i>et al.</i> , 2010
	sardine ( <i>Sardina pilchardus</i> )	Martínez-Alvarez <i>et al.</i> , 2016
	syngnathe ( <i>Syngnathus schlegeli</i> )	Wijesekara <i>et al.</i> , 2011
	limande du Japon ( <i>Limanda aspera</i> )	Jung <i>et al.</i> , 2006
	saumon du Pacifique ( <i>Onconrhnchus keta</i> )	Lee <i>et al.</i> , 2014
	carpe de roseau ( <i>Ctenopharyngodon idella</i> )	Chen <i>et al.</i> , 2012
	bonite ( <i>Katsuwana pelamis</i> )	Intarasirisawat <i>et al.</i> , 2013
	raie ( <i>Raja kenoei</i> ) ( <i>Raja clavata</i> )	Lee <i>et al.</i> , 2011 Lassoued <i>et al.</i> , 2015
	calmar géant ( <i>Dosidicus gigas</i> )	Aleman <i>et al.</i> 2011
anti-bactérien	Leatherjacket ( <i>Meuschenia sp.</i> )	Salampessy <i>et al.</i> , 2010
	sardinelle ( <i>Sardinella aurita</i> )	Jemil <i>et al.</i> , 2014
	blennie zébrée ( <i>Salaria basilisca</i> )	
	gobi ( <i>Zosterisessor ophiocephalus</i> )	
	raie pastenague ( <i>Dasyatis pastinaca</i> )	
	patelle ( <i>Patella rustiqua</i> )	
	bivalve ( <i>Galatea paradoxa</i> )	Borquaye <i>et al.</i> , 2015
	crabe des neiges ( <i>Chionoecetes opilio</i> )	Doyen <i>et al.</i> , 2012
	crabe tourteau ( <i>Cancer irroratus</i> )	Beaulieu <i>et al.</i> , 2013
	huître creuse ( <i>Crassostrea gigas</i> )	Liu <i>et al.</i> , 2008 ; Zhang <i>et al.</i> , 2015
anti-anémiante	<i>Saurida elongata</i>	Dong <i>et al.</i> , 2005
anti-inflammatoire	saumon ( <i>Salmo salar</i> )	Ahn <i>et al.</i> , 2012
photoprotectrice	tilapia ( <i>Tilapia zillii</i> )	Tanaka <i>et al.</i> , 2009
réparation du tissu épithélial	merlu ( <i>Merluccius productus</i> )	Fitzgerald, 2005
anti-coagulante	sole ( <i>Limanda aspera</i> )	Rajapakse <i>et al.</i> , 2005a
immuno-modulatrice	merlu ( <i>Merluccius productus</i> )	Duarte <i>et al.</i> , 2006



Les peptides bioactifs d'origine marine peuvent agir dans la régulation de divers systèmes physiologiques comme le système immunitaire (peptides immuno-modulateurs et anti-prolifératifs), gastro-intestinal (peptides sécrétagogues) ou encore cardio-vasculaire (peptides anti-oxydants ou anti-hypertensifs). Plus précisément, quelques séquences responsables de ces effets ont été identifiées, même s'ils résultent souvent d'une synergie entre différents peptides présents dans l'extrait. Le Tableau 19 montre quelques exemples concernant des peptides anti-oxydants et anti-hypertensifs.

Tableau 19. Quelques exemples de séquences de peptides antioxydants et antihypertensifs identifiées dans des hydrolysats de co-produits d'origine marine.

Activité	Organisme	Séquence	Référence
antioxydant	merlu ( <i>Johnius belengerii</i> )	HGPLGPL GSTVPERTHPACPDFN	Mendis <i>et al.</i> , 2005b Kim <i>et al.</i> , 2007
	thon	VKAGFAWTANQQLS	Je <i>et al.</i> , 2007
	moule ( <i>Mytilus edulis</i> )	HFGDPFH	Rajapakse <i>et al.</i> , 2005c
	calmar géant ( <i>Dosidicus gigas</i> )	FDSGPAVL, NGPLQAGPGER NADFGLNGLEGLA	Mendis <i>et al.</i> , 2005a Rajapakse <i>et al.</i> , 2005b
	antihypertensif	colin d'Alsaka ( <i>Theragra chalcogramma</i> )	GPL, GPM
daurade		FGASTRGA	Je <i>et al.</i> , 2005b
hamaguri ( <i>Meretrix lusoria</i> )		GY, VY, GF, VIY	Fahmi <i>et al.</i> , 2004
huître ( <i>Pinctada fucata martencii</i> )		VRK	Tsai <i>et al.</i> , 2008
( <i>Crassostrea talienwhanensis</i> Crosse)		FY, AW, GW, VW VVYPWTQRF	Katano <i>et al.</i> , 2003 Wang <i>et al.</i> , 2008
crevette ( <i>Acetes chinensis</i> )		FCVLRP	Hai-Lun <i>et al.</i> , 2006
thon		GDLGKTTTVSNWSPPKYKDTF	Lee <i>et al.</i> , 2010
syngnathe ( <i>Syngnathus schlegeli</i> )		TTFPHGP, HWTTQR	Wijesekara <i>et al.</i> , 2011
sole ( <i>Limanda aspera</i> )		MIFPGAGGPEL	Jung <i>et al.</i> , 2006b
saumon du Pacifique ( <i>Oncorhynchus keta</i> )		GLPLNLP	Lee <i>et al.</i> , 2014
carpe de roseau ( <i>Ctenopharyngodon idella</i> )		VAP	Chen <i>et al.</i> , 2012
bonite ( <i>Katsuwana pelamis</i> )		MLVFAV	Intarasirisawat <i>et al.</i> , 2013
raie ( <i>Raja kenoei</i> )		PGPLGLTGP, QLGFLGPR	Lee <i>et al.</i> , 2011

Les peptides marins bioactifs peuvent être extraits de sources protéiques par hydrolyse chimique ou encore par hydrolyse enzymatique (Kim et Wijesekara, 2010). Dans les industries alimentaire et pharmaceutiques, c'est l'hydrolyse enzymatique qui est privilégiée car elle permet une extraction en conditions douces, et ne nécessite pas l'utilisation de solvants organiques ou de réactifs chimiques toxiques. De ce fait, le développement de procédés d'hydrolyse enzymatique sera privilégié dans cette étude.

Dans un contexte on l'on tente de remplacer les substances chimiques des produits commercialisés par des composés plus naturels, l'intérêt pour les peptides bioactifs est croissant. Ainsi, les études portent sur diverses applications. Par exemple, les hydrolysats contenant des

peptides anti-bactériens ou anti-oxydants peuvent être incorporés à des formules alimentaires pour remplacer les conservateurs. C'est le cas de l'étude de (Ketnawa *et al.*, 2016) qui décrit l'incorporation d'hydrolysats de crevette incorporés à du tofu de poisson dans le but de diminuer les phénomènes d'oxydation des lipides et la charge microbienne. Plus original, ils peuvent être utilisés comme molécules anti-fouling (Trepos *et al.*, 2015), afin de réduire l'impact environnemental des substances habituellement utilisées.

### 3.4.2 Utilisation des peptides en alimentation aquacole

#### 3.4.2.1 Enjeux en alimentation aquacole

La FAO (2014) indique, qu'aujourd'hui, la population mondiale n'a jamais consommé autant de poisson et ce sont alors les secteurs de la pêche et de l'aquaculture qui permettent de satisfaire ces besoins nutritionnels émergents. Par conséquent, la production mondiale de l'aquaculture continue de croître et fournissait en 2012 près de la moitié du poisson destiné à la consommation humaine (Figure 29).

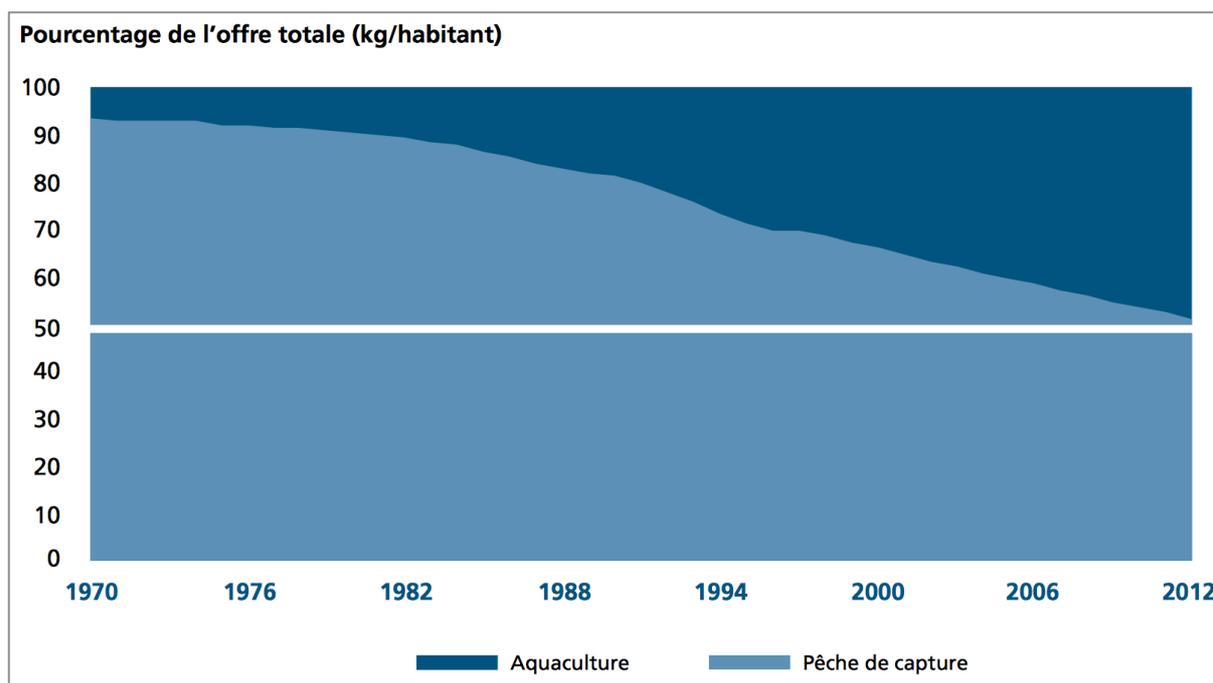


Figure 29. Part respective de l'aquaculture et de la pêche de capture dans la consommation alimentaire de poisson (FAO, 2014).

En 2010, le secteur de l'aquaculture a utilisé 73% de la production de la farine de poisson et 71% de la production d'huile de poisson (FAO 2014). Il est en plein essor depuis ces dernières années et la fourniture en aliment est le frein majeur à son développement. En effet, les aliments

fournis aux poissons d'élevage possèdent une quantité importante de farines et d'huiles de poisson, des ingrédients issus des pêcheries. Or, les ressources en protéines d'origine animale se raréfient et des produits de remplacement d'origine végétale ont alors été incorporés (Minjarez-Osorio *et al.*, 2016) dans les aliments utilisés en aquaculture. Bien qu'apparaissant comme une solution idéale, ces produits ne peuvent totalement remplacer les farines animales de l'alimentation aquacole car ils peuvent affecter la croissance des animaux (Valente *et al.*, 2016). En effet, en raison de leurs qualités nutritionnelles, les farines fournissent des acides aminés essentiels comme la lysine ou la méthionine tandis que les huiles de poisson sont une source en acide eïcosapentaénoïque (AEP) et en acide docosahexaénoïque (ADH) (Dallongeville, 2003 ; Dewailly *et al.*, 2007). Ces carences peuvent affecter l'appétit, la digestion, le métabolisme intermédiaire et la santé des poissons. Ainsi, de nombreuses études travaillent sur l'optimisation des sources protéiques et ont développé différentes solutions. Par exemple, l'apport en acides aminés essentiels peut être optimisé par des sources protéiques différentes et par supplémentation des régimes avec des acides aminés de synthèse (Gómez-Requeni *et al.*, 2003). Dans ce contexte, l'incorporation de peptides possédant des propriétés nutritionnelles, comme cela a été démontré en alimentation humaine, paraît être une solution d'intérêt (Espe *et al.*, 1999 ; Hevrøy *et al.*, 2005 ; Refstie *et al.*, 2004). De nombreuses études se concentrent sur la production d'aliments aquacoles de haute qualité qui permettent un développement optimal des poissons, depuis le stade larvaire, jusqu'au stade adulte, en passant par le stade juvénile. Dans cet état des lieux des connaissances, nous nous intéresserons plus spécifiquement au développement des larves de bar (*Dicentrarchus labrax*), qui ont été choisies comme modèle d'étude dans ce projet.

#### *3.4.2.2 Ontogenèse des fonctions digestives chez les larves de bar (*Dicentrarchus labrax*) et influence de l'alimentation*

##### *3.4.2.2.1 Généralités*

Au cours du développement larvaire, l'ontogenèse de fonctions essentielles comme la digestion, l'osmorégulation, l'immunité ou encore le métabolisme, se mettent en place. La morphologie ainsi que certaines voies métaboliques sont différentes entre les stades larvaires, juvéniles et adultes des poissons. Cependant, ces différences s'estompent au fur et à mesure du développement larvaire par la maturation de certains tissus et organes. Ainsi, à l'éclosion, le tractus digestif des larves est encore inachevé et le développement des fonctions digestives se poursuit encore plusieurs semaines après. Dans les élevages, les larves sont dans un premier temps alimentées par des proies vivantes (rotifères, artémias), car bien qu'elles soient capables d'ingérer un aliment composé, elles ne l'assimilent pas correctement, probablement du fait

d'une carence en enzymes digestives (Kolkovski *et al.*, 1993). Cependant, ce mode d'alimentation vivant représente un coût trop important et est très chronophage. Les proies sont donc petit à petit remplacées par des granulés. Ce changement d'alimentation vers des aliments composés est un sevrage précoce susceptible d'affecter la croissance des larves et de leurs fonctions digestives (Baskerville-Bridges et Kling, 2000 ; Cahu et Zambonino Infante, 1994 ; Hamre *et al.*, 2001). Il est donc important de bien connaître leurs besoins en aliments pour ne pas perturber leur ontogenèse, car cela aura des conséquences, plus tard, sur le développement des juvéniles, puis de l'adulte. En effet, le stade larvaire représente une étape cruciale dans la vie d'un poisson marin et l'alimentation des larves agit sur des gènes clés du développement et, par conséquent, la qualité des aliments est primordiale. Différentes études se sont penchées sur la compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en place des fonctions digestives et comment ils peuvent être influencés par les apports nutritionnels, afin de développer des aliments composés adaptés aux besoins spécifiques des larves de poisson (Cahu et Zambonino, 2007). L'étude des enzymes digestives, pancréatiques et intestinales a ainsi permis de mieux comprendre les phénomènes qui s'opèrent au cours de la maturation du système digestif. La Figure 30 représente le protocole de dissection d'une larve de bar utilisé pour doser ces enzymes et met en évidence l'organisation de son système digestif. Celui-ci est divisé en deux segments: le segment pancréatique et le segment intestinal. Ce dernier contient d'une part, les enzymes pancréatiques sécrétées, comme l'amylase et la trypsine et d'autre part, les entérocytes, composés d'un cytosol contenant les enzymes cytosoliques, comme la peptidase et d'une bordure en brosse et dans laquelle sont localisées des enzymes comme la phosphatase alcaline, la leucine aminopeptidase, la  $\gamma$ -glutamyl transaminase ou la maltase.

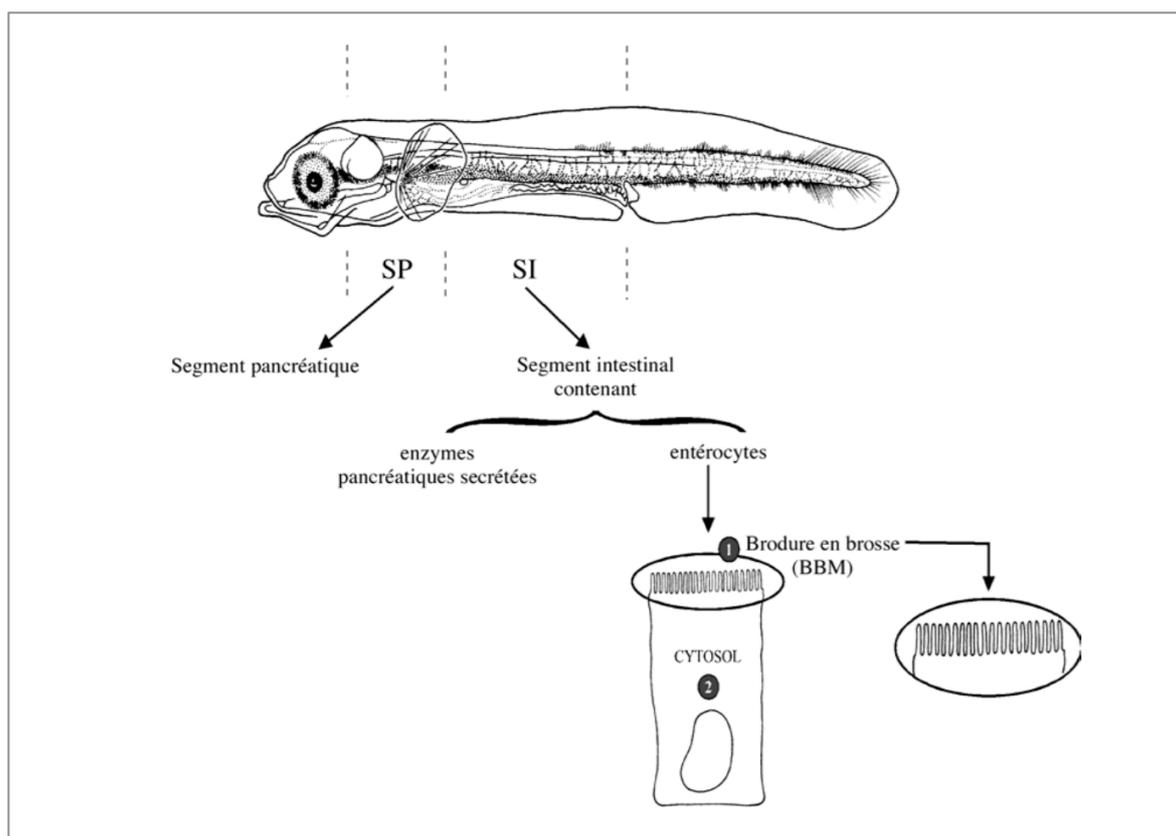


Figure 30. Dissection de la larve de bar pour doser les enzymes digestives (tiré de Cahu et Zambonino 2007).

Dans un premier temps, deux enzymes digestives pancréatiques, l'amylase et la trypsine, apparaissent très rapidement avant même l'ouverture de la bouche, indiquant que l'alimentation ne déclenche pas la synthèse de ces enzymes. Puis, leurs niveaux augmentent notablement pendant les premiers jours de développement de la larve. Elles vont rester à un niveau élevé jusqu'à environ J-25 puis décroîtront pour se stabiliser à un niveau plus bas à partir de J-30 (Cahu et Zambonino, 1994). Cependant, cette baisse ne correspond pas à une diminution de la quantité d'enzyme, mais à une augmentation de l'ensemble des protéines de l'animal. Dès les plus jeunes stades, les larves sont capables de moduler le niveau d'activité de ces enzymes en fonction de la composition du régime alimentaire. Par exemple, l'activité de la trypsine augmente avec la concentration en protéines de l'aliment, tandis que celle de l'amylase augmente avec la concentration en amidon. En revanche, le profil d'évolution des activités reste le même au cours du développement car il est déterminé génétiquement.

Ensuite, la mise en place de la fonction de digestion passe par un phénomène de maturation qui concerne le tractus digestif et qui s'opère suivant une séquence déterminée génétiquement. Les enzymes de la bordure en brosse comme la phosphatase alcaline, la leucine aminopeptidase, la  $\gamma$ -glutamyl transaminase ou la maltase sont très faiblement exprimées jusqu'à J-25 où leur

niveau d'activité augmente jusqu'à J30. Parallèlement, une enzyme cytosolique, la leucine-alanine peptidase est fortement exprimée jusqu'à J-25 puis décroît (Cahu et Zambonino Infante, 1995a). La Figure 31 illustre l'évolution des activités de la phosphatase alcaline (AP) et de la leucine alanine peptidase (leu-ala).

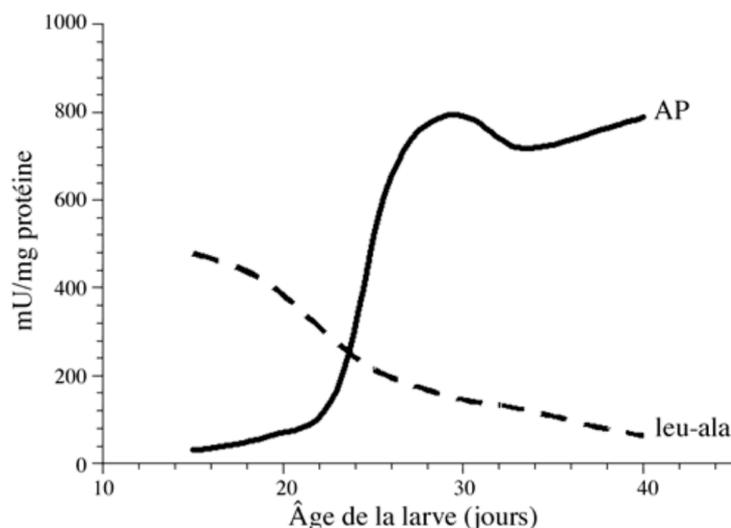


Figure 31. Évolution de l'activité d'une enzyme de la bordure en brosse, la phosphatase alcaline (AP), et d'une enzyme cytosolique, la leucine alanine peptidase (leu-ala) exprimées en unité internationale/mg de protéines au cours du développement larvaire du bar (tiré de Cahu et Zambonino 2007).

L'augmentation de l'activité des enzymes de la bordure en brosse et parallèlement, la chute de l'activité des enzymes cytosoliques correspond à une maturation de l'entérocyte. On assiste alors à la mise en place d'un nouveau type de digestion: le passage d'une digestion de type larvaire à une digestion de type adulte. Également, cette étape coïncide avec le moment où les larves sont capables de s'alimenter avec un aliment composé conventionnel. Ces observations montrent donc que les larves ont une grande capacité de digestion cytosolique, grâce à la présence d'enzymes spécifiques, principalement des di- et tri-peptidases.

Pour conclure, la régulation de la synthèse des enzymes protéiques est âge-dépendant (Péres *et al.*, 1996). L'étude de l'ensemble des réponses des enzymes digestives a permis de comprendre le phénomène de maturation du processus digestif et ainsi déterminer les besoins nutritionnels des larves pour les grandes classes de nutriments. Si l'on s'intéresse plus particulièrement à la digestion des protéines, on observe que la régulation de la trypsine est faible chez les jeunes stades et les larves montrent en revanche une forte expression des dipeptidases cytosoliques. Dans cette étude, nous nous focaliserons sur l'apport protéique et plus particulièrement sur les formes moléculaires optimales.

*3.4.2.2 Influence de la longueur des chaînes de protéines incorporées dans l'aliment sur le développement larvaire*

L'aliment doit permettre un bon déroulement de la séquence normale d'apparition des fonctions digestives génétiquement programmées, afin de permettre une bonne croissance des larves. Sa composition peut moduler le niveau d'activité des enzymes, même si leur profil d'évolution est, quant à lui, génétiquement déterminé. L'étude des activités enzymatiques des larves a également mis en évidence une forte activité des enzymes cytosoliques, conduisant à formuler l'hypothèse qu'un apport en protéines dans l'aliment sous forme d'hydrolysats, c'est-à-dire sous forme de chaînes protéiques plus courtes, serait mieux assimilé que sous forme de protéines natives. Ainsi, l'équipe de Zambonino *et al.* (1997) a étudié l'influence de l'incorporation d'hydrolysats enrichis en di- et tripeptides sur la croissance et la survie des larves de bar. Trois aliments ont été formulés: un aliment témoin avec de la farine de poisson comme source de protéine et deux autres aliments dont la farine de poisson a été remplacée par 20 et 40% d'hydrolysats enrichis en di- et tripeptides. Les auteurs ont observé de meilleurs taux de croissance et de survie des larves nourries avec 20% de peptides en comparaison avec les deux autres groupes, signifiant une amélioration globale du développement des individus. Associée à cette amélioration globale, l'étude des enzymes digestives a montré une activité élevée des peptidases cytosoliques ainsi qu'une maturation intestinale plus précoce et de plus grande amplitude. Ainsi, les protéines sous forme d'hydrolysats et donc présentant des longueurs de chaînes plus courtes sont plus facilement ingérées et digérées par les larves du fait de leur équipement enzymatique. Les nutriments sont alors mieux assimilés et la croissance des larves est meilleure. Ces résultats ont donc permis d'établir un lien entre le bon déroulement de la séquence de maturation du système digestif et un bon développement des larves qui se traduit par une croissance correcte et une survie élevée. Cependant, l'aliment contenant 40% d'hydrolysats ne permettait pas d'améliorer les performances zootechniques des larves. En effet, un excès en di- et tripeptides conduisait d'une part à un retard du développement de la bordure en brosse de l'intestin, ainsi qu'à une saturation des transporteurs. De ce fait, l'incorporation de peptides dans l'aliment doit être modérée afin d'observer des effets intéressants sur les larves. Plus tard, (Cahu *et al.*, 1999) ont confirmé ces résultats en étudiant l'effet de l'incorporation d'un hydrolysats commercial, le CPSP (concentré soluble de protéines de poisson, Sopropêche, Boulogne-sur-mer) dans l'aliment. Là encore, c'est une incorporation à un niveau modéré qui a permis d'observer un bon développement des larves. À l'issue de l'ensemble des résultats obtenus concernant le développement et la régulation des enzymes des larves, une formulation d'aliment adaptée au stade larvaire a été développée et brevetée (Zambonino *et al.*, 2000/brevet international WO 00/64273).

Dans ces deux études, la croissance et la survie sont analysées car ce sont des critères biologiques intégrateurs de l'ensemble des processus métaboliques. Cependant, un effet inattendu a également pu être observé: l'incorporation de di- et tripeptides dans l'aliment a permis de diminuer les taux de malformations squelettiques des larves. Cependant, les mécanismes impliqués n'ont pas été identifiés mais ces effets positifs sur le développement squelettique seraient dus à l'amélioration globale de la santé de la larve.

### 3.4.2.3 Influence de la forme moléculaire de la fraction protéique de l'aliment de sur les malformations squelettiques des larves de bar (*Dicentrarchus labrax*)

#### 3.4.2.3.1 Impact économique des malformations squelettiques des larves de bar dans les élevages

Dans les écloséries de bar, le point de blocage majeur concerne les malformations des larves qui se répercutent sur les individus adultes, comme illustré sur la Figure 32.



Figure 32. Bar de phénotype normal (en haut) comparé à un bar malformé (en bas).

Ces modifications du squelette altèrent la morphologie extérieure des larves et ont des incidences sur leur croissance et leur taux de survie (Boglione *et al.*, 2013a, b). Les individus qui ne survivent pas sont donc alimentés pour rien, tandis que les autres deviennent des poissons adultes malformés dont la valeur commerciale est plus faible, entraînant dans tous les cas, un coût supplémentaire pour les professionnels. Ces derniers étant soucieux de ne pas dégrader leur image, il est difficile de calculer précisément les pertes économiques que les malformations engendrent, mais elles seraient tout de même estimées à plus de 50.000.000€/an en Europe. Cependant, une réduction de 50% des malformations squelettiques pourrait permettre d'économiser environ 25.000.000€/an (Hough, 2009), soulignant ainsi l'enjeu que représente le développement de pratiques d'élevages permettant de diminuer ce problème et, par conséquent, son impact économique. Dans ce contexte, des études comme le projet européen Finefish ont travaillé sur cette problématique. Également, des entreprises comme Biomar, ont développé des

aliments contenant des probiotiques et permettant de diminuer les malformations de différentes espèces de poisson.

#### *3.4.2.3.2 Influence de l'incorporation de peptides dans l'aliment sur la diminution des malformations squelettiques des larves de bar*

Les causes des malformations sont diverses et sont principalement dues à des conditions d'élevage non optimales (taille des bacs, concentration des individus...), à des facteurs génétiques ou encore à des déséquilibres nutritionnels (Boglione *et al.* 2013a,b) comme des apports non adaptés en vitamines, en lipides ou en protéines (Zambonino et Cahu, 2010). Concernant ce dernier aspect, qui est celui auquel nous nous intéressons dans cette étude, même si à ce jour on connaît les teneurs optimales requises pour la fraction azotée (Rønnestad *et al.*, 2013), des études ont pu montrer que ce n'est pas le seul facteur limitant. Ainsi, l'étude de Zambonino *et al.* (1997) a été la première à observer un effet du poids moléculaire des protéines incorporées dans l'aliment sur les malformations des larves de bar. Plus précisément, les auteurs ont mis en évidence une diminution du taux de malformation des larves, accompagné d'une croissance et d'un taux de survie corrects, provoqué par la présence d'une teneur modérée de di- et tripeptides dans l'aliment. Cahu *et al.* (1999) ont pu confirmer ces résultats et même si les mécanismes impliqués ne sont pas encore très bien connus, il semblerait que l'introduction de peptides de petit poids moléculaire améliorerait la maturation du système digestif, permettant aux larves une meilleure assimilation des nutriments et par conséquent, un meilleur état général. Cependant, le pourcentage de di- et tripeptides dans l'aliment doit rester modéré et ne pas dépasser 20% de l'apport azoté total (% de peptides <500 Da/quantité azote total des aliments), au risque de saturer les mécanismes de transport au sein du tractus digestif provoquant une altération à la fois la croissance des larves et de leur taux de survie (Zambonino *et al.* 1997 ; Cahu *et al.* 1999). De ce fait, les études plus récentes ne dépassent pas des pourcentages d'incorporation de 23% (Delcroix *et al.*, 2015; Kotzamanis *et al.*, 2007). Pour cela, la répartition des pourcentages de poids moléculaire de l'hydrolysats, analysée en chromatographie d'exclusion stérique, est utilisée pour ajuster la formulation et obtenir la concentration finale en di- et tripeptides souhaitée. Le poids moléculaire est d'ailleurs le seul facteur pris en compte et décrit dans la caractérisation des hydrolysats pour ce type d'application. Par ailleurs, les études citées précédemment utilisent des hydrolysats issus de matières premières d'origine marine (Zambonino *et al.* 1997 ; Cahu *et al.* 1999 ; Kotzamanis *et al.* 2007 ; Delcroix *et al.* 2015). Cependant, on peut également citer les travaux de Gisbert *et al.* (2012) et Skalli *et al.* (2014) qui ont étudiés l'incorporation dans des aliments aquacoles d'hydrolysats de levures et de sang de porc.

Un autre point intéressant à évoquer dans cette analyse de la littérature, est que l'incorporation de peptides dans l'aliment a un effet positif non seulement sur la croissance, le taux de survie, et sur la diminution des malformations mais également sur la flore. Ainsi, l'effet probiotique que peut apporter l'aliment, et plus particulièrement, l'hydrolysats est un autre aspect intéressant dans le domaine de l'élevage. Des études comme celle de Kotzamanis *et al.* (2007) et Delcroix *et al.* (2015) sur le bar ou de Hermannsdottir *et al.* (2009) sur le flétan ont observé des effets bénéfiques de l'incorporation en di- et tripeptides dans l'aliment sur le microbiome des larves, et plus généralement sur leur statut immunitaire des larves, suggérant un effet probiotique des hydrolysats. Les mécanismes impliqués n'ont pas encore été mis en évidence mais la présence de peptides bioactifs ainsi que de composés non protéiques comme les phospholipides, dans l'aliment pourraient expliquer les effets observés (Delcroix *et al.* 2015).

L'objectif de ce deuxième volet, qui sera décrit dans le quatrième chapitre de ce travail, est de développer des hydrolysats à partir de têtes de saumon pour des applications en aquaculture. Dans ce but, deux hydrolysats aux compositions peptidiques contrastées ont été développés en laboratoire et caractérisés. Ils ont ensuite été fabriqués à l'échelle pilote par le partenaire Diana pour être testés *in vivo* dans les infrastructures d'IFREMER. L'objectif de ces essais est d'étudier l'influence de l'incorporation de deux teneurs différentes en peptides de petits poids moléculaires, et plus particulièrement des di- et tripeptides, issus de co-produits de saumon sur les taux de malformation de larves de bar (*Dicentrarchus labrax*).



## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 1. MATIÈRE PREMIÈRE

Les matières premières utilisées étaient des peaux et des têtes de saumon Atlantique (*Salmo salar*) congelées, fournies par la société Meralliance. Les peaux (Figure 33) ont été choisies car elles sont une source importante de collagène: celui-ci représente environ 20% du poids frais.



Figure 33. Peaux de saumon Atlantique après transformation des poissons (photographie Meralliance).

Les têtes (Figure 34) ont été sélectionnées car c'est l'un des co-produits disponibles qui contient le plus de chair, avec une teneur en protéines de l'ordre de 13% (données Meralliance). Ces deux co-produits provenaient de poissons transformés dans la semaine suivant l'abattage. Les poissons ont suivi la chaîne de production dans un local à 8°C. Les conditions de production ont garanti la qualité des produits et co-produits, et ont suivi les normes en vigueur appliquées aux usines de production agroalimentaire. Chaque type de co-produit a été collecté dans un bac spécifique dédié, puis congelé à -20°C. En effet, le procédé d'extraction du collagène développé dans la thèse nécessite impérativement une haute qualité biochimique et microbiologique des co-produits, de telle sorte que les contaminations microbiennes ou la dégration par des protéases soit la plus limitée possible. Si ces conditions ne sont pas réunies, le procédé présenté ici n'est pas adapté.



Figure 34. Tête de saumon.

## 2. DÉVELOPPEMENT DES PROCÉDÉS D'EXTRACTION DES INGRÉDIENTS

### 2.1 Mise au point d'un procédé d'extraction de collagène issu de peaux de saumon

Les protocoles d'extraction du collagène ont été réalisés à plusieurs échelles. Deux protocoles (A et E) ont d'abord été testés au LEMAR. Ensuite, un des deux protocoles (E) a été validé et il a été transposé à l'échelle pilote, où onze essais ont été réalisés au total par les partenaires industriels sous la coordination de M. Vincent Gélamur. Au cours de ces essais, différents paramètres ont été modifiés afin que le protocole soit réalisable à une échelle industrielle, tout en conservant les caractéristiques recherchées du collagène. Dans ces essais, mon rôle a été d'analyser les résultats afin de qualifier les différents collagènes obtenus.

#### 2.1.1 Infrastructures

Pour tester la faisabilité du protocole, les essais ont été réalisés à partir de différentes quantités de matière première, et ce, de manière croissante depuis les premiers essais en laboratoire jusqu'au dernier essai pilote. Pour cela, différentes infrastructures ainsi que leurs équipements ont été mobilisés, en fonction de la quantité de matière première à traiter, comme le montre le Tableau 20 :

- IUEM-LEMAR à Plouzané (29)
- SPF Diana à Elven (56)
- Atlantic Pet Food à Concarneau (29)

Tableau 20. Infrastructures utilisées pour les différents essais pilotes en fonction des capacités de traitement.

Essais	Protocoles	Capacités de traitement de la matière première	Infrastructures
Laboratoire	A et E	< 100g	IUEM-LEMAR
Pilote	E + modifications	1-10kg	Hall pilote SPF Diana
		60-900kg	Atlantic Pet Food

Les premiers essais pilotes, impliquant des quantités de matière première allant jusqu'à 1,5kg ont été réalisés dans des réacteurs de 10L (Figure 35). Au-delà de ces quantités, des seaux de plusieurs dizaines de litres, puis des bacs de plusieurs centaines de litres, ont été utilisés pour réaliser les différentes étapes des protocoles.



Figure 35. Réacteur (VMI, réacteur basculant 10L) de la société SPF-DIANA dans lequel a été réalisé l'extraction de collagène pour des quantités allant jusqu'à 1,5kg.

## 2.1.2 Protocoles d'extraction du collagène

### 2.1.2.1 Essai de deux protocoles d'extraction du collagène en laboratoire

Deux protocoles ont été testés en laboratoire: un protocole classique d'extraction acide/base à froid nommé protocole A, adapté de (Eysturskarð *et al.*, 2009a) et un protocole alternatif à l'eau à température modérée nommé protocole E, adapté de (Kołodziejska *et al.*, 2008). Le protocole classique d'extraction acide (A) a permis d'obtenir un collagène « témoin » auquel a été comparé l'échantillon obtenu avec une méthode alternative (E), afin de tester sa viabilité.

Le premier protocole testé, ou protocole A, était un procédé qui s'appuie sur la solubilité du collagène dans l'acide. Il est décrit dans la Figure 36 et se décline en quatre étapes :

#### (1) L'étape de pré-traitement des peaux

Les peaux préalablement dépulpées manuellement ont été prédécoupées en morceaux de taille comprise entre 2 et 3 cm (Figure 37) puis les morceaux ont été plongés successivement dans différents bains. La matière première a ainsi été nettoyée, délipidée, dépigmentée et débarrassée des protéines non-collagéniques afin d'obtenir un collagène clair et présentant une faible charge microbienne.

#### (2) L'étape d'extraction du collagène

Le collagène a été solubilisé par un traitement des peaux à l'acide acétique.

#### (3) L'étape de purification du collagène

Le mélange réactionnel a subi différentes étapes de centrifugation et d'ultracentrifugation (tubes Amicon) qui ont permis d'éliminer les composés insolubles ainsi que les résidus de peau afin de purifier le collagène.

(4) L'étape de conditionnement du collagène

La solution de collagène obtenue a été congelée puis lyophilisée afin de la conserver plus longtemps sans risque de dégradation.

Le protocole A a été réalisé deux fois. Concernant plus précisément les volumes et quantités de réactifs et matière première impliqués pour chacun des essais, 5g de peau ont été traités successivement avec 50mL de chacune des solutions de pré-traitement (NaOH 0,1M, alcool butylique à 10%, peroxyde d'hydrogène à 1%), puis l'extraction a été réalisée dans 50 mL de solution d'acide acétique. Les échantillons issus de ces deux essais ont été nommés A1 et A2.

Le deuxième protocole testé, ou protocole E, s'appuyait sur la rupture partielle des liaisons hydrogènes du collagène par la chaleur et est décrit dans la Figure 36. Comme pour le protocole d'extraction acide, le protocole se décline en deux étapes :

(1) L'étape de pré-traitement des peaux

Les peaux préalablement dépulpées manuellement ont été prédécoupées en morceaux de taille comprise entre 2 et 3 cm (Figure 37) puis les morceaux ont été plongés dans plusieurs bains d'eau salée et ensuite rincées pour éliminer principalement les protéines solubles non collagéniques mais également les impuretés, germes et résidus de matière grasse.

(2) L'étape d'extraction du collagène

Le collagène a été solubilisé dans l'eau sous l'action de la chaleur.

(3) L'étape de purification du collagène

La centrifugation a permis d'éliminer les résidus de peau afin de ne récupérer que la solution de collagène.

(4) L'étape de conditionnement du collagène

Là aussi, la solution de collagène a été congelée puis lyophilisée, dans un souci de conservation.

Le protocole E a été réalisé deux fois. Pour chacun des essais, **50g** de peau ont été traités avec 2x300mL de solution NaCl 0,45M pour le pré-traitement puis 300mL d'eau pour l'extraction à 45°C pendant 60min. Entre les deux, le sel a été éliminé en rinçant les peaux à l'eau distillée en continu pendant 1 min. Les échantillons issus de ces deux essais ont été nommés E1 et E2.

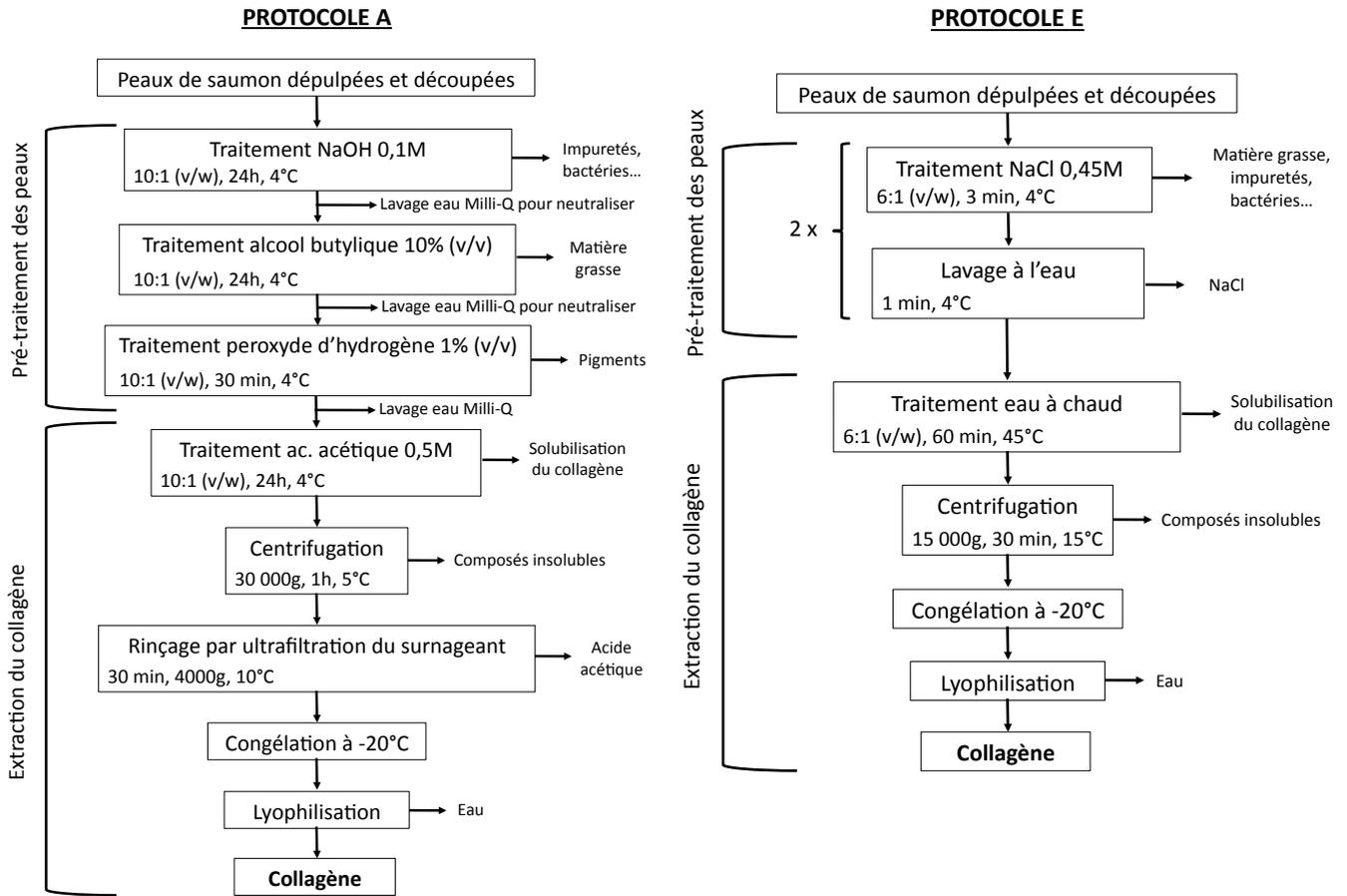


Figure 36. Diagramme des protocoles A, adapté de Eysturskarð *et al.* (2009a) et adapté de Kolodziejka *et al.* (2008) testés en laboratoire.

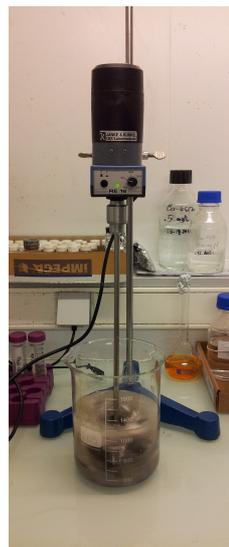


Figure 37. Protocoles d'extraction A et E du collagène testés à l'échelle laboratoire.

### 2.1.2.2 Matériel

Les centrifugations ont été réalisées sur une centrifugeuse Eppendorf (5810R avec rotor F-34-6-38). Le mélange réactionnel lors des étapes d'extraction a été mélangé à l'aide d'un agitateur à hélice Gémini à une vitesse de 750 rpm. La lyophilisation a été réalisée à -55°C à une pression comprise entre 0,02 et 0,05mbar sur un lyophilisateur Christ (Beta 1.8 LD-2).

### 2.1.3 Transposition d'un protocole d'extraction du collagène à l'échelle pilote

Le protocole d'extraction E a été choisi pour être transposé à l'échelle pilote. Dans la Figure 38, il a été divisé en 5 étapes nécessitant d'être développées, pour qu'il soit réalisable à l'échelle industrielle. Ainsi, plusieurs paramètres de chacune de ces étapes ont été modifiés tout au long des essais pilotes.

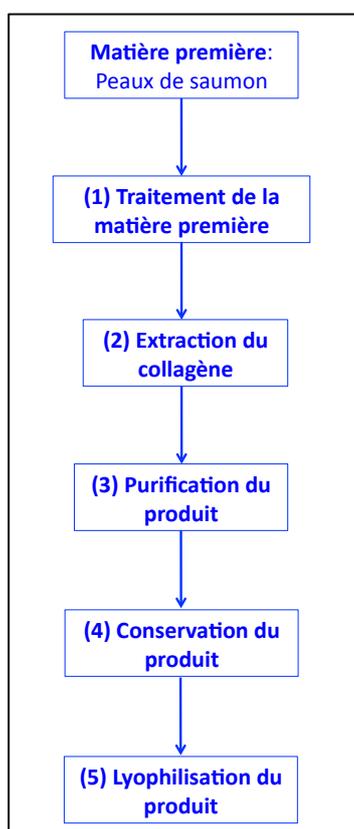


Figure 38. Schéma du protocole E adapté de Eysturskarð *et al.* (2009a) en 5 étapes à développer.

#### 2.1.3.1 Déroulement global du développement du protocole

Le Tableau 21 résume les étapes du protocole modifiées pour chacun des essais, ainsi que les différents développements testés pour chacune de ces étapes (détaillés dans les sections 2.1.3.2.

à 2.1.3.6.). Pour les trois premiers essais, le but a été de vérifier la reproductibilité du protocole à l'échelle pilote. Pour cela, le protocole testé en laboratoire a été réalisé à l'identique, et seul le lot de matière première a été modifié pour le pilote n°3 (P3), afin de vérifier qu'il n'y ait pas d'effet lots. Pour chacun des autres essais, la modification des étapes du protocole a été guidée par l'analyse critique des résultats obtenus. La disponibilité des installations n'ont pas permis de réaliser de répétitions.

Tableau 21. Étapes du protocole modifiées et quantité de matière première traitée au cours des différents essais pilotes.

	<b>Étapes du protocole modifiées et développements testés</b>	<b>Quantité de peaux traitée</b>
<b>P1</b>	-	1,5kg
<b>P2</b>	-	1,5kg
<b>P3</b>	Nouveau lot de matière première	1,5kg
<b>P4</b>	- étape (1): a, b - étape (2): a	1kg x 9
<b>P5*</b>	-	-
<b>P6</b>	- étape (3): a, b - étape (5): a (chez Innov'ia), b	10,7kg
<b>P6 bis</b>	- étape (1): c - étape (5): a (chez LIS)	190kg + 62,5kg
<b>P7</b>	- étape (1): c' + essais sous-traitant Procidys	-
<b>P8</b>	- étape (1): protocole final AM2C - étape (5): a (chez LIS)	-
<b>P9</b>	- étape (1): d (protocole 1) - étape (2): b	50kg
<b>P10</b>	- étape (1): d (protocole 2) - étape (4): a, b	225kg
<b>P10.1</b>	- étape (4): a	
<b>P11</b>	- étape (1): d (protocole 3) - étape (3): c - étape (5): c	100kg

\* matière première mal délipidée -> collagène obtenu dégradé: les développements testés sur cet essai n'ont pu être évalués

### 2.1.3.2 Développement de l'étape (1) Pré-traitement de la matière première

L'étape de pré-traitement de la matière première agit principalement à deux niveaux:

- la délipidation, qui permet d'éliminer la matière grasse
- la décontamination, qui permet de diminuer la charge bactérienne.

Plusieurs solutions ont été mises en place afin de développer cette étape tout en répondant à ces deux principales attentes. Tout d'abord, les paramètres du protocole d'origine ont été modifiés en jouant sur les quantités d'eau et les teneurs en NaCl utilisées. Ensuite, un nouvel équipement,

l'AM2C, permettant de nettoyer mécaniquement les peaux a été testé. Enfin, de nouveaux réactifs, la soude et l'acide, ont été testés dans le but d'optimiser plus particulièrement la décontamination de la matière première.

#### *2.1.3.2.1 Diminution du rapport eaux de lavage/peaux (1a): P4*

Un ratio entre les peaux et les eaux de lavage/rinçage de 1:2 a été testé, au lieu de 1:6 utilisé dans le protocole initial.

#### *2.1.3.2.2 Diminution de la teneur en NaCl (1b): P4*

Une molarité de NaCl de 0,12M a été testée, au lieu de 0,45M utilisé dans le protocole initial.

#### *2.1.3.2.3 Utilisation de l'AM2C (1c; c'): P6bis, P7*

Avant l'essai avec l'AM2C, les peaux de saumon étaient dépulpées par les équipements de la société Meralliance avant d'être congelées. Ainsi, la matière première reçue dans l'infrastructure où était réalisé l'essai était prête à être broyée, puis nettoyée par les bains successifs d'eau salée, sans étape préalable d'élimination du muscle brun. L'AM2C est une séparatrice, désosseuse et dénerveuse qui élimine la pulpe et la matière grasse des peaux de saumon. Cet appareil a été testé dans le but de s'affranchir des étapes de lavage/rinçage au NaCl, ainsi que du dépulpage des peaux. Elle a dans un premier temps été testée sur des peaux non dépulpées (**1c**). Ensuite, pour tester plus précisément sa faisabilité, plusieurs formes de peaux ont été passées à l'AM2C afin d'étudier son efficacité : des peaux entières non dépulpées et des peaux entières dépulpées selon 2 modes opératoires différents avec la Baader et la Trio (**1c'**). La composition chimique des peaux a été analysée et comparée aux peaux des essais pré-pilotes dépulpées et lavées à l'eau salée.

#### *2.1.3.2.4 Traitement des peaux par une méthode acide/base (1d): P9, P10, P11*

Une étape de décontamination par un bref traitement acide/base des peaux est une voie qui a été testée pour diminuer la charge microbienne. Des essais préliminaires ont d'abord été réalisés en laboratoire avec les échantillons issus du P7, par la société Séprosys (non montrés ici), pour déterminer si ce traitement des peaux diminuait la charge microbienne du produit final. Ces essais ont également permis de privilégier le choix de l'acide formique pour son efficacité et son action bactéricide. La méthode a ensuite été transposée à l'échelle pilote pour être développée. Pour cela, trois protocoles différents ont été testés sur les peaux sorties de l'AM2C, par ordre de numérotation. Chacun d'entre eux est détaillé dans la Figure 39.

Globalement, les peaux ont d'abord été traitées à la base puis rincées. Elles ont ensuite été traitées à l'acide formique puis rincées encore une fois (**protocoles 1 et 2**), ou neutralisées (**protocole 3**).

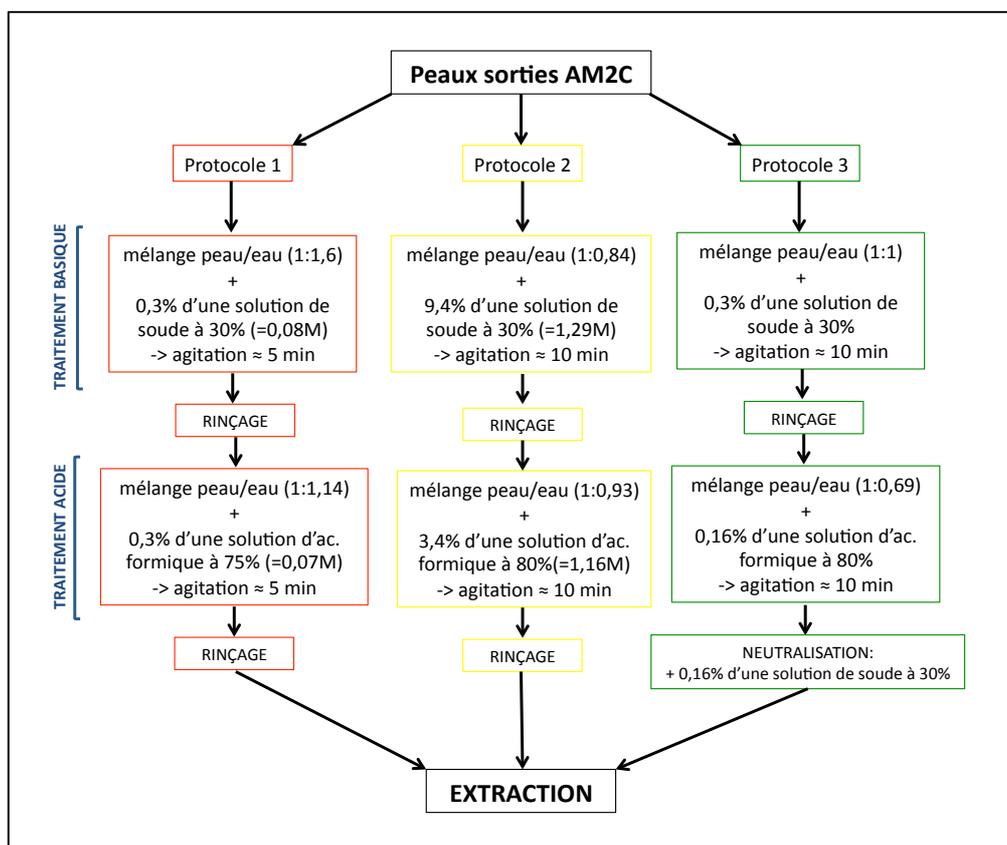


Figure 39. Protocoles de pré-traitement acide/base testés sur les peaux de saumon issues de l'AM2C avant l'étape d'extraction.

### 2.1.3.3 Développement de l'étape (2) Extraction du collagène

Du fait que les différents protocoles d'extraction du collagène se distinguent principalement par l'étape d'extraction, l'optimisation de cette étape a consisté en la modification de deux paramètres du protocole initial.

#### 2.1.3.3.1 Diminution du rapport eau d'extraction/peau (2a): P4

Une diminution du ratio eau/matière première de 1:2 a été testé, au lieu de 1:6 initialement.

#### 2.1.3.3.2 Réduction de la vitesse d'agitation (2b): P9

La vitesse d'agitation au cours de l'extraction du collagène dans l'eau à température modérée à été diminuée à 25Hz, contre les 50 Hz habituellement utilisés.

#### 2.1.3.4 Développement de l'étape (3) Purification du collagène

La purification du collagène permet d'éliminer les éléments insolubles résultant de l'extraction afin d'obtenir un produit présentant une teneur en collagène optimale. Plusieurs techniques ont été testées pour optimiser cette étape à l'échelle pilote.

##### 2.1.3.4.1 Tamisage (3a): P6

La centrifugation a été remplacée par des étapes de tamisage avec des tamis sur maille de 250µm pour éliminer les résidus de peaux qui se retrouvent habituellement dans le culot de centrifugation.

##### 2.1.3.4.2 Essais d'ultrafiltration/déminéralisation/désodorisation réalisés par SEPROSYS (3b): P6

Ces essais ont été réalisés par la société SEPROSYS dans le but d'améliorer la purification et la concentration du collagène après extraction et en remplaçant l'étape de centrifugation par la filtration sur tamis. À partir des résultats obtenus, l'échantillon issu du traitement le plus pertinent a été sélectionné pour être analysé. Ainsi, l'impact de la concentration sur membrane 50kDa à 45°C sur le collagène a été étudié.

##### 2.1.3.4.3 Décantation du produit d'extraction (3c): P11

Le mélange issu de l'extraction est décanté et la solution de collagène est ensuite soutirée par le fond.

#### 2.1.3.5 Développement de l'étape (4) Conservation du collagène

Le développement d'un protocole de conservation du collagène s'est déroulé en deux étapes. La première a consisté à sélectionner, parmi huit formulations de conservateurs, celle permettant d'obtenir un produit présentant une charge microbienne acceptable pour une commercialisation (Porracchia, 2006). La deuxième étape a porté sur l'étude de stabilité du produit auquel a été ajoutée la formulation choisie. Les développements suivants ont été réalisés par la société Yslab, partenaire du projet.

##### 2.1.3.5.1 Essais de conservateurs (4a): P10, P10.1

Afin de développer un protocole de conservation adapté, huit formulations ont été élaborées à partir de quatre conservateurs. Ils ont été sélectionnés car ils sont autorisés à être incorporés

dans des produits certifiés BIO. Parmi eux, on distingue trois conservateurs de synthèse: le sorbate de potassium, le benzoate de sodium et l'Iscaguard®PEG commercialisé par la société ISCA; et un conservateur naturel certifié ECOCERT: l'Iscaguard®+SAP, également commercialisé par la société ISCA. Le sorbate de potassium et le benzoate de sodium sont des acides organiques, une des classes de conservateurs les plus utilisés. Ils ont un double effet antimicrobien par l'acidification du milieu, d'une part, et par l'activité spécifique de l'acide, d'autre part. Le sorbate de potassium est le sel de potassium de l'acide sorbique, ou encore appelé E202. Il possède une activité essentiellement antifongique et est également actif contre les levures et certaines bactéries Gram (-) (Fernandez *et al.*, 2012). Le benzoate de sodium est le sel de sodium de l'acide benzoïque, ou encore appelé E211. Il est surtout efficace contre les levures et dans une moindre mesure, contre les moisissures (Fernandez *et al.*, 2012). Concernant l'Iscaguard®PEG, c'est un mélange de phénoxyéthanol et triéthylène glycol présentant un large spectre efficace contre les bactéries, les levures, les moisissures et les champignons. Il agit sur les tensions de surface interfaciale des membranes des cellules des microorganismes. Quant au conservateur d'origine naturel, l'Iscaguard®SAP, c'est un mélange de propanediol et d'extrait d'écorce de saule blanc qui possède des propriétés antimicrobiennes. Les huit formulations qui ont été testées sont présentées dans le Tableau 22. Pour étudier leur efficacité, chacun d'entre elle a été incorporée à des échantillons de collagène issus du pilote 8. Ensuite, le développement de la flore totale a été étudié durant 30 jours avec des mesures réalisées à J0, J7 et J15. Enfin, les résultats entre les formulations ont été comparés.

**Tableau 22. Composition des huit formulations de conservateurs testées.**

Formulation	Conservateur	Concentration
1	sorbate de potassium	0,5%
2	sorbate de potassium	0,2%
3	benzoate de sodium	0,5%
4	benzoate de sodium	0,2%
5	sorbate de potassium + benzoate de sodium	0,2%
6	Iscaguard®+SAP	0,3%
7	Iscaguard® PEG	0,5%
8	Iscaguard® PEG	0,2%

#### 2.1.3.5.2 Étude de pré-stabilité (4b): P10

Une fois la formulation sélectionnée, la deuxième étape a consisté à réaliser une étude de pré-stabilité du collagène. On parle d'étude de « pré-stabilité » et non de « stabilité » car le protocole

d'extraction n'en est encore qu'à l'étape de transposition industrielle. Cette étude permet donc d'observer le comportement du produit au cours du temps. Pour cela, la formulation de conservation sélectionnée, le benzotae de sodium à 0,5%, a été ajoutée à l'échantillon issu du pilote 10 et l'évolution de sa flore microbienne a été étudiée à T0, T=7jours, T=1mois et T=3mois, en dénombrant les germes aérobies totaux (DGAT) et les moisissures/levures totales (DMLT).

#### *2.1.3.6 Développement de l'étape (5) Séchage du collagène*

L'objectif est de conditionner le collagène sous forme solide pour les marchés à l'international. Ainsi, les essais d'optimisation ont porté sur deux procédés de séchage différents. Il faut également souligner que le collagène devait être prêt à être commercialisé à l'issue de cette étape. Il devait donc présenter, à la fois une apparence adéquate (couleur, odeur) pour une distribution en tant qu'ingrédient cosmétique, mais également une charge microbiologique faible pour assurer sa conservation. Plusieurs techniques de séchages ont été essayé et comparées afin de choisir la technique la plus adaptée.

##### *2.1.3.6.1 Le séchage par atomisation (5a): P6, P8*

Le principe de cette méthode (Masters, 1972) s'appuie sur la déshydratation d'un fluide pour le transformer en poudre par la mise en contact d'un gaz chaud et d'un fluide dispersé sous forme de fines gouttelettes en amont de la tour d'atomisation. Cette méthode permet l'évaporation du solvant de manière uniforme et rapide par contact direct. De plus, il est possible de contrôler la taille, la forme ou la solubilité des particules en jouant sur les paramètres opératoires. Cela rend cette méthode intéressante pour une application industrielle, le produit pourrait être conditionné selon les besoins du client. Cependant, il faut être vigilant à ce que ce procédé de séchage ne dénature pas la structure du collagène en rompant les liaisons hydrogènes, le convertissant en gélatine. Différents essais ont été réalisés par les sociétés Innov'ia (La Rochelle, France, <http://www.innov-ia.com>), LIS (Cérences, France, <http://www.lesaffre-ingredients-services.fr>) et enfin Tecoma (Maranello, Italie,). Cette dernière utilise la technologie Gatedryer, une technique d'atomisation mettant en œuvre un flux d'air à très haute température tandis que le temps d'exposition du liquide à cette température est très court.

##### *2.1.3.6.2 Le séchage à basse température sous vide (5b): P6*

Le principe de cette méthode de séchage est d'abaisser la pression du fluide afin que l'ébullition de l'eau, et donc son évaporation se fasse à basse température (Białobrzewski and Misiak, 1997). L'avantage de cette technique est que le collagène n'est pas exposé à une température trop forte.

Cependant, il est essentiel de vérifier que ce changement de pression n'ait pas d'influence sur la structure du collagène. Ces essais ont été réalisés par la société Inodry (Colombelles, France, <http://www.inodry.com>).

#### 2.1.3.6.3 Lyophilisation (5c): P11

La lyophilisation permet d'éliminer l'eau d'un produit grâce au phénomène de sublimation (Wolff and Gibert, 1988). Le produit est préalablement congelé et l'eau qu'il contient passe directement de l'état solide à gazeux dans un environnement à très basse pression. La vapeur d'eau quitte alors le produit et est capturée par congélation à l'aide d'un condenseur. C'est un procédé peu utilisé à l'échelle industrielle en raison de son coût élevé. Les essais ont été réalisés par la société Lyophal (Salon-de-Provence, France, <http://www.lyofal.fr>), spécialisée dans la lyophilisation de lots pilotes et industriels.

#### 2.1.4 Calcul du rendement d'extraction du collagène

Le rendement d'extraction du collagène a été calculé d'après la formule utilisée dans l'étude d'(Eysturskarð et al., 2009a), dont est adapté le protocole A. Il s'appuie sur le rapport entre la quantité de produit final obtenu (collagène lyophilisé) et le poids frais de la matière première utilisée.

$$Rdt (\%) = [\text{poids sec collagène (g)} / \text{poids frais peau (g)}] \times 100$$

Ce rendement a été calculé sur les échantillons provenant des essais en laboratoire A2, E1 et E2 et des premiers essais pilote 1, 2 et 3.

## 2.2 Réticulation enzymatique d'un collagène de saumon

Des essais de réticulation enzymatique ont été réalisés sur le collagène obtenu lors des essais pilotes, afin de modifier ses propriétés rhéologiques. Plusieurs protocoles ont ainsi été testés, dans le but de produire des hydrogels et des éponges, et de les comparer avec des protocoles de réticulation chimique.

### 2.2.1 Matériel : collagène et agents de réticulation

#### 2.2.1.1 Le collagène

Le collagène utilisé dans cette étude provenait de l'essai pilote n°2 (P2) réalisé chez SPF Diana. Il était sous forme lyophilisé et est principalement composé de protéines, le collagène en représentant plus de la moitié avec une teneur de 63%, calculée à partir du contenu en Hyp (7,8%) (Figure 40).



	Teneur (%)
Protéines totales	100 ±10,6
Hyp	7,8 ±0,7
Collagène (Hyp x8)	63 ±4,7
Matière grasse	<0,5
Cendre	<0,2

Figure 40. Aspect macroscopique du collagène utilisé pour les protocoles de réticulation.

### 2.2.1.2 Les agents de réticulation utilisés

Deux agents de réticulation ont été testés dans cette étude : un agent enzymatique et un agent chimique. La première partie du travail a consisté en la réticulation du collagène par un agent enzymatique, la transglutaminase (mTG). Afin de comparer les résultats et d'évaluer l'efficacité de cette réticulation, une réticulation chimique avec le glutaraldéhyde (GTA), a été réalisée en parallèle. En effet, le GTA est reconnu comme un agent de réticulation très efficace qui est très bien décrit dans la littérature. Des hydrogels et des gels ont été réalisés à l'aide de ces agents.

#### 2.2.1.2.1 La transglutaminase (mTG)

La transglutaminase utilisée est d'origine microbienne (*Streptoverticilium sp.*). Elle est produite par la société Ajinomoto (Hamburg, Germany). La préparation enzymatique utilisée est l'Activa WM®. Il s'agit d'un conditionnement en poudre contenant 99% de maltodextrine pour 1% d'enzyme. L'activité de l'Activa WM varie de 81 à 135 U.g<sup>-1</sup> de poudre. Elle est évaluée par une méthode de dosage basée sur la capacité de la transglutaminase à catalyser la réaction de formation d'acide glutamique  $\gamma$ -hydroxamate à partir de d'un substrat peptidique. Ainsi, le dosage de l'acide glutamique  $\gamma$ -hydroxamate permet de définir l'unité enzymatique (U) qui correspond à la quantité d'enzyme catalysant la formation d'1 $\mu$ mol de substrat (peptide) en produit (l'acide glutamique  $\gamma$ -hydroxamate) en 1 min:

$$U = 1 \mu\text{mol de produit (ou substrat)} / \text{min}$$

L'activité spécifique (U.g<sup>-1</sup>) est définie comme la capacité par laquelle 1g d'enzyme exerce l'activité catalytique:

$$\text{Activité spécifique (U.g}^{-1}\text{)} = \text{activité mTG en U/g de mTG}$$

Le choix s'est porté sur ce produit car il s'agissait du conditionnement avec le moins d'additifs. La mTG renferme 331 résidus d'acides aminés pour un poids moléculaire de 38 kDa et une

fonction thiol libre. Elle présente une structure monocaténaire non glycosylée bien que renfermant 2 sites potentiels de glycosylation. Le pH optimum d'activité est compris entre 5 et 8 et sa température optimale d'activité est de 50°C mais elle est capable d'agir à des températures de l'ordre de 10°C. Elle est dénaturée à 70°C. La mTG est indépendante de la concentration en calcium (contrairement à la transglutaminase isolée du foie de cochon d'inde).

La mTG est utilisée en agroalimentaire pour améliorer la solidité, l'élasticité et la rétention d'eau des produits carnés finis (saucisses, viandes hachés, produits reconstitués...), mais également pour les produits de la mer (filets de poissons reconstitués, surimi...) et les produits laitiers allégés où la mTG joue un rôle de texturant et de stabilisant ([www.ajinomoto.de](http://www.ajinomoto.de)).

#### 2.2.1.2.2 Le glutaraldéhyde (GTA)

Le glutaraldéhyde (CHO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CHO) présente un poids moléculaire de 100 Da. C'est un intermédiaire de synthèse organique et un composant de solution de développement de films de rayons X. Le GTA est également utilisé comme substance active dans certains produits biocides ([ww.inrs.fr](http://ww.inrs.fr)). C'est également un agent de réticulation des protéines et des composés polyhydroxylés. Le GTA est en effet un agent chimique bifonctionnel. Au niveau du collagène, il va pouvoir réagir avec deux sites réactionnels et former des liaisons covalentes entre deux terminaisons amines (Englert *et al.*, 2007).

### 2.2.2 Préparation d'hydrogels de collagène réticulé

Les premiers essais ont porté sur la préparation d'hydrogels de collagène en le réticulant grâce à une enzyme, la mTG. En comparaison, des hydrogels ont été préparés à partir de collagène réticulé avec un agent chimique, le GTA. Les protocoles sont détaillés en Annexe 1.

#### 2.2.2.1 Protocoles de réticulation du collagène par la mTG

Le protocole a été adapté de (Chen *et al.*, 2014) et de (Nomura *et al.*, 2001a). Une solution de collagène à 40g/L et une autre d'enzyme à 13 760U/L ont été préparées, chacune dans du tampon phosphate 50mM, pH 7. Les deux solutions ont été mélangées à un ratio (1:1) à température ambiante et sous agitation magnétique. La solution finale présente une concentration en collagène de 20g/L et l'enzyme représente 400 UmTG/g de protéines collagéniques. Le mélange a été incubé pendant 2h à 40°C, sans agitation, puis congelé à -20°C.

### 2.2.2.2 Protocole de réticulation du collagène par le GTA

Le protocole a été adapté de Damink *et al.* (1995) et de Yunoki *et al.* (2004). Une solution de collagène à 40g/L et une autre de GTA à 3% ont été préparées, chacune dans du tampon phosphate 50mM, pH 7. Les deux solutions ont été mélangées à un ratio (1:1) à température ambiante et sous agitation magnétique. Le mélange a été incubé pendant 2h à 20°C, sans agitation.

### 2.2.3 Préparation d'éponges de collagène réticulé

Pour l'obtention d'éponges de collagène réticulé, deux méthodes de mélange de l'agent réticulant avec le collagène, ont été testées.

#### 2.2.3.1 Par la mTG (Activa WM®)

Pour obtenir des éponges de collagène réticulé par la mTG, les hydrogels obtenus précédemment ont été lyophilisés.

#### 2.2.3.2 Par le glutaraldéhyde (GTA)

Le protocole, adapté de Damink *et al.* (1995) et Yunoki *et al.* (2004) est présenté sur la Figure 41. Il consiste à immerger du collagène natif dans une solution de GTA. Ainsi, 25 mg de collagène, sous forme lyophilisé, a été plongé dans 5 mL d'une solution de GTA à 0,5%, et a été incubé, sous agitation orbitale à température ambiante pendant 2h.

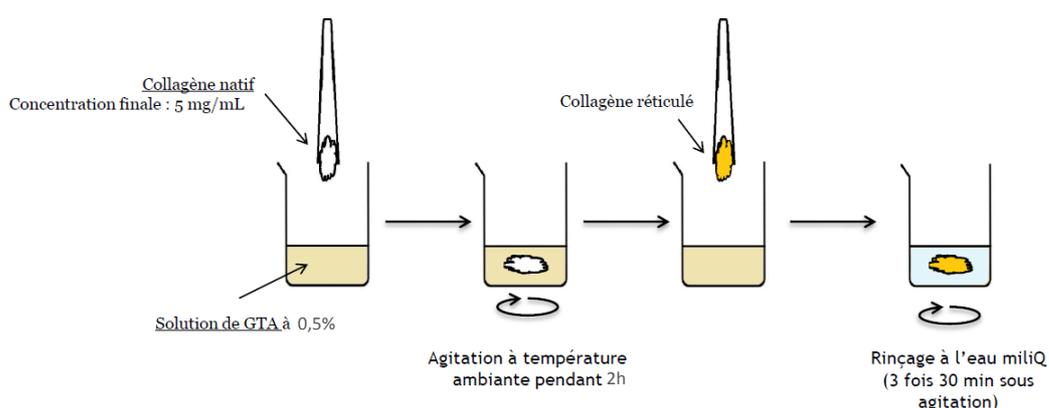


Figure 41. Synoptique du protocole suivi lors des tests préliminaires de formation d'une éponge de collagène réticulé par le GTA.

Après le temps d'incubation, l'éponge (de couleur orangée) a été rincée 3 fois, 30 min avec de l'eau miliQ. L'éponge récupérée a été essorée sur papier absorbant avant d'être lyophilisée.

### **2.3 Hydrolyse enzymatique des têtes de saumon en conditions contrôlées**

Les derniers ingrédients développés étaient issus de têtes de saumon. Ils ont été obtenus par des procédés d'hydrolyse enzymatique. L'objectif était de produire deux hydrolysats présentant chacun une population peptidique inférieure à 7000 Da, le deuxième hydrolysats étant enrichi en di- et tri-peptides par rapport au premier. Le développement et la production de deux hydrolysats avec des degrés d'hydrolyse différents ont été réalisés en plusieurs étapes. Dans un premier temps, le choix des enzymes a été déterminé par des essais en conditions contrôlées, grâce à l'utilisation d'un pH-Stat et deux protocoles ont ainsi été validés. Cependant, comme la méthode du pH-stat ne pouvait pas être utilisé pour réaliser une production à plus grande échelle par l'un des partenaires industriels du projet Pesk&Co, les protocoles ont été testés en conditions de pH non régulé et les résultats ont été comparés avec ceux obtenus en laboratoire. L'étape suivante a été de transposer les protocoles à l'échelle pré-pilote, permettant ainsi leur optimisation. Enfin, les hydrolysats ont été fabriqués à l'échelle pilote pour être ensuite incorporés à une formulation de granulés en vue des essais en alimentation aquacole.

#### **2.3.1 Matériel enzymatique**

Les deux enzymes utilisées ont été produites par la société Novozymes et fournies par la société Sigma Aldrich.

##### *2.3.1.1 Alcalase*

L'enzyme Alcalase 2,4 L est produite par fermentation à partir d'une souche sélectionnée de la bactérie *Bacillus licheniformis*. Son principal constituant enzymatique est la Subtilisine A (Subtilisine Carlsberg), une endopeptidase à sérine dépourvue de résidus cystéine. Cette enzyme possède les autorisations FAO pour être utilisée à des fins alimentaires. Elle est codée dans la classification internationale par la référence EC 3.4.21.62. Les conditions optimales pour Alcalase sont une température comprise entre 55 et 70°C et un pH compris entre 6,5 et 8,5. L'activité déclarée de l'enzyme utilisée dans le cadre des expérimentations est de 2,4 AU/g. Une AU, pour Unité Anson, correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer 1mEq de Tyrosine/min à partir d'hémoglobine dénaturée à l'urée, à 25°C et pH 7,5 (Anson, 1938). C'est une enzyme couramment utilisée pour les hydrolyses des co-produits marins car elle présente une forte activité sur les protéines de poisson (Guérard *et al.*, 2001 ; He *et al.*, 2013; Blanco *et al.*, 2015; Morales-Medina *et al.*, 2016). Cette propriété s'applique également plus particulièrement

aux protéines de saumon (Kristinsson et Rasco 2000a, b ; Gbogouri *et al.*, 2006) et permet d'obtenir un fort DH.

#### 2.3.1.2 Flavourzyme

L'enzyme Flavourzyme 500MG est un complexe peptidique qui hydrolyse les protéines en conditions neutres ou acides. C'est une hydrolase produite par fermentation d'*Aspergillus oryzae* qui possède des activités à la fois de type endopeptidase et exopeptidase, selon le pH auquel elle est utilisée. Sa référence dans le code de classification internationale est celle des leucyl aminopeptidases (EC 3.4.11.1). Les conditions optimales de travail de Flavourzyme sont une température avoisinant 50°C et un pH pouvant varier de 4 à 10. Plus précisément, une gamme de pH acides à neutres favorisent une activité endopeptidase, tandis que les pH basiques favorisent une activité exopeptidase. Elle est composée de trois endopeptidases, deux exopeptidases, deux dipeptidyl peptidases et une amylase (Merz *et al.*, 2015). Elle est souvent utilisée dans le but de diminuer l'amertume des peptides. L'activité spécifique de cette enzyme est donnée cette fois-ci en unités Leucine Amino Peptidase par g (LAPU/g). Flavourzyme 500 MG possède une activité de 500 LAPU/g. Une LAPU est la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 mmole de L-leucine-p-nitroanilide par minute, en utilisant la méthode AF 298/1 (Novo Nordisk). Cette enzyme a été choisie car elle est couramment utilisée en fin d'hydrolyse en attaquant les peptides déjà solubilisés, permettant ainsi d'augmenter le DH.

### 2.3.2 Développement et production des hydrolysats

#### 2.3.2.1 Protocoles d'hydrolyse enzymatique en condition contrôlée de pH

La méthode du pH-Stat a été utilisée afin de déterminer les conditions expérimentales (choix des enzymes, ratio enzyme/substrat, pH, température et durée de la réaction) permettant d'atteindre les deux hydrolysats aux profils chromatographiques souhaités. Le cahier des charges s'appuie sur la teneur en peptides de taille inférieure à 500 Da des hydrolysats, qui correspond globalement à la teneur en di- et tripeptides de l'échantillons. Ainsi, les protocoles d'hydrolyse doivent permettre d'obtenir deux hydrolysats caractéristiques suivantes:

(1) environ 50% de peptides < 500 Da

(2) un enrichissement d'environ 20% en peptides < 500 Da, soit une teneur autour de 70%

Ainsi, les deux échantillons obtenus, et plus particulièrement la répartition de leur poids moléculaire, serviront de référence pour le transfert d'échelle du protocole de production.

### 2.3.2.1.1 Suivi de l'évolution de l'hydrolyse et calcul du DH par la méthode du pH-Stat

Le suivi de l'hydrolyse est important pour contrôler la réaction et obtenir le produit désiré. En effet, l'activité des enzymes ne s'arrête que lorsqu'il n'y a plus de substrat disponible ou que les conditions du milieu ne sont plus adaptées. Plus précisément, ce suivi va permettre de vérifier que les paramètres de la réaction choisis, comme le pH, la température, le ratio enzyme/substrat, ou le temps sont adaptés et permettent d'obtenir un hydrolysate aux caractéristiques recherchées. Ce suivi permet également de comparer plusieurs réactions et étudier l'influence du substrat, des enzymes ou des conditions expérimentales. Il existe différentes méthodes permettant de suivre la réaction d'hydrolyse enzymatique. Elles permettent de déterminer le degré d'hydrolyse (DH) qui est défini soit comme (1) le ratio entre l'azote non protéique et l'azote total ou (2) le pourcentage du nombre de liaisons peptidiques clivées sur le nombre de liaisons peptidiques totales.

Dans cette étude, le calcul du DH par la méthode du pH-Stat (Adler-Nissen 1982,1986) a été choisi. C'est la méthode est la plus simple et la plus utilisée (Guérard *et al.*, 2001, Gbogouri *et al.*, 2006, Aleman *et al.*, 2011, Dey *et al.*, 2014). Elle s'applique dans le cas d'hydrolyses où le pH de la réaction est supérieur à 6,5 car elle fait appel au principe énoncé précédemment: la réaction d'hydrolyse enzymatique génère la libération du protons qui acidifient le milieu réactionnel. Pour quantifier le DH, le pH-Stat maintient un pH constant au cours de la réaction par ajout de base, qui réagit avec les groupes  $\alpha\text{-NH}_3^+$  et permet de les titrer. Il existe alors une relation entre le volume de soude consommé et le DH (%):

$$DH (\%) = B \times Nb \times (1/\alpha) \times (1/MP) \times (1/htot) \times 100$$

Avec:

$h$  = nombre de liaisons peptidiques hydrolysées

$htot$  = nombre total de liaisons peptidiques (meq/g)

= 7,501 meq/g pour les protéines de saumon (Kristinsson et Rasco 2000a, b)

$B$  = volume de soude consommé (mL)

$Nb$  = normalité de la soude (mmol/mL)

$MP$  = masse de protéines ( $N \times 6.25$ ) en g

$\alpha$  = degré de dissociation des  $\alpha\text{-NH}_2$

Plus précisément, la quantité de soude versée varie non seulement en fonction de la libération des protons, mais également en fonction des conditions physico-chimiques de la réaction. Ainsi, le volume de soude versé est dépendant de la température de travail, le pK variant de façon significative avec la température (Kristinsson et Rasco 2000b, c):

$$pK = 7,8 + (298-T/298T).240$$

Le facteur de dissociation  $\alpha$  utilisé dans la formule est fonction du pK et est alors défini suivant la formule suivante:

$$\alpha = (10^{\text{pH}-\text{pK}})/(1+10^{\text{pH}-\text{pK}})$$

Pour faciliter le calcul du DH, le Tableau 23 recense les différentes valeurs du degré de dissociation  $\alpha$ , en fonction de la température et du pH utilisés pour l'hydrolyse.

Tableau 23. Facteurs de dissociation  $\alpha$  des groupements aminés obtenus en fonction de la température et du pH (Adler-Nissen, 1986).

pH	Température				
	25°C	30°C	40°C	50°C	60°C
6,5	-	-	-	0,20	0,29
7,0	-	0,20	0,33	0,44	0,56
7,5	0,39	0,44	0,61	0,71	0,80
8,0	0,67	0,71	0,83	0,88	0,93
8,5	0,86	0,88	0,94	0,96	0,97
9,0	0,95	0,96	0,98	0,99	0,99
9,5	0,98	0,99	0,99	1,00	1,00
10,0	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00
10,5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
11,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

La Figure 42 montre le dispositif expérimental nécessaire pour réaliser ce dosage. Le pH-Stat permettant d'ajuster le volume de soude dans le réacteur enzymatique thermostaté est relié au logiciel de traitement de données qui calcul le DH à partir de données renseignées.



Figure 42. Dispositif expérimental pour la réaction d'hydrolyse enzymatique: réacteur enzymatique thermostaté couplé au pH-Stat.

### 2.3.2.1.2 Protocole global

Le protocole d'hydrolyse enzymatique utilisé en laboratoire a été adapté de Guérard *et al.* (2001) et Gbogouri *et al.* (2006) (Figure 43).

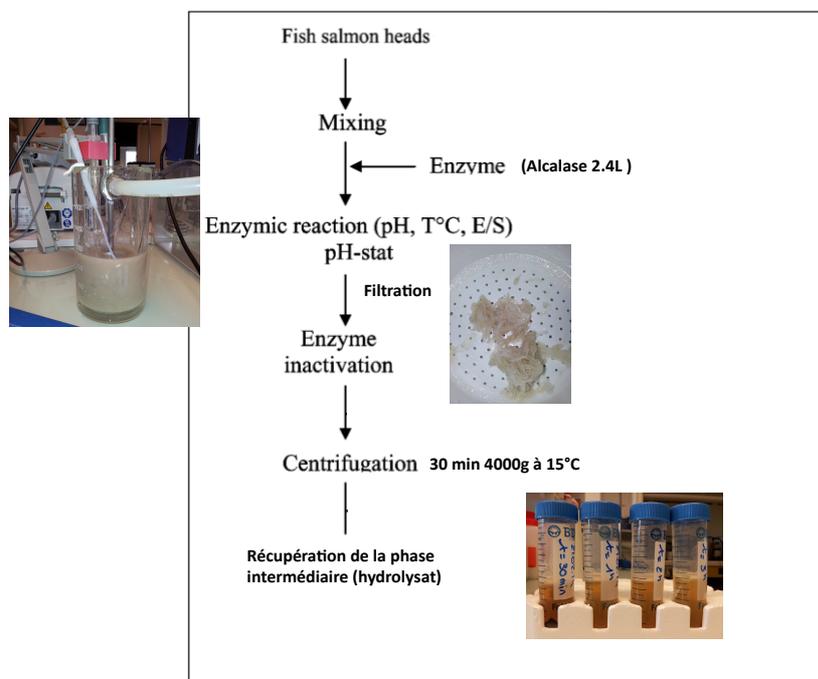


Figure 43. Diagramme du protocole d'hydrolyse enzymatique de têtes de saumon par l'Alcalase 2.4L.

Le substrat de départ était un mélange dans l'eau de têtes de saumon entières broyées par la société Meralliance, de concentration égale à 25% (m:m): 100 g de têtes et 400 g d'eau distillée. La teneur en protéines des têtes de saumon était de 13 %, soit une masse réelle de protéines égale à 13 g dans le mélange. Celui-ci a ensuite été introduit dans un réacteur ouvert de 500mL thermostaté à double paroi pour réaliser l'hydrolyse. Tout au long de l'hydrolyse, le mélange a été homogénéisé par un agitateur à hélice tournant à une vitesse de 750rpm. L'hydrolyse a été faite avec un titreux 902 Titrande de Methrom piloté par le logiciel Tiamo (Titration and More, Metrohm, France). La première phase a consisté à ajuster le pH à la valeur de consigne, c'est la phase de pré-titration puis l'hydrolyse a démarré avec l'ajout de l'enzyme. Avant chaque série d'hydrolyse, le pH-mètre a été étalonné. Une fois l'hydrolyse terminée, l'enzyme a été inactivée par traitement thermique (chauffage aux microondes du mélange jusqu'à ébullition). Puis, le mélange a été réparti dans des tubes Falcon de 50mL pour ensuite être centrifugé 30 min à 3220g (Eppendorf Centrifuge 5810R avec rotor F-34-6-38). On a alors obtenu un produit comprenant 3 phases: les composés insolubles dans le fond, les protéines solubilisées dans la

phase intermédiaire et la matière grasse en surface. On a prélevé, à l'aide d'une seringue, les protéines en solution. C'est cette phase qui a été analysée en chromatographie d'exclusion stérique.

#### *2.3.2.1.3 Conditions d'hydrolyse*

Deux procédés d'hydrolyses différents ont été réalisés. Le premier a utilisé une seule enzyme, l'Alcalase 2,4L, et a été désigné comme le protocole A. Le deuxième a combiné l'utilisation successive de deux enzymes, l'Alcalase 2,4L suivie de la Flavourzyme et a été désigné comme le protocole AF. Les conditions d'hydrolyse des deux protocoles sont détaillées dans le Tableau 24.

Tableau 24. Conditions d'hydrolyse de chacun des deux procédés A et AF réalisés en laboratoire en conditions de pH contrôlées (CC).

Protocole	Enzymes	Temps	pH	Température	Ratio substrat/eau	E/S*	Activité enzymatique
A CC	Alcalase	2h	8	50°C	3,25%	3%	72 (AU/kg)
AF CC	Alcalase Flavourzyme	2h	8	50°C	3,25%	3%	72 (AU/kg) 19530 (LAPU/kg)
		2h	7	40°C		5%	

\* E/S : le ratio enzyme/substrat correspond au rapport entre la quantité d'enzyme et la quantité de protéine du substrat, celle-ci étant estimée à 13% dans les têtes de saumon

Pour chacune des hydrolyses, les profils chromatographiques ont été analysés et comparés. Ils servant de référence pour valider les différentes étapes de développement des protocoles pour une production pilote.

#### *2.3.2.1.4 Calcul du degré d'hydrolyse*

Le degré d'hydrolyse a été calculé sur le protocole A et a permis de suivre la cinétique de la réaction d'hydrolyse en temps réel. Il n'a pas été calculé sur le protocole AF car à pH 6,5 et à 40°C, il n'y a pas de valeur du degré de dissociation  $\alpha$  (Tableau 23).

#### *2.3.2.2 Protocoles d'hydrolyses en condition de pH non contrôlée*

La méthode du pH-Stat a permis de définir deux protocoles d'hydrolyse (A et AF) permettant d'obtenir deux hydrolysats aux caractéristiques souhaitées. Afin d'être au plus proche des conditions pilotes, ces deux protocoles ont également été réalisés en conditions de pH non contrôlées et le rapport substrat/eau a été diminué à (1:1). Les têtes ont été broyées au blender

avec l'eau distillée avant d'être introduites dans le réacteur, afin de faciliter l'agitation. Pour le reste, le déroulement des protocoles a été le même que ceux décrits précédemment, à la différence que les enzymes ont été ajoutées sans que le pH du mélange n'ait été ajusté, et ce tout au long de la réaction. Pour chacune des hydrolyses, la réaction a débuté à un pH de 6,5, correspondant à celui de la matière première. Le pH s'est acidifié au cours de la réaction d'hydrolyse mais il n'est pas descendu en dessous d'un pH de 5,5, pour chacun des deux protocoles. Les profils chromatographiques ont été analysés et comparés aux échantillons obtenus en condition pH contrôlée afin de valider les protocoles sur la base de la teneur en peptides de taille inférieure à 500 Da, et ainsi les soumettre au changement d'échelle. Les conditions d'hydrolyse des deux protocoles sont détaillées dans le Tableau 25.

**Tableau 25. Conditions d'hydrolyse de chacun des deux procédés A et AF réalisés en laboratoire en conditions de pH non contrôlées (CNC).**

Protocole	Enzymes	Temps	pH	Température	Ratio substrat/eau	E/S*	Activité enzymatique
A CNC	Alcalase	2h	5-6,5	50°C	1	3%	72 (AU/kg)
AF CNC	Alcalase	2h	5-6,5	50°C	1	3%	72 (AU/kg)
	Flavourzyme	2h		40°C		5%	19530 (LAPU/kg)

\* E/S : le ratio enzyme/substrat correspond au rapport entre la quantité d'enzyme et la quantité de protéine du substrat, celle-ci étant estimée à 13% dans les têtes de saumon

### **2.3.3 Transfert d'échelle de la production des hydrolysats**

#### *2.3.3.1 Essais pré-pilotes et optimisation du procédé*

Un premier essai pré-pilote a été réalisé dans le hall pilote de l'entreprise SPF Diana (Elven, 56) pour confirmer la faisabilité du protocole à plus grande échelle. Le mode opératoire est détaillé dans la Figure 44 et a consisté à broyer 10kg de têtes (broyeur Seydelman, 13mm) qui ont ensuite été introduites dans un réacteur de 10L sans ajout d'eau avec des antioxydants (acide citrique: 2 g, acide ascorbique: 2,4 g et un antioxydant de synthèse: 4 g). Les pourcentages expriment les quantités par rapport à la quantité de tête. Une fois la température ajustée, les enzymes ont été ajoutées, en respectant les mêmes ratios E/S qu'en laboratoire, le temps de la réaction a également été respecté. Une fois l'hydrolyse terminée, le mélange a été pasteurisé par un chauffage pendant 30 min à 95°C, permettant par la même occasion de désactiver les enzymes. Enfin, le mélange a été tamisé (maille 300µm puis 40µm) puis centrifugé (centrifugeuse à assiette) en maintenant sa température à 80°C. Là encore, des antioxydants (acide citrique: 1,4 g, acide ascorbique: 2,5 g et un antioxydant de synthèse: 4,9 g) ont été ajoutés à la fraction obtenue. Les pourcentages correspondent à la quantité par rapport à la quantité de fraction

protéique récupérée. Enfin, l'hydrolysats obtenu a été analysé en SEC-FPLC et comparé aux échantillons obtenus en condition de pH non contrôlé, afin de valider les protocoles et passer à l'échelle pilote. Un essai a été réalisé pour chacun des deux protocoles développés en laboratoire. De plus, cela a également permis également d'étudier l'impact de l'ajout d'antioxydants sur le profil peptidique des hydrolysats.

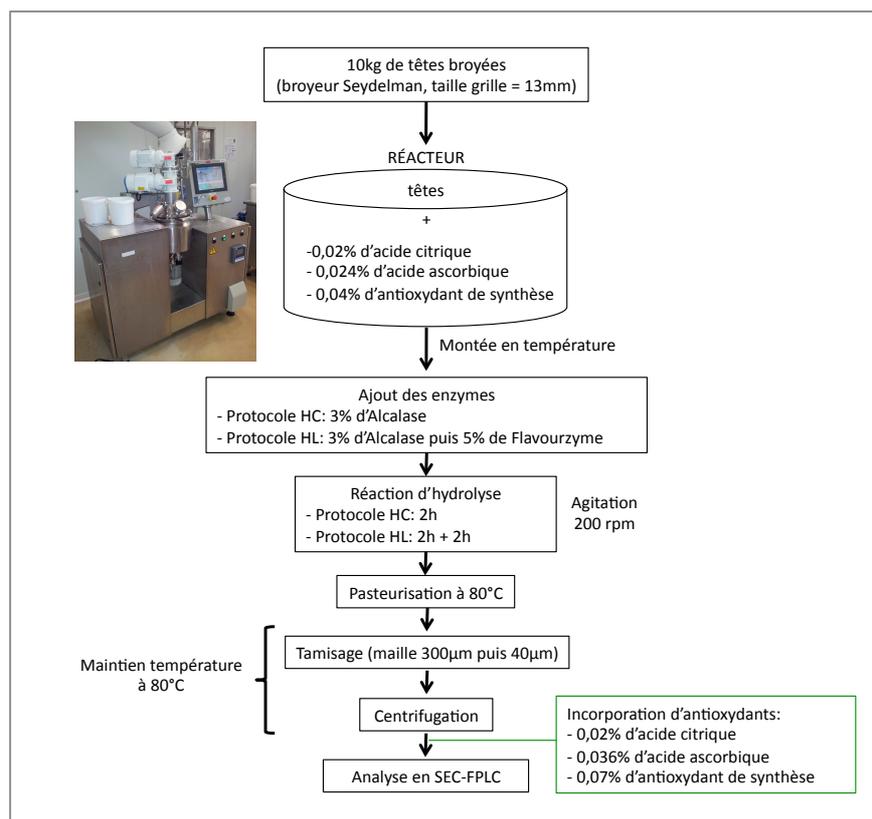


Figure 44. Diagramme descriptif des protocoles d'hydrolyse enzymatique pour les essais pré-pilotes de production des hydrolysats.

### 2.3.3.2 Production des hydrolysats à l'échelle pilote

La production des hydrolysats à l'échelle pilote pour les essais en aquaculture a également été réalisée dans le hall pilote de l'entreprise SPF-Diana (Elven, 56) dans un réacteur de 60L (Goavec). A l'issue des résultats obtenus aux essais pré-pilotes, quelques modifications ont été apportées à chacun des protocoles afin de les optimiser pour atteindre un pourcentage en peptides de taille inférieure à 500 Da proche de 50% pour le premier hydrolysats, et un enrichissement d'environ 20% dans cette même classe de taille pour le deuxième hydrolysats. Les modifications des protocoles ont été les suivantes:

- (1) ajout de 10% d'eau à la matière première

(2) augmentation des doses d'enzymes de 20%

Les protocoles d'hydrolyse pilotes ont été appelés HC (=Hydrolyse Courte) pour le protocole A tandis que le protocole correspondant au protocole AF en laboratoire est appelé HL (=Hydrolyse Longue). Les modes opératoires sont globalement identiques à ceux réalisés précédemment (section 2.3.3.1.). Cependant, les quantités en antioxydants utilisées étaient supérieures au cours de l'hydrolyse (acide citrique: 11 g, acide ascorbique: 13,2 g et un antioxydant de synthèse: 22 g) et à l'issue de la centrifugation (acide citrique: 10 g, acide ascorbique: 18 g et un antioxydant de synthèse: 35 g). Également, deux centrifugations au lieu d'une ont été réalisées et enfin l'hydrolysats a été séché par atomisation pour obtenir une poudre. Les protocoles sont détaillés sur la Figure 45.

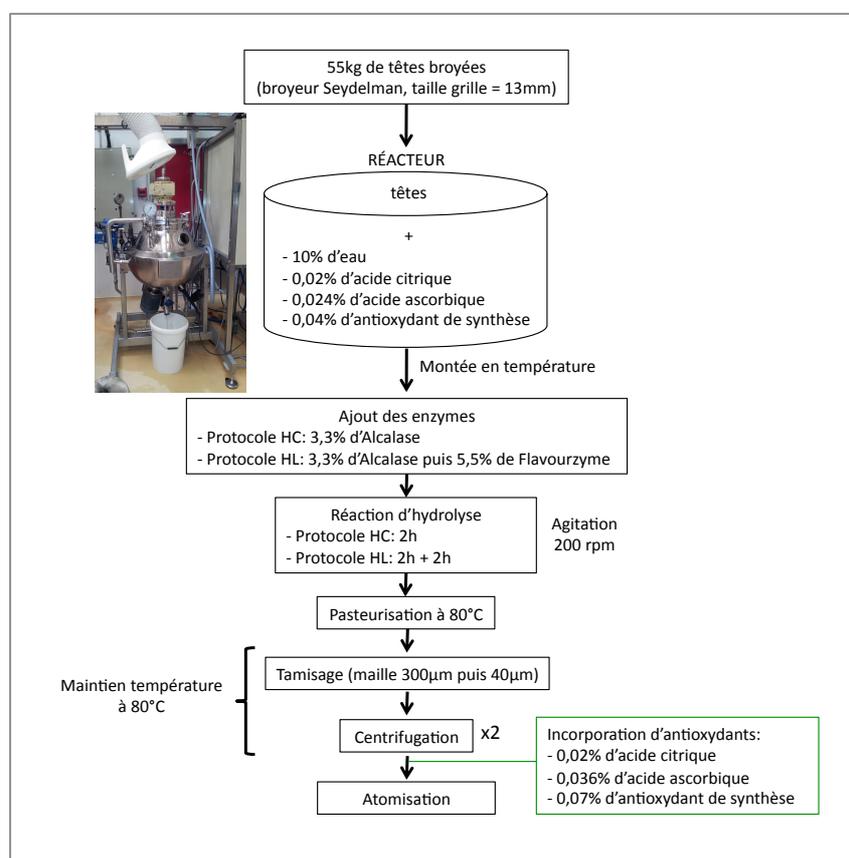


Figure 45. Diagramme descriptif des protocoles d'hydrolyse enzymatique pour la production des hydrolysats HC et HL.

La Figure 46 détaille plus précisément la courbe de procédé HL, avec XING14088=Alcalase et XING14088=Flavourzyme. Une production a été réalisée pour chacun des deux protocoles développés en laboratoire. Les poudres ont été analysées en SEC-FPLC et leur composition

proximale a été déterminée afin de s'assurer de leur potentiel d'utilisation pour les essais en aquaculture.

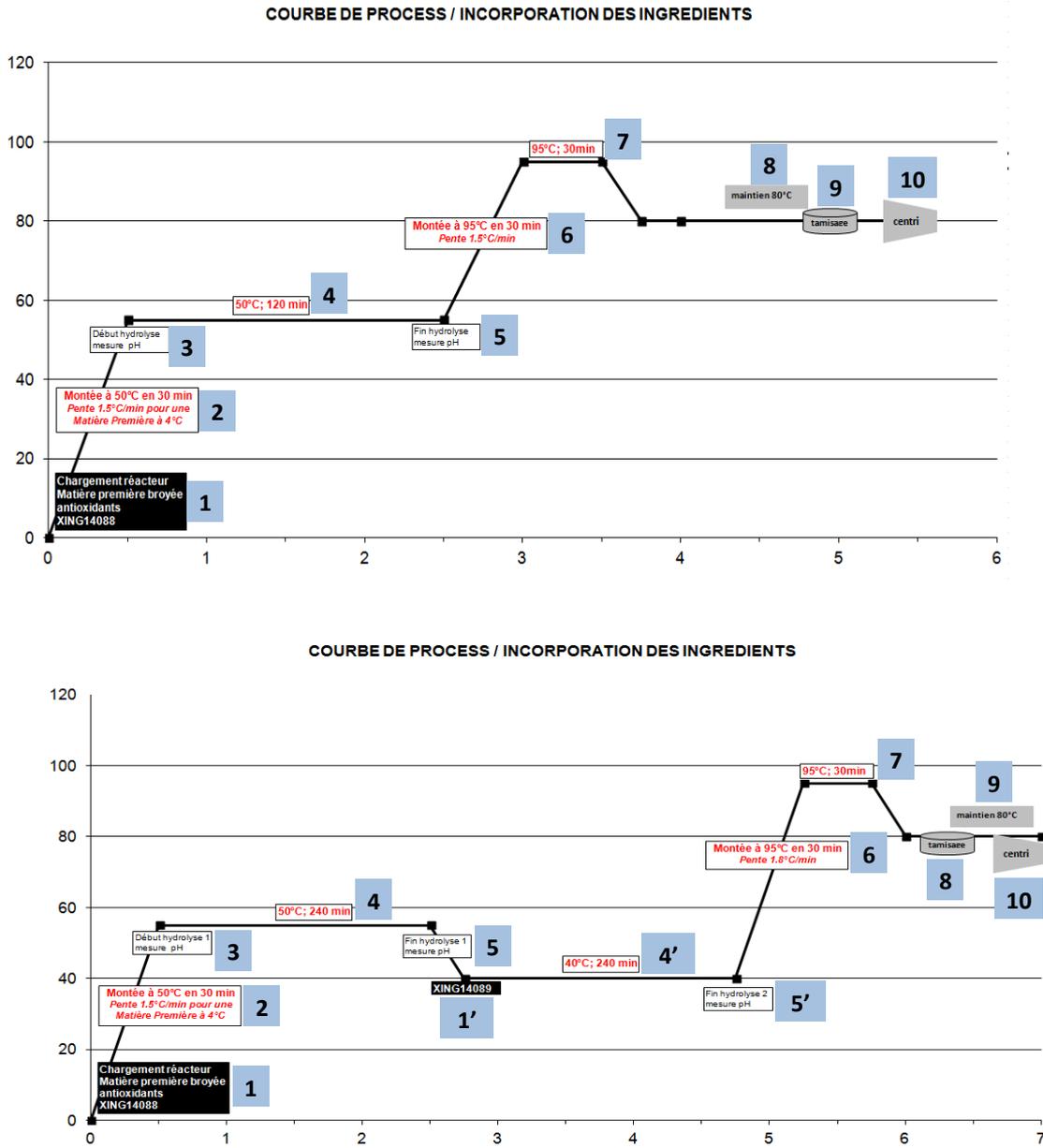


Figure 46. Courbe de procédé des protocoles HC (en haut) et HL (en bas). Les chiffres correspondent aux légendes suivantes:

1	Chargement réacteur: matière première broyée + antioxydants + Alcalase
1'	Ajout Flavourzyme
2	Montée à 50°C en 30 min
3	Début hydrolyse Alcalase – mesure du pH
4	50°C pendant 240 min
4'	40°C pendant 240 min
5	Fin hydrolyse Alcalase – mesure du pH
6	Montée à 95°C en 30 min
7	95°C pendant 30 min
8	Tamisage
9	Maintien à 80°C
10	Centrifugation

### 3. CARACTÉRISATION DES INGRÉDIENTS DÉVELOPPÉS ET ÉVALUATION DE LEUR PERFORMANCES

La caractérisation des ingrédients développés fait appel à différents types d'analyses à l'interface de plusieurs domaines d'expertise comme la chimie, la biochimie, la physique ou encore la rhéologie. Ces analyses ont été utilisées comme des outils dans la compréhension et le développement des protocoles mis en jeu. La caractérisation complète des ingrédients développés est également importante pour leur commercialisation et leur développement futur et apparaîtra sur leur fiche technique.

L'évaluation des performances des ingrédients s'applique plus particulièrement aux hydrolysats, permettant ainsi d'étudier l'influence des caractéristiques biochimiques sur des applications *in vivo*.

#### 3.1 Méthodes de caractérisation utilisées pour chacun des ingrédients

Les tableaux suivant détaillent les différentes analyses réalisées sur chacun des ingrédients obtenus.

##### 3.1.1 Collagène issu des essais pilotes

Les échantillons de collagène issus des différents essais pilotes ont été caractérisés par différentes méthodes analytiques détaillées dans le Tableau 26. La détermination du poids moléculaire par SEC-FPLC et SDS-PAGE ainsi que les dosages de protéines par la méthode de Lowry ont été réalisés au LEMAR tandis que les autres analyses ont été sous-traitées.

Tableau 26. Récapitulatif des analyses réalisées sur les échantillons de collagène issu des différents essais pilotes et laboratoire (en bleu les analyses réalisées eu LEMAR et en orange celles qui ont été sous-traitées).

Pilotes	Kjeldahl	Lowry	Hyp /Coll	MG*	Humi-dité	Cendres	Chlo-rures	Rés. sec	SEC-FPLC	SDS-PAGE	Compo ac. aminés	Micro-bio
P1	X	X	X	X	X	X	-	-	X	X	X	-
P2	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	-
P3	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	-
P4	-	X	X	X	-	X	X	X	X	X	-	X
P5	-	X	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-
P6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X
P6.bis	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X
P7	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-
P8	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
P9	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X
P10	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X
P10.1	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X
P11	X	-	X	X	-	X	X	X	X	X	-	X

\*MG=Matière grasse

### 3.1.2 Collagène natif vs collagène réticulé

La comparaison du collagène réticulé avec le collagène natif a été réalisée grâce à différentes méthodes de caractérisation (Tableau 27) par des partenaires et/ou sous-traitant extérieurs. Seul le dosage OPA a été effectué au LEMAR.

Tableau 27. Récapitulatif des analyses réalisées sur le collagène réticulé.

	Collagène natif		Collagène + mTG		Collagène + GTA	
	éponge	hydrogel	éponge	hydrogel	éponge	hydrogel
HRMAS	X		X		X	
FTIR	X		X		X	
MEB	X		X			
Rhéologie	X	X	X	X		
Dosage OPA		X		X		X

### 3.1.3 Caractérisation des hydrolysats

Les différents hydrolysats obtenus ont été caractérisés en SEC-FPLC au LEMAR tandis que les autres analyses ont été réalisées par un sous-traitant (Tableau 28).

Tableau 28. Récapitulatif des analyses réalisées sur les hydrolysats issus des différents essais pilotes et laboratoire (en bleu les analyses réalisées eu LEMAR et en orange celles qui ont été sous-traitées).

Protocoles		SEC-FPLC	Analyse proximale*	Composition en acide aminés	Flore microbienne
Laboratoire avec pH	A	X	-	-	-
	AF	X	-	-	-
Laboratoire sans pH	A	X	-	-	X
	AF	X	-	-	X
Pré-pilote	HC	X	-	-	-
	HL	X	-	-	-
Pilote	HC	X	X	X	X
	HL	X	X	X	X
Témoin	CPSP 90**	X	-	-	-

\* l'analyse proximale comprend les teneurs en protéines (méthode DUMAS), lipides totaux, cendres et résidus

\*\*hydrolysat incorporé dans le régime témoin

## 3.2 Description des méthodes analytiques utilisées

### 3.2.1 Analyses chimiques

Les analyses chimiques ont été réalisées par le laboratoire InVivo Labs (Vannes, France) suivant les normes et règlements suivants: humidité (NF V04-401-avril 2001), cendres (NF V04-404-avril 2001), matières grasses par hydrolyse (règlement CE 152/2009 du 27-01-2009, procédé B) chlorures (exprimés en Cl<sup>-</sup>, règlement CE 152/2009 du 27-01-2009), résidus sec totaux (méthode interne EAUDIET-H 14/01 adaptée du JORF : arrêté du 08/09/1977-SN), lipides totaux (méthode interne GRAB-H 13/02 adaptée du JORF : arrêté du 08/09/1977-SN) et cendres (méthode interne CEND-H 13/01 adaptée du JORF : arrêté du 08/09/1977-SN).

### 3.2.2 Analyses microbiologiques

La détermination des micro-organismes aérobies (DGAT) à 30°C suivant la norme NF en ISO 4833 et de la flore fongique totale (DMLT) selon la norme NF V08-059 a été réalisée par InVivoLabs. Les données ont été exprimées en UFC (Unités Formant une Colonie) par gramme d'échantillon.

### 3.2.3 Caractérisation des protéines

#### 3.2.3.1 Composition en acides aminés

Les acides aminés totaux (méthode interne ACIDAM 96/09 adaptée du règlement CE 152/2009 du 27-01-2009-SN) et le tryptophane total (méthode interne TRYPTO 95/05 adaptée du règlement CE 152/2009 du 27-01-2009-SN) ont été déterminés par InVivo Labs (Vannes, France). La préparation de l'échantillon nécessite l'oxydation à l'aide d'un mélange d'acide performique et de phénol avant hydrolyse d'une partie de l'échantillon. La tyrosine ainsi que tous les autres acides aminés sont dosés dans l'hydrolysate d'échantillons non oxydés alors que la cystéine et la méthionine se fait dans l'échantillon oxydé. L'échantillon oxydé et non oxydé est hydrolysé à l'aide d'acide chlorhydrique 6N pendant 24h à 100°C. Les acides aminés sont séparés par chromatographie échangeuse d'ions et dosés par réaction à la ninhydrine et détection photométrique à 570 nm (440 nm pour la proline).

#### 3.2.3.2 Dosage de l'hydroxyproline et du collagène

Ces deux dosages ont été réalisés par InVivo Labs (Vannes, France). L'hydroxyproline a été mesurée par une méthode colorimétrique suivant la norme NF V04-415-octobre 2002. Le 4-hydroxyproline libérée par hydrolyse acide est oxydée par la chloramine T qui la transforme en noyau pyrole. Celui-ci se condense à chaud avec le paradiméthyl amino benzaldéhyde (PDAB) pour former un composé de couleur rouge. L'absorbance des solutions est mesurée à 550 nm. La teneur en collagène est calculée à partir de la teneur en hydroxyproline à laquelle on applique un facteur 8, suivant la norme NF V04-415-octobre 2002.

#### 3.2.3.3 Dosage des protéines par la méthode de Kjeldahl

Le dosage des protéines par la méthode de Kjeldahl a été réalisée par InVivo Labs (Vannes, France) suivant le règlement CE 152/2009 du 27-01-2009. Brièvement, la 1<sup>re</sup> étape du dosage consiste en une minéralisation de la matière organique azotée sous la forme de sel d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). La deuxième étape est la distillation de l'ammonium par l'ajout de soude afin de transformer l'ammonium sous sa forme volatile, l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). Les vapeurs d'ammoniac ainsi formées sont condensées au contact d'un réfrigérant et recueillies dans une solution contenant deux indicateurs colorés (rouge de méthyle et bleu de bromothymol) et de l'acide borique. La troisième étape consiste à titrer l'ammoniac par une solution titrée d'acide chlorhydrique ou d'acide sulfurique. On applique ensuite un facteur de conversion 6.25 pour obtenir la teneur en protéines dans l'échantillon.

#### 3.2.3.4 Dosage des protéines par la méthode de DUMAS

Le dosage des protéines Dumas a été réalisé par InVivo Labs (Vannes, France) suivant la méthode adaptée de NF en ISO 16634-1-décembre 2008-SN. Elle s'applique aux protéines sous forme solide et consiste en une combustion totale de la matrice sous oxygène. Les gaz produits sont réduits par du cuivre puis desséchés et le CO<sub>2</sub> est alors piégé. L'azote est ensuite quantifié à l'aide d'un détecteur universel. Comme pour le dosage par la méthode du Kjeldahl, on applique ensuite un facteur de conversion 6.25 pour obtenir la teneur en protéines dans l'échantillon.

#### 3.2.3.5 Dosage des protéines par la méthode colorimétrique de Lowry

Un dosage des protéines des échantillons de collagène par une méthode colorimétrique a été mis au point afin de s'affranchir d'une analyse en sous-traitance et permettre d'utiliser en routine, une méthode analytique en interne, rapide et simple. Le collagène présente une composition spécifique en acides aminés ainsi qu'une structure particulière en triple hélice nécessitant une méthode de dosage adaptée (Komsa-Penkova et al., 1996). Trois méthodes ont donc été testées : la méthode du Biuret, la méthode de Bradford et la méthode de Lowry. Pour choisir la méthode la plus adaptée, une corrélation entre le dosage de l'azote total (réalisé par InVivoLabs) et le dosage colorimétrique, a été établie. La meilleure corrélation a été observée avec le dosage de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) qui a donc été choisi pour un dosage des protéines des échantillons de collagène en routine.

La concentration en protéines totales des différents échantillons a été déterminée à l'aide du réactif Protein Assay Reagent Package composé d'une solution de réactif A, une solution de tartrate de cuivre alcaline, et d'une solution de réactif B, le réactif de Folin (Bio Rad France). L'ensemble des dosages de protéines a été réalisé dans des microplaques, 96 puits, à fond plat de marque Greiner (Greiner - 96F-Bottom). Ainsi 25µL de solution de tartrate de cuivre alcalin puis 200µL de réactif de Folin-Ciocalteu sont ajoutés à 5µL d'échantillon dont on souhaite doser la concentration en protéines totales. Après une incubation de 15 minutes à une température de 30°C, l'absorbance des échantillons est lue à une longueur d'onde de 750nm. Toutes les mesures sont réalisées en triplicatas. Les échantillons ont été préparés à partir de collagène lyophilisé et dilué à 1% dans de l'eau distillée. Les échantillons ont ensuite été dilués à 1/20. Une gamme (Figure 47), dont les concentrations en protéines totales varient de 0,031 à 1mg.mL<sup>-1</sup>, a été réalisée pour chaque dosage effectué, à partir d'albumine de sérum bovin (BSA). Un blanc contenant 5 µL d'eau distillée a systématiquement été réalisé.

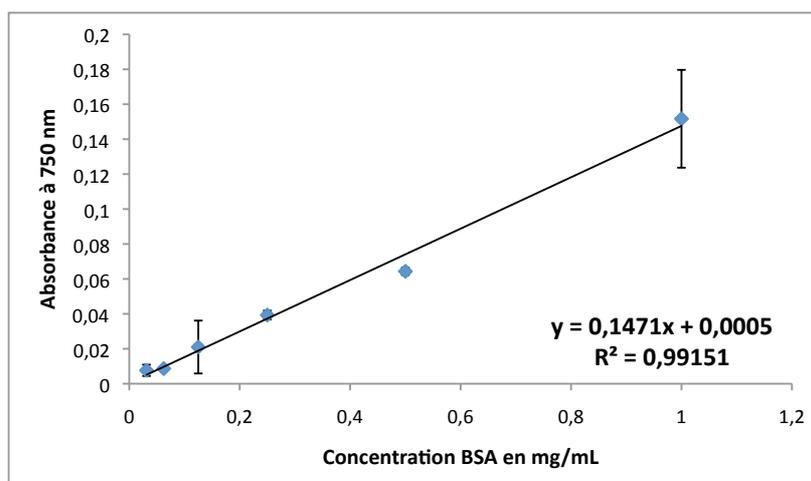


Figure 47. Gamme étalon réalisée avec du BSA pour le dosage de protéines par la méthode de Lowry.

### 3.2.3.6 Détermination du poids moléculaire de protéines par chromatographie d'exclusion stérique (SEC-FPLC)

Les analyses en chromatographie d'exclusion stérique ont été réalisées sur une colonne FPLC Superdex™ 200 10/300 GL avec un domaine de fractionnement compris entre 10 et 600 kDa (10x300-310nm, GE Healthcare Bio-sciences) à température ambiante, selon le protocole adapté du manuel d'instructions GE Healthcare 71-5017-96. La séparation chromatographique a été effectuée sur une chaîne HPLC Dionex (Thermo Fisher Scientific) composée d'une pompe (P680), d'un injecteur automatique (ASI-100), d'un détecteur à barrettes de diode (UVD170U). 40µL d'échantillon dilué à 5mg/mL et passés sur un filtre à seringue Millex PVDF (Low Protein Binding Durapore®) à pores 0,22µm ont été injectés sur la colonne. L'élution a été réalisée en tampon phosphate (pH =7) composé de 0,05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0,15M NaCl. La colonne a été équilibrée pendant au moins 2 heures à un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, soit 2 fois le volume total de la colonne, avant chaque analyse. L'absorbance a été mesurée à 220 nm.

Le poids moléculaire des échantillons a été calculé en comparaison avec la droite de calibration (Figure 48) des standards de poids moléculaire suivant: la thyroglobuline (MW=669kDa), l'apoferritine (MW=443 kDa), la β-amylase (MW=200kDa), l'alcool déshydrogénase (MW=150kDa), l'albumine de sérum bovin (MW = 66kDa), l'anhydrase carbonique (MW = 29kDa) et le cytochrome C (MW = 12,4kDa) (Gel filtration markers kit for protein molecular weights, Sigma-Aldrich). Les données ont été analysées sur le logiciel Chroméléon 6.6 (TermoFisher Scientific).

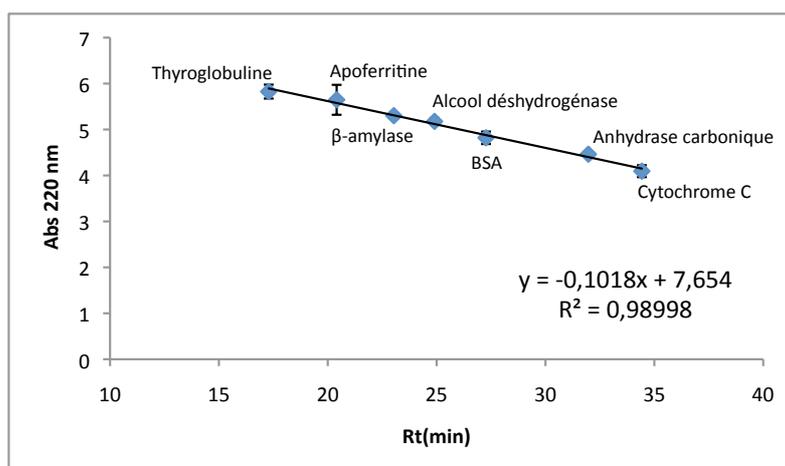


Figure 48. Droite de calibration des marqueurs de taille pour la Superdex™ 200.

### 3.2.3.7 Détermination du poids moléculaire de peptides par chromatographie d'exclusion stérique (SEC-FPLC)

Les analyses en chromatographie d'exclusion stérique ont été réalisées sur une colonne FPLC Superdex™ Peptides 10/300 GL avec un domaine de fractionnement compris entre 1000 et 7000 Da (10x300-310nm, GE Healthcare Bio-sciences) à température ambiante, selon le protocole adapté du manuel d'instructions GE Healthcare 71-5017-97 AG. La séparation chromatographique a été effectuée sur une chaîne HPLC Dionex (Thermo Fisher Scientific) composée d'une pompe (P680), d'un injecteur automatique (ASI-100), d'un détecteur à barrettes de diode (UVD170U). 40µL d'échantillon dilué à 5mg/mL et passés sur un filtre à seringue Millex PVDF (Low Protein Binding Durapore®) à pores 0,22µm ont été injectés sur la colonne. L'élution a été réalisée dans une solution à 0,1% d'acide trifluoroacétique dans 30% d'acétonitrile, d'après Guérard *et al.* (2001). La colonne a été équilibrée pendant au moins 2 heures à un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, soit 2 fois le volume total de la colonne, avant chaque analyse. L'absorbance a été mesurée à 220 nm.

Le poids moléculaire des échantillons a été calculé en comparaison avec la droite de calibration (Figure 49) des standards de poids moléculaire suivant: l'aprotinine (MW=6500 Da), l'insuline chaîne β (MW=3495,89 Da), l'insuline chaîne α (MW=2531,64 Da), la neurotensine (MW=1672,92 Da), la substance P (MW=1347,63 Da), la LH-RH II (hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires) d'alligator (MW=1182,3 Da), la substance P (fragment 1-7 (MW=900,04Da) et la leupeptine (MW = 475,6 Da) (Sigma-Aldrich). Les données ont été analysées sur le logiciel Chroméléon 6.6 (TermoFisher Scientific).

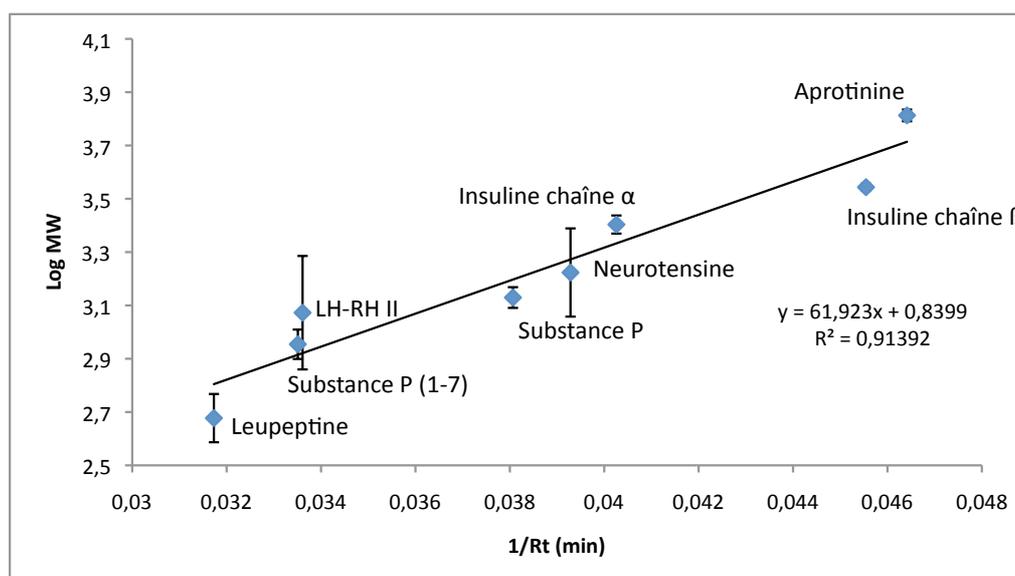


Figure 49. Droite de calibration des marqueurs de taille pour la colonne Superdex™ Peptides 10/300 GL.

### 3.2.3.8 Électrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (ou SDS-PAGE) a été adaptée de la méthode de Laemmli (1970). L'échantillon de collagène a été dilué dans de l'eau milli-Q à une concentration de  $1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  et on y a ajouté le tampon de Laemmli (1:1) contenant 65,8mM de Tris-HCl à pH 6,8, 2,1% de SDS, 26,3% (w/v) de glycérol et 0,01% de bleu de bromophénol (Bio-Rad Laboratories). Ensuite, 15 $\mu\text{L}$  de l'échantillon préparé et 10 $\mu\text{L}$  de la solution de marqueurs de poids moléculaires compris entre 10 et 250kDa (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad Laboratories) sont déposés dans les puits de gels précoulés de polyacrylamide 4-20% (Mini-PROTEAN® TGX™, Bio-Rad Laboratories). Puis, on lance la migration du gel dans un tampon Tris-Gly-SDS (pH=8,3) contenant 25mM de Tris, 192 mM de glycine et 0,1% de SDS en utilisant la cuve Mini Protean®Tetra System (Bio-Rad Laboratories). Le gel est soumis à un courant d'une intensité de 150V pendant 1h. Les protéines du gel sont fixées avec 50 mL de bleu de Coomassie (Bio-Rad Laboratories) et les gels sont rincés et décolorés à l'eau Milli-Q water. Les bandes de protéines sont lues grâce au système Gel Doc™ EZ Imager et les résultats sont analysés par le logiciel Image Lab 4.0.1. (Bio-Rad Laboratories). Pour chaque gel, une droite de calibration a été tracée avec les 4 marqueurs présentant les plus hauts poids moléculaires (250 kDa, 150 kDa, 100 kDa et 75 kDa) (Figure 50), afin d'évaluer le poids moléculaire du collagène analysé.

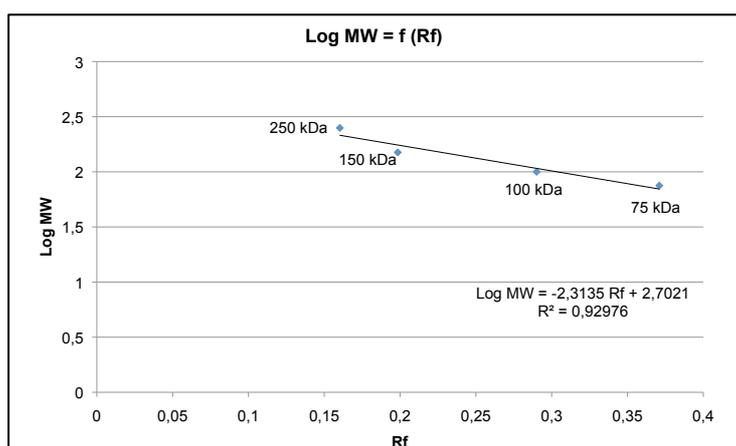


Figure 50. Exemple de droite de calibration obtenue en SDS-PAGE.

### 3.2.4 Dosage des fonctions amines du collagène par la méthode OPA

Ce dosage est une méthode colorimétrique dont le principe s'appuie sur la réaction des groupements amines avec le réactif OPA (O-phthalaldéhyde). Cette réaction forme un composé coloré détectable au spectrophotomètre à 340 nm. Ainsi, le degré de réticulation des hydrogels a été déduit en dosant le nombre de fonctions amines libres qui n'auraient pas réagi lors de la réaction de réticulation. En effet, comme indiqué dans la description du mécanisme réactionnel des 2 agents réticulants, ce sont les fonctions amines présentes aux extrémités et latéralement sur les chaînes de collagène qui permettent la formation de réaction covalentes.

Les dosages ont été réalisés sur des microplaques, 96 puits, à fond plat de marque Greiner (Greiner - 96F-Bottom). Le réactif OPA est composé de 25mL de tétraborate de sodium 0,1M, 5mL de SDS à 10%, 40 mg d'OPA dans 1mL d'éthanol et 100 $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoéthanol supplémentés d'eau distillées jusqu'à 50mL. Dans un tube à hémolyse, 1mL de réactif OPA est ajouté à 50 $\mu$ L d'échantillon. Le tube est vortexé et 250 $\mu$ L du mélange sont déposés dans un puits de microplaque. Le mélange est incubé 2min à l'obscurité et l'absorbance est lue à 340nm. Toutes les mesures sont réalisées en triplicatas.

Une gamme étalon de Leucine a été réalisée pour chaque dosage, afin de convertir les résultats en équivalent Leucine (Figure 51). Les concentrations en leucine varient de 5mM à 0,5mM. Un blanc contenant 50  $\mu$ L d'eau distillée a systématiquement été réalisé.

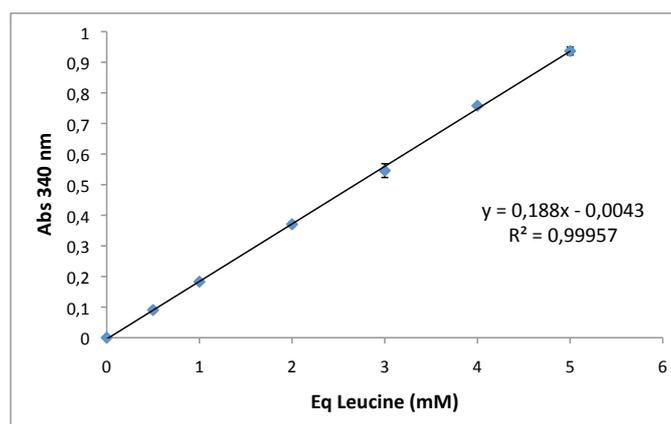


Figure 51. Gamme étalon réalisée avec de la leucine pour le dosage des fonctions amines par la méthode OPA.

Afin d'estimer le degré de réticulation des hydrogels obtenus avec chacun des agents de réticulation (mTG et GTA), un dosage OPA a été effectué sur des hydrogels à 10 g/L de collagène, réticulés avec de la mTG à 400 U/g de protéine et du GTA à 0.5%, comme précisé dans le Tableau 29.

Tableau 29. Traitement des différents échantillons de collagène (réticulé par le GTA, réticulé par la mTG, collagène natif pour réaliser le dosage OPA

Echantillons	Durée et T°C	Solution de collagène natif à 20 g/L dans TP50mM	Agents de réticulation (solution dans TP50mM*)	TP50mM
<b>GTA</b>	2h à 20°C	750 µL	750 µL de GTA à 1%	-
<b>mTG</b>	2h à 40°C	750 µL	750 µL de solution enzymatique à 68.8g d'Activa/L	-
<b>Coll natif</b>	2h à 20°C	750 µL	-	750 µL

La présence de petites fibres étant détectée après la période d'incubation, le dosage OPA a été effectué sur les échantillons centrifugés (10 000 rpm, 5 min) et non-centrifugés afin de vérifier si la présence de ces fibrilles gênait ou non la lecture de la DO lors du dosage.

### 3.2.5 Caractérisation structurale du collagène

#### 3.2.5.1 Spectrométrie InfraRouge à transformée de Fourier (FTIR)

Dans notre étude, le collagène de saumon lyophilisé a été soumis à une réflexion totale atténuée (ATR-FTIR), c'est à dire que l'échantillon est déposé sur un substrat non transparent en infrarouge. Un spectromètre FTIR (Bruker Vertex 70 FTIR) avec un module ATR a été utilisé. La gamme de spectre était comprise entre 4000 et 400  $\text{cm}^{-1}$  avec une acquisition automatique du

signal 32 scans avec une résolution 4 cm<sup>-1</sup>. Les analyses ont été réalisées en triplicatas et les données obtenues ont été analysées avec le logiciel OPUS 8.0 (Bruker).

### 3.2.5.2 *Analysis en Résonance Magnétique Nucléaire - haute résolution en rotation à l'angle magique (RMN - HRMAS)*

Les analyses en RMN - HRMAS ont été effectuées par Gaëlle Simon à la plateforme technologique de RMN-RPE-SM de l'UBO (Brest, UFR Sciences) sur un spectromètre BRUKER Advance III HD 500 (500 MHz) équipé d'une sonde HRMAS 1H/13C/15N. Pour chaque analyse, 5 mg d'échantillon de collagène lyophilisé ont été utilisés et les spectres 1D et 2D ont été réalisés. Plus précisément, les spectres 1D donnent des informations sur la présence de protons et leur environnement chimique, tandis que les spectres 2D donnent des informations à la fois sur la présence de protons, mais aussi des carbones.

### 3.2.5.3 *Microscopie Electronique à Balayage (MEB)*

Les caractéristiques morphologiques du collagène natif lyophilisé et des éponges M3-IV et M1-D lyophilisées ont été étudiées par analyses des images obtenues par le MEB (S-3200N; Hitachi, Tokyo, Japon) de la Plateforme technologique d'Imagerie, de Mesures en Microscopie et de Diffraction par Rayon X (PIMM - DRX) de l'UBO (Brest, UFR Sciences) par Gérard Sinquin. Une préparation des échantillons a été nécessaire avant qu'ils n'aient été observés à différentes magnifications. Ils ont été collés sur des supports et métallisés avec un mélange or/palladium afin de les rendre conducteurs (Figure 52).



Figure 52. Échantillon de collagène métallisé et monté sur support avant d'être observé en MEB.

### 3.2.6 **Mesures rhéologiques du collagène**

Les propriétés viscoélastiques du collagène natif et réticulé à la mTG ont été étudiées. Pour cela, les modules d'élasticité ( $G'$ ) et de viscosité ( $G''$ ) ont été mesurés. Ces travaux ont été effectués en collaboration avec le laboratoire LIMATB EA 4250 sous la direction du professeur Thierry Aubry et l'aide de Philippe Roquefort (Brest, UFR Sciences, contact : [thierry.aubry@univ-brest.fr](mailto:thierry.aubry@univ-brest.fr),

[Philippe.Roquefort@univ-brest.fr](mailto:Philippe.Roquefort@univ-brest.fr)). Elles avaient pour objectif, d'une part, de caractériser les collagènes natifs et réticulés et, d'autre part, d'étudier la réaction de réticulation du collagène par la mTG. Concernant le collagène réticulé, les mesures ont été réalisées sur les hydrogels issus du protocole G400.

#### 3.2.6.1 Détermination des températures de transition sol-gel du collagène natif

L'étude des propriétés viscoélastiques de solutions de collagène natif a permis de déterminer les températures de transition sol-gel et gel-sol. Les mesures ont été réalisées sur du collagène natif en solution à une concentration de 20 mg/mL. Celui-ci a été soumis à un gradient de température croissant de 20°C à 2°C et décroissant de 2°C à 20°C, avec un pas de 0.5°C/min, à une fréquence de 1 Hz et avec une amplitude de déformation imposée de 100%. Les résultats ont été mesurés en cisaillement oscillant simple sur un rhéomètre à déformation imposée (ARES, TA Instruments) équipé d'une géométrie "cône-plan" (angle de cône: 0,04 rad, diamètre: 50 mm, entrefer: 48 µm).

#### 3.2.6.2 Etude de la réaction de réticulation du collagène à la mTG

L'étude des modules viscoélastiques du collagène réticulé avait pour objectif de comprendre, puis d'optimiser la réaction de réticulation du collagène à la mTG. Dans un premier temps, une étude descriptive de la cinétique de gélification a été réalisée, en mesurant  $G'$  et  $G''$  aux temps 300s, 1h, 2h, 3h et 3h38, après la mise en contact du collagène et de l'enzyme. La courbe de gélification de G400 a été étudiée sur le rhéomètre ARES avec une géométrie striée Couette à 1 Hz et à 3 % de déformation. Ensuite, dans le but d'optimiser le protocole de réticulation, l'influence de deux paramètres sur  $G'$  et  $G''$  a été observée:

(1) l'impact de la durée de la réaction de réticulation

-> objectif: optimiser le temps de réaction sans diminuer les propriétés viscoélastiques de l'hydrogel

(2) l'impact d'un cycle de congélation/décongélation

-> objectif: augmenter encore les propriétés viscoélastiques de l'hydrogel

Enfin, ces mesures ont également été utilisées pour vérifier la reproductibilité du protocole optimisé. Pour réaliser l'ensemble de ces observations, des mesures ondulatoires de cisaillement sur les disques de d'hydrogels G40 ont été effectuées sur le rhéomètre à contrainte imposé Gemini (Bohlin Instruments) équipé d'une géométrie "plan" de 25 mm ou de 40 mm de diamètre. Les deux surfaces de base de la géométrie sont rudes pour éviter à l'échantillon de glisser pendant la mesure (Figure 53).



Figure 53. Mesure des modules viscoélastiques du collagène réticulé sur l'appareil Gemini.

### 3.2.6.3 Comparaison des modules viscoélastiques des collagènes natifs et réticulés

La comparaison des modules viscoélastique avait pour objectif d'étudier l'impact de trois paramètres sur les propriétés viscoélastiques du collagène :

- (1) la température
- (2) la réticulation
- (3) le cycle congélation/décongélation

Ainsi, les modules viscoélastiques du collagène natif à 20°C et 4°C et des hydrogels avec et sans cycle de congélation/décongélation ont été mesurés. Pour le collagène natif, le protocole décrit en 3.2.6.1. a été utilisé, tandis que pour le collagène réticulé, le protocole décrit en 3.2.6.2. avec l'appareil Gemini a été utilisé. Concernant le collagène réticulé, Pour ce dernier, l'impact de différents facteurs sur les propriétés viscoélastiques ont également été étudiés.

## 3.3 Étude de l'impact du DH des hydrolysats sur les performances d'ingrédients fonctionnels testés *in vivo* sur des larves de bar

Cette étude avait pour but d'évaluer l'impact de la composition peptidique des hydrolysats produits et incorporés à des granulés, sur le développement larvaire du bar, et plus particulièrement, sur l'ossification et les malformations. Trois régimes alimentaires ont été testés: un régime témoin, un régime HC et un régime HL. L'expérimentation a commencé à l'éclosion des larves et s'est poursuivie pendant 42 jours.

### 3.3.1 Animaux et dispositif expérimental

Le bar *Dicentrarchus labrax* a été le modèle choisi pour cette étude. Les œufs ont été fournis par l'écloserie Aquastream (Ploemeur, France). Les expérimentations ont été réalisées dans les structures d'élevage de l'IFREMER au Centre de Plouzané (Figure 54).



Figure 54. Salle expérimentale dans laquelle ont été réalisés les essais des ingrédients fonctionnels *in vivo* sur les larves de bar.

Après éclosion, les larves ont été réparties dans des bacs cylindroconiques de 35L à raison de 1615 larves/bac. Il y avait un total de 15 bacs, à savoir 5 bacs/condition (Figure 55). Les bacs sont alimentés en eau de mer de la rade de Brest. La salinité est de 35 g/l et le taux d'oxygène de 6 mg/l. La température de l'eau est de 14°C au début de l'expérience puis elle est augmentée graduellement pendant 8 jours jusqu'à 21°C, température qui est conservée pendant le reste de la manipulation. L'éclairage, d'une intensité de 9 w/m<sup>2</sup>, est délivré en continu par des tubes fluorescents.

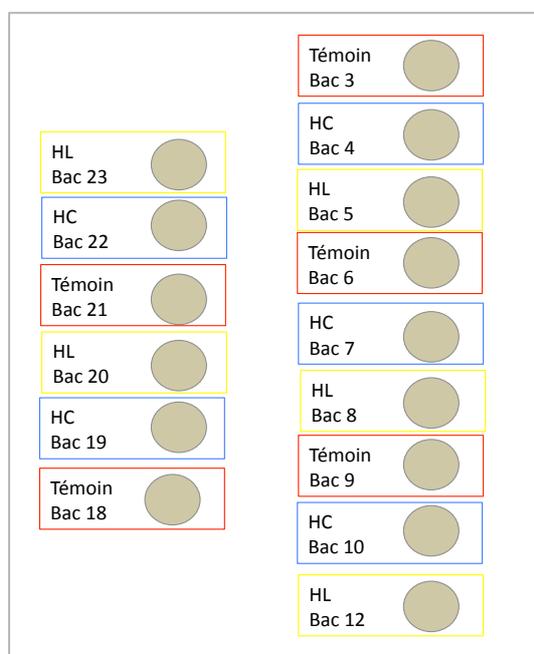


Figure 55. Schéma du dispositif expérimental mis en place pour réaliser les essais des ingrédients fonctionnels *in vivo* sur les larves de bar.

### **3.3.2 Régimes alimentaires**

Les trois aliments utilisés avaient une composition de base similaire, incorporant les mêmes ingrédients. Ils étaient isoprotéiniques, isolipidiques et isoénergétiques. Toutes les formules alimentaires contenaient une source protéique (farine de poisson et hydrolysats), une source glucidique (amidon et maltose), une source lipidique (lécithine de soja, lécithine marine, huile de foie de morue) et un mélange comprenant des minéraux, vitamines et liants. La composition des trois aliments est donnée dans le Tableau 30.

Les trois régimes se différençaient par leur composition en hydrolysat. Les régimes HC et HL contenaient les hydrolysats HC et HL produits à l'échelle pilote, tandis que le témoin, contenait l'hydrolysat CPSP90, gracieusement fourni par la société Copalis et couramment utilisé dans les écloséries.

Tableau 30. Composition des trois alimentés testés (Témoin, HC et HL) sur les larves de bar *in vivo* (d'après Zambonino *et al.*, 1997).

Ingrédients (g/kg matière sèche)	Témoin	HC	HL
Farine de poisson (77% protéines, 11% lipides, 4,3% cendres)	520	520	520
CPSP 90	130	0	0
HC	0	130	0
HL	0	0	130
Huile de poisson	0	10	0
Lécithine de soja	220	220	220
Mélange de vitamines	80	80	80
Mélange de minéraux	40	40	40
Bétaïne	10	0	0
Protéines (N x 6,25)	546	527	552
Lipides Folch total	228	231	231
Lipides neutre	34	67	65
Phospholipides	113	118	128
Matière sèche	936	933	920

Les animaux sont nourris deux fois par jour, le matin et le soir. Jusqu'à J15, les larves ont été alimentées par co-feeding avec les aliments Témoin, HC ou HL (suivant le bac, sous forme de granulés) combinés à des proies vivantes, des artémias à raison d'environ 20 artémias/ larve et par jour. Chaque bac dispose de structures individuelles et automatisées de distribution de l'aliment.

### 3.3.3 Étude phénotypique des larves

#### 3.3.3.1 Échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé à la fin de l'expérimentation, c'est-à-dire à J42. Pour évaluer le poids des larves en fonction du régime, 20 larves par bac ont été échantillonnées (n=100/régime testé) à J-42 et conservées dans du formol 5% pour être pesées. Vingt autres larves par bac (n=100/régime testé) ont été échantillonnées à J42 et conservées dans du formol à 10% pour être mesurées et pour réaliser l'analyse des malformations.

#### 3.3.3.2 Poids

Les larves ont été pesées individuellement dans les 12h suivant l'échantillonnage sur une semi-micro balance de précision  $10^{-5}$  g (CP225D-OCE, Sartorius). Le poids a été pesé en milligrammes.

#### 3.3.3.3 Taille des larves

Les larves ont été scannées et mesurées individuellement grâce à l'outil de mesure du logiciel d'analyse d'images GIMP. La longueur totale (LT) a été mesurée en millimètres.

#### 3.3.3.4 Etude de l'ossification et des malformations chez les larves

Les larves échantillonnées ont été traitées par la technique de la double coloration au bleu alcian et rouge alizarine S (Darias *et al.*, 2010) dont le protocole est détaillé en Annexe 2. Les tissus musculaires sont digérés par une solution de borate de sodium et de trypsine. Ensuite la coloration permet de colorer distinctement les tissus cartilagineux en bleu et les tissus osseux en rouge. Les larves colorées sont conservées dans une solution de glycérol contenant des grains de thymol jusqu'à numérisation. Les larves traitées sont numérisées à l'aide d'un scanner EPSON 4990 PHOTO et le logiciel GIMP. L'analyse est basée sur l'observation de l'absence, notée 0 ou la présence, notée 1, de trois paramètres :

- (1) malformation de la tête
- (2) malformation de la colonne
- (3) ossification

Elle a été répartie entre 4 lecteurs différents afin d'éliminer l'effet « lecteur ». Le nombre de malformations pour chacun des paramètres a été comptabilisé et ramené au nombre total de larves échantillonnées et le résultat a été exprimé en pourcentage.

#### *3.3.3.5 Taux de survie des larves*

Les poissons survivants sont comptés à J42. Ce nombre, rapporté au nombre initial de larves mises en élevage, permet d'estimer le taux de survie. Ce taux tient compte des poissons prélevés pour les analyses et est exprimé en pourcentage. Les animaux morts au cours de l'expérimentation n'ont pas été comptabilisés.

#### *3.3.3.6 Analyses statistiques*

Les résultats sont donnés avec la moyenne  $\pm$  écart-type et des comparaisons de moyenne ont été réalisées. La normalité des données a d'abord été testée avec un test de Shapiro-Wilk. Les données obtenues avec la mesure de la taille des larves n'étaient pas normales. Ainsi un test non-paramétrique, le test de Kruskal-Wallis, a été choisi pour l'analyse de l'ensemble des données. En effet, les tests non-paramétriques sont des tests statistiquement moins puissants que les tests paramétriques, il a donc été choisi d'analyser l'ensemble des observations avec un même degré de précision. Ensuite, des tests de comparaisons appariées ont été réalisés grâce à un test post-hoc de Pairwise afin de définir d'où venaient les différences significatives observées. Une degré de signification  $P=0,05$  a été utilisé et les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R.



## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**



## **Chapitre 1 :**

### **Mise au point d'un procédé industriel d'extraction d'un collagène de haut poids moléculaire à partir de peaux de saumon (*Salmo salar*)**

#### **Résumé:**

*Ce chapitre présente les résultats d'une démarche de Recherche et Développement pour l'obtention d'une préparation de collagène à partir de peaux de saumon. L'objectif était de développer un procédé éco-respectueux permettant l'obtention d'un collagène de haut poids moléculaire. Le procédé a d'abord été testé en laboratoire avant d'être transposé à l'échelle pilote puis industrielle. L'optimisation du protocole a notamment porté sur le traitement de la matière première pour éliminer la matière grasse et contrôler la charge microbienne. Les développements ont conduit à la mise en place d'un pré-traitement des peaux mécanique et chimique. En parallèle, un ensemble de méthodes analytiques ont été développées, comme la SEC-FPLC et le SDS-PAGE, pour caractériser les produits obtenus au cours du transfert d'échelle mais également afin d'éviter une dérive du process dans le temps.*

*Le succès et l'innovation du procédé tiennent dans la combinaison d'une matière première de haute qualité et d'un protocole d'extraction en conditions ménagées offrant une alternative aux protocoles d'extraction par voie acide couramment utilisés. Le procédé développé a permis l'obtention d'un produit possédant les caractéristiques requises pour des applications dans les domaines de la cosmétique ou des dispositifs médicaux.*

## 1. Introduction

La première partie du projet Pesk&Co porte sur le développement d'un procédé industriel pour l'extraction d'un collagène marin de haut poids moléculaire à partir de peaux de saumon qui n'avaient, à ce jour, pas de voie de valorisation au sein de la société Meralliance, chef de file du projet. Ce premier chapitre présente les travaux relatifs à la mise au point de ce procédé, aux changements d'échelle et à la caractérisation du collagène marin obtenu.

## 2. Conceptualisation de la démarche R&D

La molécule de collagène peut être utilisée dans de nombreux domaines. L'intérêt du consortium Pesk&Co repose sur le développement de produits visant les marchés à haute valeur ajoutée de la cosmétique et des dispositifs médicaux. Le procédé mis au point doit donc permettre d'obtenir un collagène qui se prête à la fois à ces deux domaines d'applications. Dans cette démarche, le développement d'un procédé d'extraction d'un collagène de haut poids moléculaire, c'est-à-dire au plus proche de sa forme native, est le plus approprié. En cosmétique, il permet d'apporter des propriétés recherchées dans certaines formulations (effet tenseur, humectant, hydratation), tandis que dans le cas des applications biomédicales, il offre la possibilité de former des réseaux tridimensionnels stables naturellement ou à l'aide d'agents réticulants. Il existe principalement deux méthodes d'extraction du collagène: la méthode d'extraction par la pepsine (Choi *et al.*, 2013 ; Jongjareonrak *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2014) et la méthode d'extraction par voie acide (Eysturskarð *et al.*, 2009a ; Minh Thuy *et al.*, 2014; Nagai et Suzuki, 2000). Le collagène pepsino-soluble présente un poids moléculaire plus faible que le collagène acido-soluble, résultant de la double action de la pepsine qui non seulement clive les télépeptides impliqués dans les liaisons inter-moléculaires, mais dissocie également une partie du collagène sous formes  $\gamma$  et  $\beta$  en chaînes  $\alpha$  (Sato *et al.*, 2000). Bien que le procédé d'extraction par voie acide soit le plus approprié, la veille bibliographique et l'analyse des brevets ont montré qu'il a déjà été décrit (Eysturskarð *et al.*, 2009a ; Minh Thuy *et al.*, 2014 ; Nagai et Suzuki, 2000) ou bien a déjà été breveté (David et Ranson, 1995 ; Shimizu *et al.*, 2005). Au vu des connaissances actuelles, cette étude propose la mise au point d'un nouveau protocole d'extraction, permettant d'obtenir un collagène de haut poids moléculaire. L'objectif est de proposer une alternative, non seulement du point de vue du mécanisme d'extraction mis en jeu, mais aussi du point de vue des réactifs utilisés, en s'inscrivant dans une approche plus éco-respectueuse. Dans ce sens, en combinant

les résultats de deux études (Kolodziejska *et al.*, 2008 et d'Eyturskarð *et al.*, 2009a), un procédé d'extraction en conditions ménagées a été conceptualisé.

Dans le cas du saumon, la peau utilisée est un co-produit particulièrement gras et exposé au phénomène d'oxydation des lipides. En effet, contrairement aux poissons blancs qui stockent leur matière grasse essentiellement dans le foie, les poissons gras comme le saumon concentrent les lipides dans les tissus adipeux situés aux niveaux périviscéral, sous cutané (dorsal et latéral), abdominal et intermusculaire (Fauconneau *et al.*, 1990). Brièvement, l'oxydation est une réaction auto-catalytique qui se déroule en plusieurs étapes. L'initiation de la réaction est favorisée par certains facteurs comme la température, l'oxygène, la lumière ou encore la présence d'ions métalliques comme le Fer. Les produits primaires de l'oxydation des lipides peuvent alors réagir avec les protéines et induire des modifications de leur structure et de leurs fonctions, des phénomènes qui ne sont donc pas compatibles avec l'objectif visé. Le contrôle de la matière première, et plus particulièrement de sa composition en matière grasse est donc un point important dans le développement du procédé. Dans le cas des procédés classiquement utilisés, ce problème est résolu par les conditions d'extraction plus drastiques, et notamment le traitement à l'acide à froid, qui permettent de limiter ces phénomènes d'oxydation.

La démarche de recherche et développement pour la production d'un collagène de haut poids moléculaire comprend plusieurs étapes et est illustrée sur la Figure 56. Après avoir établi un cahier des charges et conceptualisé la démarche, la première étape se déroule au sein du laboratoire. Deux procédés d'extractions sont testés: le procédé classique par voie acide (le protocole A), adapté de Eyturskarð *et al.* (2009a) et le procédé alternatif d'extraction du collagène en conditions ménagées (le protocole E), adapté de Kolodziejska *et al.* (2008). Un des deux protocoles testés est validé, principalement sur la base des caractéristiques biochimiques du collagène obtenu, qui devient un « prototype » de référence. Le protocole choisi est alors transposé à l'échelle pilote et deux grandes étapes s'opèrent alors: (1) le changement d'échelle et (2) l'optimisation du procédé. Le changement d'échelle permet d'une part, de confirmer la faisabilité, en comparant les résultats obtenus au prototype et, d'autre part, d'identifier les différents freins et leviers du procédé afin de le rendre viable pour une production industrielle. En fonction des différents points critiques identifiés, des essais d'optimisation sont réalisés sur le protocole. Parallèlement, et pour valider ces différents essais, un ensemble de méthodes analytiques, à l'interface entre plusieurs disciplines (science des matériaux, biochimie, physique), ont été développées afin de caractériser chaque produit obtenu et permettre une analyse critique. Une partie des méthodes a fait l'objet d'un transfert de compétences vers les industriels partenaires du projet. L'objectif est de mettre en place des méthodes simples, rapides et peu

coûteuses afin de s'affranchir le plus possible d'analyses par des sous-traitants. Ces méthodes et compétences seront alors transférées vers un futur laboratoire analytique qui sera mis en place dans le cadre du projet pour assurer le contrôle qualité de la production. Globalement, l'ensemble de la démarche est guidé par le cahier des charges défini initialement.

Pour aller plus loin, ce collagène aux propriétés intéressantes servira d'objet d'étude afin de réaliser des essais de réticulation et ainsi envisager une utilisation dans le domaine des biomatériaux (cf Chapitre 2).

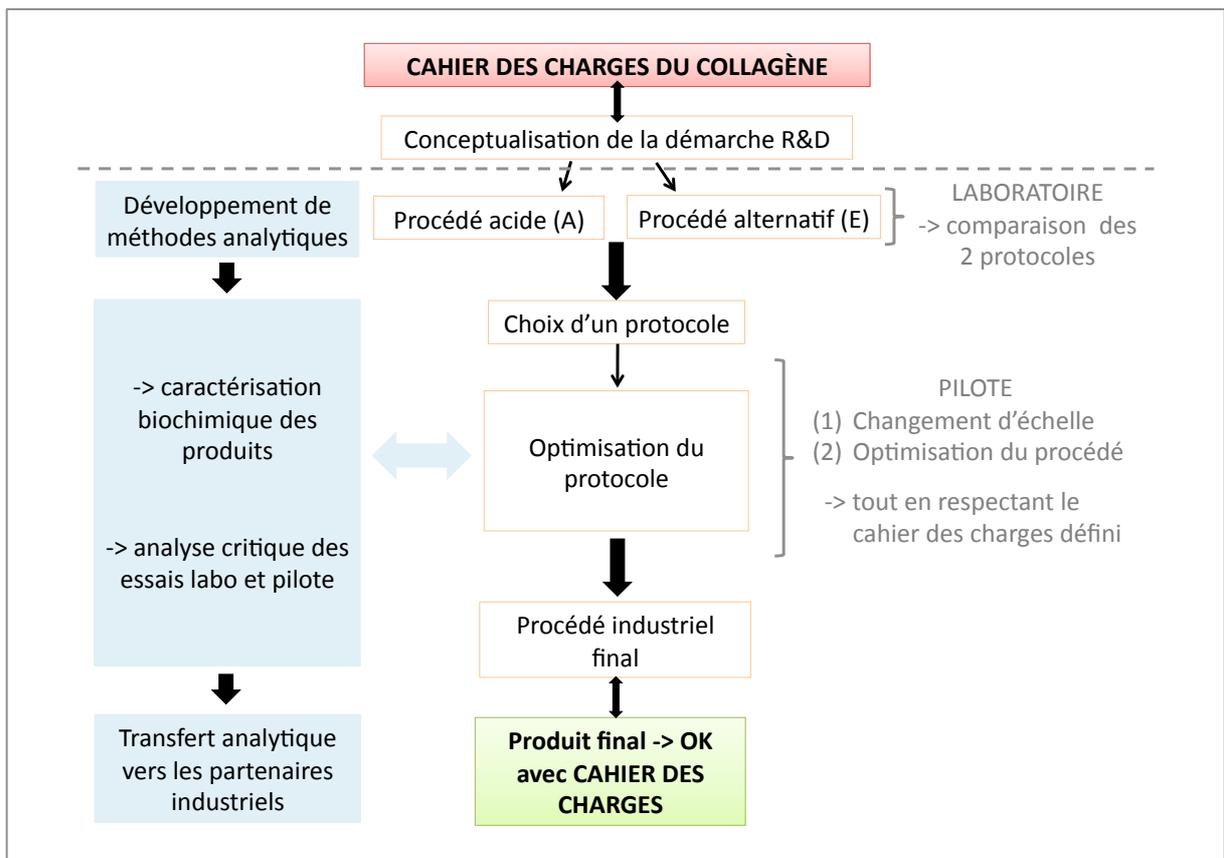


Figure 56. Démarche R&D pour la production d'un collagène de haut poids moléculaire.

### 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Analyse des produits de la concurrence

Une analyse des collagènes marins retrouvés sur le marché a été réalisée, pour les comparer au collagène de saumon développé dans ce projet, en fonction de ses caractéristiques et réfléchir à sa commercialisation. Pour cela, différents paramètres ont été étudiés comme le

conditionnement, les caractéristiques organoleptiques ainsi que la composition. Également, les produits ont été analysés au LEMAR en chromatographie d'exclusion stérique pour déterminer le poids moléculaire, permettant ainsi d'évaluer la structure tridimensionnelle du collagène et spécifier s'il s'agit d'un hydrolysate, de gélatine ou encore d'un collagène natif présentant une structure en triple hélice. On distingue deux types de collagènes commercialisés analysés ici: les produits « finis », prêt à être utilisés directement par le consommateur, et les ingrédients, qui sont incorporés dans la formulation de produits qui seront à leur tour utilisés par le consommateur. Le Tableau 31 présente les caractéristiques des produits « finis » commercialisés sur le marché asiatique.

Les produits présentés peuvent être sous forme de poudre, liquide, de gélule ou encore de comprimé. Lorsqu'ils sont sous forme de poudre, ils présentent des teneurs en protéines supérieures à 90% (92% pour les produits Centrum et Elelen, 93% pour le produit Lumi et 96% pour le produit BellaColla) tandis que ces valeurs sont comprises entre 8,9 et 29,70% pour les produits sous forme liquide, en gélule ou comprimé (8,90% pour le produit Elelen, 10% pour le produit Lumi, 21,10% pour le produit Eleven Fence, 24,07% pour le produit Aurinda et 29,70% pour les produits Queensland kin et Aucrioste). En plus du collagène, la formulation de ces produits inclut, pour certains, des vitamines (By-health, Lumi liquide, Queensland kin, Elelen liquide, Neocell et Aucrioste) et de la matière grasse (produits sous forme de gélule: Queensland kin, Aurinda, Eleven Fence, Neocell, Aucrioste). Il est à noter que les informations fournies par les fabricants sur la composition ne sont pas aussi précises pour tous les produits.

Le Tableau 32 présente les caractéristiques des collagènes retrouvés sur le marché français.

## Résultats et discussion

### Chapitre 1

Tableau 31. Description des produits formulés à base de collagènes marins et commercialisés sur le marché asiatique.

Nom commercial	Centrum	By-health	Lumi		Queensland kin	BellaColla	Eleen		Aurinda	Eleven Fence	Neocell	Aucrioste
												
<b>Forme</b>	Poudre	Poudre	Poudre	Liquide	Gélules	Poudre	Poudre	Liquide	Comprimés	Gélules	Gélules	Gélules
<b>Type de collagène</b>	Hydrolysat	Hydrolysat	Hydrolysat		Hydrolysat	Hydrolysat	Hydrolysat		-	Hydrolysat	-	Hydrolysat
<b>Provenance produit/mat. première</b>	Rousselot, France	France	Rousselot, France		Australie	Japon	France		Australie	Nouvelle Zélande	USA	Australie
<b>Conditionnement</b>	3g x 7sticks	3g x 30 sticks	5,2 g x 7 sticks	50 mL x 6 bouteilles	500mg x 90 gélules	150 g en vrac	5g x 10 sticks	50 mLx 3 bouteilles	850 mg x 30 comprimés	785mg x 60 gélules	120 gélules	500mg x 90 gélules
<b>Composition</b>												
<b>Protéines totales</b>	92%	-	93%	10%	29,70%	96%	92%	8,90%	24,07%	21,10%	-	29,70%
<b>Collagène (pour 100g)</b>	-	66,70 g	-	-	34,6 g	-	-	-	-	-	500mg/gélule	34,6 g
<b>Type de collagène</b>												
<b>Matière grasse</b>	0%	-	0	0	58,50%	0	0	0	3,78%	74,90%	-	58,50%
<b>Carbohydrates</b>	0,70%	-	1,60%	13,40%	6,70%	0	0	4,80%	31,20%	1,60%	-	6,70%
<b>Sodium (pour 100g ou 100 mL)</b>	354 mg	-	415 mg	44 mg	-	34 mg	100 mg	8 mg	-	74 mg	-	-
<b>Vitamines (pour 100g ou 100 mL)</b>	non	oui	non	oui	oui	non	non	oui	non	non	oui	oui
<b>B<sub>6</sub></b>	-	-	-	-	-	-	-	0,16 mg	-	-	présence	-
<b>B<sub>12</sub></b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	présence	-
<b>C</b>	-	présence	-	présence	-	-	-	29 mg	-	-	-	-
<b>E</b>	-	-	-	-	1,46 g	-	-	-	-	-	-	1,46 g
<b>Énergie (pour 100g ou 100 mL)</b>												
<b>en kJ</b>	1551	-	-	391	2782	1614	1538	269	1079	3201	-	2782
<b>en kcal</b>	370	-	-	93	664	385	367,34	64	256	765	-	665
<b>Posologie</b>	1-2 sticks/jour	1-2 sticks/jour	1-2 sticks/jour	1-2 bouteille/jour	1-2 gélules/jour	5-10 g/portion	1-2 sticks/jour	1-2 bouteille/jour	1-2 comprimés/jour	2-4 gélules/jour	4 gélules/jour	1-2 gélules/jour
<b>Prix (€)</b>	20,79 - 23,25	44,03 - 48,95	6,03 - 13,28	13,28 - 16,97	4,58 - 11,44	68,88	7,26 - 19,43	6,03 - 23,12	39,24 - 48,95	30,13 - 35,42	34,32 - 44,03	25,71 - 29,27
<b>Prix à l'usage (€/jour)</b>	2,98 - 6,67	1,47 - 3,28	0,86 - 3,81	2,22 - 5,68	0,08 - 0,38	2,3 - 4,6	0,73 - 3,89	2,02 - 15,41	1,31 - 3,26	0,50 - 1,18	1,14 - 1,47	0,28 - 0,65
<b>Analyse P esk&amp;Co</b>												
<b>Poids moléculaire moyen (Da)</b>	3 000 - 1 000	3 000 - 1 000	3 000 - 1 000	3 000 - 1 000	-	5 000 - 1 000	3 000 - 1 000	3 000 - 1 000	-	-	-	-

Tableau 32. Description des collagènes commercialisés en tant qu'ingrédient.

Nom produit	Hydrocollamer	Collagen HM	Naticol BPMG	Naticol 4000	Collagen CLR	Maricol S	Fagron
Marque	Abyss'	Copalis	Weishardt	Waishardt	Chemisches laboratorium		Fagron
Type de collagène	hydrolysat	hydrolysat	hydrolysat	hydrolysat	natif	natif	natif
Origine	collagène marin	peaux de poissons	peaux de poissons	peaux de poissons	peau de veau	peau de thon	peau de porc
<b>Caractéristiques physiques</b>							
Aspect	Poudre	Poudre	Poudre	Poudre	Liquide	Liquide	Liquide
Granulométrie	100 microns	fine poudre	-	-	-	-	-
Couleur	beige	crème	-	-	incolore à jaunâtre	presque transparent	incolore
Odeur	caractéristique	-	neutre	neutre	pratiquement pas	pratiquement pas	-
pH	non défini	5,5 - 7,5	5,6 - 6,4	5,6 - 6,4	3,5 - 4,1	3,0 - 4,5	3,4 - 3,8
<b>Caractéristiques chimiques</b>							
Protéines totales	> 80% (N*5,46)	> 90%	> 93%	> 93%	0,375 - 0,625% (N*6,25)	-	1 - 1,25 % (N*6,25)
Protéines collagéniques	> 80%	> 90%	-	-	0,1 - 1,0 %	0,1 - 1,0 %	0,9 - 1,1%
Hydroxyproline	> 5%	8,74%	-	-	490 - 530 µg/mL	470 - 540 µg/mL	-
Cendres	< 11%	< 7%	< 2%	< 2%	-	-	-
Matière grasse	< 3%	-	-	-	-	-	-
Humidité	< 10%	< 10%	< 7%	< 7%	> 97,8%	> 96%	-
<b>Caractéristiques microbiologiques</b>							
Total	< 10 000 ufc/g	< 10 000 ufc/g	< 1 000 ufc/g	< 1 000 ufc/g	< 100 ufc/mL	< 100 ufc/mL	< 100 ufc/mL
Levures moisissures	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g	-	-	-	-
Entérobactéries	< 100 ufc/g	< 10 ufc/g	-	-	-	-	-
Salmonelles	Absence	Absence	Absence	Absence	-	-	-
Escherichia Coli	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	-
Staphylococcus	Absence	Absence	-	-	Absence	Absence	-
<b>Métaux lourds</b>							
Total	-	< 5 ppm	< 50 ppm	-	-	-	-
Plomb	< 1 ppm	-	< 5 ppm	< 5 ppm	< 0,2 ppm	< 0,2 ppm	-
Mercure	< 0,1 ppm	-	< 0,15 ppm	< 0,15 ppm	< 0,02 ppm	< 0,05 ppm	-
Cadmium	< 0,5 ppm	-	< 0,5 ppm	< 0,5 ppm	< 0,01 ppm	< 0,05 ppm	-
Arsenic	< 1 ppm	-	< 0,8 ppm	< 1 ppm	< 0,15 ppm	< 0,15 ppm	-
<b>Poids moléculaires</b>							
Spécifications	-	1.10 <sup>3</sup> à 1.10 <sup>4</sup> Da	3 000 Da	< 4000 Da	-	-	-
Analyses Pesk&Co	< 1 000	1 000 - 500	-	-	> 300 kDa	600-100 kDa	> 300 kDa



Concernant les ingrédients commercialisés sur le marché français, on distingue les hydrolysats de collagène marin (Hydrocollamer, Collagen HM, Naticol BPMG et Naticol 4000) des collagènes natifs de poisson (Maricol S) et de mammifère (Collagen CLR et Fagron). Les hydrolysats sont vendus sous forme de poudres de couleur claire (blanche ou beige), avec une odeur de poisson peu prononcée pour la plupart et leurs teneurs en protéines sont au moins supérieures à 80%. Pour ce qui est des collagènes natifs, qu'ils soient d'origine marine ou de mammifère, ils sont commercialisés sous forme de liquide plutôt transparent et très peu odorant. Ils présentent des teneurs en protéines plus faibles (> à 1,25%) que les hydrolysats vendus sous forme de poudre, car le collagène natif est alors solubilisé dans une préparation à pH acide. Le poids moléculaire des collagènes issus de mammifère (Collagen CLR et Fagron) est majoritairement supérieur à 300 kDa tandis que le collagène marin (Maricol S) à un poids moléculaire réparti entre 600 et 100 kDa.

Globalement, pour ce qui est du poids moléculaire des produits analysés en chromatographie d'exclusion stérique, les hydrolysats ont été analysés sur la colonne Superdex™ Peptides 10/300 GL (domaine de fractionnement: 1000 - 7000 Da) tandis que les collagènes natifs ont été analysés sur la colonne Superdex™ 200 10/300 GL (domaine de fractionnement: 10 000 et 600 000 Da). Les produits sous forme de gélule ou de comprimé, du fait de leur composition en matière grasse, risquaient d'endommager la colonne et n'ont donc pas été analysés, tout comme les produits Naticol BPMG et Naticol 4000, du fait d'un nombre déjà suffisant de produits étudiés. En raison des nombreux échantillons analysés dans cette étude, les chromatogrammes ne sont pas présentés. En revanche, le Tableau 33 compare la répartition des classes de taille pour certains des échantillons.

Tableau 33. Répartition des classes de tailles des produits de la concurrence. Pour chacun, la classe de taille présentant le plus fort pourcentage est indiquée en orange (profils SEC-FPLC détaillés en Annexe 3)

Classes de taille (MW)	% de peptides								
	BellaColla	By-health	Centrum	Elelen (solution)	Elelen (poudre)	Lumi (solution)	Lumi (poudre)	Collagen HM	Hydrocollamer
> 7000	20,46	3,86	4,58	5,28	3,62	2,65	7,14	0,01	0,00
7000 - 5000	16,69	7,17	6,23	6,74	5,34	3,81	7,43	0,17	0,00
5000 - 3000	25,51	18,14	14,93	15,56	14,29	10,80	16,69	1,72	0,19
3000 - 1000	30,23	47,66	46,38	45,13	46,95	44,24	44,19	29,91	10,36
1000 - 500	6,30	17,60	21,91	19,10	23,06	24,53	19,05	44,18	40,70
< 500	0,81	5,57	5,97	8,20	6,74	13,96	5,50	24,01	48,75

Les résultats montrent que les collagènes les plus hydrolysés sont les produits Collagen HM et Hydrocollamer dont plus de 40% des peptides ont une taille comprise entre 1000 et 500 Da. Pour les autres produits, la composition peptidique est proche avec plus de 40% des peptides ayant une taille comprise entre 3000 et 1000 Da. La préparation BellaColla se démarque des autres avec 56% des peptides compris entre 5000 et 1000 Da.

Cette étude révèle que la majorité des collagènes marins retrouvés sur le marché sont donc des hydrolysats. Ils sont présents sur le marché asiatique et ils sont plutôt utilisés en tant que nutraceutiques ou cosméceutiques. Pour des applications cosmétiques, on retrouve à la fois des ingrédients sous forme d'hydrolysats, mais également sous forme de collagène natif. Cependant, on retrouve principalement du collagène de mammifère pour ce genre d'application, et le collagène marin reste encore très minoritaire sur ce marché. Ainsi, pour une application en cosmétique ou à plus haute valeur ajoutée comme pour les biomatériaux, il est préférable d'utiliser un collagène de plus haut poids moléculaire et ayant conservé sa structure tridimensionnelle en triple hélice. L'étude des produits de la concurrence confirme donc la nécessité de proposer sur le marché un ingrédient alternatif aux collagènes de mammifère, comme le collagène natif marin issu de peaux de saumon.

### 3.2 Cahier des charges du collagène à produire

Un cahier des charges du collagène à produire a été établi avant de démarrer les essais en laboratoire. Il a servi de référence pour choisir le protocole permettant d'obtenir un collagène

répondant à la fois aux exigences scientifiques et aux visions marketing et développement de produit. Concernant les spécificités biochimiques attendues, elles sont décrites dans le Tableau 34. La préparation obtenue doit tout d’abord présenter une composition en acides aminés caractéristique de celle du collagène, et notamment une teneur spécifique en hydroxyproline. Elle doit posséder des sous-unités  $\gamma$ , traduisant une conservation partielle de la structure en triple hélice du collagène. Le poids moléculaire sera au minimum de 300 kDa, ou plus dans le cas de la formation d’agrégats. Enfin, la préparation doit posséder un certain degré de pureté avec une teneur en collagène supérieure à 50% et plus de 80% de protéines.

Tableau 34. Spécificités biochimiques attendues pour la préparation de collagène.

	Spécificités
Composition acides aminés	Hyp: 6-9 Rés./100g Rés. Pro: 10-13 Rés./100g Rés. Gly: 20-28 Rés./100g Rés.
Poids moléculaire	> 300 kDa, présence sous-unité $\gamma$
Teneur en collagène	> 50% des protéines
Teneur en protéines	> 80% de l’échantillon

En vue d’une commercialisation, l’aspect visuel et organoleptique du produit est important. Il doit présenter une couleur claire et être peu odorant. Sa charge microbienne doit être faible. De manière générale, le produit doit être stable dans le temps pendant au minimum 12 mois, car la durée de conservation d’un produit sur le marché varie entre 12 et 27 mois.

Du point de vue marketing et éthique, le produit obtenu doit être entièrement traçable, depuis la provenance de la matière première jusqu’à la commercialisation, permettant principalement de s’assurer qu’il ne provient que d’une seule espèce de poisson: *Salmo salar*. De plus, la mise au point d’un procédé différent des procédés utilisés couramment (par voie acide par exemple) alimente l’image de la mise sur le marché d’un nouveau produit.

Si le produit répond à ce cahier des charges, l’ensemble de ces revendications pourra alors être précisé dans la fiche technique du produit final commercialisé (Annexe 4) et permettront de vérifier la conformité du produit vendu.

### 3.3 Composition proximale de la matière première

Le Tableau 35 montre la composition des peaux de saumon utilisées pour les essais d’extraction de collagène en laboratoire. Tout d’abord, les peaux de saumon sont composées pour plus de la moitié d’eau (58,67%). Indépendamment de cette forte teneur en eau, les peaux ont un taux équivalent de lipides et de protéines (21,40% et 20,47%, respectivement): on a donc une

matière première très grasse. Pourtant, les peaux utilisées dans cette étude ont déjà subi une première étape permettant d'éliminer une partie des lipides par un procédé mécanique AM2C: le dépulpage. Ce procédé enlève la chair restant sur la peau après transformation du poisson, et donc la matière grasse qu'elle contient. Par ailleurs, cette étape est particulièrement nécessaire pour retirer le muscle brun qui est riche en myoglobine et hémoglobine contenant du fer. Celui-ci est un pro-oxydant et joue un rôle clé dans l'oxydation lipidique (Richards *et al.*, 1998). Ces données confirment donc la nécessité de dépulper les peaux en amont du procédé. Malgré cela, une étape de nettoyage de la matière première dans les premières étapes du protocole est inévitable. On retrouve d'ailleurs une étape de pré-traitement dans les deux procédés testés en laboratoire, mais également dans la plupart des procédés d'extraction du collagène de peaux de poisson dans lesquels, le plus souvent, un traitement à l'alcool butylique joue ce rôle (Eysturskarð *et al.*, 2009a ; Jongjareonrak *et al.*, 2005)

Tableau 35. Composition proximale des peaux de saumon atlantique dont est extrait le collagène.

Composition	Peaux saumon (% poids frais)
Humidité	58,67 ± 6,44
Lipides	21,40 ± 6,61
Protéines	20,47 ± 0,55
Collagène (Hypx8)	9,37 ± 0,72
Hydroxyproline	1,17 ± 0,10
Cendres	2,00 ± 0,26

### 3.4 Comparaison des protocoles A et E d'extraction du collagène en laboratoire

#### 3.4.1 Aspect visuel des échantillons

Après lyophilisation, les échantillons obtenus ont une couleur blanche (Figure 57). Concernant leur texture, elle est très compacte et fibreuse, s'apparentant à celle du polystyrène.

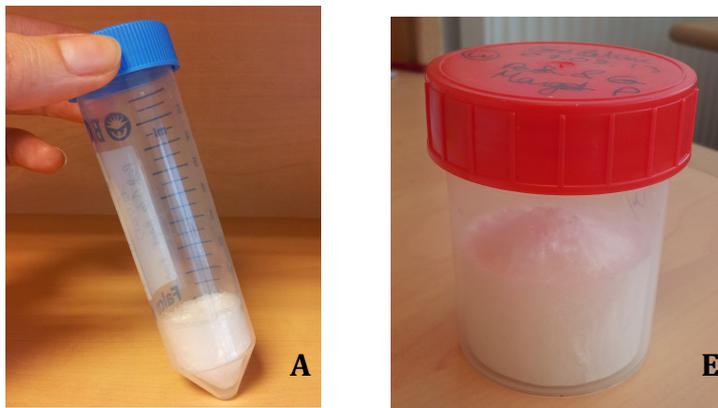


Figure 57. Collagènes obtenus par le protocole (A) et par le protocole (E) testés en laboratoire.

### 3.4.2 Composition en protéines des échantillons

La composition en protéines et collagène des échantillons obtenus pour chaque essai est indiquée dans le Tableau 36.

Tableau 36. Composition en protéines, Hyp et collagène des échantillons obtenus par les deux procédés d'extraction (A) et (E) testés en laboratoire.

Méthode d'extraction	Protéines Kjeldahl (g/100g lyophilisat)	Hyp (g/100g lyophilisat)	Hyp (en % des prot totales)	Collagène* (g/100g lyophilisat)	Collagène (en % des prot totales)
A 1	95,9 ( $\pm 0,4$ )	6,85	7	54,8	57
A 2	109,12 ( $\pm 0,4$ )	7,74	7	63,36	58
E 1	113,4 ( $\pm 0,4$ )	7,77	6,85	63	55
E 2	84 ( $\pm 0,4$ )	5,88	7	46,2	55

\* Hyp x 8, norme AFNOR (NF V04-415)

Quel que soit le procédé d'extraction, les teneurs en protéines des échantillons sont supérieures à 84%. Elles peuvent atteindre 100% pour les échantillons A2 et E1 tandis que le minimum (84%) a été obtenu pour l'échantillon E2. Les valeurs supérieures à 100% s'expliquent par l'application d'un facteur de dilution: les mesures ont été réalisées sur un échantillon dilué et rapportées au poids sec. Concernant les teneurs en Hyp des échantillons, elles varient de 5,88 à 7,77%, avec la valeur maximale obtenue pour l'échantillon E1 et la valeur minimale obtenue pour l'échantillon E2. Si l'on rapporte ces valeurs aux protéines totales contenues dans l'échantillon, l'Hyp représente environ 7%, ce qui est légèrement plus important que ce que l'on peut retrouver dans la matière première (5,7%). Le collagène représente entre 55 et 58% des protéines contenues dans l'échantillon, avec la plus faible valeur pour les échantillons E1 et E2 et le maximum pour l'échantillon A2. Pour rappel, la proportion de collagène par rapport aux protéines dans la matière première était de 46%.

Pour conclure sur ces données, les teneurs en protéines et Hyp ainsi que les proportions de collagène par rapport aux protéines totales, répondent au cahier des charges défini précédemment. Cela est observé, que l'échantillon soit obtenu à partir du protocole A ou du protocole E et ce, malgré les différences qui existent entre les échantillons. Ces résultats permettent de conclure que, sur la base de ces observations, les deux protocoles conduisent à l'obtention d'un produit équivalent sur le plan biochimique.

Plus généralement, on observe que les proportions des teneurs en Hyp et collagène par rapport aux protéines totales des échantillons, quel que soit le protocole utilisé, sont supérieures à ce

que l'on a pu observer pour la matière première. Cela démontre bien l'efficacité des deux protocoles dans l'extraction des protéines et du collagène.

### 3.4.3 Composition en acides aminés

Le Tableau 37 présente les profils en acides aminés caractéristiques du collagène, Hyp, Pro et Gly, obtenus pour les échantillons, et comparés à celui de collagènes issus de saumon, de calamar et de bœuf.

Tableau 37. Composition en acides aminés caractéristiques du collagène des échantillons obtenus avec les protocoles (A) et (E) testés en laboratoire et comparés à des collagènes de saumon, de calamar et de bœuf.

Acides aminés (Rés. /100g Rés.)	Protocole A	Protocole E	Saumon <sup>(1)</sup>	Calamar <sup>(2)</sup>	Bovin <sup>(3)</sup>
Glycine	23,51 (±1,75)	21,11 (±1,63)	36,6	33,2	22,3
Proline	11,93 (±1,05)	12,58 (±1,07)	10,6	12,2	11,2
Hydroxyproline	8,07 (±1,05)	8,74 (±0,64)	6	10,1	10,1
Acides iminés = Hyp + Pro	20,0	21,3	16,6	22,3	21,3

<sup>(1)</sup>Arnesen et Gildberg, 2007

<sup>(2)</sup>Veeruraj *et al.*, 2015

<sup>(3)</sup>Choi *et al.*, 2013

La Gly est l'acide aminé le plus abondant pour les échantillons obtenus à partir des protocoles A (23,51%) et E (21,11%) mais également pour les collagènes de saumon, calamar et bœuf. Il représente entre 20 et 30% des acides aminés totaux. Cette prédominance s'accorde avec les données de la littérature, où elle est définie comme l'acide aminé le plus abondant dans le collagène et en représente environ le tiers (Fernandes-Silva *et al.*, 2013). Concernant la teneur en Pro et Hyp, le collagène de saumon obtenu selon le procédé Arnesen et Gildberg (2007) présente les teneurs les plus faibles (10,6 et 6%, respectivement) comparé au collagène de bœuf (11,2 et 10,1%, respectivement) (Choi *et al.*, 2013) et de calamar (12,2 et 10,1%, respectivement). Les teneurs en Pro et Hyp des échantillons A sont plus élevées que celles mesurées par Arnesen et Gildberg (2007), tandis que la plus forte teneur en acides iminés est attribuée au collagène de calamar (22,3%).

Ces résultats montrent que les échantillons obtenus par les protocoles A et E présentent une composition en acides aminés caractéristique de la molécule de collagène, et ce, quel que soit le protocole utilisé. Ils permettent donc de confirmer que le protocole E permet d'extraire du collagène. Par ailleurs, la teneur en Hyp est plus faible que celle du collagène de mammifère, ce

qui est propre aux collagènes de poisson, et en particulier aux espèces d'eau froide. Malgré cela, les deux protocoles remplissent les exigences du cahier des charges en terme de teneur en acides aminés.

### 3.4.4 Chromatographie d'exclusion stérique : SEC-FPLC

Les profils SEC-FPLC des échantillons A et E et leur interprétation sont présentés sur la Figure 58.

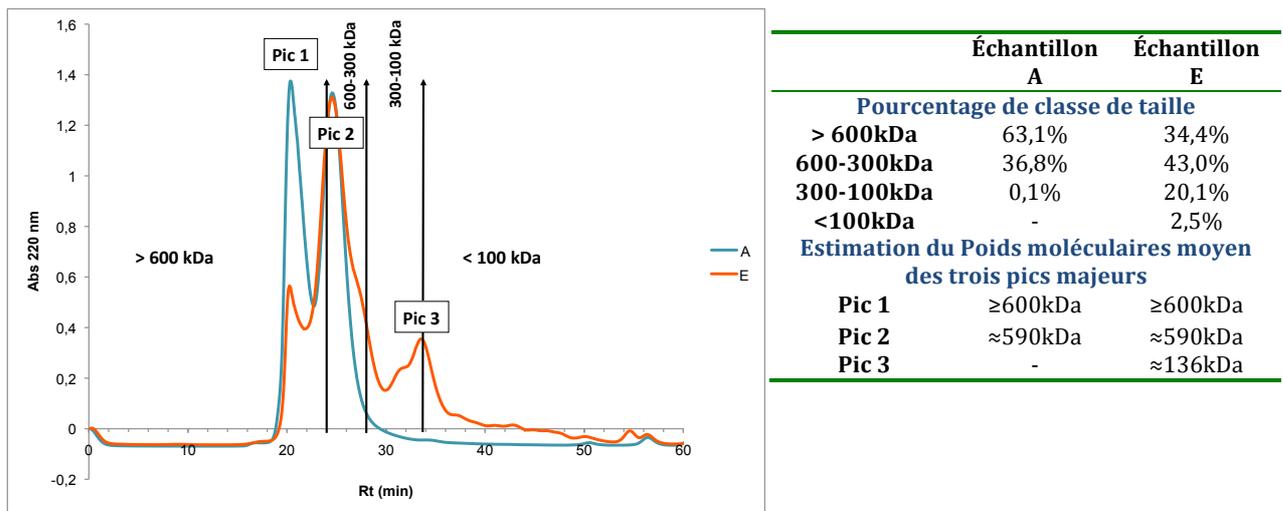


Figure 58. Éluion sur la colonne Superdex 20, répartition des classes de taille et estimation du poids moléculaire des pics majeurs des échantillons obtenus par le protocole A (courbe bleue) et le protocole E (courbe rouge) testés en laboratoire.

L'échantillon A est élué en deux pics de poids moléculaire supérieur à 300kDa:

- (1) le Pic 1 est élué dans le volume mort de la colonne, son poids moléculaire estimé est supérieur à 600 kDa
- (2) le Pic 2 : correspond à un poids moléculaire d'environ 590 kDa

L'échantillon E présente également ces deux pics mais, dans son cas, ils représentent 77% de l'échantillon. Plus précisément, les proportions des deux pics sont différentes pour chacun des échantillons et l'échantillon A présente une plus grande majorité de poids moléculaire au dessus de 600kDa (63,1%) que l'échantillon E (34,4%). Ce dernier, présente une plus faible proportion de poids moléculaires au dessus de 300kDa, et plus particulièrement au-dessus de 600kDa. Ces observations se traduisent par une éluion d'environ 20% de l'échantillon en-dessous de 300kDa avec la présence d'un troisième pic autour de 136kDa.

Les deux procédés sont donc peu dénaturants car la distribution des poids moléculaires de chacun des échantillons est, dans les deux cas, majoritairement au dessus de 300kDa, même si l'échantillon E semble être un peu plus dégradé que l'échantillon A, comme le montre la présence de constituants de plus petit poids moléculaire. Cela s'explique par le fait que l'extraction E est réalisée à 45°C, entraînant la rupture de certaines liaisons hydrogène par la chaleur. De plus, ces conditions de température sont propices à des phénomènes d'autolyse de la matière première, par l'action de protéases endogènes impliquées dans la dégradation des molécules de collagène (Intarasirisawat *et al.*, 2007). Le protocole A étant réalisé à une température de 5°C, les échantillons A ne sont pas soumis à l'ensemble de ces réactions.

Pour conclure, malgré les différences observées entre les échantillons A et E, les deux protocoles permettent d'obtenir des protéines de haut poids moléculaire et qui correspondent aux exigences du cahier des charges.

#### **3.4.5 Rendement d'extraction du collagène**

Le rendement d'extraction du collagène obtenu selon le protocole A est d'environ 8% et celui du protocole E est d'environ 11%. Le protocole E offre donc un rendement plus intéressant. Cependant, le protocole A montre tout de même un rendement proche de celui obtenu pour le lieu noir (8,9%) obtenu par Eysturskarð *et al.* (2009a). Il est donc comparable aux données obtenues dans la littérature pour le même procédé d'extraction. De la même manière, le protocole E obtient des résultats comparables à ceux obtenus pour la gélatine de morue (10,1%) et de saumon (11,3%) retrouvés dans l'étude d'Arnesen et Gildberg (2007), qui utilise une méthode d'extraction à l'eau chaude. Dans les deux cas, on obtient donc des rendements cohérents avec les résultats attendus pour chacun des procédés d'extraction utilisés.

Ainsi, le protocole E alternatif ne donne pas un rendement plus faible que le protocole A. Pour ce paramètre, le protocole alternatif ne montre pas de désavantage mais plutôt un avantage.

#### **3.4.6 Conclusion : choix du protocole à transposer à l'échelle industrielle**

Les résultats obtenus montrent que quel que soit le protocole utilisé, A ou E, les échantillons obtenus présentent les caractéristiques biochimiques suivantes: ce sont des collagènes de haut poids moléculaire (>300kDa), possédant les acides aminés caractéristiques (Gly, Pro et Hyp) de cette molécule et présentant un haut degré de pureté (> 80%).

Ainsi, le protocole alternatif E permet d'obtenir un produit présentant les caractéristiques recherchées du collagène, et ce, avec un rendement plus élevé que celui obtenu pour le protocole A. Il répond au cahier des charges défini en amont.

Il convient de souligner que la mise en œuvre d'un procédé d'extraction à l'eau à 45°C tel que le procédé E n'est possible que parce qu'un soin particulier a été apporté à la matière première pour limiter les dégradations sur le plan biochimique et microbiologique. En effet, aussitôt après transformation du poisson, les peaux sont envoyées vers un circuit spécifique où elles sont déulpées puis congelées. Habituellement, les co-produits utilisés pour l'extraction du collagène sont considérés comme des déchets dans la chaîne de transformation et leur conditionnement ne prend pas toujours en compte les risques de contamination car le protocole acide utilisé par la suite règle ces problèmes.

Le protocole E a donc été choisi pour être transposé à l'échelle pilote afin d'étudier sa faisabilité en vue d'une production industrielle, bien que ses limites soient connues, en comparaison avec le protocole A. En effet, la méthode de pré-traitement de la matière première ainsi que la température d'extraction, spécifiques de ce protocole, sont des conditions favorisant le développement bactérien, ce qui augmente le risque de dégradation du collagène. Ainsi, ce choix imposera de porter une attention particulière aux développements opérés au cours du changement d'échelle, plus particulièrement concernant les étapes les plus en amont du protocole, et celles les plus en aval. En effet, dès le début, la matière première doit être le moins contaminée possible pour freiner la croissance bactérienne au cours du protocole et, à l'issue du procédé, le produit obtenu, dont la charge microbienne est sensée être acceptable, ne doit pas être recontaminé.

Le protocole E réalisé en laboratoire a, par ailleurs, permis d'obtenir un prototype qui sera comparé aux échantillons obtenus au cours des études du changement d'échelle, afin de valider les différentes étapes du développement.

### **3.5 Transposition d'un protocole d'extraction de collagène de haut poids moléculaire à l'échelle pilote pour développer un procédé industrialisable**

Dans un premier temps, les trois premiers essais avaient pour objectif d'étudier le changement d'échelle, en vérifiant que les résultats obtenus étaient comparables à ceux observés en laboratoire. Les essais suivants ont permis l'optimisation du procédé, en jouant sur différents paramètres, afin d'établir un protocole final. Ces résultats ont fait l'objet d'une demande de brevet français en mars 2015 et de brevet international en mars 2016. L'ensemble des essais a été conduit par les partenaires industriels, sous la coordination de M. Vincent Gélamur. Chaque essai a été réalisé une seule fois, du fait de la disponibilité des installations.

L'analyse des produits obtenus après chaque essai, réalisée par le partenaire universitaire, a permis de valider et de guider les différentes étapes du travail de développement. Ainsi, l'étude s'est également penchée sur la mise au point d'un ensemble de méthodes analytiques de caractérisation du collagène. L'ensemble des caractéristiques du collagène obtenu est présenté sous la forme d'une publication scientifique pour soumission à la revue *Food Hydrocolloids*.

### 3.5.1 Étude du changement d'échelle

Au cours de ces essais, le protocole utilisé en laboratoire a d'abord été appliqué tel quel. Les modifications ont porté sur la quantité de matière première utilisée, augmentée d'un facteur 30, et sur les infrastructures et les équipements mobilisés, spécifiques d'essais pilotes. Pour évaluer la reproductibilité du protocole et valider son changement d'échelle, celui-ci a été réalisé trois fois : deux fois sur un même lot de matière première et une troisième fois sur un lot différent, afin de tester l'« effet lot ». Les profils chromatographiques et SDS-PAGE, la composition chimique, le profil en acides aminés et le rendement ont été étudiés et comparés au prototype obtenu en laboratoire. Un bilan matière de l'ensemble du protocole a également été réalisé, afin de mieux comprendre chacune des étapes du protocole. Enfin, ces essais ont abouti à l'identification des différents freins qui se présentaient pour optimiser le protocole à l'échelle industrielle, permettant ainsi de proposer des solutions à tester lors des essais d'optimisation.

#### 3.5.1.1 Composition chimique des échantillons

Les teneurs en protéines totales et en collagène des trois échantillons pilotes sont détaillées sur le Tableau 38. Les protéines dosées par la méthode de Kjeldahl montrent des valeurs supérieures à 80% avec 100% pour P1 et P2 et 93% pour P3. Pour le collagène, elles varient entre 67% pour P2 et 60% pour P3 (pas de résultats pour P1). Ces résultats confirment les teneurs obtenues pour le prototype (protéines: 84-100% ; collagène: 46-63%).

Tableau 38. Teneurs en protéines (Prot.), collagène (Coll.)\* des trois essais pilotes réalisés pour étudier le changement d'échelle.

	P1	P2	P3
Prot.	100%	100%	93%
Coll.	-	67%	60%

\* Hyp x 8, norme AFNOR (NF V04-415)

3.5.1.2 Profils en acides aminés

Sur le Tableau 39 les teneurs des trois acides aminés caractéristiques du collagène sont présentées pour les échantillons P1, P2 et P3. En comparaison avec les valeurs du prototype, la Glycine reste l'acide aminé le plus abondant avec 24,86% pour P1, 27,87% pour P2 et 26,87% pour P3. Le pourcentage en Hyp est de 8,20% pour P2 et 8,21% pour P3 (pas de résultats pour P1) tandis que le pourcentage de Pro est de 11,30% pour P1, 11,48% pour P2 et enfin, 11,19% pour P3. Là encore, les teneurs observées sont, comme pour le prototype, conformes au cahier des charges.

Tableau 39. Teneurs en Hyp, Pro et Gly des trois essais pilotes réalisés pour étudier le changement d'échelle.

Acides aminés (Rés. /100g Rés.)	P1	P2	P3
Hyp	-	8,20 (±2,46)	8,21 (±2,24)
Pro	11,30 (±1,69)	11,48 (±2,46)	11,19 (±2,24)
Gly	24,86 (±2,26)	27,87 (±2,46)	26,87 (±2,24)

3.5.1.3 Profils SEC-FPLC

Les profils SEC-FPLC obtenus pour les échantillons issus des trois premiers pilotes, nommés P1, P2 et P3, sont présentés sur la Figure 59. Comme ce qui a pu être observé pour le prototype obtenu en laboratoire, chacun des trois échantillons est élué en majorité au-dessus de 300kDa avec 64% pour P1, 68% pour P2 et 64% pour P3. La fraction supérieure à 600kDa représente 33% de P1, 32% de P2 et 34% de P3, quand elle représentait 34% du prototype. De plus, on retrouve les trois pics décrit sur le prototype: le premier avec un poids moléculaire supérieur à 600kDa, le deuxième estimé à 590kDa et le troisième autour de 150kDa.

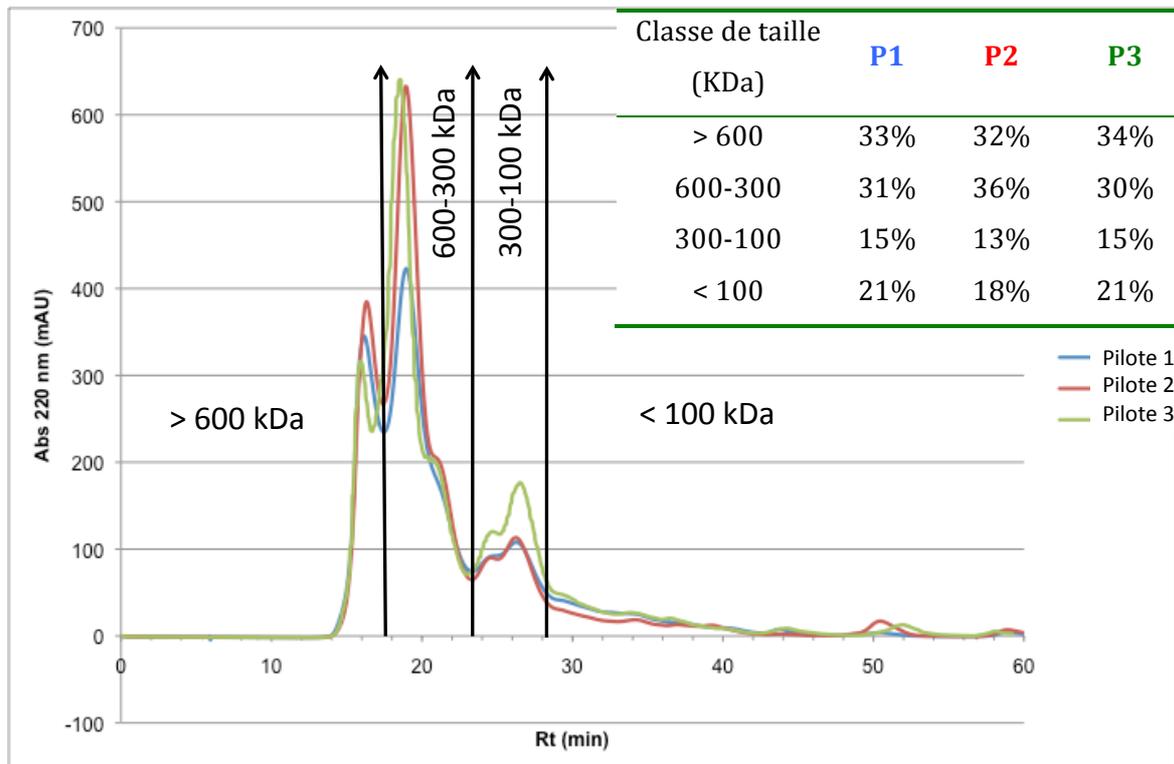


Figure 59. Éluion sur la colonne Superdex 200 des échantillons obtenus pour les essais pilotes 1 (courbe bleue), 2 (courbe rouge) et 3 (courbe verte) réalisés pour étudier le changement d'échelle.

#### 3.5.1.4 Profils SDS-PAGE

L'analyse en SDS-PAGE a été mise au point sur les échantillons issus de ces premiers essais pilotes. Les trois profils obtenus étaient comparables et l'un d'entre est présenté dans le Chapitre 2, Figure 68. Les résultats permettent de mieux comprendre la distribution des poids moléculaires des échantillons, et notamment pour ceux observés au-dessus de 300kDa. En effet, les trois profils SDS-PAGE confirment la présence de ces composés de haut poids moléculaire indiquant que ces structures ne résultent pas uniquement de phénomènes d'agrégations des molécules de collagène par des liaisons de faible énergie, mais bien par la présence de structure en triple hélice stabilisée par des liaisons covalentes, et ce pour les trois échantillons pilote. On remarque ainsi la présence de sous-unités  $\gamma$  d'environ 288kDa mais également de sous-unités  $\beta$  (231kDa) et  $\alpha$  (120kDa et 110kDa). Plus précisément, deux types de sous-unités  $\alpha$  sont présentes:  $\alpha_1$  (120kDa) et  $\alpha_2$  (110 kDa). La bande plus foncée correspondant à  $\alpha_1$ , signifie sa présence plus abondante par rapport à  $\alpha_2$ . Les résultats montrent donc l'extraction d'un collagène de type I (Gelse, 2003). De plus, cette analyse permet de donner des informations sur

le degré de pureté des échantillons obtenus. On remarque une intensité négligeable de bandes de petits poids moléculaires (<100 kDa) signifiant la faible présence de produits de dégradation et indiquant un haut degré de pureté du produit, que ce soit pour l'échantillon P1, P2 ou P3. Ainsi, si l'on revient aux teneurs en collagènes déjà décrites, ces observations indiquent que l'Hyp dosée ne provient pas d'une molécule hydrolysée.

La SEC-FPLC et le SDS-PAGE sont deux techniques complémentaires et indissociables, car elles sont basées sur des processus biochimiques différents : l'analyse en SEC-FPLC se fait en conditions non dénaturantes (solubilisation en tampon phosphate), contrairement à l'analyse en SDS-PAGE. Le couplage des deux techniques apporte des informations complémentaires et plus particulièrement concernant la présence de triple hélice. En effet, le collagène comme la gélatine présente des haut poids moléculaires en SEC-FPLC, (conditions non dénaturantes), mais c'est la présence de sous-unités  $\gamma$  en SDS-PAGE (conditions dénaturantes) qui confirme une structure en triplé hélice de la molécule et donc que l'échantillon est bien du collagène natif.

#### 3.5.1.5 Rendement

Les essais P1, P2 et P3 présentent des rendements d'extraction de 7,2%, 6,6% et 6,1%, respectivement (Tableau 40). Les rendements obtenus sont plus faibles que pour le prototype (11%). Cette différence peut s'expliquer par le fait que, bien que le protocole ait été réalisé suivant le même mode opératoire qu'en laboratoire, le changement d'échelle implique des équipements différents et par conséquent, plus difficilement manipulables du fait de leur taille (seaux, tamis...). Or, au cours des différentes étapes de lavage et de rinçage, on observe une perte de matière première, et notamment de morceaux de peaux qui restent coincés dans le tamis. Ainsi, il sera nécessaire, à l'avenir, d'adapter le matériel d'extraction afin de minimiser ces pertes de matière première et d'augmenter le rendement. Toutefois, les rendements observés pour les essais pilotes restent acceptable et ne remettent pas en cause la viabilité du protocole à l'échelle pilote.

Tableau 40. Rendement (Rdt) des trois essais pilotes réalisés pour étudier le changement d'échelle.

	P1	P2	P3
Rdt	7,2%	6,6%	6,1%

#### *3.5.1.6 Bilan matière*

Les analyses chimiques ont été réalisées sur des échantillons de l'essai P2 à chaque étape du procédé : à la fois sur le produit d'extraction (peaux broyées, peaux pré-traitées, produit final) ainsi que sur des échantillons d'eau collectés lors des étapes de lavage et rinçage. Elles ont permis d'établir le bilan matière du protocole à l'échelle pilote. Au cours de cet essai, 1,5 kg de peaux ont été traitées et le but a été d'évaluer l'importance et comprendre la nécessité de chaque étape du procédé : depuis les différentes étapes de pré-traitement de la matière première jusqu'à l'obtention du produit final (non lyophilisé).

Les résultats présentés sur la Figure 60 montrent l'importance de l'étape de lavage des peaux à l'eau salée. En effet, l'analyse chimique des eaux montre leur richesse en cendres et matière grasse. Cette première étape de lavage permet d'éliminer 83% de la matière grasse contenue dans les peaux. En revanche, on ne retrouve dans les eaux que des traces d'Hyp, de collagène et de protéines. C'est donc une étape primordiale qui permet de nettoyer la matière première, sans éliminer les protéines d'intérêt, et ce, dès la première étape de lavage/rinçage. Cependant, on retrouve dans la première eau de lavage 17% de protéines contenues initialement dans les peaux. Ce résultat s'explique par l'étape de traitement à l'eau salée dans l'élimination des protéines solubles non collagéniques.

Ces résultats démontrent qu'il faudra alors veiller au cours de l'optimisation du procédé à ne pas diminuer l'efficacité de ces étapes, au vu de l'impact que pourrait avoir la matière grasse sur le produit final (dégradation du collagène par le phénomène d'oxydation des lipides).

	Protéines	Hyp	Collagène	Matière grasse	Cendres
Peaux broyées	321,14 g	19,48 g	155,24 g	363,76 g	31,96 g
Eau lavage 1	55,44 g	<0,05%	<0,4%	323,4 g	2101,72 g
Eau rinçage 1	<0,5%	<0,05%	<0,4%	55,14 g	211,37 g
Eau lavage 2	<0,5%	<0,05%	<0,4%	<0,5%	2153,87g
Eau rinçage 2	<0,5%	<0,05%	<0,4%	<0,5%	172,56g

Figure 60. Bilan matière réalisé pour l'essai pilote 2 indiquant les quantités de protéines, Hyp, collagène matière grasse et cendres contenues dans les peaux broyées, les eaux de lavage et de rinçage, exprimées en g.

Ce travail a été nécessaire au travail d'optimisation du procédé car il permet de mieux comprendre les différentes étapes du protocole et notamment de souligner l'importance du lavage de la matière au sel pour éliminer la matière grasse.

### 3.5.1.7 Conclusion sur le changement d'échelle

Les résultats obtenus concernant l'étude du changement d'échelle pour les échantillons P1, P2 et P3 montrent, dans un premier temps, que les teneurs en protéines varient entre 93 et 100% et les teneurs en collagène entre 60 et 67%. Ensuite, l'étude de la composition en acides aminés caractéristiques du collagène révèle des teneurs comprises entre 8,20 et 8,21% pour l'Hyp, entre 11,19 et 11,48% pour la Pro et entre 24,86 et 27,87% pour la Gly. Enfin, les profils SEC-FPLC indiquent que 60% des protéines de chaque échantillon ont un poids moléculaire supérieur à 300kDa. Ces données sont comparables à celles retrouvées pour le prototype obtenu en laboratoire dans le sens où les trois échantillons répondent au cahier des charges défini.

Toutefois, les rendements obtenus pour ces essais pilotes, compris entre 6,1% et 7,2%, sont plus faibles que ceux retrouvés pour le prototype. Cela ne remet pas en cause la validité du protocole

à l'échelle pilote mais il faudra veiller, au cours des prochains essais, à toujours obtenir un rendement proche des ordres de grandeur déjà observés. Ainsi, les efforts doivent se poursuivre sur le développement d'un équipement adapté facilitant le transvasement de la matière première au cours des différentes étapes du protocole, et plus particulièrement lors du pré-traitement, afin de diminuer les pertes de matières.

Par ailleurs, une nouvelle méthode d'analyse des poids moléculaire a été développée sur ces échantillons: le SDS-PAGE. Contrairement à l'analyse en SEC-FPLC, c'est une méthode dénaturante et cette particularité permet d'obtenir des informations complémentaires sur la structure des protéines qui composent l'échantillon. Plus particulièrement, les profils SDS-PAGE ont permis d'identifier les sous-unités  $\gamma$ ,  $\beta$  et  $\alpha$  du collagène, permettant de conclure sur sa structure en triple hélice stabilisée par des liaisons covalentes. Cela confirme donc les résultats obtenus en SEC-FPLC qui concluaient sur une molécule de haut poids moléculaire.

La caractérisation du collagène issu de ces essais pilotes est détaillée et discuté dans le papier dont elle fait l'objet.

Ces différents résultats permettent de conclure, d'une part, sur le succès du changement d'échelle, et d'autre part, sur la reproductibilité du protocole. Le rapport d'échelle a été augmenté de 30 et le lot de matière première a été modifié que la qualité du collagène final ne soit affectée.

D'autre part, l'étude de ces essais par le bilan matière a permis de souligner l'importance de l'étape de pré-traitement des peaux dans l'élimination de la matière grasse qui, rappelons-le, est à l'origine des phénomènes d'oxydation des protéines. La première étape de lavage permet également d'éliminer une partie des protéines solubles, par le phénomène de précipitation par les sels, permettant ainsi d'augmenter la pureté en collagène du produit final. Cette technique est couramment utilisée dans la littérature (Kolodziejska et al. 2008; Shimizu et al. 2005; Wang *et al.*, 2014) et le NaCl peut être remplacé par d'autres types de sels comme le NaOH (Eysturskarð *et al.*, 2009a ; Liu *et al.*, 2014; Veeruraj *et al.*, 2015) ou le NaHCO<sub>3</sub> (Chen *et al.*, 2016), toujours dans le but d'éliminer les protéines autres que le collagène, mais également les pigments.

### 3.5.2 Identification des freins et leviers pour l'optimisation du protocole

L'étude de la reproductibilité du procédé à l'échelle pilote a permis d'identifier des étapes clés comme la délipidation de la matière première, mais également les étapes qui devront être optimisées, dans un souci de faisabilité industrielle, que ce soit du point de vue des déchets produits ou encore du matériel à utiliser. La Figure 61 montre les différents freins ainsi que les

leviers possibles pour un développement industriel du procédé. Pour mieux comprendre la démarche, le protocole a été défini par quatre étapes principales : (1) le traitement de la matière première (2) l'extraction du collagène, (3) la centrifugation du produit et enfin, l'étape (4), le séchage du produit. Pour chacune de ces grandes étapes, plusieurs freins ont été identifiés ainsi qu'une ou plusieurs solutions aux problèmes.

(1) Traitement de la matière première :

C'est une étape qui utilise beaucoup d'eau et de NaCl. Ces eaux chargées en sels, en matière grasse et autres impuretés devront être traitées en aval, entraînant des coûts supplémentaires. De plus, un brevet existe concernant l'extraction de collagène marin impliquant une étape de lavage des peaux au sel (Shimizu *et al.*, 2005), même si le risque vis à vis de ce brevet a été évalué comme « modéré ». Deux solutions sont alors envisagées : la diminution des quantités d'eau et NaCl ou bien remplacer cet étape par un nettoyage mécanique. D'autre part, l'utilisation de matériel adéquat est nécessaire afin de réaliser les bains successifs de lavage et rinçage de la matière première, en quantités industrielle. En effet, des seaux et tamis ont été utilisés à l'échelle pilote, ce qui n'est pas réalisable à une plus grande échelle. Ainsi, plusieurs équipements seront testés afin de choisir le plus approprié au procédé et aux quantités de peaux qui seront traitées.

(2) Extraction du collagène:

Encore une fois, c'est une étape qui nécessite de grandes quantités d'eau. Or le produit étant trop dilué à la sortie de l'extraction, l'eau sera dans tous les cas éliminée à la fin du procédé afin d'obtenir un produit sec, ou bien sous forme de gel. Ainsi, il serait judicieux de diminuer, dès cette étape, les quantités d'eau mises en jeu, rendant plus facile et rapide son élimination à la fin du procédé. D'autre part, l'extraction du collagène se fait à 45°C, et à cette température, le risque de développement de la flore bactérienne est important. Or, l'extraction d'un collagène natif de haut poids moléculaire à température modérée, à partir d'une matière première de très haute qualité est au cœur de du procédé. La température est donc un paramètre qui ne peut être modifié. Dans ce cas, le problème peut être réglé avant l'étape d'extraction, par une décontamination des peaux par un traitement acide/base, ou bien après l'extraction, par une méthode de stérilisation du produit (ionisation au rayonnement  $\gamma$ , filtration débactérisante, ajout de conservateurs). Ces traitements permettront d'augmenter la stabilité du produit final, d'autant plus s'il est commercialisé sous forme de gel.

(3) Centrifugation du produit:

Après extraction, l'étape de centrifugation est nécessaire pour purifier le produit. C'est une étape qui permet d'éliminer les peaux restantes et également les composés insolubles. C'est aussi une étape primordiale quant à l'aspect final du produit : après centrifugation, le produit est très clair et ne présente presque pas de résidus en suspension. Cependant, la centrifugation, méthode très

largement utilisée en laboratoire, est plus difficile à mettre en place à une échelle industrielle. Ainsi, il serait intéressant de la remplacer par des étapes de tamisage ou encore de filtration.

(4) Le séchage par lyophilisation:

La lyophilisation est un procédé très coûteux. Or, de nombreux ingrédients cosmétiques sont commercialisés sous forme sèche. L'avantage d'un ingrédient sous forme sèche est sa capacité de conservation plus longue que sous forme liquide ou de gel. Plusieurs méthodes de séchage ont donc été testées au cours des essais suivants.

L'autre solution est la commercialisation du collagène sous forme de gel. Dans ce cas, un conservateur doit être ajouté au produit afin d'augmenter sa durée de conservation.

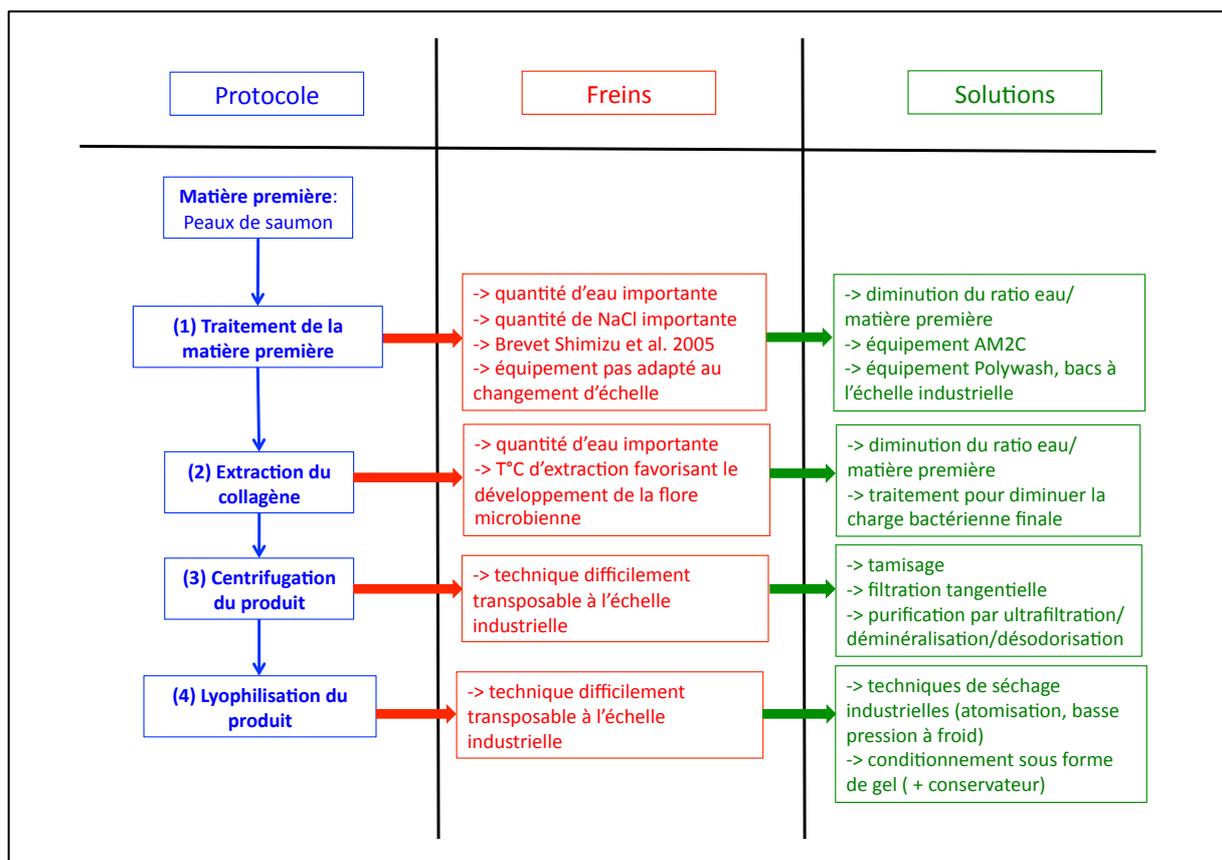


Figure 61. Freins et leviers identifiés au cours des étapes du procédé d'extraction du collagène afin de le transposer à l'échelle industrielle.

Les résultats qui suivent vont donc décrire de quelle manière le procédé d'extraction peut être optimisé et adapté à une échelle industrielle, sans impacter la nature du collagène obtenu et pour que celui-ci reste conforme au prototype défini. Là aussi, la caractérisation du collagène est primordiale pour comprendre l'impact du procédé sur le produit obtenu et valider les différentes étapes optimisées.

Comme évoqué dans la Figure 38, le protocole a été simplifié en quatre principales étapes à optimiser:

### **3.5.3 Optimisation du protocole**

Afin d'optimiser le protocole, différents paramètres ont été testés soit simultanément au cours d'un même essai ou individuellement sur des essais différents. L'ordre et le choix des facteurs testés ont été guidés par les résultats obtenus au fur et à mesure.

Tout d'abord, le travail d'optimisation a porté sur l'étude de l'effet de trois facteurs: la concentration en NaCl des eaux de lavage, les volumes d'eau utilisées au cours des étapes de lavage/rinçage, ainsi qu'au cours de l'étape d'extraction du collagène.

Le pilote suivant a porté sur des essais de tamisage pour purifier le mélange après extraction, ainsi que sur l'étude de deux techniques de séchage du produit final (atomisation et séchage basse pression à froid). Parallèlement, des protocoles d'ultrafiltration et des traitements désodorisants et blanchissant ont été réalisés par le sous-traitant Seprosys sur les échantillons liquides obtenus sur ce même essai.

Ensuite, un nouvel équipement, l'AM2C, a été testé. Un essai supplémentaire a été nécessaire pour optimiser son utilisation. Au cours de ce dernier, une partie de la matière première pré-traitée par le nouvel équipement a été utilisée pour réaliser des essais d'optimisation par le sous-traitant Procidys. De plus, la solution de collagène a été séchée par une méthode d'atomisation, qui a été réitérée au cours de l'essai suivant.

Les derniers essais ont porté sur l'optimisation du pré-traitement des peaux avec l'ajout d'étapes de lavages acide/base à faible molarité. Parallèlement, des additions de conservateurs ont été testées afin de diminuer la charge microbienne du collagène et améliorer sa stabilité. Quatre essais, dont le dernier du travail d'optimisation, ont permis de perfectionner les conditions de ces deux paramètres et d'aboutir à leur couplage. Ce dernier pilote, a également permis de tester deux nouvelles méthodes de séchage.

Les sections suivantes présentent une sélection de résultats choisis parmi l'ensemble des analyses réalisées sur les échantillons au cours des différents essais pilotes d'optimisation. Ils ont été sélectionnés suivant de l'importance qu'ils ont eue dans le choix des paramètres optimisés.

*3.5.3.1 Optimisation des quantités d'eau et de NaCl du protocole: diminution du rapport eaux de lavage/peaux, diminution du rapport eau d'extraction/peau et diminution de la molarité en NaCl à 0,12M*

Les profils SEC-FPLC et SDS-PAGE des différents collagènes obtenus (non détaillés ici) ne sont pas impactés par les modifications de ces paramètres. Les échantillons présentent entre 60 et 70% de protéines de poids moléculaire supérieur à 300kDa et on obtient, à chaque fois, un collagène de type I présentant des sous-unités  $\gamma$ ,  $\beta$  et  $\alpha$ . De même, les teneurs en protéines (90-100%) et en collagène ( $\approx$ 50% des protéines) ne sont pas influencées. Par conséquent, les quantités d'eau de lavage, de rinçage et d'extraction peuvent être diminuées à un ratio  $\frac{1}{2}$  (au lieu de  $\frac{1}{6}$ ) et une molarité en NaCl de 0,12M peut être utilisée sans impacter les qualités du collagène obtenu. Par ailleurs, les résultats sont comparables aux produits issus des trois premiers essais pilote, confirmant l'efficacité du changement d'échelle et sa reproductibilité.

En revanche, la diminution du rapport eau d'extraction/peau impacte la qualité visuelle du produit. En effet, la solution prend une couleur grise alors que le prototype de départ montre une couleur blanche. Cette coloration peut être due au fait que la force mécanique appliquée sur les peaux est plus forte : il y a moins d'eau, le contact des peaux avec la pâle agitatrice et entre les peaux est plus important, ce qui aurait pour effet d'extraire davantage de pigments. Si cette optimisation est adoptée, il faudra alors réfléchir à un traitement de la solution après extraction, afin de la décolorer. L'aspect final du produit est effectivement un élément essentiel pour la commercialisation du produit. Dans ce sens, plusieurs pistes ont été explorées pour résoudre ce problème. Tout d'abord, les traitements testés par SEPROSYS d'ultrafiltration/déminéralisation/désodorisation pourraient être appliqués sur la solution de collagène, après extraction. L'autre solution serait de diminuer la vitesse d'agitation au cours de l'extraction, afin de diminuer la force mécanique appliquée sur les peaux et éviter au maximum l'extraction de pigments et d'autres composés non collagéniques.

*3.5.3.2 Optimisation de la purification du collagène*

*3.5.3.2.1 Le tamisage*

Le tamisage n'a pas d'influence sur la structure du collagène obtenu qui présente des profils SEC-FPLC et SDS-PAGE comparables au prototype, de même que ses teneurs en protéines et collagène. De plus, le produit obtenu ne contient presque pas de résidus de peaux et reste clair. Le tamisage n'altère donc pas la qualité du collagène, par rapport à la centrifugation. Cette technique se présente donc comme une alternative intéressante à la centrifugation au niveau industriel.

3.5.3.2.2 Filtration/purification du collagène

La concentration sur membrane 50kDa à 45°C sur le collagène n’a pas eu d’impact sur le poids moléculaire du collagène, les profils SEC-FPLC et SDS-PAGE restent conformes à ceux du prototype. En revanche, cette technique a permis de concentrer le collagène obtenu, comme l’indiquent les résultats du Tableau 41. La méthode de concentration par filtration sur membrane a permis d’augmenter la teneur en protéine des échantillons : +44% de protéines pour la solution de collagène centrifugée et +56% pour la solution de collagène tamisée. Également, ce traitement a permis d’augmenter les teneurs en Hyp et collagène de l’échantillon: environ 40% d’Hyp et de collagène en plus pour l’échantillon tamisé et environ 24% d’Hyp et de collagène en plus pour l’échantillon centrifugé. Cependant, la teneur en résidu sec a augmentée et si l’on observe les teneurs en collagène au sein de chaque échantillon on remarque qu’elle est plus faible dans l’échantillons filtré sur membrane (62%) que sur l’échantillon centrifugé (73%) ou tamisé (70%). Le procédé entraîne donc une perte de collagène probablement provoquée par la rétention d’une partie de l’échantillon sur les membranes de filtration.

Par ailleurs, on remarque que la teneur en chlorures, après l’étape de concentration/filtration n’est plus qu’à l’état de traces, par rapport au 2 autres échantillons. Ainsi, le traitement permet de concentrer l’échantillon mais aussi de le purifier en éliminant une partie des sels.

Tableau 41. Comparaison de la composition chimique de collagènes issus des essais de filtration/purification.

	Solution de collagène après centrifugation	Solution de collagène après filtration sur tamis	Solution de collagène concentrée par filtration sur membrane (SEPROSYS)
Résidu sec (%)	2,33	2,13	3,36
Lipides (%)	<0,5	<0,5	<0,5
Protéines Kjeldahl (%)	2,7	2,5	3,9
Cendres (%)	<0,2	<0,2	<0,2
Chlorures (%)	0,08	0,08	<0,05
Hyp (%)	0,21	0,19	0,26
Collagène (%)	1,7	1,5	2,1

### 3.5.3.2.3 *Décantation du produit d'extraction*

Au cours du dernier essai pilote (P11), le mélange obtenu à l'issue de l'extraction a subi une décantation afin de purifier la solution de collagène. La solution obtenue est encore trouble et n'est pas complètement débarrassée des composés insolubles. Ce point sera donc à optimiser lors de prochains essais.

### 3.5.3.3 *Optimisation du pré-traitement de la matière première*

L'étape de pré-traitement de la matière première a deux objectifs : (1) retirer la couche de muscle riche en lipides présente sous la peau et (2) contrôler la charge microbienne de la matière première.

#### 3.5.3.3.1 *Utilisation d'un nouvel équipement: l'AM2C*

L'AM2C est un équipement qui a été testé au cours de l'étape de pré-traitement des peaux dans le but de remplacer le lavage des peaux à l'eau salée. En effet, bien que les quantités de NaCl mises en jeu puissent être diminuées (voir 4.3.1), il n'en reste pas moins nécessaire de traiter les eaux de rejet. L'AM2C est une séparatrice, désosseuse et dénervieuse qui permet un nettoyage mécanique des peaux et plus particulièrement de la matière grasse. Celle-ci est responsable de l'oxydation des protéines provoquant la dégradation du collagène et par conséquent l'obtention de protéines de plus petit poids moléculaire. Les premiers essais pilotes de cet équipement a consisté à l'utiliser sur 190kg de peaux, non dépulpées au préalable. Le produit obtenu a été analysé en chromatographie d'exclusion stérique (Figure 62), afin de vérifier que cette étape de nettoyage était assez efficace pour préserver la structure en triple hélice du collagène.

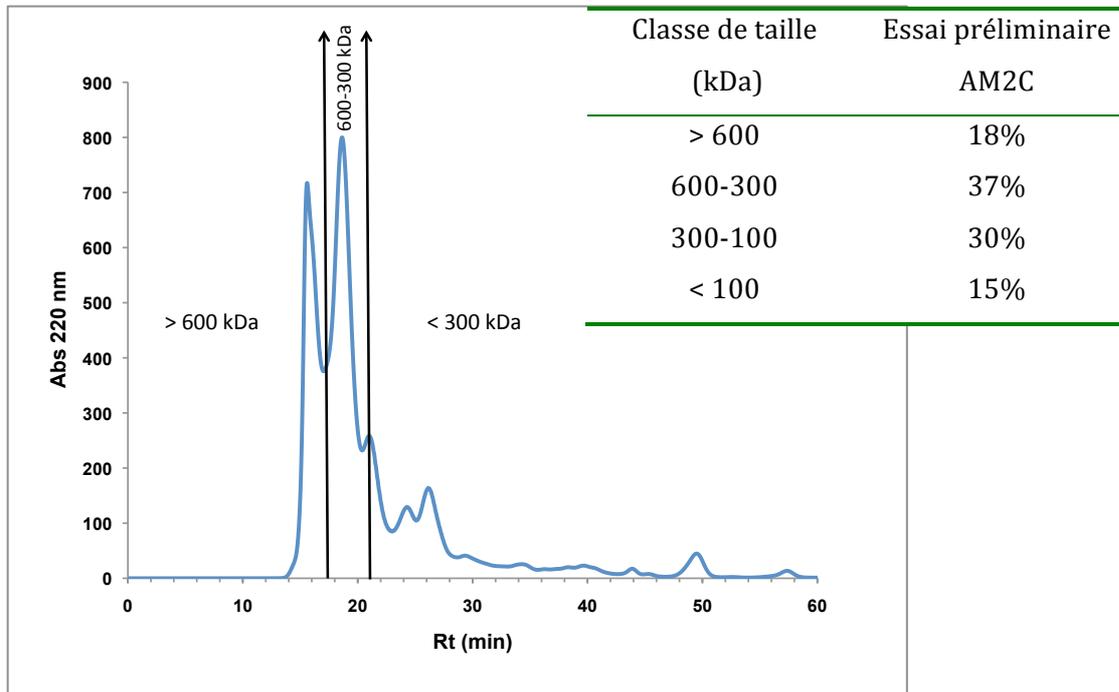


Figure 62. Éluion sur la colonne Superdex 200 de l'échantillon obtenu à l'issu de l'essai pilote au cours duquel a été testé l'équipement AM2C.

Le chromatogramme révèle un échantillon composé d'une majorité de molécules de poids moléculaire supérieur à 300kDa, 55% plus précisément avec 18% au-dessus de 600kDa. Ainsi, le traitement des peaux à l'AM2C a permis d'obtenir un collagène qui n'est pas dégradé et qui présente un haut poids moléculaire, conformément au prototype. L'équipement permet donc d'éliminer suffisamment de matière grasse sur la matière première pour éviter l'oxydation des protéines et la dégradation du collagène. Par ailleurs, il permet de ne récupérer que la peau à la sortie et la question qui se pose est donc de savoir si le dépulpage des peaux est toujours nécessaire lorsque l'AM2C est utilisée.

Ce questionnement a fait l'objet d'une étude d'optimisation de l'utilisation de l'AM2C. Pour cela, les compositions proximales de matières premières ayant subit différents traitements (pas de dépulpage et dépulpage suivant deux méthodes) avant d'être passées à l'AM2C ont été étudiées et comparées avec des peaux issues du lavage à l'eau salée. Les résultats montrent (Tableau 42) que les peaux traitées par un lavage à l'eau salée (essais pilotes P1, P2, P3) sont 25% plus riches en humidité que les peaux traitées à l'AM2C. Cela s'explique par le fait que les peaux, lors du lavage s'imbibent d'eau. Cela est d'ailleurs visible à l'œil nu, au cours du procédé, puisque les peaux occupent plus de volume. Concernant la composition des peaux, les peaux non dépulpées et uniquement traitées à l'AM2C sont 2 à 3 fois plus riches en lipides (14,88%) que les peaux

dépulpées avant l'AM2C (7,22% et 5,42%) ou lavées à l'eau (5,76%). Ces peaux sont donc moins riches en protéines et par conséquent moins riches également en Hyp et collagène.

Tableau 42. Analyse proximale des peaux issues de l'AM2C après avoir été dépulpées (ou non) de différentes manières.

Composition	Peaux non dépulpées +AM2C	Peaux dépulpées à la Baader + AM2C	Peaux dépulpées à la TRIO +AM2C	Pré-pilotes: Peaux dépulpées + lavage eau salée
Humidité	57,34 (calcul différentiel)	59,86 (calcul différentiel)	59,41 (calcul différentiel)	74 ±0,6
Résidus sec	42,66 ±1,0	40,14 ±1,0	40,59 ±1,0	26 (calcul différentiel)
Lipides (% poids sec)	14,88	7,22	5,42	5,76
Protéines (% poids sec)	80,87	86,95	93,37	93,08
Cendres (% poids sec)	10,55	12,95	10,10	10
Chlorures (% poids sec)	0,63	0,87	0,71	-
Hyp (% poids sec)	5,88	6,38	6,31	6,08
Collagène (% poids sec)	47,12	51,07	50,50	48,46

Malgré les différences observées au niveau de la composition lipidique des peaux non dépulpées et traitées à l'AM2C, l'analyse en chromatographie d'exclusion a montré que le procédé a permis d'obtenir un collagène qui n'est pas dégradé et qui présente un haut poids moléculaire, conformément au prototype. Un deuxième essai a été réalisé et a confirmé ce résultat. Il a également montré que la composition proximale de l'échantillon n'était pas négativement influencée par les différences de composition lipidiques des peaux traitées à l'AM2C: l'échantillon contenait 86% de protéines parmi lesquelles 56% de collagène, des données là aussi comparables au prototype.

Ces résultats ont permis de développer une nouvelle méthode de pré-traitement des peaux sans influencer la conformité du produit final obtenu par rapport au cahier des charges. L'utilisation de l'AM2C présente donc un avantage considérable. Elle permet un nettoyage des peaux sans utilisation d'eau salée, réglant ainsi le problème du traitement des déchets de lavage de la matière première et du risque lié au brevet existant (Shimizu et al., 2005). De plus, elle permet de s'affranchir de l'étape de dépulpage des peaux, qui était essentielle avant le lavage à l'eau salée et qui représente une étape supplémentaire dans le protocole. L'AM2C remplace en une

seule étape, ce qui en nécessitait deux, à savoir (1) le dépulpage et (2) le lavage/rinçage au NaCl. La substitution par le traitement à l'AM2C ajoute une innovation et une forte valeur ajoutée au procédé.

#### *3.5.3.3.2 Lavage des peaux par un traitement base/acide*

Les premiers essais d'optimisation du protocole ont mis en évidence la forte charge bactérienne du liquide collagénique issu des extractions. Or il est nécessaire d'obtenir un produit très peu contaminé, d'une part, pour que sa commercialisation soit autorisée sur le marché cosmétique ou médical, mais également pour assurer sa stabilité au cours du temps. Ainsi, différents essais en laboratoire ont été réalisés par le partenaire Procidys pour mettre au point un protocole de décontamination du produit sans affecter le poids moléculaire du collagène. Le partenaire a également veillé à l'obtention d'un produit clair et désodorisé, avec un bon rendement. Le procédé répondant à ces exigences (résultats non montrés ici) consiste en un lavage de la matière première par une solution basique, suivie d'une solution acide. La durée d'incubation des peaux et les concentrations en acide et base seront faibles pour éviter une pré-extraction du collagène par voie chimique.

Ces modifications du protocoles ont alors été testées sur un essai pilote au cours duquel 50kg peaux ont été traitées à la sortie de l'AM2C. Le traitement acide/base fait chuter la flore totale de la solution de collagène qui passe de 60 000 UFC/g à 20 000 000 UFC/g, grâce à la décontamination de la matière première. En revanche, le profil chromatographique du collagène obtenu (Figure 63) montre que 80% de l'échantillon est élué au-dessus de 300kDa, alors que seulement 20% est élué en dessous de 300kDa.

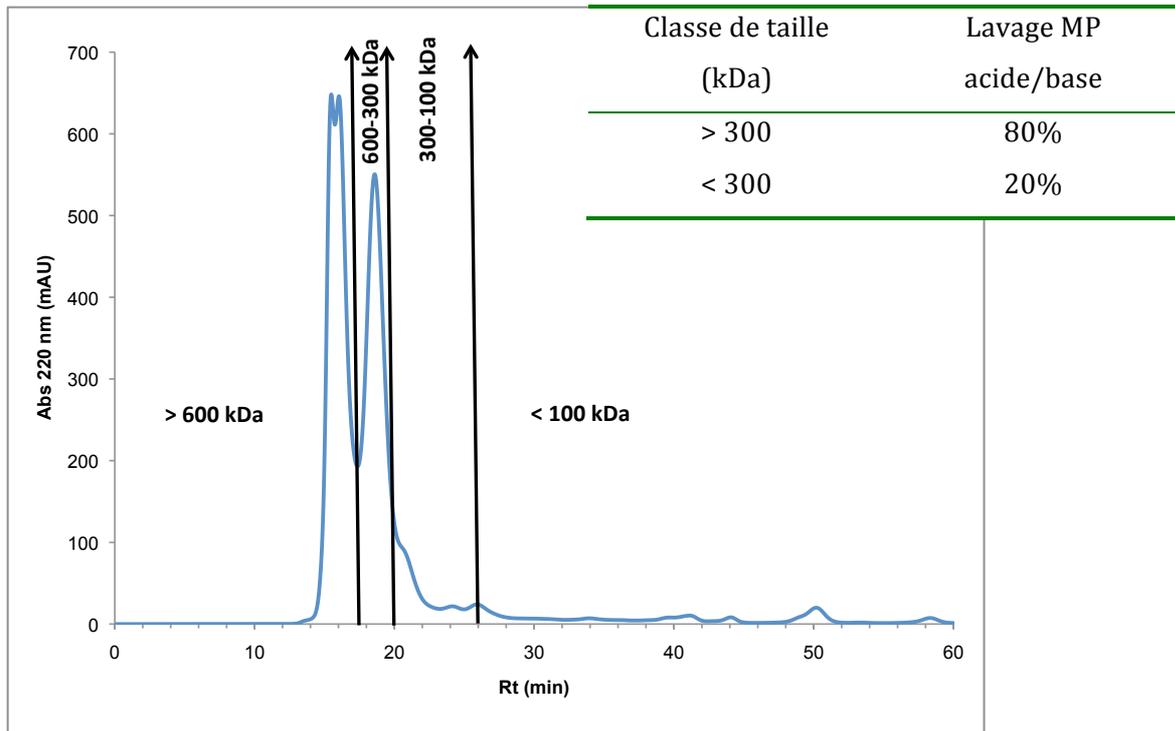


Figure 63. Éluion sur la colonne Superdex 200 de l'échantillon obtenu à l'issu de l'essai préliminaire de lavage de la matière première par la méthode acide/base.

Ces résultats sont plus proches de ceux obtenus après une extraction par l'acide, comme observé lors des essais préliminaires en laboratoire. Le lavage acide/base doit donc être optimisé en diminuant la molarité des solutions utilisées et plus particulièrement celle de la solution acide, afin de garder la spécificité du procédé.

Pour approfondir ces résultats, un autre essai a été réalisé et deux protocoles ont été testés afin d'être comparés:

- (1) un protocole avec une étape de lavage acide/base des peaux en utilisant les mêmes molarités que l'essai précédent ; échantillon (P+).
- (2) un protocole sans étape de lavage des peaux; échantillon (P-).

La Figure 64 résume les résultats obtenus. Les deux échantillons montrent une majorité de haut poids moléculaire supérieur à 300kDa mais dans des proportions différentes: 93% pour (P+) et 82% pour (P-). L'échantillon (P-) présente une proportion plus importante de poids moléculaires autour de 100 kDa, une caractéristique qui était spécifique du prototype obtenu en laboratoire. Ces observations sont confirmées par les profils SDS-PAGE: l'échantillon (P+) présente uniquement trois bandes bien distinctes correspondant aux sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  tandis que l'échantillon (P-) présente en plus des bandes intermédiaires, correspondant aux petits

poils moléculaires visibles en SEC-FPLC. Les résultats permettent donc de confirmer l'influence du pré-traitement acide/base. En effet, le collagène obtenu avec ce traitement possède des spécificités plus proches du collagène extrait par voie acide, que du collagène extrait par le procédé initialement développé et représenté par le prototype. Ainsi, il semble nécessaire d'optimiser les concentrations en acide mises en jeu lors de cette étape, afin de conserver l'identité du produit développé.

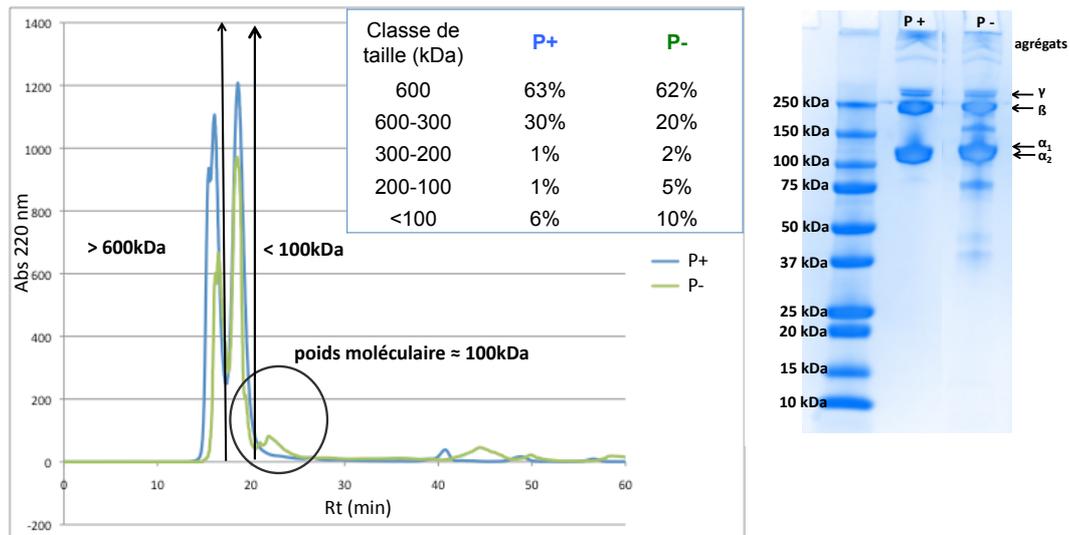


Figure 64. Éluion sur la colonne Superdex 200 et profils SDS-PAGE des échantillons de collagène issus de protocoles avec (P+) ou sans (P-) pré-traitement par lavage acide/base des peaux.

L'essai suivant, qui est également le dernier de la série des essais pilotes de l'étude (P11), a permis de tester une concentration plus faible de la solution acide. Le profil chromatographique obtenu (non montré ici) montre un collagène de haut poids moléculaire, conforme au cahier des charges. Également, la solution de collagène extraite présente des valeurs de charge microbienne <10 UFC/g démontrant l'efficacité du lavage acide/base, même à une molarité plus faible.

Afin de mieux comprendre l'influence du pré-traitement acide/base, les profils SDS-PAGE des différents collagènes obtenus au cours des essais pilotes ont été comparé (Figure 65). Les échantillons notés P9, P10 et P11 sont les trois protocoles avec une étape de pré-traitement acide/base de la matière première avec P9 et P10 présentant les molarités en acide les plus importantes et P11 le protocole optimisé. Les échantillons P1, P6, P6bis, P7, P8 et P10.1 sont issus d'essai sans étape de pré-traitement acide/base. On remarque que les échantillons P9 et P10 présentent des bandes distinctes de poids moléculaire supérieur à 75kDa tandis que le reste des échantillons possèdent, certes des bandes distinctes correspondant aux sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$

mais également des bandes intermédiaires entre  $\alpha$ , et  $\beta$ , spécifiques du protocole d'extraction à l'eau à température modérée (Kolodziejska *et al.*, 2008) et des bandes en-dessous de 75kDa, correspondant à des produits de dégradation. En terme de profil SDS-PAGE, l'échantillon P11 est comparable aux échantillons dont la matière première n'a pas subit de lavage acide/base.

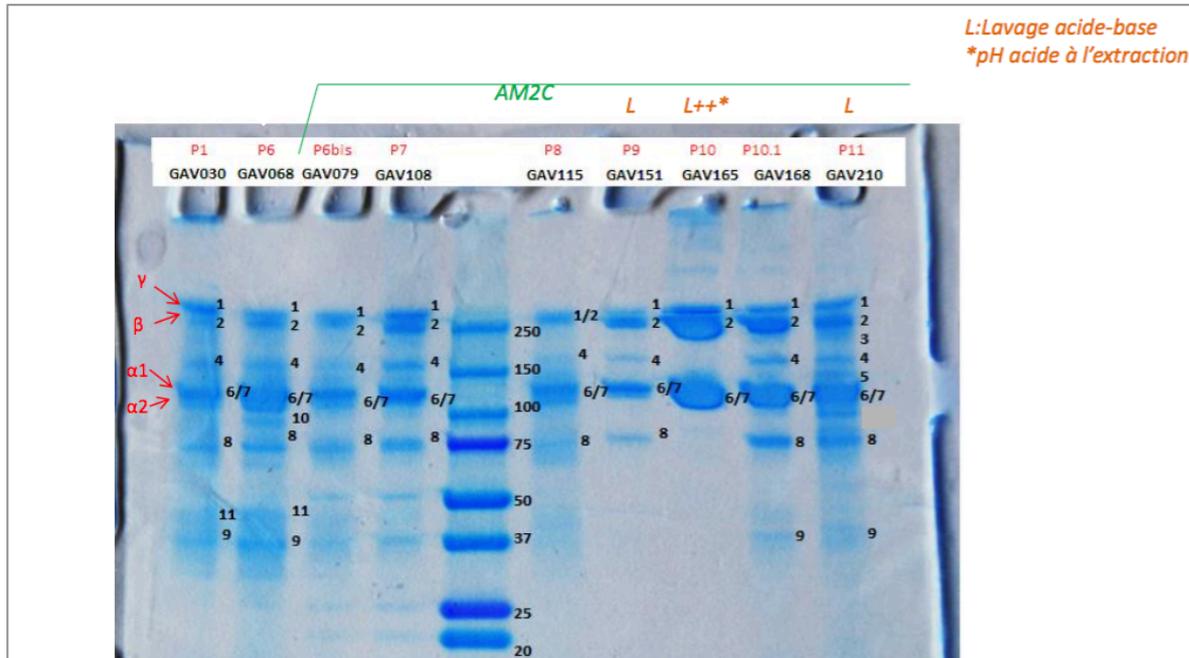


Figure 65. Comparaison des profils SDS-PAGE des collagènes obtenus au cours des différents essais pilotes.

Ces résultats démontrent le succès de l'optimisation de cette nouvelle étape dans le pré-traitement des peaux qui d'une part, permet de décontaminer le produit final et d'obtenir un collagène comparable à celui initialement développé et qui répond au cahier des charges.

### 3.5.3.4 Optimisation du conditionnement du produit

#### 3.5.3.4.1 Lyophilisation du collagène

Trois techniques de séchage différentes ont été testées sur les solutions de collagène issues de différents essais pilotes dans le but d'obtenir un produit final sous forme solide. Suivant la méthode utilisée, la solution de collagène a été soumise à des changements de pression ou de température afin d'être déshydratée. Le collagène possède une structure en triple hélice particulière et maintenue par des liaisons non covalentes. Des facteurs comme la chaleur ou la pression peuvent rompre ces liaisons et conduire à l'effondrement de la molécule, c'est le principe utilisé pour la fabrication de la gélatine. Afin de vérifier que les méthodes de séchage

utilisées ne modifient pas la structure en triple hélice du collagène extrait, les profils SEC-FPLC des échantillons ont été étudiés. Les premiers essais concernaient l'étude du séchage par atomisation, par le sous-traitant Innov'ia et du séchage à basse température sous vide, par le sous-traitant Inodry. Les échantillons obtenus ont été solubilisés à la concentration de 10g/L et comparés à la solution de collagène. Les résultats sont présentés sur la Figure 66.

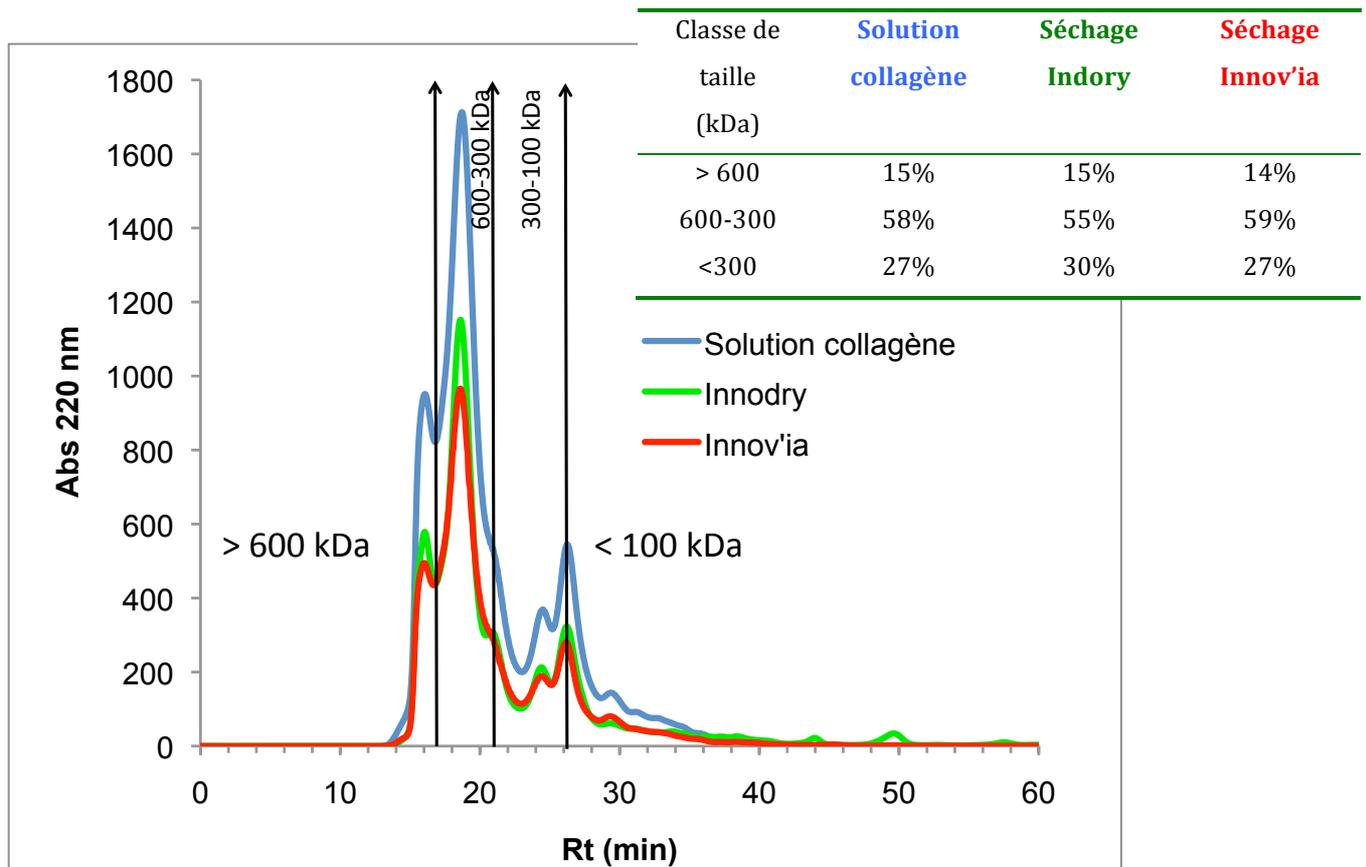


Figure 66. Élué sur la colonne Superdex 200 des échantillons obtenus avec les essais de séchage par les techniques Innodry (en vert) et Innov'ia (en rouge) et comparés à la solution de collagène d'origine (en bleu)

Les profils SEC-FPLC montrent une distribution des poids moléculaires comparables entre les trois échantillons, qui sont élués pour leur majorité au-dessus de 300kDa avec 73% pour la solution de collagène, 70% pour l'échantillon Innodry et 73% pour l'échantillon Innov'ia. Les deux procédés de séchage permettent donc de conserver la structure du haut poids moléculaire du collagène.

Les essais suivants ont porté sur l'étude d'un séchage par atomisation réalisé par un autre sous-traitant, Lesaffre, tandis que le dernier essai a porté sur la comparaison d'un séchage par atomisation utilisant la technologie Gatedryer (sous-traitant Tecoma) avec une lyophilisation à l'échelle industrielle (sous-traitant Lyophal). Les résultats obtenus en SEC-FPLC (non montrés

ici) montrent des profils superposés et la répartition des classes de taille des différents échantillons n'est pas modifiée. Ainsi, les observations pour ces différents essais rejoignent la première conclusion: les procédés de séchage n'ont pas d'influence sur la structure du collagène extrait.

Concernant l'aspect du produit final, le procédé qui se distingue est la lyophilisation. Le produit obtenu est solide et s'apparente à l'aspect du polystyrène, comme ce qui a pu être observé sur les échantillons issus des essais en laboratoire. Il prend la forme du contenant dans lequel il est congelé puis lyophilisé. Cependant, le produit final obtenu est hétérogène et présente des parties plus foncées que d'autre. Cela s'explique par l'étape de décantation testée au cours de cet essai, qui nécessite encore d'être optimisée. Concernant les autres procédés de séchage, ils permettent d'obtenir des poudres de couleur blanche.

Il sera donc possible de commercialiser le collagène sous forme de poudre ou solide (par lyophilisation) sans affecter la structure en triple hélice du collagène. Cette forme déshydratée présente l'avantage de bien se conserver sur le long terme, contrairement à un conditionnement sous forme de gel qui contiendrait alors de l'eau, ce qui facilite le développement bactérien. Cependant, la poudre est plus compliquée à utiliser car elle demande une étape supplémentaire de dilution, induisant un risque de perte du produit ou encore d'imprécision dans le protocole (biais entraîné par la pesée ou l'utilisateur). L'étude de marché déterminera sous quelle forme le produit sera commercialisé.

#### *3.5.3.4.2 Essais de conservateurs et étude de pré-stabilité*

L'étude du pré-traitement de la matière première par un lavage acide/base a permis de diminuer la charge microbienne du collagène obtenu mais les teneurs restent encore trop importantes pour autoriser une commercialisation du produit (20000 UFC/g). L'ajout d'un conservateur est nécessaire, d'une part, pour diminuer un peu plus la charge microbienne, mais également pour assurer la stabilité de l'échantillon au cours du temps.

La première partie du travail consistait à sélectionner un conservateur et sa concentration adéquate. Les résultats de ces essais de conservateurs sont présentés dans la Tableau 43. La diminution de la flore totale la plus importante a été observée à J15 avec le benzoate de sodium à 0,2%. Ce conservateur permet de diviser par 4 la flore totale en l'espace de 15 jours. Celle-ci passe de plus de 20.000.000UFC/g à 4.400.000UFC/g, tandis que cette valeur est de 9.700.000 pour une concentration de benzoate de sodium de 0,5%. En revanche, au même temps de prélèvement l'utilisation du conservateur Iscaguard® donne une flore totale identique à celle observée pour T0, et cela, quelle que soit la concentration utilisée. Quant à l'utilisation du sorbate de potassium, une diminution de la flore totale de l'échantillon est observée à J15 pour

la concentration de 0,5%, mais la valeur reste supérieure à celle obtenue pour le benzoate de Sodium. Par ailleurs, le benzoate de sodium à 0,2%, mélangé au sorbate de potassium à 0,2% n'a pas d'effet non plus sur la flore totale du collagène qui reste supérieure à 20.000.000UFC/g à J15. Ainsi, le sorbate de potassium et le benzoate de sodium sont les deux conservateurs qui permettent d'obtenir les charges les plus faibles. Contrairement aux deux autres conservateurs testés (Iscaguard®+SAP et Iscaguard®PEG), le sorbate de potassium est le sel de potassium de l'acide sorbique tandis que le benzoate de sodium est le sel de sodium de l'acide benzoïque. Par conséquent, ils possèdent un double effet antimicrobien, d'une part, parce qu'ils provoquent une acidification du milieu et, d'autre part, par l'activité spécifique de l'acide. Leur mode de fonctionnement pourrait donc expliquer pourquoi ils diminuent plus fortement la charge microbienne. Par ailleurs, ils sont déjà utilisés dans d'autres collagènes liquides (Fagon, com. pers.) et, plus largement, leur usage est très répandu dans les ingrédients cosmétiques (Lores *et al.*, 2016).

Le choix s'est donc porté sur le benzoate de sodium seul, à 0,2% car son incorporation permet d'obtenir la charge la plus faible et il sera utilisé dans le procédé final.

Tableau 43. Comparaison des flores totales obtenues sur les échantillons de collagène avec l'ajout de différents conservateurs (sorbate de potassium, benzoate de sodium, Iscaguard®+SAP et Iscaguard®PEG).

	Code formule	flore totale (en UFC/g)		
		t0	t7j	t15j
collagène	GAV 115	>20 000 000	15 000 000	13 000 000
sorbate de potassium 0,5%	COLSOR 0.5	/	>20 000 000	7 900 000
sorbate de potassium 0,2%	COLSOR 0.2	/	14 000 000	>20 000 000
benzoate de sodium 0,5%	COLBEN 0.5	/	9 200 000	9 700 000
benzoate de sodium 0,2%	COLBEN 0.2	/	17 000 000	4 400 000
sorbate de potassium 0,2% + benzoate de sodium 0,2%	COLMIX 0.2	/	13 000 000	>20 000 000
ISCAGUARD SAP 0,3%	COLSAP 0,3	/	19 000 000	>20 000 000
ISCAGUARD PEG 0,5%	COLPEG 0.5	/	15 000 000	>20 000 000
ISCAGUARD PEG 0,2%	COLPEG 0.2	/	> 20 000 000	>20 000 000

Malgré la diminution de la flore totale de l'échantillon, les valeurs restent encore trop élevées pour une commercialisation du produit. Par ailleurs, le même constat a été établi concernant les résultats des essais concernant le pré-traitement acides/base des peaux. Dans ce sens, la deuxième partie du travail a consisté à étudier l'influence de la combinaison de ces deux facteurs sur la flore totale du collagène. Le benzoate de sodium a donc été ajouté à une concentration de 0,2% à deux solutions de collagène issues d'essai où un protocole d'extraction avec pré-traitement acide/base des peaux et un autre protocole sans pré-traitement acide/base des peaux ont été réalisés. Les résultats sont présentés sur le Tableau 44.

Tableau 44. Évolution de la charge microbienne au cours des essais de couplage pré-traitement matière première/conservateur.

	DGAT (UFC/g)	DMLT (UFC/g)
Lavage MP acide/base	< 10	< 10
Pas de lavage MP acide/base	> 300 000	> 15 000

Tandis que la solution de collagène issue du protocole sans pré-traitement montre une charge microbienne supérieure à 300.000 UFC/g pour le DGAT et supérieure à 15.000 pour le DMLT, l'échantillon issu du protocole avec pré-traitement montre pour les chacune des deux analyses

un valeur inférieure à 10 UFC/g. Le pré-traitement des peaux permet donc de diminuer par 30.000 la charge microbienne de l'échantillon déjà traité avec le conservateur. Ces résultats montrent donc la nécessité de combiner dans le protocole le pré-traitement acide/base des peaux à l'ajout de conservateur dans la solution de collagène finale.

Par ailleurs, une étude de pré-stabilité a été réalisée sur l'échantillon le moins contaminé, à savoir, celui ayant subi à la fois un pré-traitement acide/base de la matière première et un ajout de conservateur, pour observer l'évolution de la charge microbienne au cours du temps. Les résultats sont présentés sur le Tableau 45.

Tableau 45. Évolution de la charge microbienne au cours de l'étude de pré-stabilité du collagène.

	T0	T 7 jours	T 1 mois	T 3 mois
DGAT (UFC/g)	< 10	< 2000	< 2000	< 2000
DMLT (UFC/g)	<10	< 10	< 10	< 10

Ils montrent que la charge microbienne pour la mesure de DGAT augmente à T=7jours pour passer d'une valeur inférieure à 10 UFC/g à une valeur inférieure à 2000 UFC/g. Cependant, celle-ci reste constante jusqu'à la fin de l'étude à T=3mois. En revanche, la valeur de DMLT reste inférieure à 10 UFC/g tout au long de l'étude. Ces résultats s'expliquent par le fait que les microorganismes risquent de dénaturer la structure native du collagène. En leur absence, la molécule est conservée.

Ainsi, l'ajout d'un conservateur combiné à un pré-traitement acide/base permet non seulement de diminuer la charge microbienne de la solution de collagène obtenue, mais également de maintenir pendant 3 mois une charge microbienne rendant possible la commercialisation du produit.

## 4. CONCLUSION

Cette étude décrit le développement d'un produit, de la paillasse jusqu'à la production industrielle en passant par les étapes d'optimisation du procédé en phase pilote. L'objectif de départ a été atteint : un procédé d'extraction d'un collagène de haut poids moléculaire issu de peaux de saumon a été développé. Le succès et l'innovation du procédé tiennent dans la combinaison d'une matière première de haute qualité et d'un protocole d'extraction en conditions ménagées offrant une alternative aux protocoles d'extraction par voie acide couramment utilisés, permettant l'obtention d'un produit possédant les caractéristiques nécessaires à des applications dans les domaines de la cosmétique ou de biomédicale.

### ***Optimisation du procédé***

L'optimisation du procédé s'est principalement focalisée sur deux étapes du protocole: (1) le pré-traitement de la matière première et (2) le conditionnement du produit. Concernant le premier point, la teneur élevée en lipide des peaux présentait un risque majeur de dégradation des protéines, ce qui a nécessité d'une étape de pré-traitement pour éliminer efficacement la matière grasse. L'équipement AM2C testé et optimisé au cours des essais pilotes a permis de régler ce problème, tout en évitant l'utilisation de quantités d'eau et de réactifs à traiter par la suite, comme ce qui était nécessaire dans le protocole initial. De plus, cet équipement a permis de remplacer deux étapes (1) le dépulpage et (2) le lavage à l'eau salée par une seule, simplifiant ainsi le protocole. La charge microbienne élevée du produit final a nécessité une étape de pré-traitement des peaux par un lavage acide/base, dont les concentrations en réactifs restent encore à optimiser et l'ajout d'un conservateur. Celui-ci joue un rôle non seulement dans la décontamination du produit, combiné avec le pré-traitement acide/base, mais également sur la stabilité et la conservation du produit. Par ailleurs, afin de maintenir dans le temps la charge microbienne observée sur le collagène à l'issue du procédé d'extraction, différents conservateurs ont été testés et c'est le benzoate de sodium qui a été sélectionné.

D'autre part, le séchage a fait l'objet de plusieurs essais. Globalement, cette étape finale n'influence pas les caractéristiques du produit final mais c'est une étape du protocole qui nécessite encore d'être finalisée, notamment dans le choix du prestataire final.

### ***Développement des méthodes analytiques du collagène***

La caractérisation du collagène est indispensable pour s'assurer que le protocole utilisé permet d'obtenir un collagène qui répond au cahier des charges et de s'assurer qu'il n'y aura pas

de dérive du process dans le temps. Le développement de méthodes analytiques, en parallèle de l'optimisation du procédé, s'est révélé essentiel pour comprendre l'impact des différentes étapes du procédé sur le produit final. Ainsi, des outils indispensables au contrôle qualité et à de la production industrielle du collagène de saumon, ont été développés. C'est notamment le cas de la chromatographie d'exclusion stérique, couplée au SDS-PAGE. Ces méthodes ont également fait l'objet d'un transfert de compétence vers les industriels afin d'assurer leur autonomie à l'issue du projet. A titre d'exemple, les partenaires du projet ont déjà pu mettre au point un nouveau protocole d'analyse en chromatographie d'exclusion stérique utilisant une colonne dont domaine de fractionnement est plus élevé (1.500.000 Da à 15.000 Da), ce qui permettra d'élargir la qualification du collagène obtenu dans la gamme des poids moléculaires supérieurs à 600kDa.

D'autre part, il est indispensable de caractériser finement le collagène en vue de son application. En effet, en fonction de sa structure ou de sa composition, le collagène n'aura pas le même comportement au sein d'une formulation cosmétique ou en tant que matrice dans des biomatériaux. Cela permettra de fournir des informations précises aux clients, notamment sur les plaquettes commerciales.

#### ***Perspectives d'optimisation du procédé***

Bien que l'optimisation du procédé pour obtenir un collagène répondant au cahier des charges soit un succès, un travail de recherche et de développement reste encore à faire sur le devenir des « co-produits de co-produits », c'est-à-dire les déchets issus du procédé comme la partie liquide issue de l'AM2C ou encore les résidus de peaux non solubilisés à la sortie de l'extraction. Concernant les déchets liés à l'utilisation de l'AM2C, ils sont très riches en matière grasse et en pulpe. On peut imaginer les utiliser pour la production d'extraits et de concentrés aromatiques ou encore d'huiles. À propos des résidus de peaux non solubles, qui contiennent toujours de l'Hyp et du collagène comme l'a montré le bilan matière réalisé lors des essais pré-pilotes, il serait intéressant de réaliser une deuxième extraction, mais à la pepsine. En effet, au cours de l'extraction à l'eau à température modérée, un collagène proche du collagène acido-soluble a été obtenu. Or, le collagène insoluble restant dans la peau peut être extrait sous l'action de la pepsine qui est capable de cliver les télopeptides. Un procédé inspiré de l'étude de Jongjareonrak et al. (2005) pourrait être utilisé.

*Un procédé industriel d'extraction de collagène a été mis au point, permettant l'obtention d'un produit conforme aux exigences du cahier des charges défini en amont. Ce travail de développement fait l'objet d'une demande de brevet (nationale et internationale) et le collagène obtenu sera commercialisé sous le nom de PeskCollagène 3D Pro®. Le chapitre qui suit décrit ses caractéristiques, sous la forme d'une publication scientifique.*

## Chapitre 2:

# Characterization of a new commercial preparation of marine collagen (PeskCollagen 3D Pro®) from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin

**Margot Provost<sup>1</sup>, Klervi Le Lann<sup>1</sup>, Philippe Roquefort<sup>2</sup>, Thierry Aubry<sup>2</sup>, Fabienne Guérard<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> University of Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR UMR 6539, IUEM, Technopôle Brest-Iroise, rue Dumont d'Urville 29280, Plouzané, France

<sup>2</sup> Université de Bretagne Occidentale, FRE CNRS 3744, IRDL, F-29200 Brest, France

### **Résumé:**

*La préparation commerciale de collagène marin PeskCollagène 3D Pro® a été caractérisée par des méthodes analytiques à l'interface entre plusieurs disciplines comme la biochimie, la rhéologie ou encore la microscopie. C'est un collagène de type I qui possède une composition en acides aminés caractéristique des collagènes marins issus d'espèces d'eau froide avec 8,20% d'Hyp, 11,48% de Pro et 27,87% de Glycine. Cependant, il montre un haut poids moléculaire supérieur à 300kDa et comparable à celui de collagènes de mammifères, et confirmé par l'ensemble des résultats obtenus par les différentes méthodes : SDS-PAGE, chromatographie d'exclusion stérique et FTIR. La caractérisation rhéologique a souligné des températures de fusion ( $T_m=13,5^{\circ}\text{C}$ ) et de gélification ( $T_{gel}=5^{\circ}\text{C}$ ) plus faible que celles mesurées pour les collagènes de mammifères, du fait de la teneur plus faible en acides iminés. Les observations en microscopie du produit PeskCollagène 3D Pro® sous forme d'éponge révèlent une structure très poreuse combinée à des tailles de pores optimales supérieures à 100 $\mu\text{m}$ , offrant un potentiel d'application en ingénierie tissulaire et en médecine régénérative. La préparation commerciale PeskCollagène 3D Pro® répond aux besoins du marché du fait de son haut poids moléculaire, mais sans les contraintes sanitaires et religieuses associées.*

## 1. INTRODUCTION

Collagen is one of the most abundant proteins in the animal kingdom. The name “collagen” is used as a generic term for proteins forming a right-handed triple superhelical structure consisting of three similarly sized left-handed helical polypeptide chains  $\alpha$  with a Gly-X-Y repeating unit, in which the X and Y positions are often occupied by the imino acids: proline (Pro) and hydroxyproline (Hyp), respectively (Gelse, 2003). Collagen and gelatin are different forms of the same macromolecule, however, gelatin is obtained from the partial hydrolysis of native collagen. The conversion rate of collagen into gelatin depends on processing parameters such as temperature, time and pH (Kołodziejska *et al.*, 2008).

The main sources of industrial collagen are those from pig skin, bovine hide, and pork and cattle bones. However, mammalian gelatins (porcine and bovine), being the most popular and widely used, are subject to major constraints and skepticism among consumers due to socio-cultural and health-related concerns (Gómez-Guillén *et al.*, 2011). As a partial alternative to mammalian collagen and gelatin, many recent studies have examined the properties of collagen and gelatin from fish skin and bones (Nalinanon *et al.* 2011; Li *et al.* 2013; Duan *et al.* 2009; Chandra *et al.* 2013; Wang *et al.* 2014; Shyni *et al.* 2014), scales (Pati *et al.* , 2010; Thuy *et al.*, 2014 ; Chen *et al.*, 2016), swim bladders (Chandra and Shamasundar, 2015; Sinthusamran *et al.*, 2013), and marine invertebrates such as squid (Alemán *et al.*, 2013), echinoderms (Sugni *et al.*, 2013) and sponge (Pallela *et al.*, 2011).

Collagen shows a typical amino acid composition characterized by its high content of glycine and imino acids (Pro and Hyp). Cold-water fish collagen, like salmon collagen, has a lower content of imino acids than mammalian collagen. The denaturation temperatures (Td) of collagen from cold-water fishes are lower than those of warm-water fishes due to a lower content of imino acids (Pro and Hyp) compared to those of temperate and warm-water fish (Guérard, 2007). Indeed, it is well established that imino acid content is correlated with gelling and melting temperatures due to the rigidity provided by R groups.

The intrinsic biological and physicochemical features of collagen and gelatin make them useful in various fields. Traditionally, collagen and gelatin are used for food, cosmetic and pharmaceutical applications mainly based on their gel-forming properties. Recently, an increasing number of new applications have been found in the food industry such as techno-functional ingredients, biodegradable film-forming materials and micro-encapsulating agents, due to the growing interest for more natural ingredients to replace synthetic ones (Ferraro *et al.*, 2010). As an example, biodegradable gelatin based films exhibiting antimicrobial properties were obtained by the incorporation of cinnamon essential oil nanoliposomes (Wu *et al.*, 2015). Furthermore, several studies

have dealt with the enzymatic hydrolysis of collagen or gelatin for the production of peptides exhibiting biological activities, such as ACE-inhibitory peptides (Alemán *et al.*, 2013), neuroprotective effects (Pei *et al.*, 2010), and anti-fatigue and anti-oxidation activity (Ding *et al.*, 2011). In addition, the biocompatibility, biodegradability, low immunogenicity and cell-adhesive properties of collagen and gelatin are also suitable for biomedical applications and offer a great promise as biomimetic scaffolds for regenerative medicine (Abou Neel *et al.*, 2013 ; Clarke *et al.*, 2011 ; Fernandes-Silva *et al.*, 2013 ; Ferreira *et al.*, 2012 ; Yamada *et al.*, 2014).

Most of the commercial preparations of marine collagen are hydrolyzed collagens, a form of collagen used as an ingredient in gelatin, medicine capsules and other foods. However, high molecular weight collagens showing a well preserved triple superhelical structure may have many advantageous features for tissue engineering used in regeneration of tissues and organs.

Nowadays, the rising interest in giving a good use of by-products generated by fish filleting industry explains why exploring different species and optimizing the extracting conditions of collagen and gelatin has attracted the attention of researchers in the last decade (Gómez-Guillén *et al.*, 2011). According to FAO (2014), fish wastes and by-products represent around 50 % of the whole fish. In theory, these fish by-products are potential sources of valuable ingredients and bioactive molecules but actually, only a small portion will provide ingredients with high added value. Most by-products and fish wastes are reduced to fishmeal and fish oil. Today, according to the targeted application, the demand market requires more or less reliable sources of collagen and gelatin supply. In the particular case of by-products from farmed salmon, the skin would provide a secure source of marine collagen with the advantage of being traceable and renewable.

In this study, the commercial preparation PeskCollagène 3D Pro® from salmon (*Salmo salar*) skin (SC) was characterized using biochemical, structural and rheological investigation techniques. The study could help for better utilization of skin from salmon processing, resulting in the production of a high molecular weight collagen. Besides, this collagen from marine origin might meet the needs of markets that are not amenable to beef or porcine collagens.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Materials**

Collagen from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin (PeskCollagen 3D Pro®) named SC was provided by PESK&CO consortium (29000, Quimper, FRANCE). Two commercial collagens were used for comparison: a collagen from calf skin named CC (freeze-dried, Bioreagent, Sigma-Aldrich) and a

collagen solution from bovine skin named BC (Bioreagent, Sigma-Aldrich).

## **2.2 Methods**

All experiments were replicated three times. The results were presented with mean and standard deviation.

### **2.2.1 Proximate analysis**

Proximate analyses were carried out by InVivo Labs company (56250 Saint-Nolff, France). Ash and moisture contents were determined according to NF V04-401 (04/2001) ; fat and total nitrogen contents were determined according to CE 152/2009 regulation (27/01/2009). Hyp content was determined using a colorimetric method and collagen content was deduced from Hyp content using the conversion factor of 8, according to NF V04-415 (10/2002).

### **2.2.2 Amino acid analysis**

Amino acid analysis was carried out by InVivo Labs company (56250 Saint-Nolff, France) according to CE 152/2009 regulation (27/01/2009).

### **2.2.3 Molecular weight distribution**

#### *2.2.3.1 Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis gel*

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to the method of Laemmli (1970). Briefly, freeze-dried collagen sample was suspended in Milli-Q water to 1.5 mg.mL<sup>-1</sup> and supplemented by Laemmli Sample Buffer (1:1) containing 65.8 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.1% SDS, 26.3% (w/v) glycerol and 0.01% bromophenol blue (Bio-Rad Laboratories) in the presence and absence of 2.6% β-mercaptoethanol. 15μL of sample solution and 10μL of molecular markers ranging from 10 to 250kDa (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad Laboratories) were applied to sample wells 4-20% polyacrylamide precast gels (Mini-PROTEAN® TGX™, Bio-Rad Laboratories) and run with Tris-Gly-SDS buffer (pH=8,3) containing 25mM Tris, 192 mM glycine and 0,1% SDS using the Mini Protean®Tetra System (Bio-Rad Laboratories). Sample resolution was performed at a constant 150V for 1h. Gels were stained with 50 mL of Coomassie blue (Bio-Rad Laboratories) and then destained with Milli-Q water. Protein bands were detected with Gel Doc™ EZ Imager and data was analysed by Image Lab 4.0.1. (Bio-Rad Laboratories).

#### *2.2.3.2 Size exclusion fast protein liquid chromatography*

The SEC-FPLC analysis was performed according to the procedure adapted from GE Healthcare

Instructions 71-5017-96 AG. Chromatographic separation was performed on a Dionex system (Thermo Fisher Scientific) consisting of a P680 HPLC pump, an ASI-100 Automated Sample Injector and a Dionex UVD170U detector. Separation was carried out on a FPLC Superdex 200 10/300 GL column (10 x 300-310 mm) composed of a cross-linked agarose and dextran composite matrix with a 600-10kDa optimum separation range (GE Healthcare Bio-Sciences), at room temperature. The mobile phase consisted of phosphate buffer 0,05 M (pH=7) containing 0,15M NaCl. The sample was diluted at a concentration of 10mg/mL in mobile phase. Separation was carried out under a flow rate of 0.5 mL.min<sup>-1</sup> and the injection volume was 40 µL. UV detection was carried out at 220 nm. Molecular weight of the salmon collagen was calculated and compared with distributions of the standard compounds: thyroglobulin (MW=669kDa), apoferritin (MW=443kDa), β-amylase (MW=200kDa), alcohol dehydrogenase (MW=150kDa), albumin bovine serum (MW = 66kDa), carbonic anhydrase (MW=29kDa) and cytochrome C (MW=12.4kDa) (Gel filtration markers kit for protein molecular weights from Sigma-Aldrich). Data were analyzed with the software Chromeleon 6.6 (ThermoFisher Scientific).

#### **2.2.4 Sol-gel and gel-sol transition temperature characterization**

Linear viscoelastic measurements are classically used to determine the gelling and melting temperatures in gelling systems (Gilsenan and Ross-Murphy, 2000). Prior to rheological tests, dry collagen was dissolved at 20°C, and collagen solutions at a fixed concentration of 20 mg.mL<sup>-1</sup> were prepared. In order to characterize the sol-gel and gel-sol transition, linear viscoelastic properties of salmon collagen solution as a function of temperature were studied in oscillatory simple shear with a rheometer ARES (TA Instruments), equipped with a cone and plate geometry (cone angle: 0.04 rad, diameter: 50 mm, gap: 48 µm). More precisely, during cooling from 20°C to 2°C and heating back to 20°C at a constant rate of 0.5°C/min, the viscoelastic moduli, i.e. the storage modulus  $G'$  and the loss modulus  $G''$ , at a fixed frequency of 1Hz, were determined as a function of temperature.. It should be reminded that  $G'$  is linked with the elastic energy stored in the structure, whereas  $G''$  is related to viscous dissipation.

#### **2.2.5 Fourier transform infrared spectroscopy**

Freeze-dried salmon skin collagen was subjected to attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR). FTIR spectrometer (Bruker Vertex 70 FT-IR) with an ATR module was used. For spectra analysis, the collagen samples were placed onto the crystal cell and the cell was clamped into the mount of the FTIR spectrometer. The spectra in the range of 400–4000 cm<sup>-1</sup> with automatic signal gain were collected in 32 scans at a resolution of 4 cm<sup>-1</sup> per point and were ratioed

against a background spectrum recorded from the clean empty cell at 25 °C (adapted from Singh et al. 2011). The resultant spectra were analyzed using OPUS 8.0 software (Bruker).

### 2.2.6 Scanning electron microscopy

The morphological characteristics of freeze-dried collagen extracted from salmon skin were studied by SEM (S-3200N; Hitachi, Tokyo, Japan). The resulting sponges were mounted on stubs, sputter-coated with a gold/palladium mix and then observed at various magnifications.

## 3. RESULTS

### 3.1 Macroscopic appearance

Macroscopic appearance of marine collagen PeskCollagen 3D Pro<sup>®</sup> after freeze-drying is shown in Figure 67. Observed through the naked eye, it appears like a white sponge with a porous structure.



Figure 67. Marine collagen PeskCollagen 3D Pro<sup>®</sup> sponge.

### 3.2 Proximate composition

The proximate composition of salmon skin collagen is given in Table 46. PeskCollagen 3D Pro<sup>®</sup> is mostly composed of proteins, which differentiates them from other commercialized collagen products (Peng *et al.*, 2004). Collageneous proteins represent 63% of PeskCollagen 3D Pro<sup>®</sup>, that is more than the half of the total protein contents, as determined from Hyp content of 7.8%. Moreover, ash and lipids content is below the detection limit, highlighting a negligible content in the commercial preparation.

Protein concentration, and more particularly collagen concentration, is an important feature of a collagen product (Peng *et al.*, 2004) regarding applications, for instance in cosmetics (Secchi, 2008) and biomedical applications (Yamada *et al.*, 2014). Therefore, because of its very high collagen content,

the commercial preparation PeskCollagen 3D Pro® is a good candidate as a collagen product for these two markets

Tableau 46. Proximate composition of commercial marine collagen PeskCollagen 3D Pro®.

	Content (%)
Total Proteins	100 ±10,6
Hyp	7,8 ±0,7
Collagen (Hyp x8)	63 ±4,7
Lipids	<0,5
Ash	<0,2

### 3.3 Amino acid analysis

The amino acid composition of SC is shown in Table 47 and compared with those of two mammalian collagens (calf and bovine) and four collagens from marine origin (salmon, shark, sturgeon and squid). Glycine is the most abundant amino acid in all species, approximately one-third of the total amino acid content. SC is composed of the lowest amount of Hyp (8.2 Res./100g Res.) compared with shark, eel-fish and squid (9.4, 9.75 and 10.1 Res./100g Res., respectively) and mammalian species (bovine tendon collagen: 10.1 Res./100g Res.; calf skin collagen: 9.4 Res./100g Res.). SC shows the lowest amount of imino acids (19.68 Res./100 Res.), like eel-fish collagen, due to a low content of Pro (9.6 Res./100 Res.) despite a high content of Hyp. Relatively high contents of Ala, Pro, Glu and Hyp are observed in all collagens while the contents of Ile, Cys and Tyr are very low. Similar trends were reported by Wang *et al.* (2011), Veeruraj *et al.* (2013) and Kittiphattanabawon *et al.* (2010). Overall, fish collagens have lower concentrations of imino acids (Pro and Hyp) compared to mammalian collagens, and this may explain why the denaturation occurs at low temperature, because the imino acids stabilize the ordered conformation when gelatin forms a network. However, in addition to low imino acid contents, other molecular characteristics such as the average molecular weight and molecular weight distribution give fish gelatins features like low gelling and melting temperatures (Karim *et al.*, 2009).

Tableau 47. Amino acid content in some fish and squid gelatins compared to bovine and calf gelatins (residues /100 total amino acid residues).

Amino acids (Res. /100g Res.)	PeskCollagen 3D Pro® <sup>1</sup>	Eel <sup>2</sup>	Blacktip shark <sup>3</sup>	Sturgeon <sup>5</sup>	Squid <sup>6</sup>	Bovine <sup>7</sup>	Calf <sup>8</sup>
Glycine	27.87	27,8	32,1	32,75	33,2	22.3	33
Proline	11.48	9,6	11	11,53	12,2	11.2	12.1
Glutamic acid	10.66	8	7,6	7,14	5,6	10.7	7.5
Alanine	9.84	12,5	12	10,99	11,9	8.8	11.9
Arginine	9.02	5,6	5,4	5,6	5,2	8.2	5
Hydroxyproline	8.20	9,4	9,1	9,75	10,1	10.1	9.4
Aspartic acid	8.20	6	4	3,91	4,4	6.2	4.5
Methionine	2.46	-	1,5	0,58	1,3	1.0	0.6
Threonine	3.28	2,4	2	2,27	2,1	2.1	1.8
Serine	4.92	3,1	2,9	4,63	2,9	3.4	3.3
Leucine	4.10	0,9	2,3	1,69	1,7	3.6	2.3
Lysine	4.10	7,6	2,7	2,33	3,2	3.5	2.6
Valine	1.64	2,8	2,5	1,52	1,7	2.8	2.1
Tyrosine	1.64	0,3	0,2	0,32	1,2	1.1	0.3
Phenylalanine	1.64	0,5	1,3	1,34	0,8	2.4	0.3
Hydroxylysine	-	0,4	0,5	0,73	0,5	0	0.7
Isoleucine	<1.64	0,8	1,8	1,11	1,1	1.8	1.1
Cysteine	<1.64	1,2	0,1	-	0,6	0.24	0
Histidine	<1.64	0,3	0,7	1,73	0,3	0.8	0.5
Imino acids = Hydroxyproline + Proline	19.68	19	20,1	21,28	22,3	21.3	21.5

1 Results carried out by InVivo Labs

2 Veerujaj *et al.*, 2013

3 Kittiphattanabawon *et al.*, 2010

5 Wang *et al.*, 2014

6 Veeruraj *et al.*, 2015

7 Choi *et al.*, 2013

8 Fernandes-Silva *et al.*, 2013

### 3.4 Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

The SDS-PAGE patterns of SC, bovine collagen (BC) and calf collagen (CC) presented in Figure 68 show that all collagens exhibit the same pattern: presence of two  $\alpha$  chains,  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ ,  $\beta$  chain and  $\gamma$  chain.

For SC, these different bands correspond to molecular weights of 120 kDa, 110kDa, 231kDa and 288 kDa, respectively. Similar SDS-PAGE patterns are observed for both  $\beta$ -mercaptoethanol treated and untreated SC collagen, suggesting that no disulphide bonds were present in SC. Lack of disulphide bonds was also observed for scallop collagen (Choi *et al.*, 2013), bamboo shark (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010), and carp skin collagen (Chen *et al.*, 2015). SC is characterized by the presence of two  $\alpha$  chains, whose molecular weights are similar to the type I collagen of most other fish species, such as deep-sea redfish (Wang *et al.*, 2011), fishballoon fish (Huang *et al.*, 2011), Brownstripe red snapper (Jongjareonrak *et al.*, 2005), sturgeon (Wang *et al.*, 2014), carps (Liu *et al.*, 2014), seabass (Sinthusamran *et al.*, 2013) and Tilapia (Niu *et al.*, 2013), but slightly higher than those previously reported on salmon gelatin obtained using an acid/alkali process for which molecular weight of  $\alpha$ -chains and  $\beta$ -chains were 95kDa and 195 kDa respectively (Diaz *et al.*, 2011). The density of  $\alpha_1$  is higher than  $\alpha_2$ , indicating that  $\alpha_2$  chain is less abundant than  $\alpha_1$  chain in the collagen, which is a typical electrophoretic profile of type I collagen. Higher molecular weight components corresponding to dimers ( $\beta$  component) and trimmers ( $\gamma$  component) are observed in SC samples, which also exhibit intermediate bands between  $\alpha_1$  and  $\beta$  components, and also below 100kDa. These additional bands could be the signature of hydrolysis products of elementary chains of collagen or a residue of non-collageneous proteins. Unlike other fish collagen described in the literature,  $\beta$ -chain and  $\gamma$ -chain aggregates are present in higher quantities in SC. This might reflect the high cross-links density in SC. Thus, analysis indicates that the commercial preparation (PeskCollagen 3D Pro®) of salmon skin collagen is mainly of type I and contains a high amount of  $\beta$ -chain and  $\gamma$ -chain aggregates. The high amount of beta and gamma collagen might be attributed to the presence of non-covalent intra- and intermolecular bonds in salmon skin collagen.

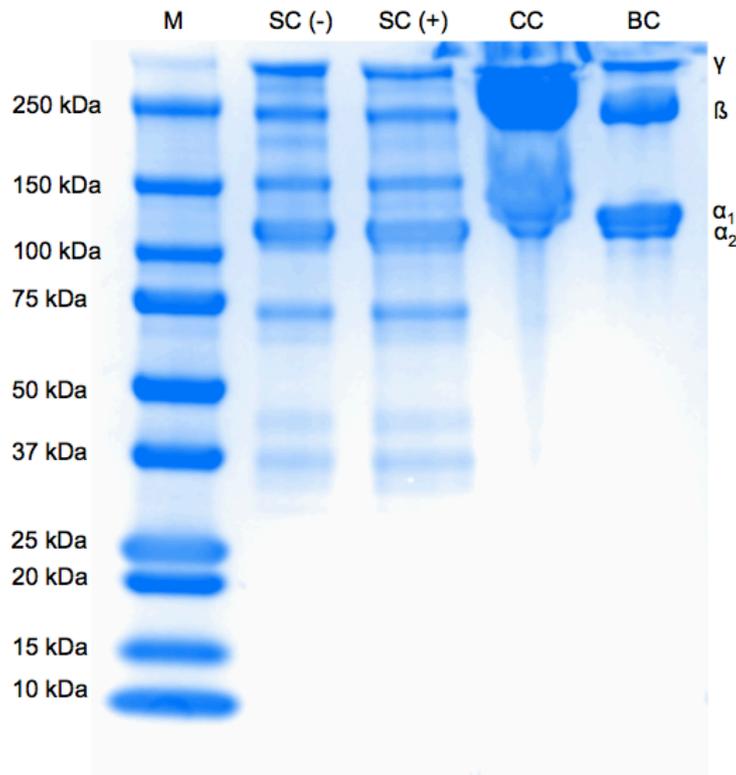


Figure 68. SDS-PAGE pattern of collagens: salmon collagen (SC) with (+) or without (-)  $\beta$ -mercaptoethanol. M: Molecular markers, CC: Calf skin collagen, BC: Bovine collagen.

### 3.5 Size exclusion fast protein liquid chromatography

Figure 69 shows the elution profiles of SC, calf collagen and bovine collagen obtained by SEC-FPLC analysis. SC is eluted in 2 major and a minor peaks. The first and second peaks ( $>600$  kDa et  $\approx 530$  kDa, respectively) can be assigned to aggregates whilst the  $\alpha$ -chains ( $\approx 100$  kDa) are found in the third peak. Additionally,  $\gamma$  chains are found as a shoulder of the second peak ( $\approx 330$  kDa), and another shoulder ( $\approx 150$  kDa) is observed in the third peak. The present results confirm major bands detected on SDS-PAGE (Figure 68). CC exhibits one major peak above 600 kDa and two minor peaks, one around 530 kDa (aggregates) and one below 100 kDa. BC is eluted as a major peak above 530 kDa. SEC-FPLC chromatograms show that SC, BC and CC collagens are all composed of a majority of high molecular weight components, above 530kDa.

Previous studies demonstrated that collagen or gelatin macromolecules are organized either as single chains, or as two or three chains, depending on processing parameters, i.e. acid or enzymatic treatment, as well as temperature of extraction, pH and time. For example, when gelatin was prepared by the acid extraction method, Eysturskarð *et al.* (2009b) obtained chromatographic profiles for fish gelatins from haddock, saithe and cod, composed of two major peaks, one assigned to the  $\alpha$ -chains ( $\approx 100$ kDa) and the other to the  $\beta$ -chains ( $\approx 200$  kDa) with shoulder indicating the presence of

molecules of higher molecular weights. Concerning gelatins from both salmon and cod, HPLC-gel filtration profiles showed that gelatins extracted at 65°C were more hydrolysed than gelatins extracted at 56°C (Arnesen and Gildberg, 2007). In addition, when the extraction temperature was increased from 56 to 65°C, only minor changes occurred in the molecular weight pattern of the salmon gelatins, suggesting that not only intermolecular but also intra-molecular crosslinks are more thermostable in salmon than in cod gelatins. Kittiphattanabawon *et al.* (2010) demonstrated that the amount of cross-linked components ( $\beta$ - and  $\gamma$ -chains) and  $\alpha$ -chains decreased with increasing extraction temperature and time, and that they were less degraded at low extraction temperature (45°C) compared to high extraction temperature (75°C)

The chromatographic profiles suggest that SC, BC and CC collagens are not only organized through intra-molecular cross-links between  $\alpha$  chains, leading to the formation of a triple helical structure, but also through inter-molecular cross-links, leading to the formation of aggregates characterized by high molecular weights. Previous studies suggested that inter-molecular cross-links were more present and thermostable in skin collagen of some fish species compared to others (Gómez-Guillén *et al.*, 2002 ; Jongjareonrak *et al.*, 2005; Arnesen and Gildberg, 2007 ; Kittiphattanabawon *et al.*, 2010). Harsh extraction conditions are usually associated with the generation of low molecular weight fractions, resulting in weaker gelling properties compared to those of high molecular weight gelatin (Badi and Howell, 2006).

Fish gelatins have limited application due to their lower gel strength and gel stability compared to those from mammalian counterparts. Such differences are governed by the molecular weight distribution and amino acid composition, and are also linked with a lower content of imino acids (Pro and Hyp). Weaker gelling properties can be obtained when harsh extraction conditions are used, mainly associated with the generation of low molecular weight fractions compared to high molecular weight gelatin.

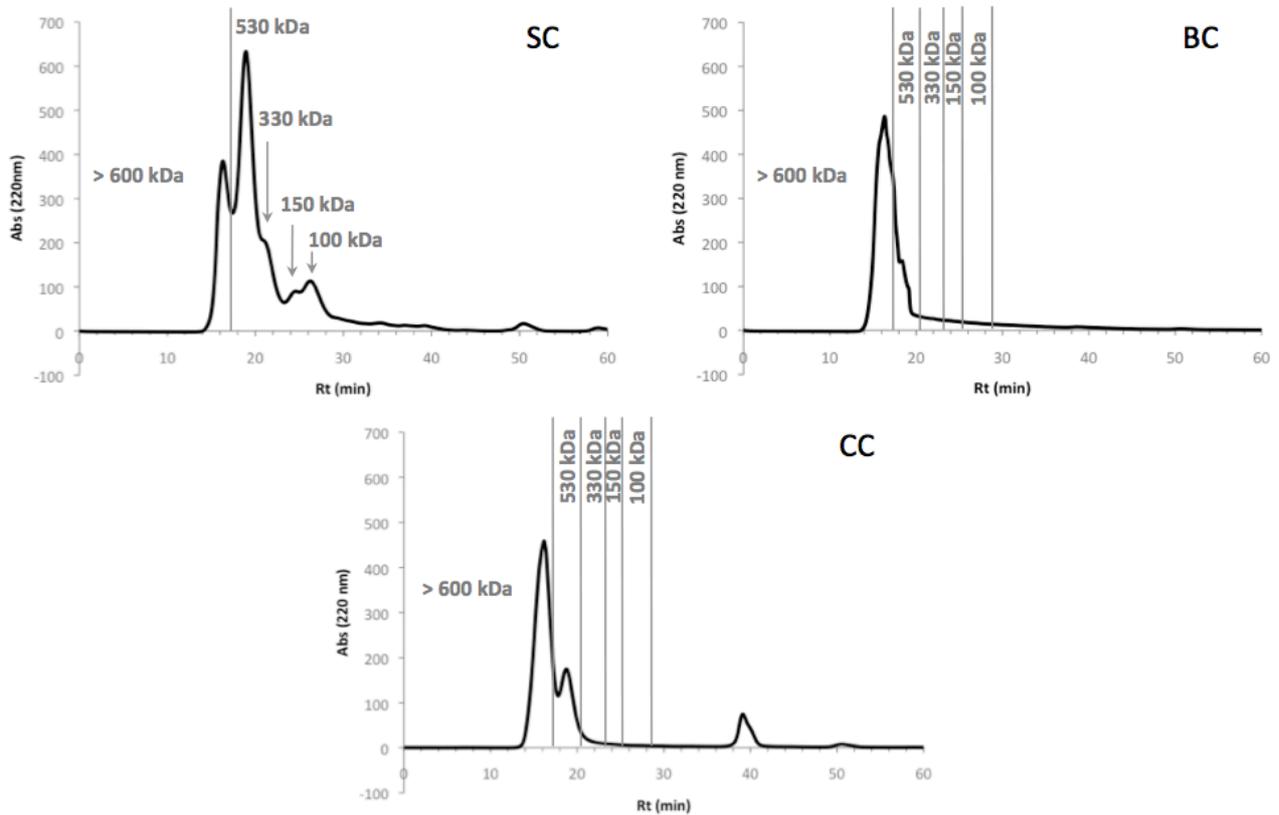


Figure 69. Elution on Superdex 200 column of salmon collagen (SC), calf collagen (CC), bovine collagen (BC). Relative absorbance at 220 nm is given as a function of retention time.

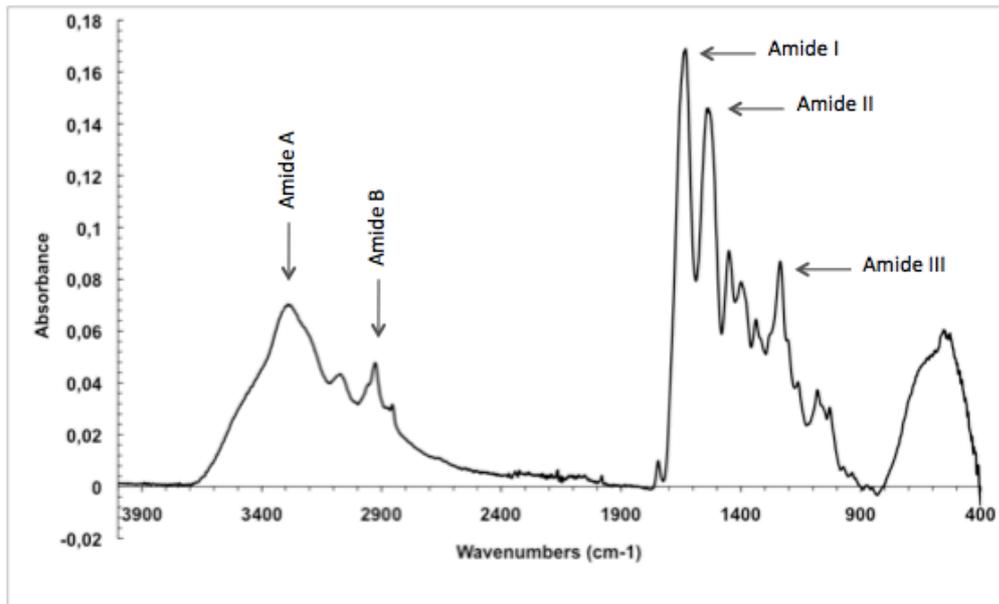
### 3.6 Fourier transform infrared spectroscopy

The freeze-dried scaffold of SC is characterized by FTIR spectroscopy in total reflectance (ATR) mode ; spectra are shown in Figure 70 The FT-IR spectra ( $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ ) show three strong absorption peaks at about  $1630\text{ cm}^{-1}$ ,  $1534\text{ cm}^{-1}$  and  $1235\text{ cm}^{-1}$  related to the amide I, II and III, respectively. Amide A is recognized at  $3289\text{ cm}^{-1}$  and amide B band is observed at  $2926\text{ cm}^{-1}$ . Since all scaffolds prepared are proteinous (collagen) in nature, amide absorption bands are seen in all spectra (Muthukumar et al., 2014).

The absorption ratio between amide III band and  $1450\text{ cm}^{-1}$  band ( $1449\text{ cm}^{-1}$ ) of collagen is approximately equal to 1.0 (0.85), confirming the secondary triple helical structure of SC presented in this study (Guzzi Plepis et al. 1996). It is comparable with ratios found for calf skin collagen (Ahmad et al. 2010), for yellowfin tuna (Woo et al. 2008) and for red drum fish scale collagen (Chen et al. 2016), suggesting preservation of the triple helical structure in these collagens (Moreno et al. 2012). Indeed, the amide III peak is related with intermolecular interactions in collagen. It consists of components from C\H and N\H stretching in plane bending from amide linkages, as well as absorptions arising from wagging vibrations from  $\text{CH}_2$  groups from the Gly backbone and Pro side-chains (Guzzi Plepis et al., 1996). In this way, this ratio indicates that hydrogen bonds are involved in high molecular weight

collagen and reflects a triple helical structure of collagen scaffold, confirming that the secondary structure of salmon collagen is not altered. The amide I with characteristic wavenumber in the range of 1700–1600 $\text{cm}^{-1}$  is mainly with polypeptide backbone C\O stretching vibration (Payne and Veis, 1988), which is a sensitive marker of the peptide secondary structure (Veeruraj *et al.* 2013). This absorption confirms that the formation of hydrogen bonds between N\H stretch and C\O (Gly) occurs within the triple helix (Zanaboni *et al.*, 2000). Amide II is generally responsible for the combination of the NH in plane bend and the CN stretching vibrations (Muyonga *et al.* 2004b).

The broad band between 3700 and 3100  $\text{cm}^{-1}$  results from an overlap of different vibrations of units with hydrogen, such as N–H stretching which is associated with amide A. Free N\H stretching vibration commonly occurs in the range 3400–3440 $\text{cm}^{-1}$  and when the NH group of a peptide is involved in a hydrogen bond, the position was shifted to lower frequency, at around 3300  $\text{cm}^{-1}$  (Li *et al.* 2004; Doyle *et al.* 1975). Amide B band represents the asymmetrical stretch of  $\text{CH}_2$ . The major bands of SC are similar to those of other marine fish such as Atlantic salmon (Hoyer *et al.*, 2012 ; Moreno *et al.*, 2012), sharks (Fernandes-Silva *et al.*, 2013 ; Kittiphattanabawon *et al.*, 2010), mackerel (Li *et al.*, 2013), sturgeon (Liang *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2014), pollock (Yan *et al.*, 2008), tuna (Woo *et al.*, 2008), marine eel-fish (Veeruraj *et al.* 2013), seabass (Sinthusamran *et al.* 2013 ; Muthukumar *et al.* 2014), sailfish (Tamilmozhi *et al.*, 2013), cobia (Zeng *et al.*, 2012). Therefore, results of Fourier transform infrared spectroscopy suggest that SC has the same structure as that of other marine collagens. It is a simple and practical method commonly used to judge collagen triple-helical structure, but also changes in secondary structure like differences in functional groups or in inter- and intra-molecular interactions (Ahmad *et al.* 2010 ; Veeruraj *et al.* 2013 ; Chen *et al.* 2016).



Region	Peak wavenumber (cm <sup>-1</sup> )
Amide I	1630 cm <sup>-1</sup>
Amide II	1534 cm <sup>-1</sup>
Amide III	1236 cm <sup>-1</sup>
Amide A	3289 cm <sup>-1</sup>
Amide B	2926 cm <sup>-1</sup>
-	1449 cm <sup>-1</sup>

Figure 70. FTIR spectra of freeze-dried PeskCollagen 3D Pro®. Absorbance is given as a function of wavenumbers (cm<sup>-1</sup>).

### 3.7 Sol-gel and gel-sol transition temperatures

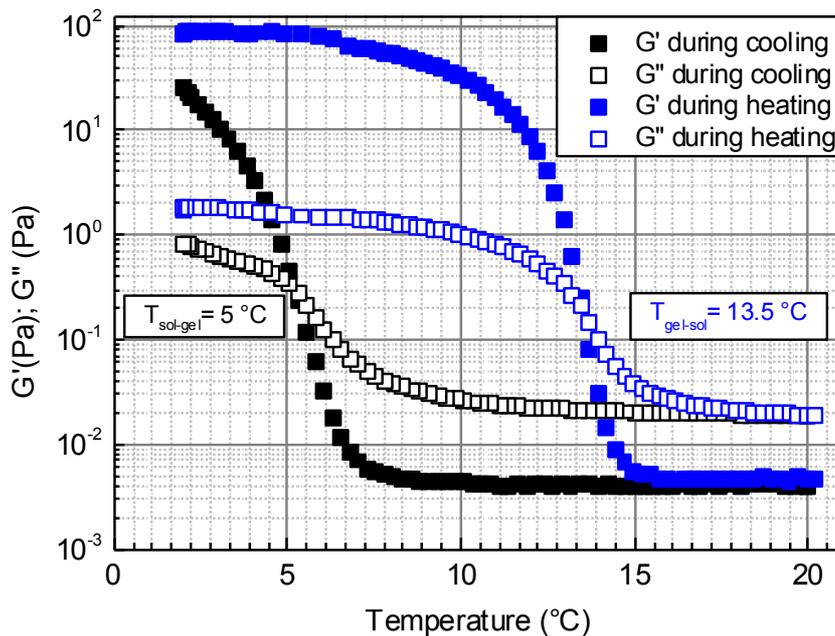


Figure 71. Temperature dependence of linear viscoelastic moduli,  $G'$  and  $G''$ , at 1 Hz and 10% strain amplitude, of PeskCollagen 3D Pro®.

The storage modulus,  $G'$ , and the loss modulus,  $G''$ , of SC solutions (20g.L<sup>-1</sup>), at 1Hz and strain amplitude of 10%, was plotted in Figure 71 during both linear heating (from 2°C to 20°C) and cooling (from 20°C to 2°C). From this plot, the gelling and melting temperatures can be experimentally determined as the two temperatures corresponding to the crossover of  $G'$  and  $G''$  curves, marking the transition from liquid-like to solid-like behaviors (cooling), or reverse (heating). From data plotted in Figure 71, the sol-gel transition temperature, or gelling temperature ( $T_{gel}$ ), is shown to be 5°C whereas the gel-sol transition temperature, or melting temperature ( $T_m$ ), is shown to be 13.5°C.

Concerning sol-gel transition temperature, previous results from literature showed a  $T_{gel}$  of 4.5°C for 10% (w/v) commercial cold water fish gelatin (Haug *et al.*, 2004) and 8°C for a 5% (w/v) saithe gelatin solution (Eysturskarð *et al.*, 2009a). It is well known that gelling temperature increases with increasing concentration because shorter distance between chains favors formation of junction zones (Haug *et al.*, 2004). Thus, SC 2% (w/v) solutions exhibit an interesting gelling temperature, which could be improved by increasing collagen concentration in solution.

For gel-sol transition temperature, previous results from literature showed a  $T_m$  between 13-14°C for commercial cold water fish gelatin (Haug *et al.*, 2004), 16°C for saithe gelatin solution (Eysturskarð *et al.*, 2009a), and 12-13°C for cod gelatin (Gómez-Guillén *et al.*, 2002), whereas bovine gelatin melts at 30°C (Haug *et al.*, 2004). Hence,  $T_m$  of SC is similar to those of commercial fish gelatins and close to other cold-fish species but considerably lower than values of mammalian gelatin.

This observations are explain by the fact that non-covalent bonds like electrostatic interactions play an important role in formation and stability of the collagen gel network (Haug *et al.*, 2004). In this way, OH-groups of the Hyp stabilize the triple helical areas (Veis, 1964) and the lower content of imino acids of SC compared with mammalian or warm-water collagen is account for lower  $T_m$  and  $T_{gel}$ . In the case of heating collagen solution, the few hydrogen bonds are rapidly broken causing collapsing of collagen triple helical structure whereas in the case of cooling, a lower temperature is need to better immobilize molecules and promote meeting of the few sites for hydrogen bonds. Hence, even if SEC-FPLC and SDS-PAGE patterns showed high molecular weights and FTIR results evidenced a triple helical structure, the low  $T_m$  obtained suggests a less importance of hydrogen bonds in inter- and intra-molecular cross-links involved in collagen structure stability, than in the case of mammalian collagens or warm-water fish species (Ahmad *et al.*, 2010).

Other methods enable to characterize thermal behavior of collagen. They are based on different principles, allowing the determination of the so-called collagen denaturation temperature ( $T_d$ ). Using differential scanning calorimetry, one defines  $T_d$  as the temperature of the endothermic peak (He *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2014, Hoyer *et al.*, 2014, Liu *et al.*, 2014), whereas circular dichroism defines it as the midpoint temperature between native-folded and completely unfolded forms (Duan *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2014), which corresponds to the helix-to-coil transition ; finally, the study of viscosity changes which occur at  $T_d$  (Veeruraj *et al.*, 2013) can be used to determine this temperature. The

existence of two temperature terminologies ( $T_m$  or  $T_d$ ) together with the use of various experimental methods to determine them, make the comparison between results in the literature somewhat delicate. In all cases, the thermal behavior and stability of the collagen is related with inter- and intra-molecular hydrogen bonds, and more precisely with Hyp contents. On the whole, rheological measurements complete information given by FTIR analysis on the collagen structure and on how hydrogen bonds contribute to the stabilization of the triple helical structure.

Specific thermal behavior of salmon collagen caused by amino acid composition makes gel unstable at human body temperature, in the perspective of medical applications. In a context where biomedical supports were developed, there is an interest in replacing mammalian collagen with marine collagen, because of religious and health objections. If  $T_{gel}$  could be improved by increasing concentration of collagen solution, creation of cross-links into collagen network should enable to enhance  $T_m$ . Numerous cross-linking methods were described to enhance thermostability of fish collagens, using either physical, chemical or enzymatic agents. Physical treatments can be ultraviolet irradiation or dehydrothermal treatment (Weadock et al., 1995), chemical treatments involve glutaraldehyde (Chiou et al., 2008; Englert et al., 2007a), carbodiimide (Chiou et al., 2008; Englert et al., 2007a), genipin (Fernandes-Silva et al., 2013a) and finally, enzymatic treatment with microbial transglutaminase (Chau et al., 2005; Collighan and Griffin, 2009; Nomura et al., 2001a; Stachel et al., 2010) or phenoloxidase like laccase (Jus et al., 2011).

### 3.8 Scanning electron microscopy

The SEM images of PeskCollagen 3D Pro® sponges are presented in Figure 72. A & B. Collagen surface is partially wrinkled probably because of dehydration during the freeze-drying step, as described in previous studies (Schuetz *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). SC shows a highly open, interconnected and porous structure. Pores are loose, large and elongated, with a mean characteristic size up to 100  $\mu\text{m}$ . Moreover, fibers can be observed with a diameter from 14 $\mu\text{m}$  to 90 $\mu\text{m}$  (Figure 72B).

A highly porous nature of the collagen matrix is expected to act as a scaffold for cell growth and proliferation because the size of the voids in the matrix could allow cell penetration. Furthermore, materials have to present a shape recover property with sufficient porosity because, *in vivo*, they are always exposed to mechanical stresses in compression, tension or torsion (Yunoki 2007, Parenteau-Bareil *et al.*, 2010, Fernandes-Silva *et al.*, 2013). Within porous supports, the pore size should be at least slightly above that of cells for their growth. For example, a 300-400  $\mu\text{m}$  range was reported as suitable for osteoblasts growth and vascularization (Yaylaoglu *et al.*, 1999a). In previous studies, pore sizes between 50 and 150  $\mu\text{m}$  were found to be optimal for improved extracellular matrix production (Ma, 2003 ; Muthukumar *et al.*, 2014). This details show that the microstructure, such as adequate porosity, mean pore size, surface area, pore wall morphology, pore shape and interconnectivity are

important for cell seeding, migration, proliferation, gene expression and new tissue formation in three dimensions (Yang *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2002 ; Ma 2003 ; Song *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Fernandes-Silva *et al.*, 2013 ; Veeruraj *et al.*, 2013 ; Muthukumar *et al.*, 2014). In the present work, PeskCollagen 3D Pro® highly porous structure coupled with pore size between 100 and 500 µm, together with high interconnectivity, is expected to be suitable for cell growth (Yaylaoglu *et al.* 1999, Fernandes-Silva *et al.*, 2013). In this way, the commercial preparation seems to exhibit an adequate morphology for tissue engineering and regenerative medicine. High molecular weight of PeskCollagen 3D Pro® because of its aggregative capacities also offer advantages. Indeed, in contrast to structure of freeze-dried monomeric collagen-based sponges, which are more frequently used (Hoyer *et al.*, 2014), structures of fibrillized collagen mimic the natural extracellular matrix and can provide additional mechanical strength (Yunoki *et al.*, 2007).

Thus, in order to use collagen as a biomaterial for tissue engineering, morphological characterization of its structure is necessary. Furthermore, this tool enables to develop protocols capable to modulate matrix microstructures, by the understanding of their effects. As observed by (Zhang *et al.*, 2007), different pore sizes of collagen sponges might be attributed to different collagen concentrations before lyophilizing. Indeed, these authors showed that collagen pore size increased with the increase of water content in the preparation, and the pore size of the collagen sponge could be adjusted so that it is above the size of the implantation cells for cell incursion and growth (Zhang *et al.*, 2007). Moreover, additional refreeze-drying can induce recombination of collagen fibers leading to the formation of sheets, resulting in the creation of larger pores from the fusion of smaller ones. It has to be noted that the slight collapse of the scaffold during this process should have an opposite effect; i.e., should reduce the pore size (Ma, 2003). That is why it is difficult to compare various collagen sponges.

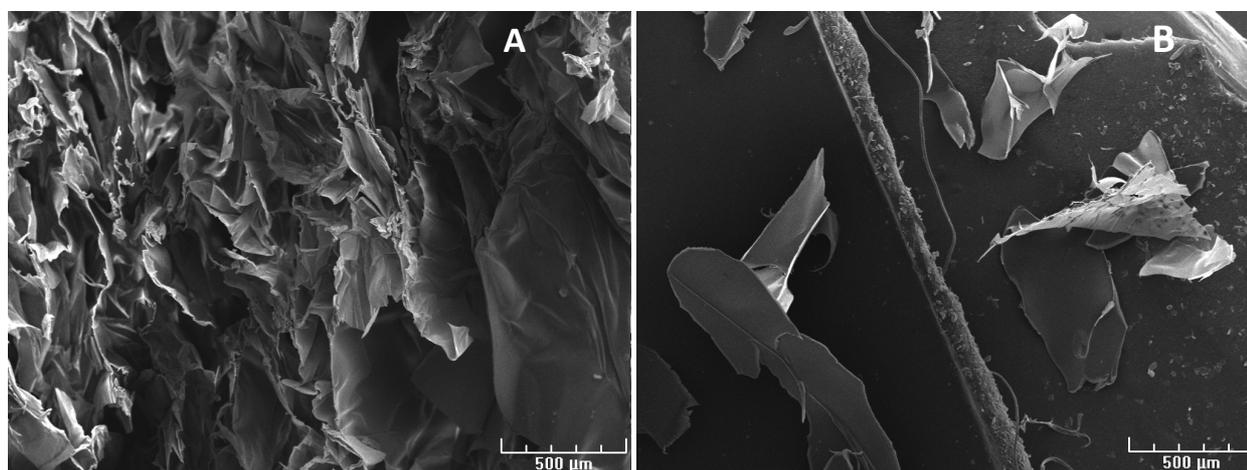


Figure 72. SEM images of PeskCollagen 3D Pro® sponges (A and B).

To complete the morphological description of marine collagen, transmission electron microscopy (Liu *et al.* 2014) and atomic force microscopy have also been used in the literature (Hoyer *et al.* 2012, 2014; Li *et al.* 2009b) to observe collagen self-assembly *in vitro*. Contrary to SEM observations, samples characterized by TEM or AFM techniques, were observed in the liquid state, in an appropriate solvent in terms of pH, ionic strength and temperature in order to observe fibril formation. Such investigation techniques give information about reassembled fibril thickness, length and structure, organization (orderly, D-periodicity...), which helps to rebuild native-like collagen fibrils (Liu *et al.* 2014).

However, further works are needed to study both chemically or enzymatically cross-linked collagen and to determine optimal solvent conditions (pH, ionic strength, temperature) in order to control porosity and fibril-formation for the production of tunable biomimetic biomaterials for tissue engineering. Actually, collagens sponges functionality can be improved, combining structures with minerals, polysaccharides like chitosan or bioactive molecules showing antibacterial activity, (Barreras *et al.*, 2016; Jeevithan *et al.*, 2013) to promote cellular growth, vascularisation and mineralization in the process of tissues reconstruction.

#### **4. CONCLUSION**

This study described the marine commercial collagen, named PeskCollagen 3D Pro®. It is a type I collagen, which shows an amino acid composition typical of cold-water fish species collagens. Its high molecular weight is confirmed by all results obtained with different characterization methods : SDS-PAGE, SEC-FPLC and FTIR. Despite that, rheological characterization shows a lower melting temperature than that of mammalian collagen, because of a lower content in imino acids.

Finally, microscopy analysis of PeskCollagen 3D Pro® sponge reveals a highly porous structure coupled with optimal pore size making it potentially adequate for uses in tissue engineering and regenerative medicine.

To conclude, PeskCollagen 3D Pro® meets the needs of the market with properties close to those of mammalian collagen, like high molecular weight, but without sanitary and religious constraints.

#### **Acknowledgements**

The authors thank the support of the marine science and technology clusters “Pôle Mer Bretagne” and “Valorial”. This study was co-financed with fundings of the Brittany Region, the Conseil Général Finistère, Quimper Communauté and Oseo. The authors sincerely thank M. Vincent Gelamur from Meralliance company, Roxane Fagon and Marc Hemon from YSLAB company, Mrs Isabelle Guiller from

SPF-DIANA for their involvement in the Pesk&Co consortium, Marion Ritter and Gwenola Lafagge from SPF-DIANA company for the help in obtaining collagen, Nathalie Cosquer from CEMCA (UMR CNRS 6521, UBO, Brest, France) for the help in FTIR analysis and Gérard Siquin from PIMM-DRX (UBO, Brest) for the help in SEM analysis.



## Chapitre 3 :

### Études préliminaires de la réticulation enzymatique d'un collagène de saumon de haut poids moléculaire

#### **Résumé :**

*Ce chapitre présente les résultats d'une étude exploratoire concernant l'impact de procédés de réticulation chimique et enzymatique sur les propriétés du collagène obtenu et les mécanismes de modifications mis en jeu. L'objectif de ce travail est d'élargir les applications potentielles du collagène PeskCollagène 3D Pro® développé, vers le secteur des dispositifs médicaux. Pour cela, un protocole de réticulation par le glutaraldéhyde, un agent chimique, et un protocole de réticulation par une transglutaminase d'origine microbienne ont été testés. Les hydrogels obtenus, et plus particulièrement celui obtenu avec le procédé enzymatique, ont été analysés grâce à différentes méthodes de caractérisation, permettant l'étude de plusieurs niveaux d'organisation. Les résultats ont ainsi montré que la réticulation enzymatique, modifie la structure tridimensionnelle du réseau en rapprochant les molécules de collagène par la formation de liaisons intermoléculaires. Par conséquent, un réseau plus dense est obtenu, ce qui modifie la taille des pores qui sont alors plus petits que ceux observés pour le collagène natif. Également, les propriétés mécaniques sont améliorées avec une augmentation de la température de fusion et du module élastique. Cependant, ces résultats sont encore exploratoires et le travail devra se poursuivre afin d'évaluer précisément le potentiel du collagène réticulé, et plus particulièrement, pour des applications en ingénierie tissulaire.*

## 1. Introduction

Le premier chapitre du manuscrit a décrit le développement d'un procédé industriel d'extraction d'un collagène de haut poids moléculaire. Au cours de ce développement de procédé, une importance particulière a été apportée à la préservation de la structure en triple hélice de la molécule. De plus, ce procédé d'extraction permet de conserver les télépeptides aux extrémités terminales des hélices, comme pour la méthode d'extraction par voie acide, ce qui confère au collagène ses capacités de polymérisation pour former des matrices 3D *ex vivo*. Ces caractéristiques biochimiques particulières rendent le collagène intéressant pour une utilisation comme biomatériau car il est alors capable de mimer la matrice extracellulaire, mais également d'apporter davantage de résistance mécanique aux structures formées (Yunoki *et al.*, 2007). La conservation de cette structure biochimique est d'autant plus importante pour le collagène de poisson de type I, et particulièrement lorsqu'il est extrait d'espèces d'eau froide comme le saumon, présente naturellement des propriétés mécaniques et thermiques plus faibles que celles du collagène de type I de mammifère (El-Rashidy *et al.*, 2015 ; Hoyer *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2015; Yamada *et al.*, 2014). Ce dernier est déjà couramment utilisé dans les dispositifs médicaux commercialisés. Or, ce collagène est associé à des contraintes religieuses ou à un risque sanitaire. C'est pour ces raisons que le collagène d'origine marine suscite un intérêt croissant auprès de la communauté scientifique et de l'industrie. Les propriétés spécifiques du collagène marin ont été confirmées par les résultats concernant la caractérisation du Collagen3DPro® dont les faibles teneurs en acides iminés, Hyp (8,20%) et Pro (11,48%), comparés aux collagènes de mammifères, conduisent à une température de gélification d'environ 5°C tandis que sa température de transition gel-sol est d'environ 13,5°C. Ces spécificités rendent plus difficile son utilisation en tant que matrice pour un support en ingénierie tissulaire car le collagène devient liquide à la température du corps humain (37°C). Il ne peut donc pas servir, tel quel, comme support de croissance et de développement des cellules. Ainsi, il est nécessaire de le réticuler. Cette réaction permet, en effet, de former des liaisons croisées covalentes entre les chaînes de collagène afin de stabiliser le réseau tridimensionnel formé et ainsi d'augmenter ses propriétés mécaniques et sa stabilité thermique. Rappelons qu'il existe plusieurs techniques de réticulation utilisant des agents chimiques comme le glutaraldéhyde (Chiou *et al.*, 2008 ; Englert *et al.*, 2007), des agents physiques (Yamada *et al.*, 2014) ou encore des agents enzymatiques comme la transglutaminase (Chau *et al.*, 2005 ; Nomura *et al.*, 2001a ; Spurlin *et al.*, 2009 ; Stachel *et al.*, 2010 ; Zhu et Tramper, 2008). Les traitements chimiques donnent de très bons résultats en terme de stabilité et de résistance mécanique mais leur potentielle cytotoxicité et leur faible biocompatibilité (Yamada *et al.*, 2014) remettent en cause leur utilisation. En revanche, la réticulation enzymatique ne présente pas ces inconvénients (Chen *et al.*, 2005), et permet d'améliorer les propriétés du collagène. C'est encore une méthode peu explorée pour le collagène de poisson, et on ne recense à l'heure actuelle aucune étude sur la réticulation par voie enzymatique (action de la transglutaminase

microbienne) du collagène de saumon atlantique. En effet, le projet s'inscrit dans une démarche de développement de procédés à la fois innovants et limitant l'utilisation de produits nocifs pour l'environnement ou la santé.

D'autre part, la caractérisation du collagène décrite dans le Chapitre 2 a permis de développer un ensemble de méthodes analytiques, à l'interface de plusieurs domaines, permettant ainsi de comprendre toute la complexité de la molécule, et ce, à plusieurs échelles. L'analyse des caractéristiques physiques, biochimiques et chimiques et plus particulièrement, en rhéologique et microscopie, va permettre d'étudier les effets de la réticulation du collagène sur sa structure chimique, sur son comportement thermique ainsi que sur sa microstructure.

L'objectif de ce travail est d'explorer les possibilités de réticulation du collagène de saumon obtenu à partir des essais pilotes. La réticulation enzymatique par la transglutaminase microbienne a été privilégiée. Afin d'évaluer ses performances, une réticulation chimique par le glutaraldéhyde, dont l'efficacité a largement été démontrée, est utilisée comme témoin. L'étude porte sur l'obtention d'un collagène réticulé sous deux structures tridimensionnelles différentes: (1) les hydrogels, qui présentent une composante solide et une composante fluide, et (2) les éponges, composées d'un réseau solide, plus ou moins dense, de fibres de collagène. Différents modes opératoires et paramètres seront testés et les collagènes réticulés obtenus seront examinés grâce aux méthodes analytiques développées, afin de comparer les protocoles utilisés. Contrairement au procédé d'extraction développé précédemment, dont le but premier était son optimisation pour une application industrielle, les essais suivants sont plus préliminaires. En effet, ils vont dans un premier temps permettre de tester la faisabilité de la réticulation sur le Collagen 3DPro® et de comprendre le mécanisme de la réaction. Cependant, le choix des protocoles et des paramètres testés sera orienté en vue d'une application industrielle future.

Ce travail a été réalisé avec la collaboration de Klervi Le Lann (post-doctorante UBO-LEMAR).

## 2. Résultats et discussion

### 2.1 Préparations d'hydrogels et d'éponges de collagène réticulés

Cette première partie présente l'observation macroscopique des hydrogels et des éponges obtenues avec les protocoles de réticulation du collagène mis au point avec (1) la transglutaminase microbienne et (2) le glutaraldéhyde.

#### 2.1.1 Hydrogels

##### 2.1.1.1 Réticulation par une transglutaminase d'origine microbienne (mTG)

Des tests préliminaires ont été réalisés pour mettre au point le protocole de réticulation. L'efficacité de la réaction a d'abord été évaluée par l'observation macroscopique des solutions ou hydrogels obtenus, afin de l'appréhender et de comprendre dans quelle mesure elle pouvait être visible à l'œil nu. La Figure 73 montre les résultats obtenus. La réticulation par la mTG est caractérisée par une gélification de la solution qui est croissante avec la concentration en enzyme et donc avec le nombre de liaisons créées. En effet, l'hydrogel présentant la plus forte concentration en enzyme (200U/g de protéine) est plus rigide et se maintient mieux que ceux aux concentrations inférieures en enzyme (100 et 50U/g de protéine). Ces observations donnent donc également quelques pistes sur les possibilités d'ajustement de l'hydrogel et plus particulièrement de ses propriétés mécaniques en fonction de l'application visée, qui pourront être évaluées grâce aux analyses en rhéologie.



Figure 73. Hydrogels obtenus lors des essais préliminaires de réticulation du collagène par la mTG avec les différentes concentrations en enzymes testées (200, 100 et 50 U/g de protéine).

À l'issue de ces essais, un protocole permettant d'obtenir des gels à l'aspect homogène, lisses en surface, avec une bonne tenue, et ne présentant ni amas ni agglomérats, a été mis au point, comme le montre la Figure 74.

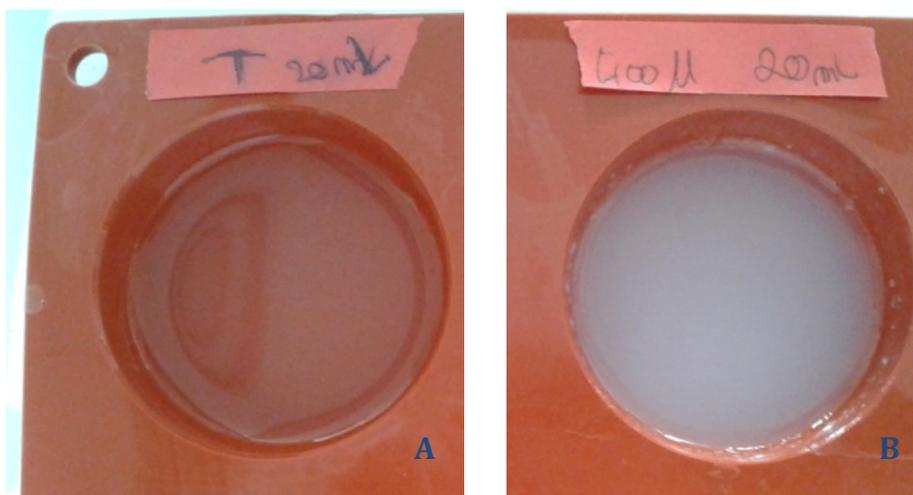


Figure 74. Comparaison de la solution de collagène natif incubée à 40°C (A) avec la solution de collagène + mTG incubée à 40°C (B).

Après incubation à 40°C pendant 2h, la solution de collagène mélangée à l'agent réticulant se présente sous forme de gel, contrairement à la solution de collagène natif qui reste liquide. Cette observation confirme que la réaction de réticulation a créé des liaisons covalentes entre les molécules de collagène permettant de retenir l'eau entre les molécules et maintenant ainsi le réseau sous la forme d'un hydrogel tridimensionnel. L'observation d'un hydrogel du même type sera, par la suite, le principal paramètre observé pour vérifier que la réaction ait bien eu lieu, avant de poursuivre avec des analyses de caractérisation. En plus du changement observé dans la structure des gels, leur couleur est également différente. La solution réticulée devient opaque et blanchâtre, tandis que la solution de collagène seule reste translucide. Da Silva *et al.* (2014) ont également observé une turbidité des hydrogels combinés de gélatine/chitosan et réticulés par la mTG à des concentrations en enzyme comparables. Pour expliquer ce phénomène, ils citent l'étude de (Souguir *et al.*, 2012) qui décrit une interaction entre la pression osmotique et élastique dans le réseau au cours de la réaction de réticulation. La première contrainte favorise l'expansion des hélices, tandis que la deuxième favorise leur contraction. Le procédé de réticulation induit alors une accumulation locale de la pression élastique au niveau du site de liaison de l'enzyme, conduisant à une augmentation de la concentration en polymères et donc du nombre de liaisons créées dans cette même zone. C'est le regroupement des molécules de collagène à certains endroits du réseau qui diffuse alors la lumière conduisant à l'observation d'un gel opaque et traduisant une certaine hétérogénéité dans la structure.

La réticulation permet donc de changer l'aspect visible de la solution de collagène et d'obtenir un hydrogel. Les résultats d'analyses présentés par la suite permettent de vérifier que la réaction ne

modifie pas la structure biochimique en triple hélice du collagène mais qu'elle améliore la microstructure et les propriétés mécaniques de l'hydrogel.

#### 2.1.1.2 Réticulation par un agent chimique, le glutaraldéhyde (GTA)

La réticulation du collagène par le GTA se traduit par une coloration jaune. L'intensité de la coloration augmente de manière proportionnelle avec la concentration en agent, c'est-à-dire en fonction du nombre de liaisons créées dans le réseau. Cependant, contrairement à la réticulation par la mTG, la réaction ne permet pas d'obtenir un hydrogel solide et celui-ci reste liquide à température ambiante, comme le montre la Figure 75. À 4°C, le même phénomène est observé alors qu'une solution de collagène natif avec la même concentration en protéines gélifie. Une des explications pouvant expliquer ces observations serait le mode de réticulation engagé. En effet, la mTG catalyse une réaction de transamination, liant directement une glutamine et une lysine, et rapprochant alors les différents brins de collagènes qui emprisonnent l'eau. À 4°C, la solution de collagène non réticulé se solidifie car les molécules sous formes de triples hélices s'assemblent par l'intermédiaire de liaisons intermoléculaires pour former des superstructures de haut poids moléculaires. En revanche, le GTA induit une réticulation chimique, en formant des "ponts" entre deux terminaisons amines, impliquant ainsi une plus faible proximité entre les chaînes de collagène et permettant ainsi à l'eau de circuler dans le réseau, donnant un aspect liquide à la solution.

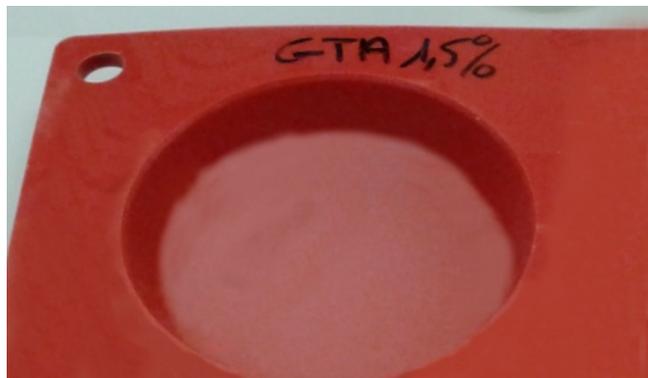


Figure 75. Hydrogel obtenu après réticulation d'une solution de collagène par du GTA.

Ces résultats montrent que la réticulation du collagène par le GTA fonctionne. Cependant, contrairement au collagène réticulé par la mTG, l'utilisation du collagène réticulé par le GTA tel quel n'est pas une option envisageable. En effet, il ne forme pas une structure solide et il est donc indispensable de passer par une étape de lyophilisation pour envisager son utilisation en tant que biomatériau.

## 2.1.2 Éponges

### 2.1.2.1 Réticulation par la mTG

La lyophilisation des hydrogels fabriqués a permis l'obtention d'éponges qui ne se redissolvent pas dans l'eau. Elles peuvent ainsi être réhydratées, mais cela ne redonnera pas un hydrogel comme observé à l'issue du protocole précédent, comme le montre la Figure 76. Les éponges possèdent une capacité d'absorption qui peut être mesurée. Cette capacité fait de ces structures un candidat idéal pour des applications dans l'industrie pharmaceutique et biomédicale en plus de présenter l'avantage d'être biocompatible (Ovsianikov *et al.*, 2011). En effet, elles peuvent être utilisées comme support poreux pour y ensemercer des cellules souches, combinées à des facteurs de croissance et à des molécules bioactives (antibiotiques, antiprolifératives...).

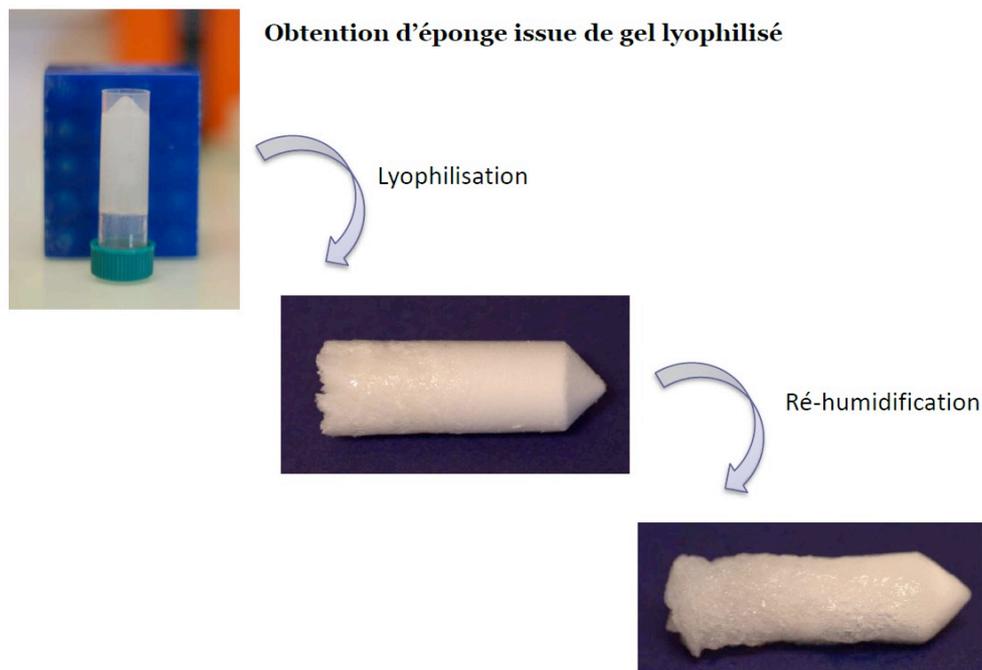


Figure 76. Éponges obtenues par lyophilisation des hydrogels réticulés par la mTG.

### 2.1.2.2 Réticulation par le GTA

Le protocole testé, différent de celui utilisé dans la section précédente avec la mTG, consistait à immerger le collagène natif lyophilisé dans une solution de GTA. Le rendement de la réticulation est de 100% (n=3). L'éponge réticulée, puis lyophilisée afin d'éliminer l'eau de rinçage, est de couleur jaune et d'aspect à la fois dur et compact, très différent du collagène natif qui est blanc et dont l'aspect fait plutôt penser à du polystyrène Figure 77. Comme l'éponge obtenue par réticulation par la mTG, l'éponge réticulée par le GTA se réhydrate facilement, et ne se redissout pas dans l'eau. Ces observations, ajoutées à la couleur jaune de l'éponge, permettent de confirmer que la réaction de réticulation ait bien eu lieu. Cependant, bien que ce protocole ait déjà été utilisé dans la littérature

(Damink *et al.*, 1995), il ne semble pas approprié à un changement d'échelle pour une production à but commercial, contrairement au protocole utilisé pour la fabrication d'une éponge réticulée par la mTG. En effet, le caractère innovant du projet repose sur le développement d'un nouveau procédé qui constitue une alternative naturelle et non cytotoxique aux procédés chimiques de réticulation utilisés presque exclusivement pour la réticulation des collagènes de mammifères. En effet, afin de conserver une approche innovante qui soit respectueuse de l'environnement, comme l'a été le procédé d'extraction du collagène PeskCollagen 3D Pro® développé, il serait plus intéressant de développer des procédés de réticulation alternatifs à l'utilisation de réactifs chimiques qui feront appel à l'action d'enzymes. La réaction de réticulation sera ainsi menée dans des conditions douces en termes de  $t^\circ$  et de pH, conditions qui ne sont pas dénaturantes pour le collagène. De plus, les collagènes marins réticulés seront dépourvus de traces de résidus chimiques potentiellement cytotoxiques qui ne sont pas toujours compatibles avec les lignées cellulaires utilisées pour la régénération tissulaire.

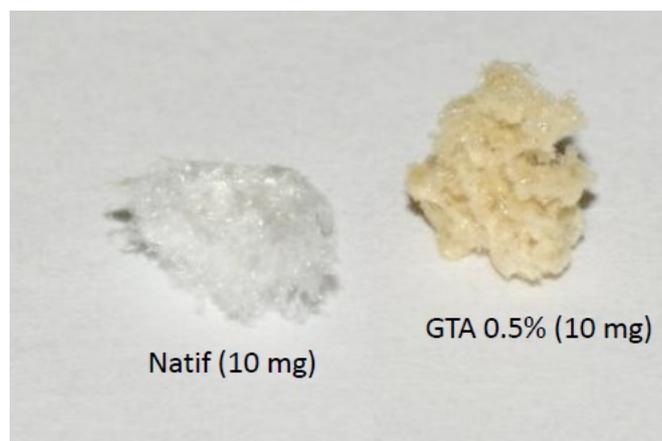


Figure 77. Comparaison de collagène natif lyophilisé (à gauche) et d'une éponge de collagène réticulé par le GTA (à droite).

Les résultats présentés dans cette première partie permettent de montrer qu'il est possible de réticuler le collagène PeskCollagen 3D Pro®, extrait et caractérisé dans les chapitres précédents, par voie enzymatique. De plus, ce procédé permet d'obtenir un réseau tridimensionnel soit sous la forme d'un hydrogel, dont la résistance peut *a priori* être modulable, soit sous la forme d'une éponge réhydratable après une étape de lyophilisation. Les résultats qui suivent vont définir l'influence du procédé sur la structure de la molécule de collagène et les propriétés microstructurales et mécaniques des hydrogels obtenus.

Pour conclure sur l'observation macroscopique des collagènes réticulés, la possibilité de réaliser des hydrogels grâce à l'utilisation de la mTG est encourageante pour la suite de cette étude. Ce type de support présente de nombreux intérêts car il trouve des applications dans des domaines variés et en

particulier dans les secteurs médicaux et pharmaceutiques. En effet, leur importante teneur en eau et leur structure souple les apparentent aux tissus naturels permettant leur utilisation en génie tissulaire (Peppas *et al.*, 2000 ; Van Vlierberghe *et al.*, 2011).

## 2.2 Influence de la réticulation sur la structure biochimique du collagène

### 2.2.1 Dosage OPA

Pour comparer les deux agents de réticulation et leur efficacité, un dosage OPA a été effectué sur les deux hydrogels obtenus. Ce dosage permet de comparer le nombre de fonctions amines présentes avant et après la réaction et ainsi évaluer le nombre de liaisons covalentes créées pour chacun des deux agents réticulant.

La Figure 78 compare le nombre moyen de fonctions amines retrouvées dans les échantillons. Les valeurs retrouvées sont significativement différentes entre les trois échantillons (Anova :  $p < 0,01$ ), le collagène natif montrant la valeur maximale avec  $2,54 \pm 0,07$  mM éq. leucine, suivi du collagène réticulé par la mTG avec  $1,99 \pm 0,04$  mM éq. leucine et enfin le collagène réticulé par le GTA avec  $0,18 \pm 0,02$  mM éq. Leucine. Ainsi, ces résultats confirment la formation de liaisons covalentes entre les molécules au cours de la réaction de réticulation. Plus précisément, le protocole utilisant le GTA permet d'en former plus que le protocole utilisant la mTG.

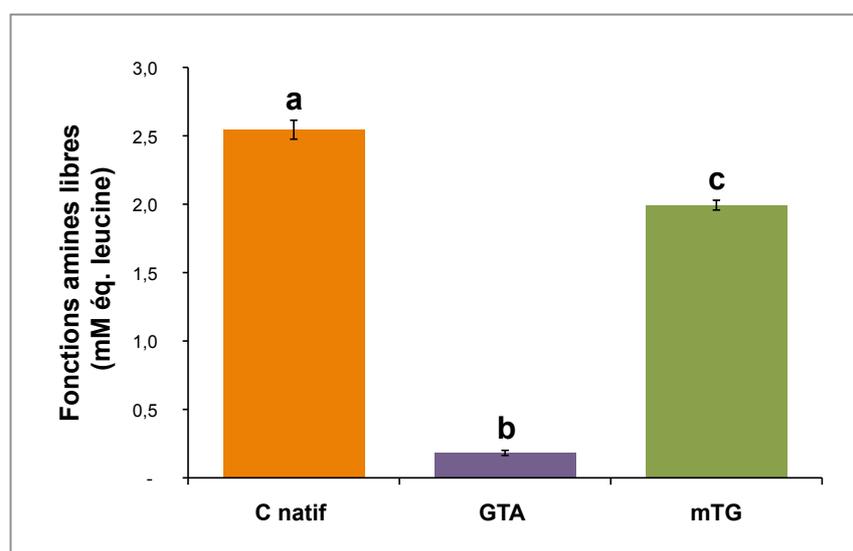


Figure 78. Pourcentages moyens de groupements amine libres avant et après la réticulation du collagène. C natif: collagène natif; GTA: hydrogel réticulé par le GTA 0; mTG: hydrogel réticulé par la mTG.

Le Tableau 48 présente les données sous la forme de pourcentages moyens de fonction amines liées au cours de la réaction de réticulation. Les résultats confirment les différences significatives déjà observées précédemment entre les deux protocoles. En effet, tandis que la réticulation par la mTG

permet de lier  $26,54 \pm 1,31\%$  des fonctions amines tandis que la réticulation par le GTA mobilise  $93,29 \pm 0,68\%$  des fonctions amines. Ces résultats indiquent que le GTA est plus efficace que la mTG.

Tableau 48. Pourcentage de fonctions amine liées lors de la réticulation du collagène natif par le GTA et par la mTG sur les hydrogels exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type. *Anova* :  $p < 0.001$ .

	% de fonctions amine consommées
collagène + GTA	$93,29 \pm 0,68^a$
collagène + mTG	$26,54 \pm 1,31^b$

La meilleure efficacité du GTA par rapport à la mTG est cohérente avec ce qui a déjà été démontré dans la littérature (Zeugolis *et al.*, 2009). En effet, le GTA réagit avec toutes les fonctions amines libres, et en priorité avec celles de la lysine (Silva *et al.*, 2004), tandis que la mTG est spécifique des fonctions amines de la lysine et de la glutamine. Par conséquent, le GTA est capable de former un nombre plus important de liaisons covalentes, en comparaison à l'enzyme. Cependant, même si le nombre de liaisons créées est plus faible, la réaction de réticulation par la mTG permet tout de même d'obtenir un hydrogel solide, comme l'ont montré les observations macroscopiques, démontrant ainsi le potentiel d'application de la mTG comme agent réticulant.

Par ailleurs, le choix s'est porté dans cette étude sur l'utilisation du dosage OPA mais la méthode au TNBS permet également de doser les fonctions amines et pourrait être utilisée pour évaluer les performances des agents de réticulation, comme le montrent les études de Damink *et al.* (1995) et Silva *et al.* (2004).

### 2.2.2 Analyses en RMN-HRMAS

La résonance magnétique nucléaire permet d'analyser la structure tridimensionnelle du collagène avec une résolution atomique. Du fait du protocole expérimental, elles n'ont pu être réalisées que sur les éponges de collagène.

#### 2.2.2.1 Éponge de collagène réticulé par la mTG

##### **Comparaison des spectres en 1D ou <sup>1</sup>H-RMN-HRMAS**

L'analyse RMN-HRMAS en 1D permet d'étudier la présence des protons ainsi que leur environnement chimique au sein de l'échantillon. Les spectres du collagène natif et de l'éponge de collagène réticulé par la mTG sont représentés sur la Figure 79. Le premier permet de distinguer les différents acides aminés présent dans l'échantillon, grâce à l'analyse de leurs déplacements chimiques respectifs. Ainsi, on retrouve les trois acides iminés caractéristiques du collagène : l'Hyp à 4,31 ppm, la Gly à 3,94, 2,98 et 2,25 ppm ainsi que la Pro à 3,62 et 2,07 ppm. En revanche, sur le deuxième spectre, un signal intense, qui masque les autres, est observé entre 3,25 et 4,25 ppm. Il correspond à celui de la

maltodextrine contenue dans la mTG qui n'est pas purifiée avant d'être utilisée dans le protocole d'obtention de l'éponge de collagène réticulé. Cette observation empêche donc toute analyse comparative des deux spectres obtenus.

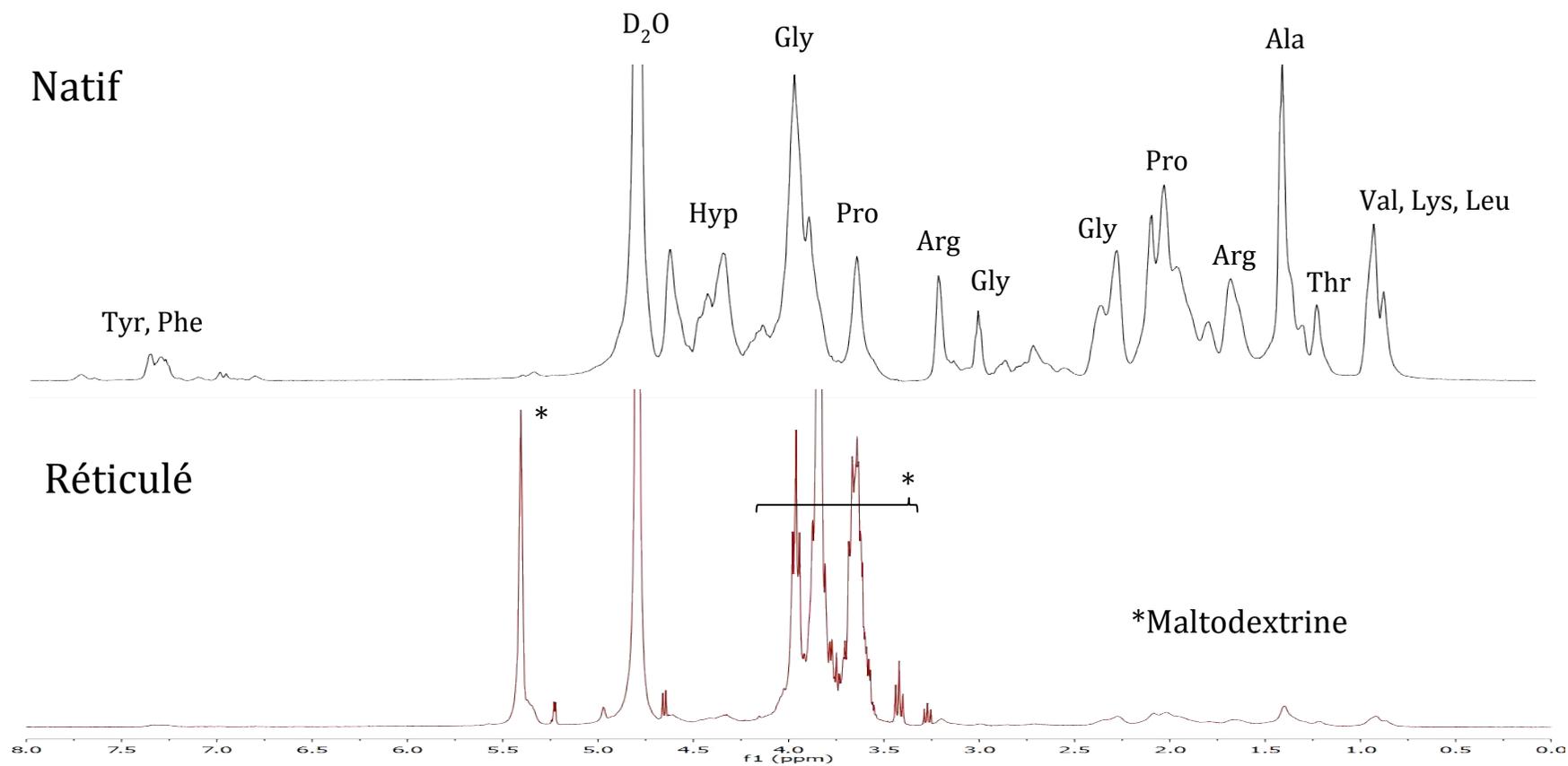


Figure 79. Spectres  $^1\text{H}$ -RMN-HRMAS du collagène natif et de l'éponge de collagène réticulé par la mTG. Les déplacements chimiques des atomes d'hydrogène sont représentés en abscisse et exprimés en parties par million (ppm).



**Comparaison des spectres en 2D ou  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -RMN-HRMAS**

À la différence des spectres en 1D présentés dans la section précédente, les spectres 2D en RMN-HRMAS permettent d'étudier la présence à la fois des protons et des noyaux carbones ainsi que leur environnement chimique, mettant en évidence les interactions directes entre les deux atomes. Les spectres obtenus pour le collagène natif et pour le collagène réticulé par la mTG sont présentés sur la Figure 80. Comme pour les spectres 1D, les différents acides aminés présents dans les échantillons sont identifiés grâce à leurs déplacements chimiques caractéristiques. Il n'y a pas de différence entre les deux spectres pour la plupart des acides aminés, sauf pour la glutamine et la lysine, signalées par des carrés rouge. Pour la glutamine, deux signaux présents sur le spectre du collagène natif à 4,19(H)/44,24(C) ppm et 3,88(H)/57,74(C) ppm n'apparaissent plus sur celui du collagène réticulé tandis que pour la lysine, un signal qui n'était pas présent sur le spectre du collagène natif, l'est sur celui du collagène réticulé à 1,31(H)/32,08(C) ppm.

Dans un premier temps, ces résultats donnent des informations sur les acides aminés présents dans l'échantillon. En effet, chaque pic est représentatif d'une interaction entre atomes et ces interactions peuvent mettre en jeu les atomes d'un seul acide aminé (interactions intra-résidu) ou les atomes d'acides aminés distincts (interactions inter-résidus). L'ensemble des pics générés par un acide aminé dans un spectre intra-résidu permet alors de caractériser partiellement le type de cet acide aminé. Ainsi, l'analyse du spectre du collagène natif confirme la présence des acides aminés caractéristiques du collagène (Gly, Hyp, et Pro) et retrouvés dans l'aminogramme présenté dans le Chapitre 2. Concernant le collagène réticulé, on ne retrouve pas de modification des déplacements chimiques associé à ces acides aminés indiquant que la réaction de réticulation ne modifie pas la structure moléculaire des chaînes polypeptidiques de collagène, et plus particulièrement la séquence peptidique.

Dans un deuxième temps, ces résultats permettent de mettre en évidence les sites impliqués dans la réticulation par la mTG. De ce fait, les deux spectres se distinguent par des différences majeures dans les déplacements chimiques de signaux correspondant aux terminaisons amines des groupements lysine et glutamine. Ces résultats préliminaires sont tout à fait concordant avec le mécanisme d'action de la mTG décrit dans la partie « Matériel et méthodes » et les résultats préalablement décrit dans la littérature (Collighan et Griffin, 2009 ; Lorand et Graham, 2003 ; Orban *et al.*, 2004 ; Stachel *et al.*, 2010). En effet, cette enzyme catalyse la formation de liaisons covalentes entre le groupement amine d'une glutamine et celui d'une lysine, conduisant à la modification de l'environnement chimique de ces acides aminés en particulier.

Ainsi, les résultats des analyses en RMN-HRMAS ont permis de confirmer la création de liaisons covalentes entre les molécules de collagène au cours de la réaction de réticulation par la mTG

sans modifier la structure moléculaire des chaînes polypeptidiques qui forment la triple hélice. Cependant, ces résultats donnent uniquement des indications sur la structure primaire des protéines et des analyses supplémentaires doivent donc être réalisées afin d'étudier dans quelle mesure la création de liaisons entre les molécules influe sur la structure tridimensionnelle du réseau.

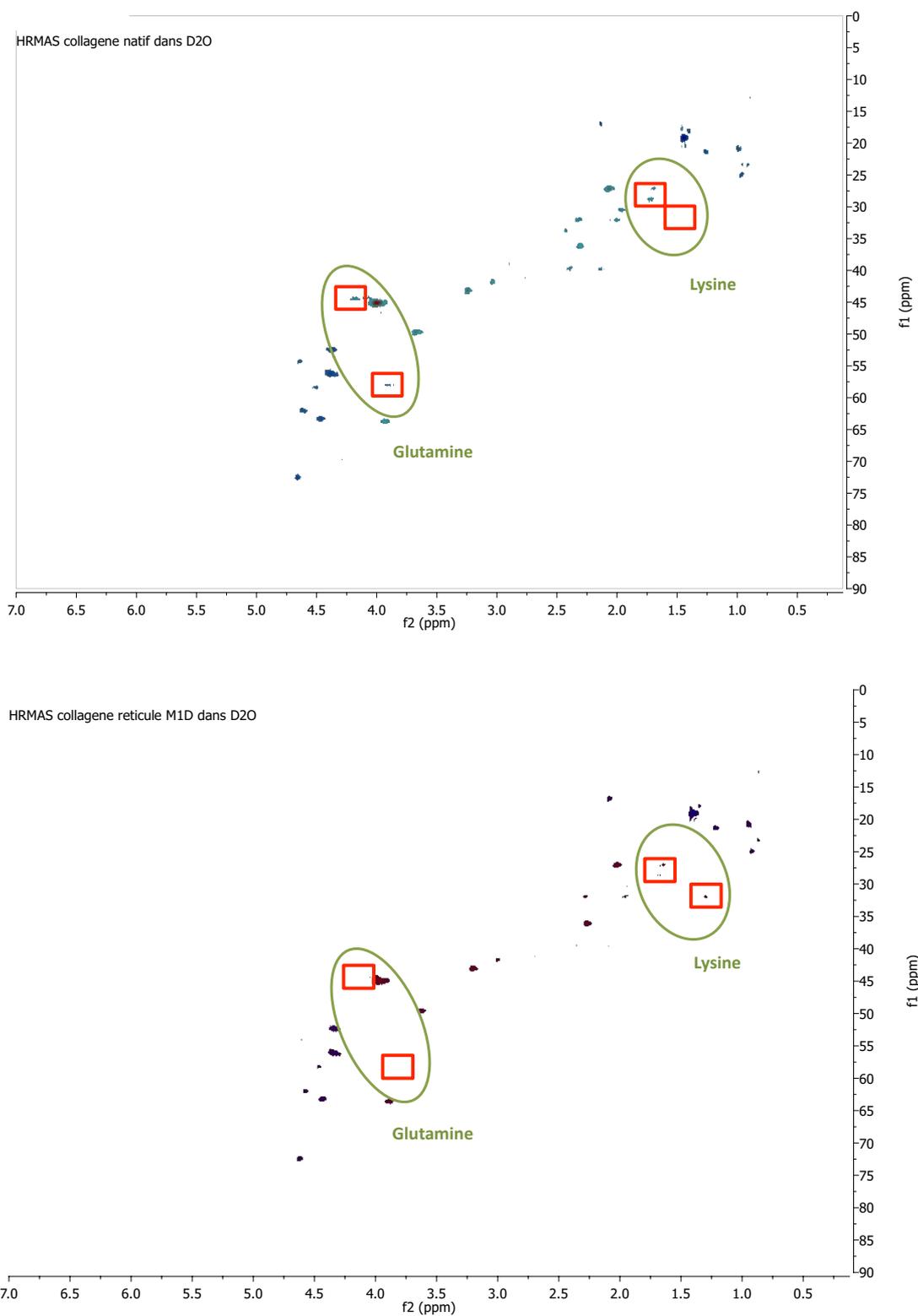


Figure 80. Comparaison des spectres  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -RMN-HRMAS (HSQC – direct C-H) obtenus pour le collagène natif lyophilisé (en haut) et l'éponge réticulée par la mTG (en bas). Les déplacements chimiques des atomes d'hydrogène sont représentés en abscisse et ceux des atomes de carbone en ordonnée, exprimés en parties par million (ppm). Les rectangles rouges indiquent les différences majeures observables entre le collagène natif et l'éponge réticulée.

### 2.2.2.2 Éponge de collagène réticulée par le GTA

#### **Comparaison des spectres en 1D ou <sup>1</sup>H-RMN-HRMAS**

Contrairement au spectre des échantillons réticulés par la mTG, le spectre des échantillons de collagène réticulé par le GTA a pu être comparé à celui du collagène natif. En effet, ce protocole comprend une étape de rinçage de l'éponge afin d'éliminer les résidus toxiques de GTA qui n'apparaissent donc pas sur le spectre.

Les spectres sont représentés sur la Figure 81. En 1D, on observe que le signal à 2,98 ppm et correspondant à la Gly n'est plus présent sur le collagène réticulé par le GTA. On observe également une inversion au niveau des signaux 1,27 et 1,46 ppm, correspondant à l'alanine et à la thréonine. Pour le collagène natif, le signal à 1,46 ppm est moins intense que celui à 1,27 ppm avec un rapport de 0,74 entre les intensités. Pour le collagène réticulé par le GTA, le signal à 1,27 ppm est plus intense que celui à 1,46 ppm avec un rapport de 1,46 entre les intensités. Or, la résonance des protons liés à ces acides aminés (alanine et thréonine) est proche de celle des protons liés à la lysine, un acide aminé impliqué dans la réaction de réticulation du collagène par le GTA. Ainsi, même si des changements directs ne sont pas observables en RMN 1D concernant la lysine, ces résultats montrent que la réticulation au GTA entraîne des changements de l'environnement protonique de certains acides aminés, dont la résonance est proche de la lysine. L'analyse en RMN 2D est alors nécessaire pour avoir des informations plus précises.

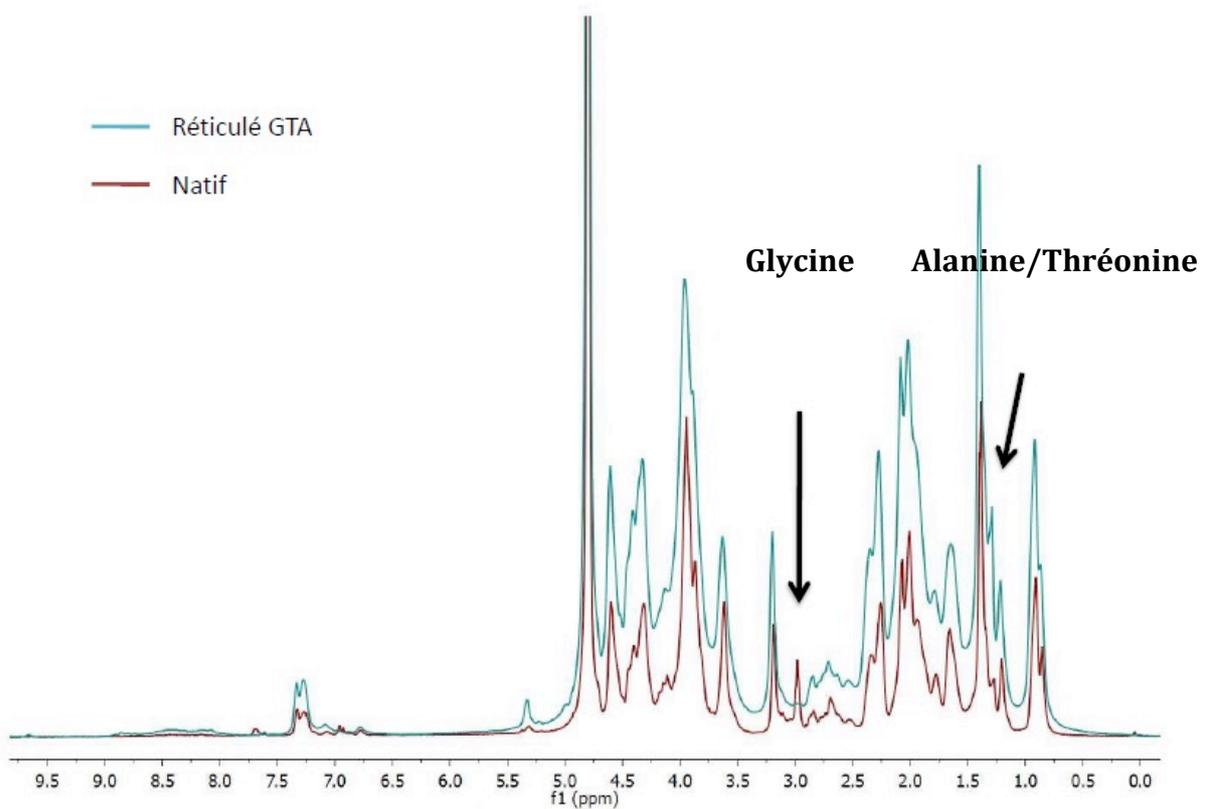


Figure 81. Comparaison des spectres  $^1\text{H}$ -RMN-HRMAS obtenus pour le collagène natif lyophilisé (en rouge) et l'éponge réticulée par le GTA 0.5% (en bleu). Les déplacements chimiques des atomes d'hydrogène sont représentés en abscisse et exprimés en parties par million (ppm). Les flèches indiquent les deux différences majeures observables entre le collagène natif et l'éponge réticulée.

#### Comparaison des spectres en 2D ou $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -RMN-HRMAS

Les spectres des échantillons de collagène natif et de collagène réticulé par le GTA analysés en résonance magnétique 2D sont présentés sur la Figure 82. Les différences observées concernent la glutamine, la lysine et la glycine. Concernant la glutamine, le signal à 3,88(H)/57,74(C) ppm apparaît sur le collagène natif mais pas sur le collagène réticulé par le GTA. De la même manière, le signal à 3,03(H)/41,93(C) ppm correspondant à la glycine, apparaît uniquement sur le collagène natif, confirmant un changement dans l'environnement de cet acide aminé également observé sur le spectre 1D. En revanche, le signal à 1,34(H)/31,97(C) ppm correspondant à la lysine apparaît seulement pour le collagène réticulé par le GTA. Cette observation est cohérente avec le mécanisme d'action du GTA, qui réagit en priorité avec les groupements amines de cet acide aminé (Silva *et al.*, 2004).

Les analyses en RMN-HRMAS ont donc permis de mettre en évidence les sites impliqués dans la réticulation par le GTA, confirmant ainsi l'implication des groupements lysine dans la réaction (Silva *et al.*, 2004).

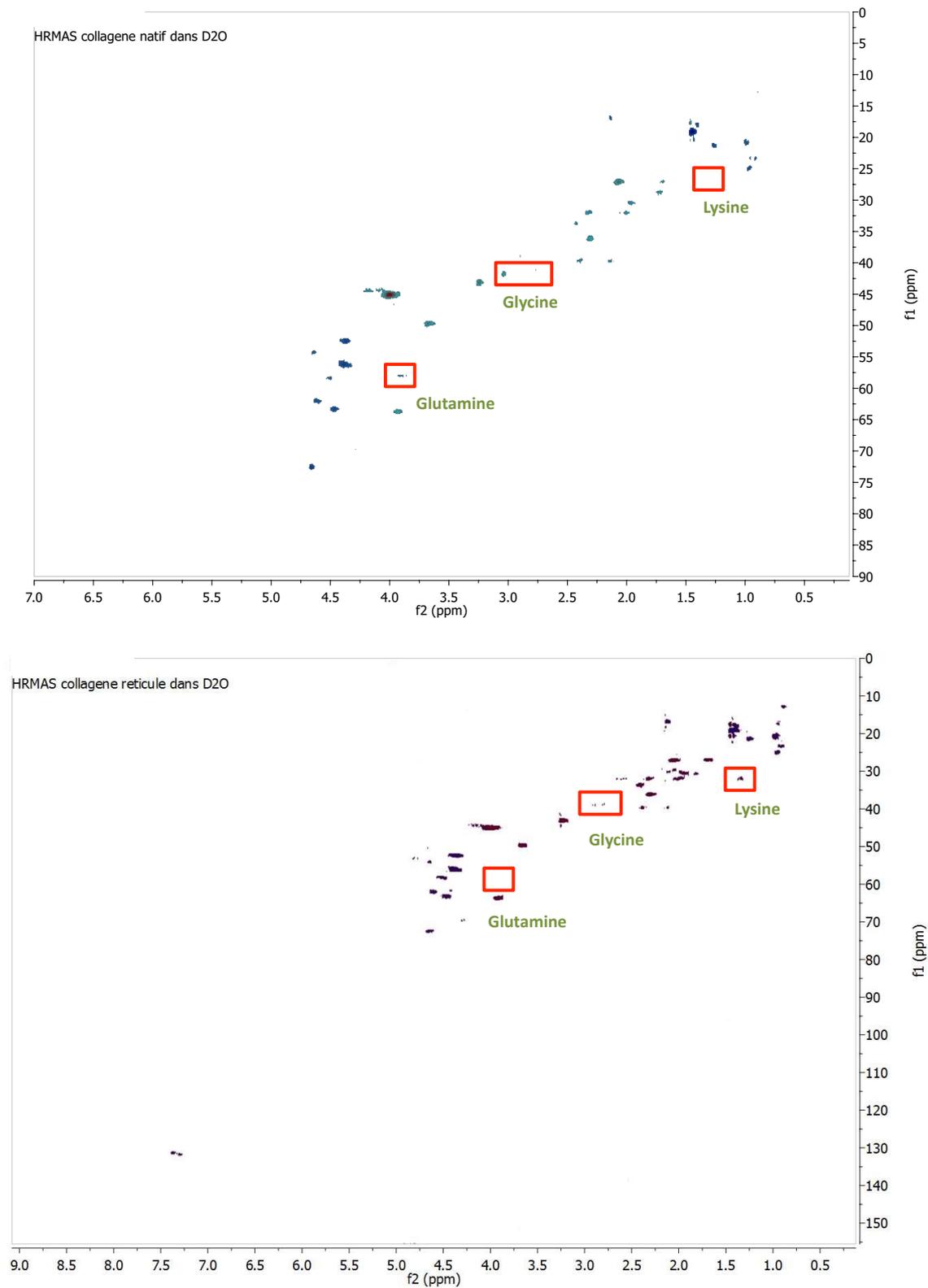


Figure 82. Comparaison des spectres 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -RMN-HRMAS (HSQC – direct C-H) obtenus pour le collagène natif lyophilisé (en haut) et l'éponge réticulée par le GTA 0.5% (en bas). Les déplacements chimiques des atomes d'hydrogène sont représentés en abscisse et ceux des atomes de carbone en ordonnée, exprimés en parties par million (ppm). Les rectangles rouges indiquent les deux différences majeures observables entre le collagène natif et l'éponge réticulée.

Pour aller plus loin concernant l'analyse en RMN-HRMAS des collagènes réticulés sous forme déshydratés par la mTG et le GTA, on peut considérer que la lyophilisation n'a pas d'influence sur la structure biochimique du collagène. Ainsi, les résultats observés ici pourront s'appliquer également aux hydrogels, à condition qu'ils soient préparés dans du D<sub>2</sub>O plutôt que dans l'eau. En effet, le pic généré par la présence d'eau écraserait alors les spectres, comme c'est le cas pour la maltodextrine présente dans la mTG.

### **2.2.3 Analyses en FTIR**

Les analyses en spectroscopie infrarouge permettent d'analyser la structure chimique du collagène. L'équipement ne permettant des analyses que sur des échantillons déshydratés, celles-ci n'ont été réalisées que sur les éponges.

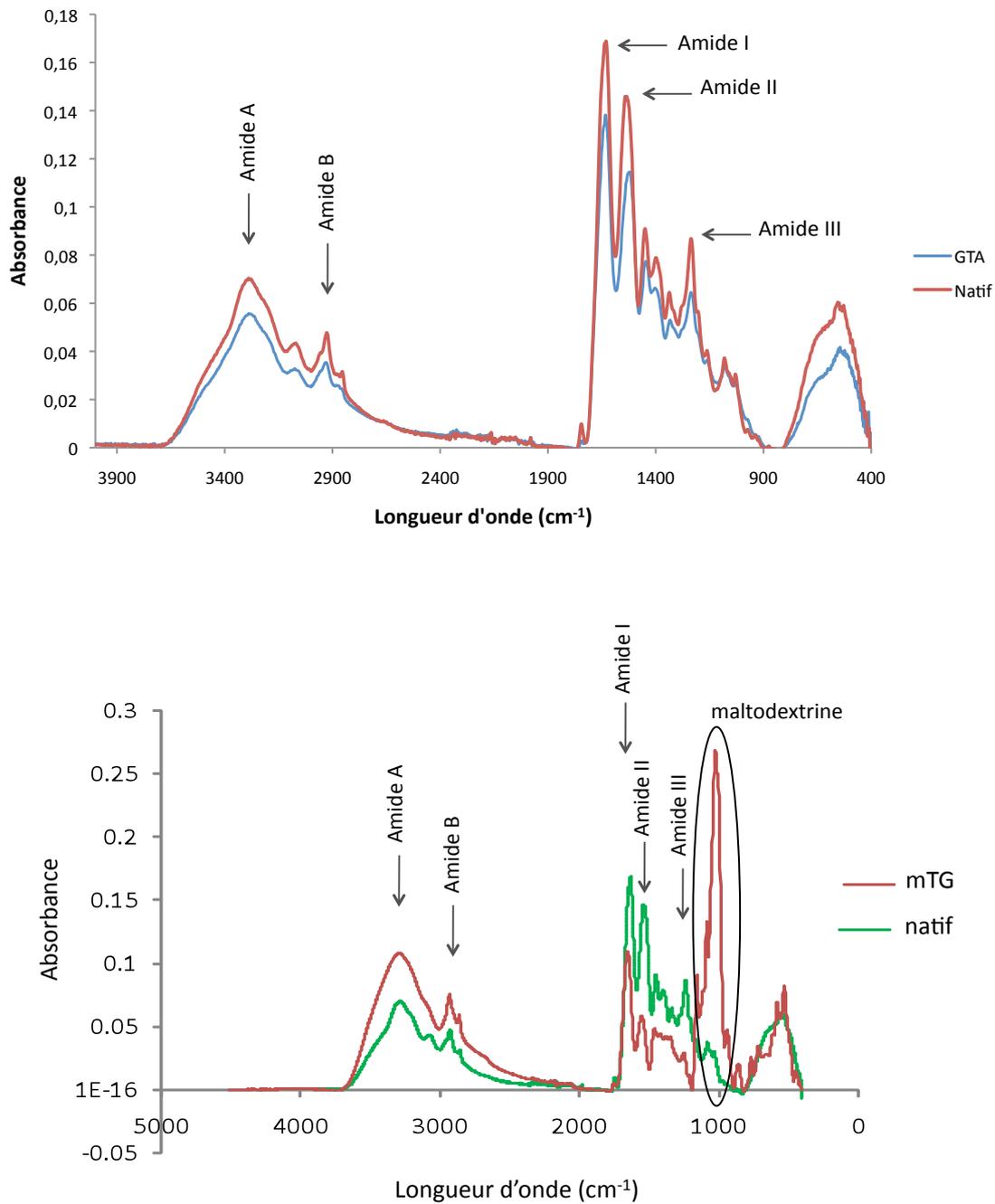


Figure 83. Comparaison des spectres FTIR-ATR du collagène natif et des éponges réticulées par le GTA (en haut) et la mTG (en bas).

Les spectres obtenus en FTIR (4000-400 cm<sup>-1</sup>) pour les collagènes réticulés par le GTA et la mTG sont présentés sur la Figure 83. Plus précisément, chacun présente trois pics majeurs d'absorption correspondant aux amides I, II et III ainsi que deux autres pics correspondant aux amides A et B. L'ensemble de ces bandes d'absorption est observé pour tous les spectres car

elles sont caractéristiques des échantillons de nature protéique (Muthukumar *et al.*, 2014). Puisque la réaction de réticulation, que ce soit par le GTA ou la mTG, n'influence pas la teneur en protéines de l'échantillon, il est donc logique de retrouver ces pics sur les échantillons de collagène avant et après réticulation. Ainsi, chacun des deux spectres de collagène réticulé (GTA et mTG) se superposent au spectre de collagène natif. Cependant, le spectre de collagène réticulé par la mTG présente des pics d'absorptions supplémentaires qui peuvent s'expliquer par des signaux provoqués par la maltodextrine présente dans la mTG et observés à 1150, 1078 et 1016  $\text{cm}^{-1}$  (Krishnaiah *et al.*, 2012).

Les déplacements chimiques des amides de chacun des spectres sont détaillés dans le Tableau 49.

Tableau 49. Déplacements chimiques des amides pour les échantillons de collagène natif et réticulés analysés.

Région du spectre	Collagène natif	Collagène réticulé GTA	Collagène réticulé mTG
Amide I	1630 $\text{cm}^{-1}$	1633 $\text{cm}^{-1}$	1644 $\text{cm}^{-1}$
Amide II	1534 $\text{cm}^{-1}$	1520 $\text{cm}^{-1}$	1544 $\text{cm}^{-1}$
Amide III	1235 $\text{cm}^{-1}$	1236 $\text{cm}^{-1}$	1242 $\text{cm}^{-1}$
Amide A	3289 $\text{cm}^{-1}$	3288 $\text{cm}^{-1}$	3275 $\text{cm}^{-1}$
Amide B	2926 $\text{cm}^{-1}$	2928 $\text{cm}^{-1}$	2918 $\text{cm}^{-1}$
amide III/1450 $\text{cm}^{-1}$	0,85	0,83	0,61
Maltodextrine	-	-	1150, 1078 et 1016 $\text{cm}^{-1}$

Pour les échantillons de collagène natif et réticulé par le GTA, le rapport entre l'absorbance de l'amide III et l'absorbance de la bande résonnant autour de 1450  $\text{cm}^{-1}$  se situe aux alentours de 1 (0,85 et 0,83, respectivement), révélant la préservation de la structure secondaire en triple hélice du collagène (Guzzi Plepis *et al.*, 1996). Pour la réticulation par la mTG ce ratio est plus faible avec une valeur de 0,61, indiquant la conservation d'une proportion moins importante de triples hélices en comparaison avec les deux autres échantillons. Ces observations révèlent une

spécificité du protocole de réticulation par la mTG. En effet, cette valeur inférieure retrouvée est due à une absorbance de l'amide III relativement plus faible dans l'échantillon réticulé par la mTG qui indique alors un nombre de liaisons intramoléculaires plus faibles dans l'échantillon. En effet, les agents de réticulation sont connus pour inhiber partiellement ou totalement la formation de la triple hélice de collagène (Gómez-Guillén *et al.*, 2001). Dans le cas de la mTG, cela peut s'expliquer plus précisément par le mode de réticulation de l'enzyme qui rapproche les molécules entre elles pour former des structures de plus haut poids moléculaire, conduisant à un nombre de liaisons intermoléculaires supérieur au nombre de liaisons intramoléculaires. Cette hypothèse a été décrite par (Ledward, 1986), qui précisent également que ce sont ces mêmes liaisons qui aident à rendre le réseau plus stable. Ainsi, des auteurs comme Gómez-Guillén *et al.* (2001) et Jongjareonrak *et al.* (2006) ont pu observer la formation de structures de plus haut poids moléculaire (supérieur à 300 kDa) en SDS-PAGE, au détriment des sous-unités  $\gamma$  et  $\beta$ . Il serait donc intéressant d'étudier plus précisément en FTIR l'influence de l'enzyme sur la structure tridimensionnelle de la molécule de collagène, en testant différentes concentrations en enzyme par exemple. Ainsi, l'équipe de (Uriarte-Montoya *et al.*, 2010) a observé l'influence de différentes concentrations en chitosan sur du collagène de calmar pour former des films. De la même manière, (Fernandes-Silva *et al.*, 2013) ont observé des degrés de réticulation d'un collagène de requin plus importants en augmentant les concentrations en génépine, utilisée comme agent réticulant. C'est, par ailleurs, ce qui a déjà été observé macroscopiquement sur les hydrogels de collagène réticulé par la mTG en augmentant la concentration en enzyme (section 2.1.1.1.). En effet, plus la concentration en enzyme augmentait et plus les hydrogels présentaient une meilleure tenue.

Plus généralement, le Tableau 50 regroupe les informations concernant les fonctions chimiques correspondant à chaque amide observé sur les spectres FTIR.

Tableau 50. Attribution des fonctions chimiques pour chaque amide retrouvée sur les spectres des collagènes natif et réticulés étudiés.

Région du spectre	Fonctions chimiques	Référence
Amide I	Vibrations des groupes CO des polypeptides	Payne et Veis, 1988
	Marqueur de la structure II des peptides	Veeruraj <i>et al.</i> 2013
	Liaison H entre NH et CO : responsable de la formation en triple hélice	Zanaboni <i>et al.</i> , 2000
Amide II	Vibrations des groupes NH liés aux CN	Muyonga <i>et al.</i> , 2004b
Amide III	Interactions intermoléculaires résultant des liaisons amide	Guzzi Plepis <i>et al.</i> 1996
	Vibrations des CH <sub>2</sub> de la glycine et de la proline	
Amide A	Vibrations des groupes avec un hydrogène	Doyle <i>et al.</i> , 1975
	Si NH + OH (niveau peptide) -> $\approx 3300\text{ cm}^{-1}$	
Amide B	CH <sub>2</sub> asymétriques	Muyonga <i>et al.</i> 2004b
amide III / bande à 1450 cm <sup>-1</sup>	Si $\approx 1$ -> conservation de la triple hélice	Guzzi Plepis <i>et al.</i> 1996

Ainsi, ces résultats montrent principalement des différences entre les collagènes natifs et réticulés par la mTG. Plus précisément, le rapport entre l'intensité de l'amide III / bande à 1450 cm<sup>-1</sup> révèle une augmentation du nombre de liaisons intermoléculaires dans le réseau, et provoquée par la réaction de réticulation, qui traduirait la formation de structures de haut poids moléculaire.

Globalement, les analyses en RMN-HRMAS et FTIR permettent, dans le cas de la réticulation par la mTG, de détecter sa présence et confirmer le succès de la réticulation comme ont pu le faire d'autres études (Uriarte-Montoya *et al.*, 2010 ; Fernandes-Silva *et al.*, 2013). Plus précisément, elles permettent d'observer des changements dans l'environnement des acides aminés impliqués dans la réaction de réticulation ainsi qu'une augmentation du nombre de liaisons inter-moléculaires laissant penser à un rapprochement des molécules de collagènes provoqué par la formation de liaisons, en comparaison avec le collagène natif. L'ensemble de ces résultats indique donc des changements survenus au cours de la réaction de réticulation dans la structure 3D du réseau, sans préciser dans quelle mesure ils influent sur ses propriétés mécaniques. Il est donc nécessaire de réaliser des analyses supplémentaires pour évaluer cet aspect.

Pour aller plus loin dans l'interprétation, on peut considérer que la lyophilisation n'a pas d'influence sur la structure biochimique du collagène et que les résultats observés peuvent également s'appliquer aux hydrogels de collagène réticulé.

## **2.3 Caractérisation de la microstructure et des propriétés mécaniques des hydrogels de collagène réticulé par la transglutaminase**

Les analyses suivantes portent uniquement sur le procédé de réticulation par la mTG car c'est celui qui sera favorisé pour une application biotechnologique future. Comme expliqué précédemment, l'objectif du projet Pesk&Co s'inscrit dans une approche qui privilégie des procédés alternatifs utilisant des conditions douces (en terme de pH et de température), ainsi que des réactifs moins cytotoxiques.

### **2.3.1 Observation de la microstructure des collagènes natif et réticulés en microscopie électronique à balayage (MEB)**

La MEB, a été réalisée sur des échantillons solides permettant ainsi de comparer la microstructure du collagène natif lyophilisé à l'éponge de collagène réticulé par la mTG.

La Figure 84 compare les images obtenues en MEB du collagène natif lyophilisé et de l'éponge de collagène réticulé par la mTG. Il s'agit ici de résultats préliminaires, qui demanderont à être confirmés par de nouvelles expérimentations. L'objectif était d'observer l'influence de la réticulation sur le réseau tridimensionnel des protéines. Les images en MEB montrent que le collagène réticulé présente une microstructure plus dense et plus régulière, indiquant que la réaction de réticulation influence la morphologie du réseau. Une augmentation de la densité du réseau a également été décrite par (Jongjareonrak *et al.*, 2006) sur des gélatines extraites de deux espèces de vivaneaux (*Priacanthus macracanthus* et *Lutjanus vitta*) et réticulées par la mTG. Gómez-Guillén *et al.* (2001) ont constatés les mêmes observations sur de la gélatine de cardine (*Lepidorhombus bosci*) réticulée également par la mTG. Ces derniers associent cette augmentation de densité au phénomène de réticulation des protéines. Dans le cas présent, les triples hélices de collagène sont rapprochées par la création de liaisons entre les structures.

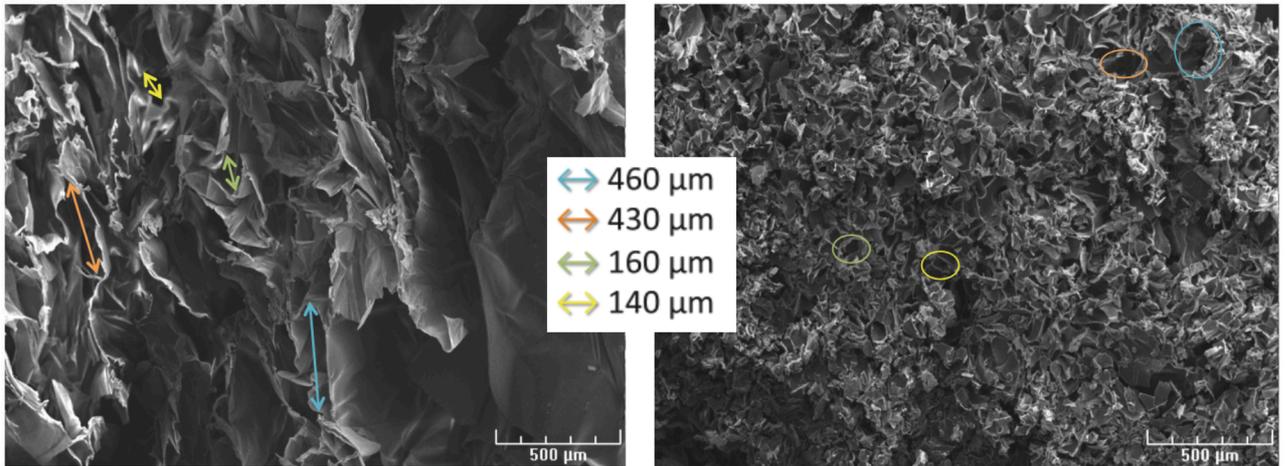


Figure 84. Comparaison du collagène natif lyophilisé (à gauche) à l'éponge de collagène réticulé par la mTG (à droite) observés en MEB.

Plus précisément, les différences les plus visibles sont observées au niveau du maillage du réseau. La présence de quelques fibres a également été observée en MEB pour les deux échantillons. Concernant la taille moyenne des pores constituant les mailles du réseau, elles sont détaillées dans le Tableau 51 pour chacun des collagènes. Il s'agit de mesures approximatives qui n'ont pas été obtenues par un logiciel d'analyse d'image. Elles donnent seulement un ordre de grandeur et demandent à être interprétées avec précaution.

Tableau 51. Comparaison de la taille des pores et des fibres du collagène natif lyophilisé et de l'éponge de collagène réticulé par la mTG, observées en MEB.

	Collagène natif	Collagène mTG
Taille des pores (μm)	400 - 100	100 - 40

La réaction de réticulation modifie la taille des pores qui semble diminuer dans le cas du collagène réticulé. La création de liaisons entre les molécules de collagène provoquant le rapprochement de celles-ci pourrait expliquer l'augmentation de la densité du réseau et la présence de pores au diamètre plus petit. De plus, cette hypothèse est en accord avec les observations en FTIR qui montrent l'augmentation du nombre de liaisons intermoléculaire.

Ainsi, ces résultats permettent de démontrer que la réticulation par la mTG conserve la porosité du réseau tout en modifiant sa morphologie qui devient plus dense. Ces changements globaux

sont la conséquence de la diminution du diamètre des pores qui deviennent plus petits et dont les tailles varient moins.

L'effet inverse est observé par (Ma, 2003) avec l'utilisation du GTA comme agent de réticulation d'un collagène de bœuf. En effet, les auteurs ont montré que la taille moyenne des pores passait de 100  $\mu\text{m}$  pour le collagène non réticulé à plus de 200  $\mu\text{m}$  pour les éponges réticulées. De la même manière, Fernandes-Silva *et al.* (2013) observent après une réticulation par la génépine d'un collagène de requin, une multiplication par un facteur deux de la taille des pores qui passe de 50 à 100  $\mu\text{m}$ . Néanmoins, Zhang *et al.* (2007) ont attribué les différences des tailles de pores à différentes concentrations de collagène avant la lyophilisation. En effet, ces auteurs ont montré que la taille des pores augmentait avec l'augmentation de la teneur en eau dans la préparation initiale de collagène. Par ailleurs, Ma (2003) a observé qu'une lyophilisation supplémentaire peut induire l'agrégation des fibres de collagène qui se combinent alors pour former des feuilles, ce qui conduit à la fusion de certains des pores pour en générer des plus grands. Pour toutes ces raisons, il est difficile de comparer les différentes données de la littérature et il est alors préférable de tenir compte de la morphologie des éponges en fonction des applications biomédicales ciblées.

Plus généralement, la caractérisation morphologique de la microstructure du réseau est un des paramètres les plus importants des matériaux pour leur utilisation en régénération des tissus. En effet, il est reconnu que les propriétés de la microstructure telle qu'une porosité adéquate et plus précisément la taille moyenne et la forme des pores ainsi que leurs interconnexions sont tout autant d'éléments à prendre en compte pour l'ensemencement des cellules, leur migration, leur prolifération, l'expression des gènes et la formation de nouveaux tissus (Chen *et al.*, 2002 ; Fernandes-Silva *et al.*, 2013 ; Ma, 2003 ; Muthukumar *et al.*, 2014 ; Song *et al.*, 2006 ; Veeruraj *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2007). Globalement, une matrice hautement poreuse est un bon support pour la croissance et la prolifération cellulaire car la taille des vides permet une bonne pénétration des cellules. Plus particulièrement, il a été rapporté que la taille des pores, pour une croissance optimale des cellules, doit être au moins légèrement supérieure à celui de la cellule elle-même. Par exemple, une taille entre 300 et 400  $\mu\text{m}$  a été signalée comme étant adaptée à la croissance des ostéoblastes (Yaylaoglu *et al.*, 1999). D'autre part, une taille de pores comprise entre 50 et 150  $\mu\text{m}$  est jugée optimale pour l'amélioration de la production des matrices extracellulaires (Ma, 2003; Muthukumar *et al.*, 2014). Néanmoins, les pores d'environ 100  $\mu\text{m}$  de large d'une éponge vont certainement devenir plus large en étant réhydraté dans le milieu de culture cellulaire (Yaylaoglu *et al.*, 1999). Ainsi, les deux types de collagène, que ce soit avant ou après réticulation, semblent présenter une morphologie adéquate pour l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative. La microstructure du collagène réticulé très poreuse,

présentant des tailles de pores comprises entre 50 et 100  $\mu\text{m}$  et une grande interconnectivité, devrait être appropriée pour la croissance des cellules (Fernandes-Silva *et al.*, 2013).

Concernant une utilisation du collagène comme vecteur pour les substances médicamenteuses, sa microstructure doit présenter un réseau régulier, et proportionnel à la dose de médicaments à distribuer. Les éponges doivent être dotées de pores uniformes, réguliers et alvéolés. De telles matrices sont favorables, non seulement pour la diffusion des substances, mais aussi à l'évaporation des liquides (Veeruraj *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2007). En prenant la structure du réseau en compte, l'éponge de collagène réticulé semble là aussi avoir de meilleures propriétés pour la distribution de substances médicamenteuses que le collagène natif.

Pour conclure, la réticulation du collagène de saumon par la mTG confère des avantages à sa microstructure pour une utilisation comme dispositif médical.

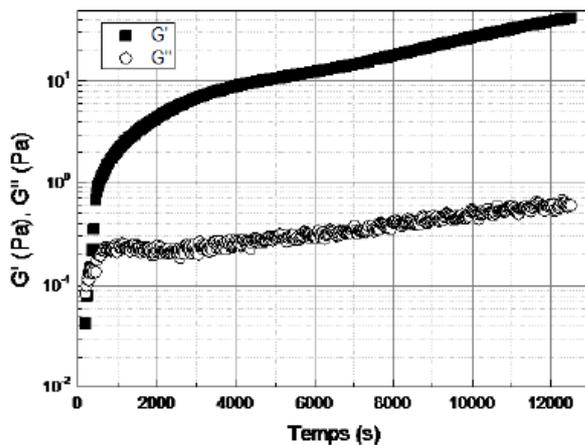
### 2.3.2 Analyses rhéologiques

Les analyses en rhéologie ont été réalisées sous la direction du Pr. Thierry Aubry, avec l'aide de M. Philippe Roquefort au LIMAT B (Université de Bretagne Occidentale). Elles consistent à mesurer les modules visco-élastiques des échantillons étudiés. Le module  $G'$  décrit le comportement élastique de l'hydrogel et est associé à la conservation de l'énergie tandis que le module  $G''$  reflète la viscosité de l'hydrogel et est associé à la dissipation de l'énergie (Chen *et al.*, 2011). Dans cette section, l'accent sera mis sur l'étude du module élastique car c'est un paramètre déterminant pour des applications en régénération tissulaire (Engler *et al.*, 2006).

#### 2.3.2.1 . Étude de la réaction de réticulation

(a) Détermination de la cinétique de gélification de l'hydrogel réticulé par la mTG

La Figure 85 représente l'évolution des modules viscoélastiques de la solution de collagène et de mTG au cours de la réaction de réticulation. À  $t=5$  min, le module élastique ( $G'$ ) est égal au module visqueux ( $G''$ ) indiquant la formation d'un gel. Celui-ci se forme donc dès les premières minutes consécutives au mélange des solutions de collagène et d'enzyme. Ensuite, les valeurs de  $G'$  restent supérieures à celle de  $G''$ , indiquant le maintien de la solution sous forme d'un gel. Ces résultats traduisent le mécanisme d'action de l'enzyme. En effet, au début de la réaction, tous les résidus lysine et glutamine sont disponibles mais au fur et à mesure, ils sont moins nombreux à être libres et la probabilité de former des liaisons diminue, ce qui explique la stabilisation du module  $G'$ . Ces observations ont été confirmées par Bode *et al.* (2011) sur du collagène de tilapia réticulé par la mTG.



Temps	G' (Pa) Elasticité	G'' (Pa) Viscosité
~300 s (5 min)	0,1	0,1
1 h	8	0,2
2 h	15	0,3
3 h	32	0,5
3 h 28	42	0,6

Figure 85. Cinétique de la gélification de l'hydrogel de collagène réticulé par la mTG à 20°C.

L'hydrogel de collagène réticulé présente un comportement "pseudo-élastique" (Sirbu *et al.*, 2008), caractérisé par une augmentation importante des modules viscoélastiques dans la première demi-heure de réticulation puis un ralentissement de l'augmentation de la valeur des deux modules au cours du temps.

Ces mesures permettent de mettre en évidence la formation rapide de liaisons covalentes à partir du moment où le collagène et l'enzyme sont mis en contact et cela, même à 20°C, alors que la température d'activité optimale de la mTG est située autour de 50°C.

(b) Impact du temps de gélification sur les propriétés viscoélastiques du collagène réticulé après un cycle de congélation-décongélation

La Figure 86 représente les modules  $G'$  des hydrogels après 1h, 2h et 3h de réticulation. Les hydrogels obtenus après 2h et 3h se distinguent nettement de l'hydrogel obtenu après 1h de réaction. En revanche, il y a peu de différences entre les modules élastiques des échantillons après 2h de réaction et ceux après 3h. Ces résultats indiquent que le temps de réaction entre l'enzyme et le collagène doit être d'au moins 2h pour que l'hydrogel présente une valeur  $G'$  maximale, et par conséquent, que l'hydrogel soit stable et montre les propriétés mécaniques optimales pour ce ratio collagène/mTG. Cependant, même si le module  $G'$  semble montrer une valeur stable au-delà de 2h de réaction, cette observation peut également être due aux contraintes imposées par la création de liaisons covalentes et qui empêcheraient l'accès pour l'enzyme à de nouveaux sites de liaison (Bode *et al.*, 2011).

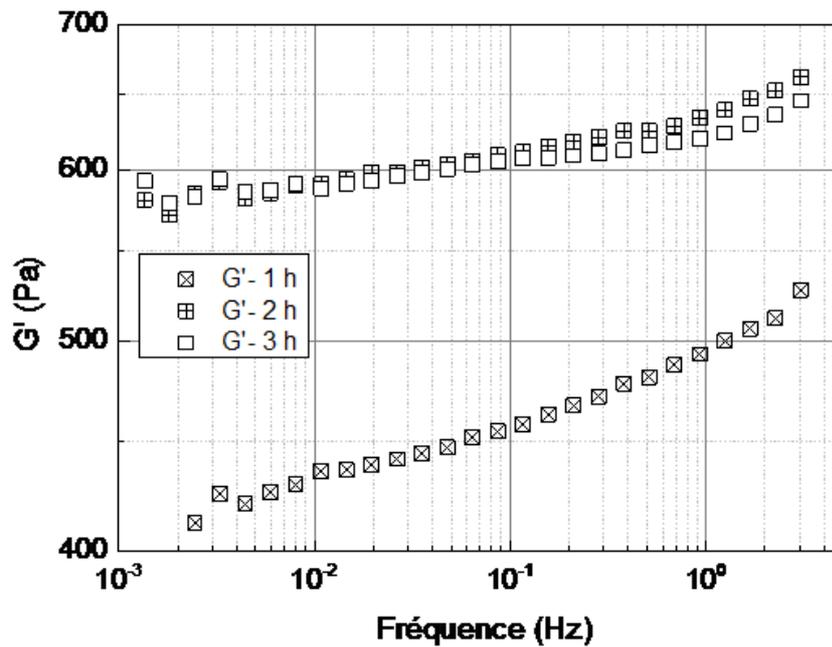


Figure 86. Evolution du module élastique en fonction de la fréquence et du temps de réaction de la mTG avant congélation de l'hydrogel de collagène réticulé.

Ainsi, ce type de mesures pourrait être utilisé dans le but d'optimiser les concentrations en enzyme et en collagène dans la réaction de réticulation afin d'éviter un excès de réactifs (enzyme ou collagène), tout en permettant de former le maximum de liaisons covalentes possibles dans le réseau.

(c) Etude de reproductibilité des propriétés élastiques du collagène réticulé après un cycle de congélation/décongélation

Le Tableau 52 présente les modules élastiques de huit hydrogels obtenus à partir du même protocole, afin d'évaluer sa reproductibilité. Le module élastique moyen entre les huit échantillons est de  $691 \text{ Pa} \pm 53$ . Ces résultats montrent que la reproductibilité du protocole utilisé est acceptable, du point de vue rhéologique, et qu'il permet d'obtenir à chaque fois des réseaux tridimensionnels aux propriétés mécaniques similaires.

Tableau 52. Modules élastiques  $G'$  mesuré pour huit d'hydrogels de collagène réticulés par la mTG et après un cycle de congélation/décongélation.

	$G'$ (Pa) Elasticité
Échantillon 1	690
Échantillon 2	750
Échantillon 3	665
Échantillon 4	710
Échantillon 5	740
Échantillon 6	730
Échantillon 7	640
Échantillon 8	600
Moyenne ( $\pm$ écart-type)	691 $\pm$ 53

Par ailleurs, la courbe de température de 20 à 90°C (résultats non présentés) montre qu'il n'y a pas d'influence d'une augmentation de la température sur les propriétés élastiques de l'hydrogel, et ce, même au-delà de la température de fusion du collagène qui est de 13,5°C (cf Chapitre 2). Ainsi, la création de liaisons covalentes dans le réseau permet de stabiliser et par conséquent, d'augmenter sa température de fusion, en comparaison avec le collagène natif non réticulé. Ces données montrent également l'irréversibilité des liaisons créées. Ces observations ont déjà été montrées dans d'autres études comme celle de (Nomura *et al.*, 2001) sur du collagène de requin réticulé par la mTG, dont les auteurs ont pu observer en calorimétrie différentielle à balayage, une augmentation de la température de dénaturation du collagène de 2°C après réticulation. Gomez-Guillen *et al.* (2001) ont également observé une augmentation des modules viscoélastiques de la gélatine de cardine (*Lepidorhombus bosci*) réticulée par la mTG, par rapport à la gélatine non réticulée, et attribuent également ce phénomène à l'action de l'enzyme qui crée des structures de haut poids moléculaire stabilisées par de nombreuses liaisons covalentes nécessitant alors une température plus élevée pour les dissocier.

L'ensemble de ces analyses en rhéologie ont ainsi permis de comprendre le mécanisme réactionnel entre l'enzyme et le collagène, et de vérifier la reproductibilité du protocole. Ces outils pourront également être utilisés pour une optimisation ultérieure des conditions expérimentales.

#### 2.3.2.2 . Caractérisation des modules élastique des collagènes réticulé et comparaison avec le collagène natif

Le Tableau 53 compare les modules élastiques ainsi que l'aspect visuel des hydrogels de collagène natif (à 4°C et 20°C) et celui des hydrogels réticulés par la mTG avec et sans cycle de

congélation/décongélation. Ces mesures sont des essais préliminaires et il n'y a donc pas eu de répétitions.

Tableau 53. Comparaison des modules élastique du collagène natif à 4°C et 20°C et du collagène réticulé à 20°C avant et après un cycle de congélation-décongélation.

	G' (Pa) Elasticité	Aspect
Collagène natif à 20°C	4.10 <sup>-3</sup>	Liquide
Collagène natif à 4°C	50	Gel
Collagène réticulé à 20°C	35	Gel
Collagène réticulé + cycle congélation/décongélation à 20°C	650	Gel

À une température de 20°C, le collagène réticulé présente un module élastique 8,7 fois supérieur que celui du collagène natif avec des valeurs de 35 et 4.10<sup>-3</sup>, respectivement. De plus, ces résultats s'accompagnent d'un aspect macroscopique différent: tandis que le collagène natif est sous forme liquide, on retrouve le collagène réticulé sous forme de gel. Cela signifie qu'à 20°C, le collagène natif est au-dessus de sa température de fusion (initialement de 13°C, comme indiqué dans le Chapitre 2) alors que le collagène réticulé ne l'a pas encore atteinte. De plus, le collagène réticulé, sans cycle de congélation/décongélation présente des propriétés élastiques du même ordre de grandeur que le collagène natif à 4°C (35 et 50 Pa, respectivement). Par ailleurs, leurs aspects visuels sont similaires: on obtient un gel dans les deux cas, signifiant que le collagène est en dessous de sa température de fusion. Ainsi, la réticulation par la mTG, sans traitement supplémentaire permet d'augmenter la température de fusion du collagène natif, qui était initialement de 13°C (cf Chapitre 2) et qui devient alors supérieure à 20°C. Par conséquent, ses propriétés sont alors proches de celles retrouvées pour le collagène à 4°C. Cependant, bien que leur aspect visuel et leurs propriétés mécaniques soient proches, chacun présente un type de réseau différent. Tandis que le collagène natif à 4°C est stabilisé grâce à la formation spontanée de triples hélices par le phénomène d'agrégation des différentes chaînes  $\alpha$ , le collagène réticulé doit sa stabilité à la création de liaisons covalentes entre les molécules de collagène grâce à l'activité de l'enzyme. Par ailleurs, l'augmentation des valeur des modules G' et G'' après un

traitement de l'hydrogel avec un agent de réticulation, enzymatique, physique ou chimique, est connue dans la littérature (Gómez-Guillén *et al.*, 2001; Yunoki *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2011). Le cycle de congélation/décongélation permet d'augmenter les propriétés élastiques de l'hydrogel de collagène réticulé par la mTG. Cela est cohérent avec les données de la littérature, où les propriétés viscoélastiques des gels de biopolymères augmentent avec le nombre de cycles de congélation/décongélation (Lozinsky *et al.*, 2003 ; Van Vlierberghe *et al.*, 2011). Par ailleurs, Bode *et al.* (2011) ont travaillé sur la réticulation du collagène de tilapia par la mTG en comparant une réaction de réticulation réalisée au dessus de la température de fusion du collagène, et une autre, en dessous de la température de fusion du collagène. Ils ont alors démontré une influence non seulement de l'agent réticulant sur le module viscoélastique de l'hydrogel, mais également de la température de réaction. En effet, les auteurs distinguent la formation d'un gel « physique » qui est la conséquence de l'assemblage des chaînes de collagène en triple hélice, de la formation d'un gel « chimique » qui est la conséquence de la formation de liaisons covalentes entre les protéines. Ainsi, lorsque la réaction est réalisée au dessus de la température de fusion du collagène, l'hydrogel est stabilisé à la fois par les triples hélices de collagène formées, et par les liaisons covalentes résultant de l'action de l'enzyme (Figure 87). La combinaison de ces deux phénomènes permettrait alors d'augmenter les propriétés mécaniques de l'hydrogel. Dans cette étude, la mTG n'est pas désactivée après la réaction de réticulation et il se peut donc que la réaction continue au cours de la congélation de l'hydrogel, à une température à laquelle le collagène forme des triples hélices qui sont alors stabilisées par les liaisons covalentes créées.

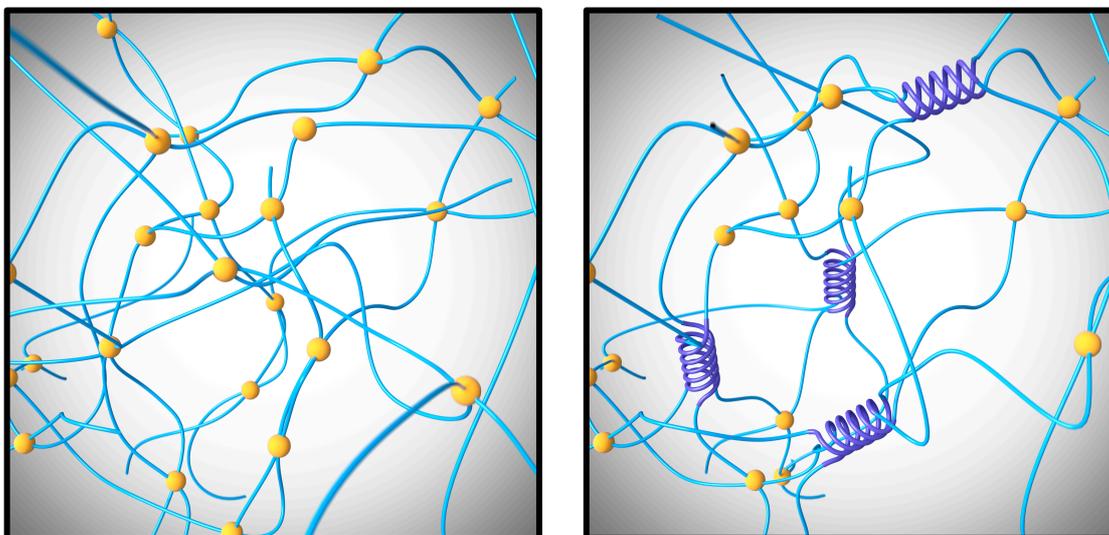


Figure 87. Schématisation d'un gel « chimique » (à gauche) et d'un gel « chimique » et « physique » (à droite), obtenus par réticulation de collagène de tilapia par la mTG (illustration Sébastien Hervé).

En terme d'utilisation du collagène, l'élasticité de l'hydrogel est un paramètre à prendre en compte, notamment pour l'implantation de cellules souches. En effet, le microenvironnement, et plus particulièrement son élasticité, est un facteur clé qui va jouer sur leur différenciation (Engler *et al.*, 2006). Par exemple, une élasticité de l'ordre de 1000 Pa pourrait favoriser les cellules cérébrales, de 10 000 Pa celle des cellules musculaires, et enfin la différenciation en cellules osseuses sera encouragée par une élasticité autour d'une centaine de kPa. Concernant la régénération neurale, une élasticité comprise entre 10 et 4000 Pa est nécessaire, comme l'ont montré Palazzolo *et al.* (2015) avec des hydrogels d'alginate, sur lesquels ils ont observé la viabilité et le développement de neurones issus d'embryons de rats. Ces auteurs ont mis en évidence l'importance des propriétés mécaniques du microenvironnement, pour lesquelles les neurones sont extrêmement sensibles pour se développer et fonctionner. Avec des valeurs de module élastique comprises entre 35 et 650 Pa, le collagène réticulé par la mTG étudié dans cette étude se prêterait à ce type d'application. En revanche, pour des applications en régénération osseuse, l'élasticité du réseau n'est pas suffisante. En effet, l'équipe de Fernandes-Silva *et al.* (2013) a montré le développement de cellules chondrocytaires sur des hydrogels de collagènes de requin réticulés à la génépine présentant une élasticité de 57 300 Pa. Ce travail est encore exploratoire et devra être poursuivi afin d'évaluer précisément le potentiel d'application du collagène comme dispositif médical. Il serait par exemple intéressant d'augmenter la concentration en enzyme ou encore de la combiner avec l'ajout de composés comme le chitosan,

qui en plus d'augmenter les propriétés mécaniques du réseau, agit sur la reconstruction et la régénération cellulaire (Jeevithan *et al.*, 2013).

Ces résultats montrent que l'étude des propriétés rhéologiques a permis de mesurer l'effet de cette réaction sur les propriétés mécaniques et de caractériser l'hydrogel de collagène réticulé afin d'évaluer son potentiel d'application.

### 3. Conclusion et Perspectives

Les données présentées dans cette section sont des résultats préliminaires concernant la réticulation du produit PeskCollagen 3D Pro®. Ils ont permis de démontrer qu'un procédé de réticulation du collagène marin était possible en utilisant un agent réticulant autre que les agents chimiques dont l'efficacité a déjà largement été prouvée mais qui sont cytotoxiques, en utilisant une enzyme microbienne, la transglutaminase. Le protocole a permis d'obtenir un hydrogel de collagène présentant une microstructure poreuse et dense, avec une taille de pores adaptée à la croissance cellulaire, et présentant des propriétés élastiques favorisant la spécification des cellules neuronales. Également, cette étude a permis de mettre en place des protocoles faisant appel à différents domaines d'expertise tels que le dosage OPA, la résonance magnétique nucléaire ou encore la spectroscopie infrarouge qui ont permis de mieux comprendre les mécanismes réactionnels impliqués. L'ensemble de ces techniques pourront ainsi être utilisées par la suite pour continuer ces travaux. Surtout, les hydrogels obtenus ont pu être précisément caractérisés, en vue d'une application biotechnologique future grâce aux techniques de microscopie et aux mesures du module élastique.

La microstructure et l'élasticité sont les deux principaux facteurs à prendre en compte pour définir si l'hydrogel répond aux propriétés exigées par le type d'application visée. Il est donc nécessaire de coupler les analyses en microscopie et en rhéologie pour caractériser le collagène réticulé. Le couplage de ces deux méthodes permettra également d'orienter le protocole de réticulation afin d'obtenir les propriétés souhaitées. Ainsi, la suite du travail pourrait porter sur l'étude de l'effet des concentrations en enzyme sur la microstructure (porosité, densité, taille des pores) et sur la force de gel des hydrogels obtenus. Ces travaux permettront alors de trouver la concentration en enzyme permettant de fournir au réseau de collagène les propriétés adaptées à l'application visée.

Plus largement, plusieurs pistes pourraient être explorées afin de modifier les propriétés du collagène réticulé. S'agissant d'une utilisation pour des dispositifs médicaux, il est préférable de

se tourner vers l'ajout de composés naturels comme le chitosan, qui en plus d'améliorer les propriétés mécaniques (Silva *et al.*, 2014 ; Jeevithan *et al.*, 2013) apporte des propriétés antibactériennes et régénérantes aux éponges et hydrogels (Jeevithan *et al.*, 2013). De la même manière, des études travaillent sur l'incorporation d'extraits algaux (Haddar *et al.*, 2012) pour apporter des propriétés antioxydantes, ou encore sur des extraits de végétaux terrestres là encore pour des effets bioactifs antimicrobiens. Également leurs propriétés technofonctionnelles sont valorisées afin d'augmenter la stabilité du réseau et d'influencer sa microstructure (Cheirmadurai *et al.*, 2016).

Pour conclure, ces résultats permettent de poser les premières bases pour développer de futures applications à très haute valeur ajoutée pour le PeskCollagen 3D Pro®.



## **Chapitre 4 :**

### **Fabrication de deux hydrolysats au DH contrasté à partir de têtes de seumon et évaluation de leurs performances *in vivo***

#### **Résumé :**

*Ce chapitre présente les résultats du volet concernant la valorisation des têtes de saumon. L'objectif était, dans un premier temps, d'obtenir deux hydrolysats aux compositions peptidiques contrastées : (1) un hydrolysats avec environ 50% de peptides inférieurs à 500Da et (2) un hydrolysats enrichi en di- et tripeptides avec environ 70% de peptides inférieurs à 500Da; puis de les incorporer dans des aliments aquacoles afin d'étudier leur influence sur les malformations des larves de bar *Dicentrarchus labrax*. L'utilisation de procédés d'hydrolyse enzymatique utilisant deux préparations enzymatiques, l'Alcalase® et la Flavourzyme, présentant des mécanismes d'action différents ont permis de maîtriser la réaction et d'obtenir, d'abord en laboratoire, puis à l'échelle pilote, un premier hydrolysats contenant 40% de peptides inférieurs à 500Da et un deuxième en contenant 61%. Ensuite, les deux hydrolysats ont été incorporés dans la formulation de granulés à des teneurs modérées, afin d'évaluer leurs performances *in vivo* sur les larves de bar. Un aliment témoin, fabriqué à partir d'un hydrolysats commercialisé a également été testé. Les premiers résultats concernant l'observation phénotypique des larves ont montré une diminution des malformations squelettiques de la tête et de la colonne vertébrale pour les groupes nourris avec les régimes contenant les hydrolysats fabriqués, en comparaison avec le groupe nourri avec le régime témoin. Des analyses sont encore en cours pour déterminer s'il existe des différences concernant la flore intestinale, l'expression de gène et l'expression de protéines entre les différents groupes de larves, dans le but de mieux comprendre les mécanismes physiologiques impliqués.*

## 1. Introduction

Plusieurs causes sont à l'origine de l'apparition des malformations chez les larves de bar, les principales étant dues à des conditions d'élevage non optimales (taille des bacs, concentration des individus...), à des facteurs génétiques ou encore à des déséquilibres nutritionnels tels que des apports non adaptés en vitamines, en lipides ou encore en protéines (Boglione *et al.*, 2013a,b, Cahu *et al.*, 2010).

Cette étude s'intéresse à l'apport en protéines de l'aliment car, bien que l'on connaisse les teneurs optimales requises pour la fraction azotée (Ronnestad *et al.*, 2013), cela n'est pas le seul facteur limitant. En effet, le poids moléculaire des protéines incorporées dans l'aliment joue un rôle majeur dans le développement larvaire. L'étude de Zambonino *et al.*, (1997) a été la première à observer un effet positif de l'incorporation d'hydrolysats enrichis en di- et tripeptides sur la diminution du taux de malformation des larves. Même si les mécanismes impliqués ne sont pas encore très bien connus, l'introduction de peptides de petit poids moléculaire améliorerait la maturation du système digestif, lui permettant une meilleure assimilation des nutriments et par conséquent, un meilleur état général de la larve. Cette observation est une hypothèse qui permettrait d'expliquer la diminution du taux de malformation. Cependant, le pourcentage dans l'aliment doit rester modéré et ne pas dépasser 20% de l'apport azoté total, au risque de saturer les mécanismes de transport au sein du tractus digestif provoquant une altération à la fois la croissance des larves et de leur taux de survie (Zambonino *et al.*, 1997, Cahu *et al.*, 1999).

En alimentation aquacole, il existe différents types d'hydrolysats de protéines, commercialisés ou utilisés au niveau expérimental. Ils diffèrent d'une part par la matière première dont ils sont extraits (caséine, krill, crevette, farine ou co-produit de poisson), leur mode de production (ensilage, hydrolyse enzymatique, fermentation) et enfin, par leurs caractéristiques biochimiques (composition en acides aminés, profil de poids moléculaire) (Boglione *et al.*, 2013b). Dans cette étude, le choix s'est porté sur la production de deux hydrolysats à partir de têtes de saumon, par des procédés d'hydrolyse enzymatique.

Le premier objectif de ce travail est de produire deux hydrolysats présentant une même composition proximale et une même teneur en acides aminés mais avec une répartition des poids moléculaire différente:

- (1) un hydrolysats au DH plus élevé que l'hydrolysats commercial couramment utilisé: ils doit présenter une teneur en peptides de poids moléculaire inférieur à 500 Da autour de 50%

(2) un hydrolysats enrichi en di- et tripeptides par rapport au premier: il doit présenter environ 20% supplémentaire de peptides de taille inférieur à 500 Da, soit environ 70% Pour cela, les deux procédés d'hydrolyse seront mis au point en laboratoire puis, les protocoles seront transposés à l'échelle pilote. En parallèle, la caractérisation des hydrolysats obtenus permettra de valider les différentes étapes de mises au point et de production. La deuxième partie du travail concerne l'étude des performances zootechniques de chacun des deux hydrolysats. L'objectif est d'étudier l'impact de la teneur en di- et tripeptides de la portion azotée de l'aliment sur les malformations des larves de bar *Dicentrarchus labrax*.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1 Production et caractérisation biochimique des hydrolysats

La première partie du travail a été la production des deux hydrolysats et leur caractérisation afin de s'assurer qu'ils présentent les propriétés attendues, et plus particulièrement en terme de poids moléculaire.

#### 2.1.1 Production d'hydrolysats en laboratoire

##### 2.1.1.1 Conditions de pH contrôlées en laboratoire

Deux protocoles d'hydrolyse ont été réalisés en laboratoire en conditions de pH contrôlées, à l'aide d'un pH-Stat:

(1) un protocole d'hydrolyse par l'Alcalase

(2) un protocole d'hydrolyse à l'Alcalase suivi d'une hydrolyse par la Flavourzyme

Dans un premier temps, pour chacun des protocoles, l'évolution des pourcentages de peptides par classes de taille a été suivie afin de mieux comprendre le déroulement de l'hydrolyse en fonction de l'enzyme utilisée.

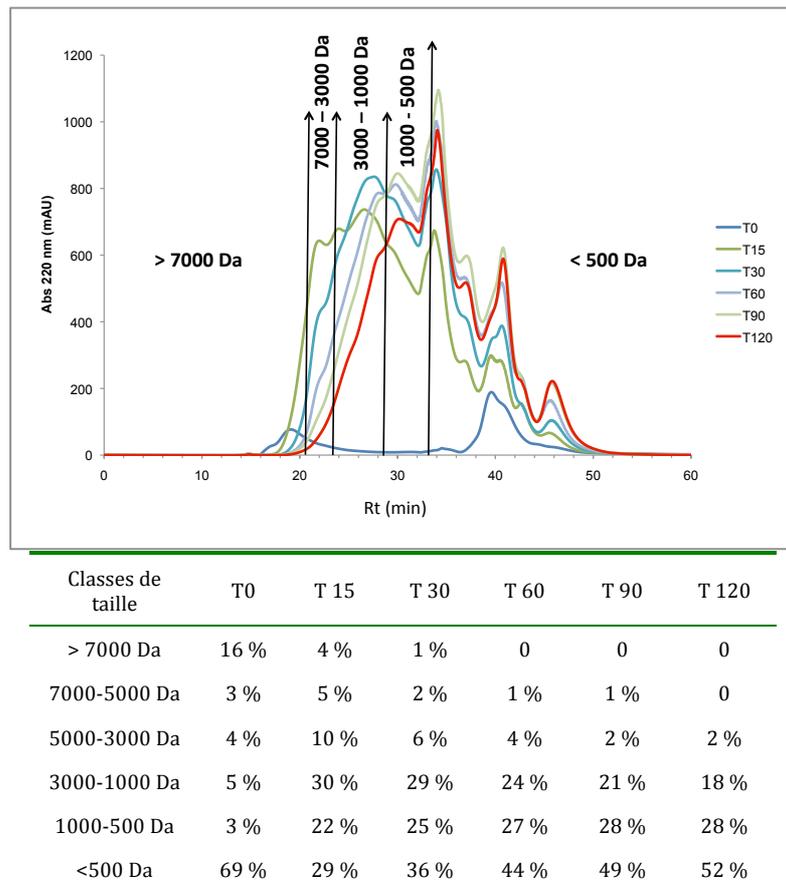


Figure 88. Éluion sur la colonne Superdex Peptides d'hydrolysats de têtes de saumon obtenus avec l'Alcalase (ratio E/S=3%). La réaction a été réalisée à pH=8 contrôlé, à 50°C et les prélèvements ont été réalisés à T0, T=15min, T30min, T=60min, T=90min et T=120min.

La Figure 88 montre l'évolution de la population peptidique du mélange au cours des 2h d'hydrolyse par l'Alcalase en conditions contrôlées. La courbe représentant le degré d'hydrolyse en fonction du temps est détaillée en Annexe 5. Entre T15 et T30, on remarque que la fraction 7000-1000 Da devient moins importante (45% et 37%, respectivement) au profit de la fraction inférieure à 1000 Da qui atteint 51% à T15 puis 61% à T30. On observe le même phénomène jusqu'à T90 (24% pour la fraction supérieure à 1000 Da et 77% pour la fraction inférieure à 1000Da). Mais à T120, seule la fraction inférieure 500 Da s'enrichit en peptides: elle passe de 49% à 52% tandis que la fraction 1000-500 se maintient à 28%.

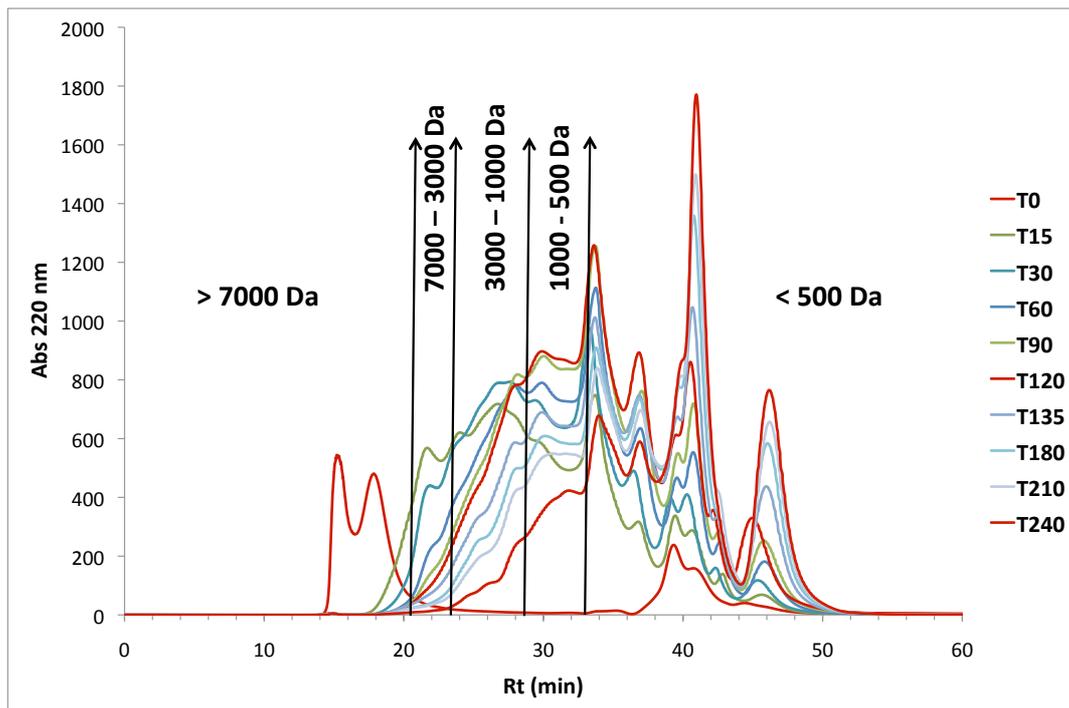
Il s'agit ici d'une hydrolyse enzymatique en conditions hétérogènes car le substrat protéique de départ est un broyat insoluble. L'évolution de la population peptidique au cours de l'hydrolyse confirme la description de Mohr (1980) qui dissocie deux étapes dans l'hydrolyse. Après ajout de l'enzyme, survient une première phase durant laquelle un grand nombre de liaisons peptidiques sont clivées et dont la conséquence est la libération rapide de peptides et d'acides aminés. La deuxième phase, plus lente, concerne l'hydrolyse des particules qui vont se détacher

du cœur insoluble du substrat et dont l'hydrolyse permettra d'enrichir au fur et à mesure le milieu réactionnel en peptides solubles.

Dans les résultats présentés ici, on remarque qu'au début de la réaction, la majorité des peptides de poids moléculaire inférieur à 1000 Da sont libérés dans le mélange, tandis qu'à partir de 90 minutes, seuls des di- et tripeptides sont solubilisés, correspondant à l'hydrolyse plus lente des protéines plus compactes. À ce moment là de la réaction, le facteur limitant est le nombre de liaisons peptidiques disponibles (Guérard *et al.*, 2001). Ces résultats sont liés à l'évolution du degré d'hydrolyse au cours du temps, défini comme le pourcentage du nombre de liaisons peptidiques clivées sur le nombre de liaisons peptidiques totales. En effet, il croît rapidement en début de réaction puis commence à stagner. Ainsi, l'étude de Guérard *et al.* (2001) a montré que les 90 premières minutes de l'hydrolyse, au moment où le DH augmente rapidement, correspondent à la première étape décrite par Möhr (1980), tandis qu'au delà, le DH se stabilise, correspondant alors à la deuxième étape de la réaction.

Pour permettre de cliver de nouvelles liaisons, il faut ajouter une enzyme présentant un autre mode d'action que le type endopeptidase spécifique de l'Alcalase afin de libérer davantage de di- et tripeptides. Les résultats suivants montrent l'effet de l'ajout de l'enzyme Flavourzyme, présentant une activité à la fois endopeptidase et exopeptidase, dans le mélange.

Pour conclure, le protocole développé grâce à l'utilisation de la méthode du pH-Stat a permis d'obtenir un hydrolysât avec les caractéristiques recherchées avec une teneur en peptides de taille inférieure à 500 Da autour de 50%.

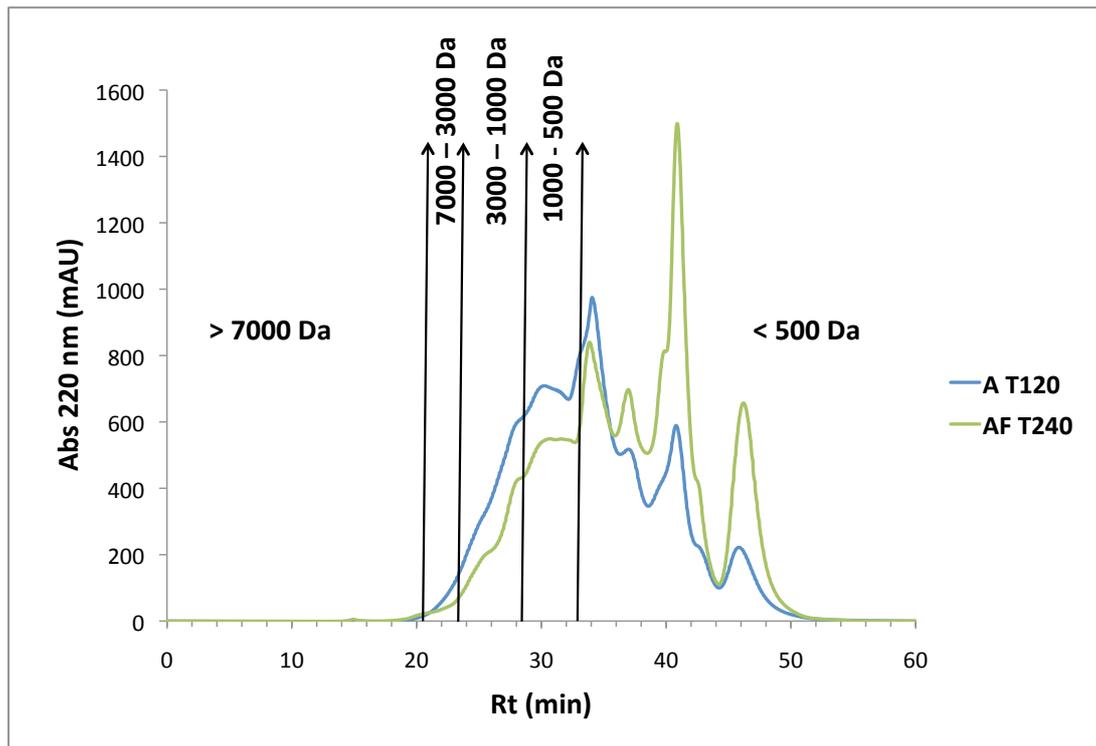


Classe de taille	T0	T15	T30	T60	T90	T120	T135	T150	T180	T210	T240
> 7000 Da	61%	4%	1%	1%	0	0	0	0	0	0	0
7000-5000 Da	2%	4%	3%	1%	1%	0	0	0	0	0	0
5000-3000 Da	2%	9%	7%	4%	2%	2%	1%	1%	1%	1	0
3000-1000 Da	2%	30%	30%	24%	21%	18%	16%	14%	12%	10%	6%
1000-500 Da	1%	23%	26%	27%	28%	27%	24%	22%	21%	20%	16%
<500 Da	33%	29%	33%	44%	48%	52%	59%	62%	65%	69%	78%

Figure 89. Élu­tion sur la colonne Superdex Peptides d'hydrolysats de têtes de saumon obtenus avec l'Alcalase (ratio E/S=3%) à pH=8 contrôlé et 50°C suivie de la Flavourzyme (ratio E/S=5%) à pH=7 contrôlé et 40°C. Les prélèvements ont été réalisés à T0, T=15min, T30min, T=60min, T=90min, T=120min.

La Figure 89 montre l'évolution de la population peptidique du mélange au cours des 2h d'hydrolyse à l'Alcalase suivie des 2h d'hydrolyse avec la Flavourzyme en conditions contrôlées. Dans un premier temps, les observations sont similaires à celles décrites précédemment avec l'hydrolyse à l'Alcalase. Entre T15 et T90, on remarque que la fraction 7000-1000 Da devient moins importante (43%, puis 40%, suivi de 29% et enfin 24%) au profit de la fraction inférieure à 1000 Da (52%, puis 59%, suivi de 71% et enfin 76%) et à partir de T120 et jusqu'à T240, seule la fraction de peptides inférieurs à 500 Da s'enrichit avec des pourcentages de 52% à 78%, tandis que les fractions de peptides de poids moléculaire supérieur à 500Da diminuent (47%, 41%, 37%, 34%, 31% et enfin 22%).

Au début, la réaction avec l'Alcalase se déroule comme ce qui a été décrit précédemment, ce qui permet de rendre des sites de coupure accessibles. Ensuite, la réaction se poursuit avec l'hydrolyse par la Flavourzyme. Celle-ci, grâce à son activité à la fois endopeptidase et exopeptidase permet de cliver les extrémités N-terminales des protéines, provoquant ainsi la libération de peptides de poids moléculaire inférieur à 500 Da. Cette réaction est la même que celle permettant de désamériser les hydrolysats: les peptides hydrophobes, libérés par l'hydrolyse à l'Alcalase, et responsables du goût amer sont clivés grâce à l'activité exopeptidase de l'enzyme Flavourzyme utilisée à un pH basique (Saha et Hayashi, 2001).



Classe de taille	A T120	AF T240
> 7000 Da	0	0
7000-5000 Da	0	0
5000-3000 Da	2%	0
3000-1000 Da	18%	6%
1000-500 Da	27%	16%
<500 Da	52%	78%

Figure 90. Éluion sur la colonne Superdex Peptides des deux hydrolysats obtenus avec les deux protocoles (Alcalase=A T120: E/S=3%, pH=8, T°C=50°C pendant 2h et alcalase suivi de Flavourzyme=AF T240: E/S=3%, pH=8, T°C=50°C pendant 2h puis E/S=5%, pH7, T°C=40°C pendant 2h) en conditions de pH contrôlées.

La Figure 90 compare les profils de poids moléculaire obtenus avec les deux protocoles d'hydrolyse.

L'hydrolysate AF a été enrichi en di- et tripeptides grâce à l'action de l'enzyme Alcalase suivie de l'enzyme Flavourzyme. En effet, il contient 1,5 fois plus de peptides de poids moléculaire inférieur à 500 Da, ce qui représente une augmentation de 52% par rapport à l'hydrolysate A. L'hydrolysate AF contient 26% de peptides de poids moléculaire inférieur à 500 Da supplémentaire, par rapport à l'hydrolysate A permettant d'affirmer qu'il répond bien au cahier

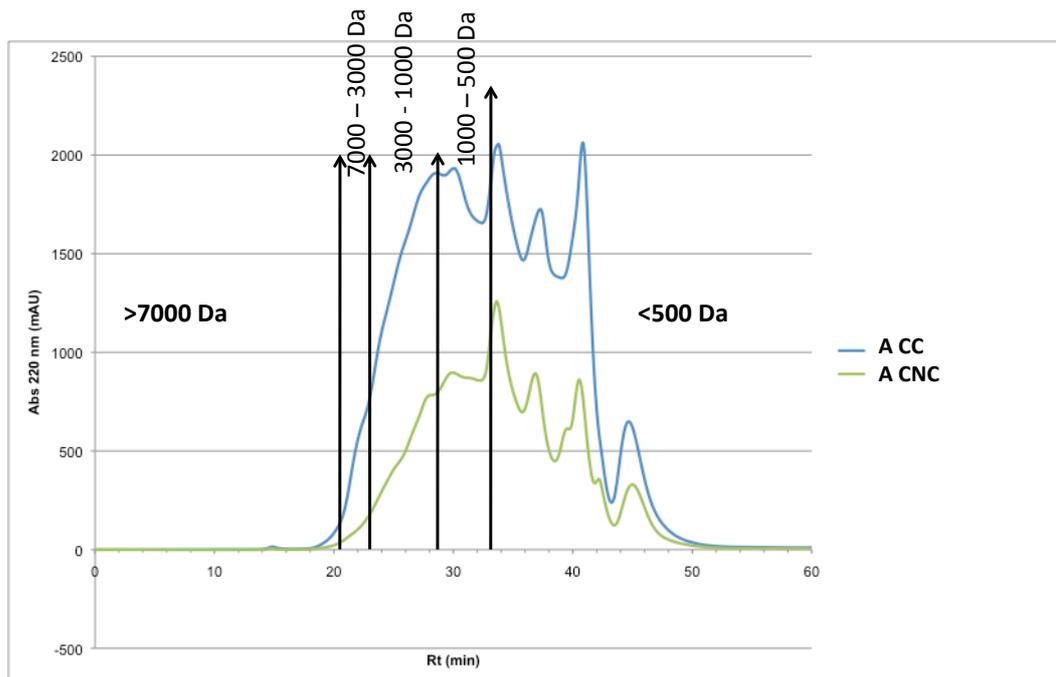
des charges établi en amont. L'étude de Nchienzia *et al.* (2010) a également observé un DH élevé grâce à l'hydrolyse successive par l'Alcalase puis la Flavourzyme de farine de poulet, comparée à une hydrolyse utilisant les deux enzymes simultanément, soulignant le rôle de l'Alcalase pour rendre accessibles les liaisons ensuite hydrolysées par la Flavourzyme.

Pour conclure, l'utilisation de procédés d'hydrolyse enzymatique, couplés à la chromatographie d'exclusion stérique ont permis de maîtriser la réaction et d'obtenir deux hydrolysats présentant majoritairement des poids moléculaires inférieurs à 3000 Da, dont l'un d'eux enrichi en di- et tripeptides.

#### 2.1.1.2 Hydrolyse en conditions de pH non contrôlées en laboratoire

Les deux protocoles d'hydrolyse réalisés précédemment en conditions de pH contrôlées ont permis d'obtenir des hydrolysats aux propriétés voulues et une production à l'échelle pilote est alors envisageable. Pour cela, différentes étapes de changement d'échelle ont été réalisées. La première, dont les résultats sont présentés dans cette section, consistait à réaliser les deux protocoles d'hydrolyse en conditions de pH non contrôlées, et en diminuant les ratios d'eau dans le mélange réactionnel, afin de se rapprocher au mieux, en laboratoire, des conditions pilotes.

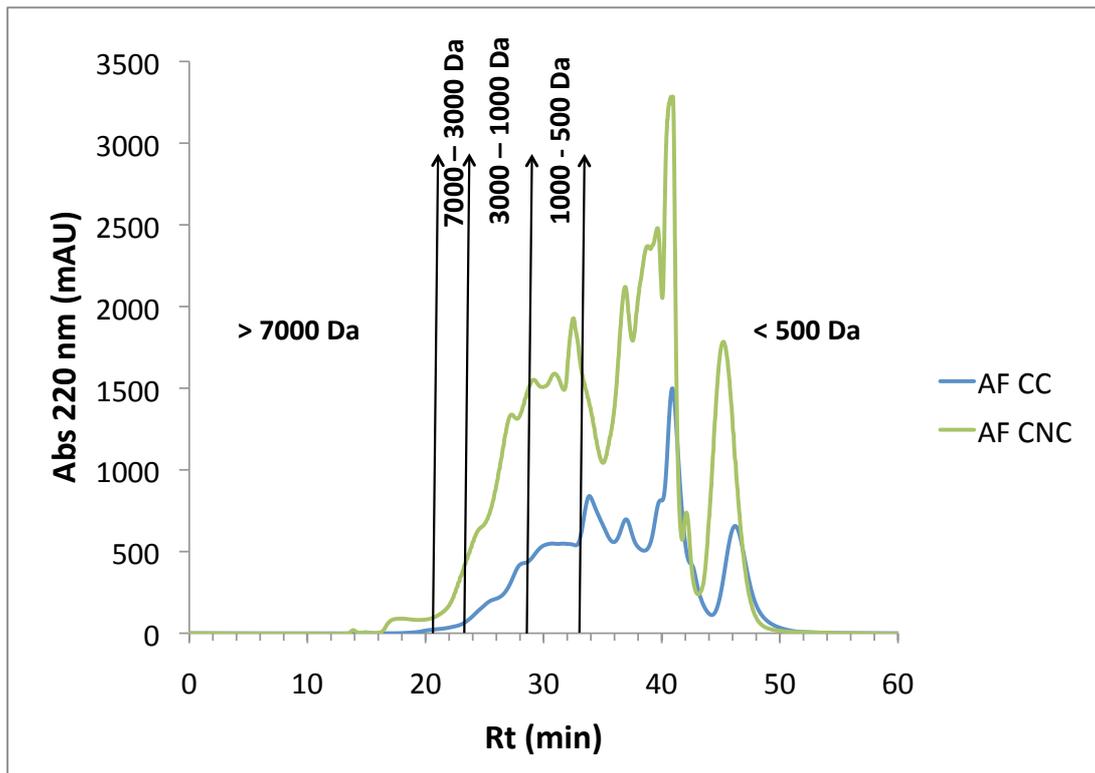
La Figure 93 compare les chromatogrammes obtenus avec le protocole d'hydrolyse à l'Alcalase (A) en conditions de pH contrôlées et non contrôlées. Une diminution de 7,1% du pourcentage de peptides inférieurs à 500 Da est observée en conditions non contrôlées par rapport aux conditions contrôlées.



Classe de peptides	A CC	A CNC
> 7000 Da	0,33	0,48
7000-5000 Da	0,43	0,86
5000-3000 Da	1,72	3,61
3000-1000 Da	18,40	22,85
1000-500 Da	27,29	24,07
< 500 Da	51,82	48,13

Figure 91. Éluion sur la colonne Superdex Peptides des hydrolysats obtenus par hydrolyse à l'Alcalase en conditions de pH contrôlées (A CC: E/S=3%, pH=8, T°C=50°C pendant 2h) et en conditions de pH non contrôlées (A CNC: E/S=3%, pH=5-6,5, T°C=50°C pendant 2h).

La Figure 91 compare les chromatogrammes obtenus avec le protocole d'hydrolyse à l'Alcalase suivie de la Flavourzyme (AF) en conditions de pH contrôlées et non contrôlées. Une diminution de 22% de la quantité de peptides de taille inférieure à 500 Da est observée en conditions non contrôlées par rapport aux conditions contrôlées.



Classe de peptides	AF CC	AF CNC
> 7000 Da	0,19	1,10
7000-5000 Da	0,09	0,35
5000-3000 Da	0,29	1,40
3000-1000 Da	5,61	14,64
1000-500 Da	15,62	21,71
<500 Da	78,19	60,79

Figure 92. Élu­tion sur la colonne Superdex Peptides des hydrolysats obtenus par hydrolyse à l'Alcalase puis à la Flavourzyme en conditions de pH contrôlées (AF CC: E/S=3%, pH=8, T°C=50°C pendant 2h puis E/S=5%, pH=7, T°C=40°C pendant 2h) et en conditions de pH non contrôlées (AF CNC: E/S=3%, pH=5-6,5, T°C=50°C pendant 2h puis E/S=5%, pH=5-6,5, T°C=40°C pendant 2h).

Ainsi, en conditions de pH non contrôlées, que ce soit pour l'hydrolyse A ou l'hydrolyse AF, le pourcentage de peptides inférieurs à 500 Da est plus faible. Cela suppose que la réaction réalisée dans ces conditions aboutit à un DH plus faible. Ces observations s'expliquent d'une part, parce que, en conditions de pH non contrôlées, le pH n'est pas ajusté au fil de la réaction. Ainsi, le mélange s'acidifie et on ne se trouve plus dans les conditions optimales de l'Alcalase (pH=8) mais à un pH plutôt acide, de l'ordre de 6,5 en début de réaction et qui descend jusqu'à 5,5. Il en

est de même pour l'enzyme Flavourzyme dont l'activité endopeptidase sera favorisée dans cette gamme de pH, au détriment de son activité exopeptidase. Or, c'est bien cette dernière activité qui permet de libérer davantage de di- et tripeptides. La deuxième raison est la diminution de la quantité d'eau qui rend plus difficile le mélange de la matière première, et donc la diffusion des enzymes dans le mélange, et plus particulièrement au début de la réaction, lorsque la matrice n'est pas encore bien solubilisée dans le mélange. Cependant, les compositions peptidiques des hydrolysats restent contrastées, avec 12,7% de peptides inférieurs à 500 Da supplémentaires dans l'hydrolysat AF par rapport à l'hydrolysat A. Les protocoles vont donc être testés en conditions pré-pilotes.

### 2.1.2 Transposition des procédés d'hydrolyse à l'échelle pré-pilote

Les échantillons ont été fabriqués à l'échelle pré-pilote et analysés par SEC-FPLC par la société Diana au sein de leurs infrastructures. Ces conditions miment exactement les conditions pilotes. L'hydrolyse nommée « HC », correspond au protocole à l'Alcalase, nommé A en laboratoire, et l'hydrolyse nommée « HL », correspond au protocole à l'Alcalase suivi de la Flavourzyme, nommé AF en laboratoire.

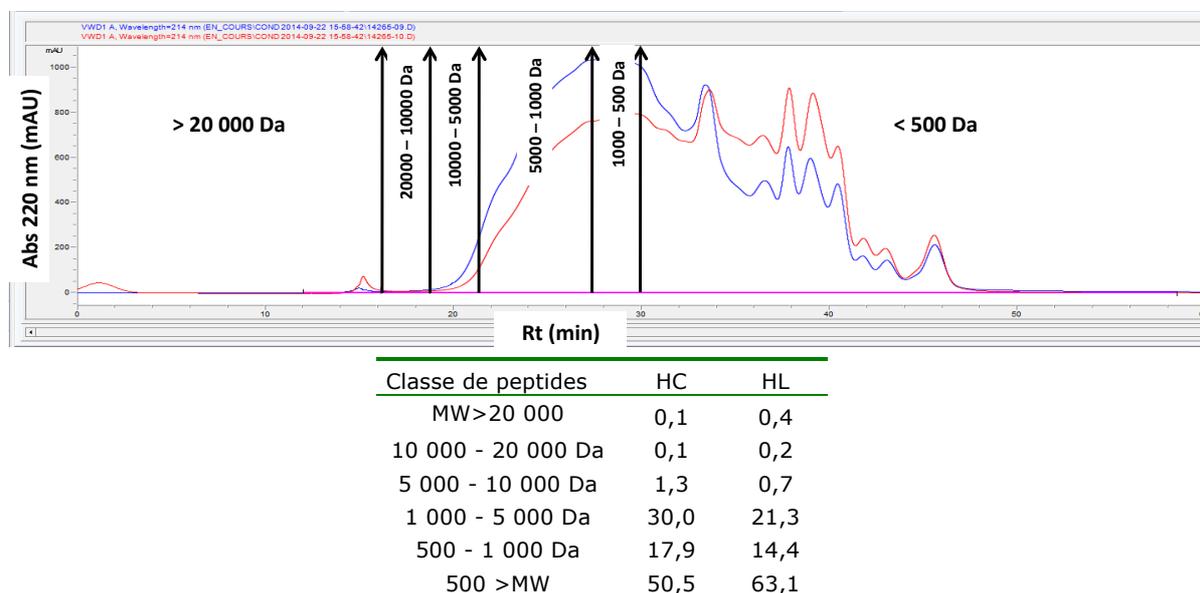


Figure 93. Comparaison des profils des deux hydrolysats obtenus avec les protocoles HC: Alcalase seule (en bleu) et HL, Alcalase puis Flavourzyme (en rouge) transposés à l'échelle pré-pilote. Les analyses ont été réalisées par le partenaire SPF-DIANA.

La Figure 93 compare les deux hydrolysats HC et HL produits à l'échelle pré-pilote. Les analyses ayant été réalisées par la société SPF-DIANA, il faut donc être vigilant si on les rapporte aux chromatogrammes obtenus au LEMAR. L'analyse des deux chromatogrammes, permet

d'observer 12,6% de peptides inférieurs à 500 Da supplémentaires pour l'hydrolysate HL, par rapport à l'hydrolysate HC. Ces écarts sont comparables à ceux obtenus en laboratoire en conditions non contrôlées où l'augmentation observée était de 12,7%. Les facteurs limitant sont donc les mêmes que ceux décrits dans la section précédente. Les populations peptidiques des hydrolysats HC et HL, bien que différentes, mériteraient d'être plus contrastées entre elles, mais également en comparaison avec l'hydrolysate commercialisé qui sera utilisé comme témoin (CPSP 90), afin de s'assurer d'observer un effet *in vivo* sur les larves de bars. Dans ce sens, les conditions expérimentales des deux hydrolysats ont été optimisées pour la production pilote afin de se rapprocher des exigences du cahier des charges initial.

## 2.2 Production des deux hydrolysats à l'échelle pilote

Afin d'augmenter le DH des hydrolysats, chacun des protocoles a été optimisé en ajoutant de l'eau, et en augmentant le ratio enzyme/substrat. Les deux hydrolysats obtenus ont été comparés à l'hydrolysate commercial CPSP 90 en terme de poids moléculaire et de compositions proximale.

### 2.2.1 Caractérisation du poids moléculaire des hydrolysats

#### 2.2.1.1 Étude du changement d'échelle

Le Tableau 54 montre les pourcentages de classe de taille obtenus pour les deux protocoles à l'échelle du laboratoire en conditions de pH contrôlées en comparaison avec l'échelle pilote. Si l'on se penche sur la représentation des peptides de taille inférieure à 500 Da parmi lesquels on retrouve les di- et tripeptides, on remarque que les pourcentages sont plus faibles à l'échelle pilote pour les deux protocoles d'hydrolyse. Plus précisément, il y en a 1,30 fois moins pour le protocole d'hydrolyse à l'Alcalase et 1,27 fois moins pour le protocole d'hydrolyse à l'Alcalase suivi de la Flavourzyme. Ces tendances ont déjà été observées en laboratoire lors des essais en conditions de pH non contrôlées.

Cependant, on peut considérer que le cahier des charges est rempli car dans les deux cas, le deuxième protocole d'hydrolyse qui combine l'Alcalase et la Flavourzyme permet d'enrichir à hauteur de 20% la teneur en peptides de taille inférieure à 500 Da.

Tableau 54. Comparaison des pourcentages de classes de peptides entre les hydrolysats obtenus avec les protocoles d'hydrolyse réalisés en laboratoire en conditions de pH contrôlées (A Labo: E/S=3%, pH=8, T°C=50°C pendant 2h et AF Labo : E/S=3%, pH=8, T°C=50°C pendant 2h puis E/S=5%, pH=7, T°C=40°C pendant 2h) et les hydrolysats obtenus avec les protocoles d'hydrolyse réalisés en conditions pilotes (HC pilote: hydrolyse à l'Alcalase et HL pilote : hydrolyse à l'Alcalase puis Flavourzyme).

Classe de peptides	A Labo	HC pilote	AF Labo	HL pilote
> 7000 Da	0	3,12%	0	0,58%
7000-5000 Da	0	1,69%	0	0,32%
5000-3000 Da	2 %	4,91%	0	1,19%
3000-1000 Da	18 %	26,07%	6%	13,52%
1000-500 Da	28 %	24,12%	16%	23,00%
<500 Da	52 %	40,09%	78%	61,38%

### 2.2.1.2 Comparaison des trois hydrolysats utilisés pour l'expérimentation *in vivo*

La Figure 96 compare les profils chromatographiques des deux hydrolysats produits à l'échelle pilote avec le profil de l'hydrolysat commercial CPSP 90 qui sera incorporé dans l'aliment témoin. Les trois profils ne se superposent pas, mettant en évidence les différents DH des échantillons: l'échantillon le moins hydrolysé étant le CPS90, suivi de HC et enfin de HL. Ces différences se traduisent également par une distribution différentes des poids moléculaire, et notamment pour les di- et tripeptides.

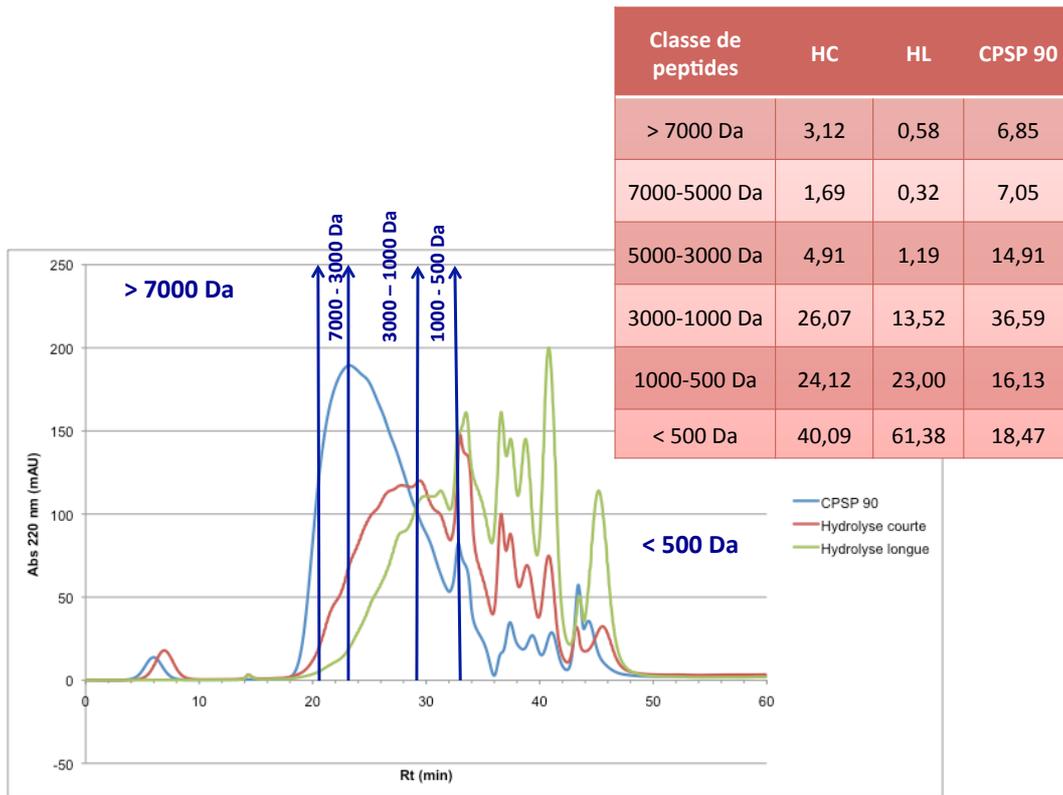


Figure 94. Élu­tion sur la colonne Superdes Peptides des trois hydrolysats qui seront incorporés dans les aliments: HC (hydrolysats obtenu avec l'Alcalase en conditions pilotes), HL (hydrolysats obtenu avec l'Alcalase puis la Flavourzyme en conditions pilotes) et CPSP 90 (hydrolysats commercialisé).

Pour aller plus loin dans l'analyse des pourcentages de classe de taille, la Figure 94 compare la répartition des poids moléculaires des trois hydrolysats sous forme d'histogramme. Globalement, les hydrolysats HC et HL sont majoritairement composés de peptides de taille inférieure à 3000 Da dont plus de 60% inférieurs à 1000Da. En revanche, le CPSP 90 se répartit équitablement dans trois classes de taille: un tiers supérieur à 5000 Da, un tiers entre 3000 et 1000 Da et le dernier tiers inférieur à 1000 Da.

Plus précisément, l'hydrolysats HC est riche en dipeptides, tripeptides et acides aminés libres, qui représentent 40 %. Cependant, les oligopeptides et les peptides de poids inférieur à 3000 Da représentent chacun une part non négligeable de l'échantillon avec 24 % et 26 %, respectivement. Quant à l'hydrolysats HL, il est composé pour sa majorité de dipeptides, tripeptides et acides aminés libres, qui représentent 61,4 % de l'échantillon, suivi d'oligopeptides (23%) et de peptides de poids inférieur à 3000 Da (13,5%). Concernant l'hydrolysats CPSP 90, celui-ci est majoritairement composé de peptides de taille supérieure à 1000 Da qui représentent 65,4% de l'échantillon.

Si l'on compare les trois hydrolysats en s'intéressant de plus près aux fractions inférieures à 500 Da qui contiennent les dipeptides, tripeptides et acides aminés libres, à savoir les composés d'intérêt dans cette étude, cette fraction représente 18,5% pour CPSP90 soit 2,2 fois moins par rapport à HC (40%) et 3,3 fois moins par rapport à HL (61,4%). Entre HC et HL, HL contient 1,5 fois plus de peptides inférieurs à 500 Da que HC. Ainsi, on a bien des hydrolysats aux compositions peptidiques contrastées, et plus particulièrement concernant la proportion des peptides de petits poids moléculaires.

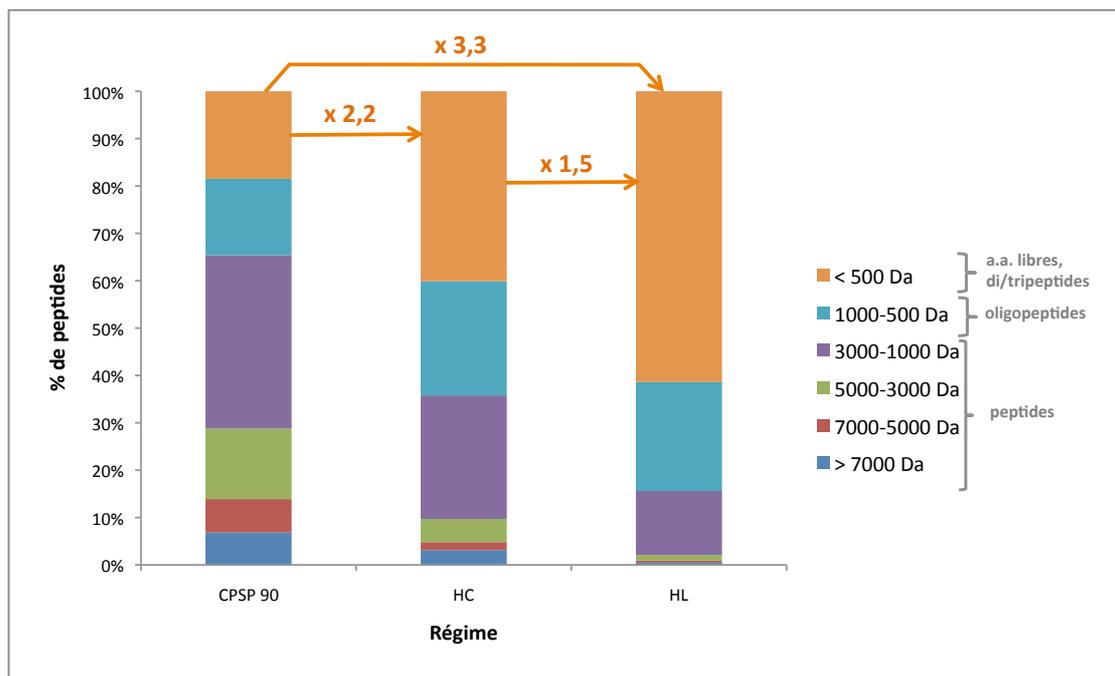


Figure 95. Répartition des poids moléculaires des hydrolysats produits à l'échelle pilote, HC et HL, et de l'hydrolysate témoin, CPSP 90

Concernant l'utilisation des hydrolysats en aquaculture en tant qu'ingrédient dans la formulation des aliments, de nombreuses expérimentations ont porté sur l'étude de l'influence de l'incorporation de différents teneurs en peptides dans l'aliment sur les performances zootechniques des larves de poissons (Cahu *et al.*, 1999 ; Carvalho *et al.*, 2004 ; Delcroix *et al.*, 2015 ; Zambonino *et al.*, 1997 ; Kotzamanis *et al.*, 2007 ; Skalli *et al.*, 2014). Ainsi, plusieurs protocoles ont été utilisés afin de faire varier la teneur en peptides dans l'aliment, démontrant la possibilité d'agir à différents niveaux dans la formulation. D'une part, il est possible de travailler sur la teneur en peptides de l'hydrolysate en lui-même. Par exemple, Zambonino *et al.* (1997) ont enrichi un hydrolysate en di- et tripeptides jusqu'à une teneur de 75% par un procédé d'ultrafiltration membranaire avec un seuil de coupure de 1000 Da. De leur côté, De Vareilles *et al.* (2012) ont enrichis un hydrolysate commercial en utilisant également ce procédé mais cette fois-ci avec deux seuils de coupure de 30000 et 5000Da, afin de produire deux hydrolysats

différents. Dans ce sens, (Bourseau *et al.*, 2009) décrivent un procédé d'ultrafiltration et de nanofiltration membranaire, combiné à un procédé d'hydrolyse enzymatique, et permettant ainsi d'enrichir les hydrolysats obtenus en peptides de poids moléculaire inférieur à 750 Da, à une échelle industrielle. Dans la présente étude, le choix s'est porté sur l'enrichissement en di- et tripeptides par l'utilisation de deux protocoles d'hydrolyse enzymatiques différents, en jouant sur les mécanismes d'action spécifiques des enzymes, et plus particulièrement la combinaison de l'activité endopeptidase de l'Alcalase, à l'activité exopeptidase de la Flavourzyme. D'autre part, il est également possible de travailler sur la concentration de l'hydrolysate dans l'aliment, comme c'est le cas pour les études de Zambonino *et al.* (1997), Cahu *et al.* (1999), Kotzamanis *et al.* (2007), De Vareilles *et al.* (2012) et Skalli *et al.* (2014). Cependant, ces derniers auteurs (Skalli *et al.* 2014) ont démontré que le fait de doubler la quantité d'hydrolysate dans l'aliment n'augmente pas l'effet sur la physiologie des larves. Ils préconisent donc, pour tester l'influence d'un enrichissement en peptides, d'incorporer plutôt des hydrolysats aux DH différents mais aux mêmes concentrations dans la formule, ce qui permet également, du point de vue pratique, de diminuer les coûts pour les professionnels.

Plus généralement, l'objectif fixé dans les études est l'obtention d'hydrolysats riches en peptides de taille inférieure à 10 000 Da (Opheim *et al.* 2015) car ils présentent des atouts pour une utilisation potentielle dans les domaines de la nutrition humaine et de l'alimentation animale. En effet, les peptides présentant entre 3 et 20 résidus (soit un poids moléculaire moyen compris entre 300 et 2000 Da) sont de bons candidats dans la recherche de bioactivités car les peptides présentant des propriétés intéressantes, de part leur petite taille, peuvent alors franchir la barrière intestinale et leur effet biologique est donc plus important (Roberts *et al.* 1999). De plus, les peptides dont l'activité biologique est reconnue font cette taille (Pihlanto-Leppälä, 2000). Plus particulièrement, les classes de tailles comprises entre 100-500 Da et 1000-3500 Da présentent le plus fort potentiel pour des activités biologiques (Guérard *et al.*, 2005; Vandanjon *et al.*, 2009). Par ailleurs, la favorisation d'une forte proportion des peptides inférieurs à 10 000 Da dans l'hydrolysate permet de prévenir tout risque de maladie liée à un prion, ce qui ouvre de plus grandes perspectives quant au domaine d'application de l'ingrédient.

### 2.2.1.3 Composition proximale

Le Tableau 55 indique la composition proximale de chacun des hydrolysats.

Tableau 55. Composition proximale des hydrolysats CPSP 90, HC et HL.

Teneur	CPSP 90	HC	HL
Protéines	86,2% ± 2,6	81,6% ± 2,4	81,5% ± 2,4
Lipides	6,4% ± 0,5	8,9% ± 0,7	3,8% ± 0,5
Matière sèche	96.1% ± 1,0	97,8% ± 1,0	97,9% ± 1,0
Cendres	7,6% ± 0,3	6,7% ± 0,3	6,9% ± 0,3

Concernant la teneur en protéines, elle est supérieure à 80% pour tous les hydrolysats, avec la teneur la plus forte de 86,2% pour CPSP 90, suivie de 81,6% pour HC et enfin 81,5% pour HL. Les procédés d'hydrolyse des hydrolysats HC et HL permettent d'obtenir des rendements en protéine similaire. Ces valeurs sont supérieures à 80% et donc comparables à celles retrouvées dans la littérature pour des hydrolysats issus de protéines de saumon atlantique. Ainsi, Kristinsson et Rasco (2000a) retrouvent une teneur comprise entre 86,9% et 88,1% pour des hydrolysats de muscle de saumon tandis que Gbogouri *et al.* (2006) affichent des valeurs comprises entre 78,9% et 85,7% pour des hydrolysats de tête de saumon, et enfin, Opheim *et al.* (2015) présentent des teneurs comprises entre 82,8 et 86,0% pour des hydrolysats de co-produits de saumon (tête, carcasse et viscères). Ces fortes teneurs s'expliquent par la solubilisation des protéines au cours du procédé d'hydrolyse. Ainsi, les hydrolysats obtenus montrent des teneurs en protéines comparables à d'autres hydrolysats issus de saumon, mais également d'autres poissons. En effet, de nombreuses études ont rapporté des teneurs comprises entre 60 et 90% (revue de littérature de Chalamaiah *et al.*, 2012), conférant aux hydrolysats de poisson un fort potentiel pour des utilisations en nutrition, humaine ou animale.

Concernant les teneurs en cendres, elles sont équivalentes entre les hydrolysats et inférieures à 10%, comme ce que l'on retrouve pour la plupart des hydrolysats de poisson (Chalamaiah *et al.*, 2012). Généralement, elles sont moins importantes pour les hydrolysats obtenus en conditions de pH non contrôlées. En effet, en conditions de pH contrôlées, l'ajout de soude pour maintenir une valeur constante augmente la teneur en minéraux de l'échantillon (Gbogouri *et al.* 2006 ; Kristinsson et Rasco 2000c ; Chalamaiah *et al.* 2012).

Concernant la matière sèche, un fort pourcentage est observé pour tous les hydrolysats. Il est dû au procédé de séchage (atomisation pour HC et HL), qui permet d'éliminer presque entièrement l'eau de la solution protéique à l'issue du procédé de séparation des différentes phases du mélange réactionnel. Cette étape réalisée à la fin du protocole permet d'optimiser la conservation des hydrolysats en évitant le développement bactérien.

Concernant les teneurs en lipides observées, elles sont inférieures à 10% pour les trois hydrolysats, et même inférieure à 5% pour HL. La revue de littérature de Chalamaiah *et al.*

(2012) révèle que la plupart des hydrolysats de poisson montrent des teneurs en lipides inférieures à 5% et seulement une minorité au-dessus de 5%. Or, les hydrolysats étudiés résultent de protocoles réalisés en laboratoire. Si l'on s'intéresse à l'étude de Opheim *et al.* (2015), qui a comparé les teneurs en lipides d'un même procédé d'hydrolyse réalisé en laboratoire et transposé à l'échelle industrielle, on remarque que les teneurs en lipides de l'hydrolysats obtenu à l'échelle industrielle sont presque quatre fois plus élevées que celles de l'hydrolysats obtenu en laboratoire, avec une teneur de 3,3% contre 12,9%. Le changement d'échelle ne permet pas de reproduire les conditions exactes du laboratoire, et c'est le cas pour l'étape d'élimination de la matière grasse. Dans cette étude, l'étape de centrifugation à l'échelle pilote s'avère efficace car elle permet d'obtenir des teneurs en lipides inférieures à 10%, comparables à un produit commercialisé comme le CPSP 90, d'autant plus que les co-produits de saumon utilisés pour cette étude sont riches en lipides.

Les teneurs en lipides dans l'aliment jouent un rôle important dans la survie et le développement des larves. Une première expérimentation sur des larves de bars, qui n'a pas été décrite ici, a été réalisée avec des aliments préparés à partir d'hydrolysats dont les teneurs en lipides étaient respectivement de 13,3% pour HC et 24,3% pour HL. Les larves ont présenté des croissances très faibles et par conséquent, un mauvais état physiologique général qui a entraîné des taux de mortalités inhabituels dans certains bacs. Une des hypothèses pour expliquer les taux de croissance faible est que les granulés, du fait de leur teneur en matière grasse, s'aggloméraient, rendant leur ingestion plus difficile du fait de leur grosse taille et entraînant une sous-alimentation des larves. Ainsi, le protocole a été modifié pour obtenir les résultats présentés ici, en ajoutant une deuxième étape de centrifugation. Cela souligne l'importance de la composition proximale de l'hydrolysats sur ses propriétés et, surtout, la prise en compte des caractéristiques particulières de la matière première, en particulier si celle-ci est riche en matière grasse. Par ailleurs, la FAO a établi une valeur standard pour l'utilisation des hydrolysats en alimentation humaine, dont la teneur ne doit pas dépasser les 0,5% de matière grasse. Ainsi, pour un développement futur concernant d'autres applications, l'étape d'élimination de la matière grasse sera à optimiser. Il serait alors possible de travailler sur l'élimination de celle-ci en amont du protocole, grâce à l'utilisation d'un tricanteur centrifuge par exemple.

2.2.1.4 Teneur en acides aminés

Le Tableau 56 présente la teneur en acides aminés de chacun des hydrolysats.

Tableau 56. Composition en acides aminés totaux des hydrolysats HC et HL obtenus en conditions pilotes

A. aminés	Teneur (%)	
	HC	HL
Ala	5,22 ± 0,42	5,13 ± 0,41
Arg	5,07 ± 0,41	4,87 ± 0,39
Asp	6,63 ± 0,53	6,25 ± 0,50
Cys	0,62 ± 0,05	0,58 ± 0,05
Glu	9,91 ± 0,79	9,71 ± 0,78
Gly	8,15 ± 0,65	7,39 ± 0,59
His	1,62 ± 0,13	1,58 ± 0,13
Iso	2,67 ± 0,21	2,74 ± 0,22
Leu	4,75 ± 0,38	4,56 ± 0,36
Lys	5,22 ± 0,42	5,02 ± 0,40
Met	1,87 ± 0,15	1,79 ± 0,14
Phe	2,70 ± 0,22	2,61 ± 0,21
Pro	4,47 ± 0,36	4,44 ± 0,36
Ser	3,26 ± 0,26	3,24 ± 0,26
Thr	3,19 ± 0,15	3,06 ± 0,24
Trp	0,56 ± 0,04	0,56 ± 0,04
Tyr	2,06 ± 0,16	2,06 ± 0,16
Val	3,34 ± 0,27	3,33 ± 0,27

Les deux hydrolysats produits présentent un profil équivalent en acides aminés. L'acide aminé le plus abondant est l'acide glutamique (9,91% pour HC et 9,71% pour HL), suivi de la glycine (8,15% pour HC et 7,39% pour HL) et enfin, de l'acide aspartique (6,63% pour HC et 6,25% pour HL). Les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur que celles retrouvées par Opheim *et al.* (2015) sur l'hydrolyse de co-produits de saumon à l'échelle industrielle, avec une teneur de 10,33% pour l'acide glutamique, de 7,86% pour la glycine, et enfin de 7,05% pour l'acide aspartique. Dans la littérature, l'acide aspartique et l'acide glutamique sont les acides aminés les plus abondants pour le capelin (Shahidi *et al.*, 1995), le merlu du Pacifique Nord (Benjakul et Morrissey, 1997), le hareng (Liceaga-Gesualdo et Li-Chan, 1999), le sélar à bande dorée

(Klompong *et al.*, 2009) ou encore le maquereau japonais (Hou *et al.*, 2011), entre autre, comme le détaille la revue de littérature de Chalamaiah *et al.* (2012).

De plus, les deux hydrolysats produits possèdent tous les acides aminés essentiels aux poissons: l'arginine (5,07%), l'histidine (1,62%), l'isoleucine (2,67%), la leucine (4,75%), la lysine (5,22%), la méthionine (1,87%), la phénylalanine (2,70%), la thréonine (3,19%), le tryptophane (0,56%) et enfin la valine (3,34%). À partir de ces acides aminés, tous les autres acides aminés, qualifiés traditionnellement comme non essentiels, peuvent alors être synthétisés. Ainsi, les différents rôles des acides aminés, illustrés dans la Figure 96, peuvent être assurés.

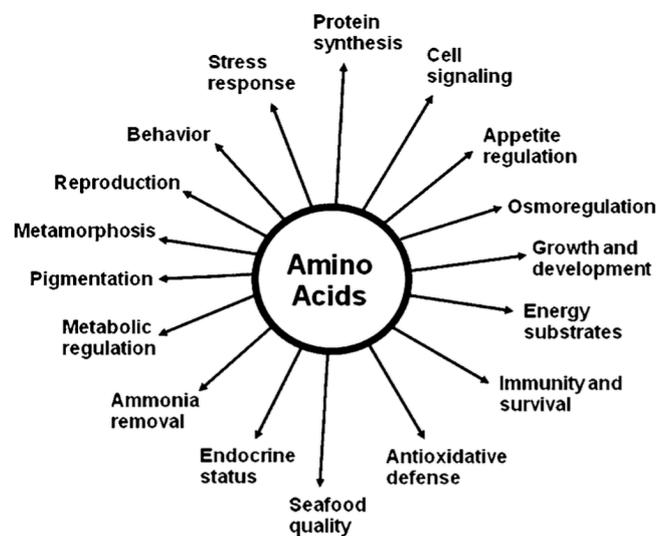


Figure 96. Représentation du rôle des acides aminés dans la croissance, le développement et la santé des poissons (tiré de Li *et al.*, 2009a).

Cette première section a décrit les caractéristiques des deux hydrolysats produits et qui seront incorporés dans les aliments afin de tester leurs performances zootechniques sur les larves de bar. Les deux protocoles d'hydrolyse enzymatique ont permis d'obtenir d'une part, un hydrolysate au DH plus élevé que l'hydrolysate commercial couramment utilisé en aquaculture et, d'autre part, un deuxième hydrolysate enrichi en di- et tripeptides par rapport aux deux autres. Par ailleurs, ils ont une composition proximale et une teneur en acides aminés comparables, permettant ainsi d'évaluer uniquement l'effet du poids moléculaire sur les malformations de larves de bar.

### **2.3 Étude de l'influence du degré d'hydrolyse sur le développement larvaire de bars *Dicentrarchus labrax***

Les deux hydrolysats produits à l'échelle pilote et caractérisés précédemment ont été incorporés dans la formulation de granulés utilisés en alimentation aquacole, afin d'étudier l'influence de l'enrichissement de deux proportions différentes de peptides de petits poids moléculaire (inférieure à 500 Da), sur les performances zootechniques de larves de bar, et plus particulièrement, l'effet sur les malformations. Pour cela, la croissance des larves en terme de poids et de taille, a été étudiée au milieu de l'expérimentation (J-26) et à la fin de l'expérimentation (J-42). L'étude des malformations de la colonne vertébrale et de la tête ainsi que l'ossification des larves a été réalisée à la fin de l'expérimentation, de même que l'étude des taux de survie.

#### **2.3.1 Teneurs en di- et tri-peptides des aliments testés**

Trois aliments différents ont été fabriqués en intégrant dans leur formulation au choix, un des deux hydrolysats produits à l'échelle pilote (HC ou HL) ou bien l'hydrolysat commercial CPSP 90. On appellera ces trois aliments HC, HL et Témoin, respectivement. Ils présentent une composition proximale isoprotéiques et isolipidiques mais leur teneur en peptides de petit poids moléculaire, et plus particulièrement la fraction inférieure à 500 Da, les différencie. Ainsi, leur apport nutritionnel est comparable et seule l'influence de la forme moléculaire de leur portion azotée peut alors être étudiée sur les performances zootechniques des larves de bar.

Pour comparer plus facilement les trois aliments testés dans cette expérimentation à ceux utilisés dans d'autres études, le pourcentage de peptides de poids inférieur à 500 Da a été rapporté à la quantité d'azote totale dans l'aliment. Ainsi, si l'on étudie la composition des aliments fabriqués, le témoin contient 4% de dipeptides, tripeptides et acides aminés libres, l'aliment HC en présente 10% (soit 6% de plus que le témoin) tandis qu'il est de 15% pour l'aliment HL (soit 11% de plus que pour le témoin). Entre les aliments HC et HL, cette teneur présente un écart de 5%. Le Tableau 57 recense les différentes teneurs en peptides de taille inférieure à 500Da retrouvées dans des aliments testés sur des larves de bar dans la littérature.

Tableau 57. Composition en di- et tripeptides de différents aliments testés sur des larves de bars dans la littérature

Référence	Aliment	% de peptides < 500 Da*
Zambonino et al. 1997 -> 3 aliments testés	P0	0
	P20	20%
	P40	40%
Cahu et al. 1999 -> 4 aliments testés	H0	0
	H19	6%
	H38	12%
	H58	18%
Kotzamanis et al. 2007 -> 4 aliments testés	C10	7%
	S10	11%
	C19	13%
	S19	23%
Delcroix et al. 2015 -> 6 aliments testés	Témoin	4%
	HYD2	6%
	HYD3	7%
	HYD5	17%
	HYD4	19%
	HYD1	22%
Pesk&Co -> 3 aliments testés	Témoin	4%
	HC	10%
	HL	15%

\* exprimé en % de peptides <500 Da/quantité azote total des aliments

L'étude de Zambonino *et al.* (1997) a été la première à démontrer l'impact positif de l'incorporation d'un apport protéique sous forme de di- et tripeptides sur la croissance et les malformations des larves de bar. Cependant, les résultats ont également démontré qu'une trop grande proportion de peptides de petits poids moléculaire a un impact négatif sur la croissance des larves, un résultat confirmé par Cahu *et al.* (1999). Les auteurs préconisent donc d'utiliser un niveau modéré de di- et tripeptides dans les aliments, c'est-à-dire sans dépasser des valeurs autour de 20%. Ainsi, les études plus récentes ne dépassent pas des pourcentages d'incorporation de 23%. Par ailleurs, ces considérations ont également été confirmées sur des études concernant d'autres espèces comme le flétan (Hamre *et al.*, 2001), la carpe (Carvalho *et al.* 2004) ou encore le sar commun (De Vareilles *et al.* 2012).

Les études citées précédemment utilisent des hydrolysats issus de matières premières d'origine marine mais on peut également citer les travaux de Gisbert *et al.* (2012) et Skalli *et al.* (2014) qui ont étudiés l'incorporation dans des aliments aquacoles d'hydrolysats de levures et de sang de porc.

### 2.3.2 Étude de la croissance des larves

#### 2.3.2.1 Poids des larves

La Figure 97 compare les poids moyens des larves obtenus en fonction du régime alimentaire à J-26, c'est-à-dire après 9 jours d'alimentation avec des granulés uniquement, le co-feeding ayant duré jusqu'à J15. Les larves nourries avec HL montre le poids le plus important avec une valeur moyenne de 4,044mg, contre 4,088mg pour les larves nourries avec HC et 3,745mg pour les larves nourries avec l'aliment témoin, mais les différences observées ne sont pas significatives. Ainsi, à ce stade de développement et dans ces conditions expérimentales, les DH des hydrolysats incorporés aux aliments n'ont pas d'influence sur le poids moyen des larves de bar.

Par ailleurs, les poids observés montrent des ordres de grandeurs comparables aux données retrouvées dans les études de Zambonino *et al.* (1997) et Delcroix *et al.* (2015), tandis qu'elles sont supérieures à celles de Cahu *et al.* (1999) et Skalli *et al.* (2014), pour un stade de développement équivalent, mais inférieures à celles de Kotzamanis *et al.* (2007) pour des aliments présentant des teneurs en di- et tripeptides similaires. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les lots d'œufs ne donnent pas toujours des larves aux performances zootechniques comparables (Boglione *et al.*, 2013b).

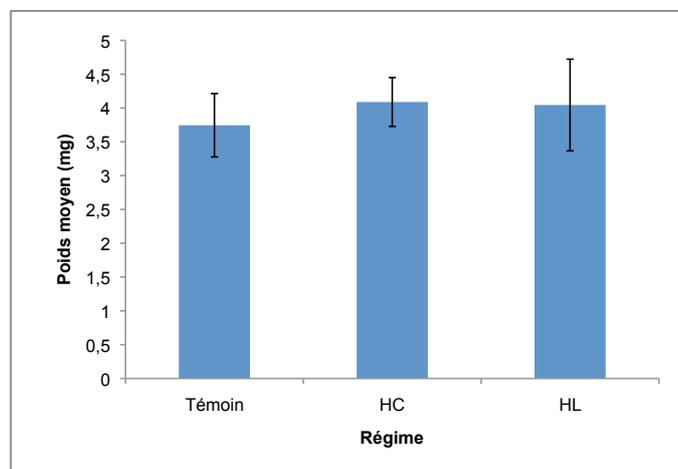


Figure 97. Comparaison des poids moyens des larves obtenus pour les trois différents régimes à J-26.

La Figure 98 compare les poids moyens des larves obtenus en fonction du régime alimentaire à J-42. Les larves nourries avec HL montrent un poids moyen supérieur à celui des larves nourries avec les deux autres régimes: il est 1,11 fois plus élevé que pour celui des larves nourries avec le régime témoin et 1,27 fois plus élevé que celui des larves nourries avec le régime HC. Cependant, une différence significative est observée uniquement entre le régime HC et le régime HL,

indiquant que l'enrichissement en di- et tripeptides dans l'aliment HL procure un avantage aux larves en terme de gain de poids, en comparaison avec le régime HC. Comme pour les valeurs retrouvées à J-26, celles-ci sont comparables à celles retrouvées dans l'étude de Zambonino *et al.* (1997), tandis qu'elles sont supérieures à celles de Cahu *et al.* (1999) et Skalli *et al.* (2014) pour des aliments présentant des teneurs en di- et tripeptides similaires.

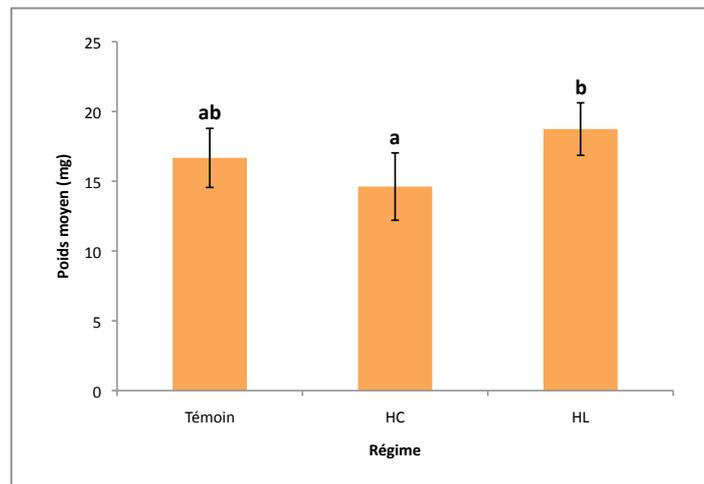


Figure 98. Comparaison des poids moyens des larves obtenus pour les trois différents régimes à J-42 (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Ces résultats montrent donc qu'à J-26, les régimes alimentaires n'ont pas d'influence visible sur la croissance des larves même si les larves alimentées avec le régime HL montrent le poids moyen le plus élevé. Cette tendance se confirme à J-42, où leur poids moyen est significativement plus important que celui des larves nourries avec HC mais équivalent à celui des larves nourries avec l'aliment témoin. Par conséquent, l'incorporation de di- et tripeptides dans le régime HL n'a pas d'influence sur la croissance des larves, par rapport au régime témoin, confirmant un niveau encore modéré d'incorporation de di- et tripeptides et ainsi, n'entraînant pas de désavantage physiologique sur les larves. Les différentes études permettant d'aboutir à la mise au point de l'aliment témoin breveté (Zambonino *et al.* 2000 brevet international WO 00/64273) ont émis l'hypothèse, par l'étude du niveau d'activité des enzymes digestives, que l'incorporation d'un niveau modéré de di- et tripeptides dans l'aliment permettait le bon déroulement de la séquence de maturation du système digestif des larves (Cahu *et al.*, 1999; Zambonino *et al.*, 1997). Les larves sont alors capables d'assimiler correctement les nutriments fournis et s'en suit alors une amélioration globale du développement des larves. Cette hypothèse a été évoquée dans d'autres études sur les larves de bar (Delcroix *et al.*, 2015; Kotzamanis *et al.*, 2007; Skalli *et al.*, 2014) mais également sur des travaux concernant la daurade royale (Gisbert *et al.*, 2012). Cependant Delcroix *et al.* (2015) précise qu'encore aucune relation n'a été

clairement établie entre les teneurs en di- et tripeptides dans l'aliment et la maturation du système digestif. L'étude des mécanismes impliqués reste donc encore une piste à explorer.

Plus généralement, les différences significatives observées entre les régimes HC et HL sont observées à J-42. Or, d'autres études montrent des différences significatives à des temps plus précoces dans le développement des larves. Par exemple, Zambonino *et al.* (1997) observent une amélioration de la croissance dès J-26 mais uniquement pour l'aliment enrichi à 40% en di- et tripeptides et à J-30 pour le régime enrichi à 20%, pour Cahu *et al.* (1999) c'est à J-35 que les régimes à 0 et 6%, se démarquent de manière positive des régimes à 12% et 18%. On peut également citer Kotzamanis *et al.* (2007) qui en observent dès J-15, Delcroix *et al.* (2015) à J-30 et enfin, Skalli *et al.* (2014) à J-25. Il serait alors intéressant de répéter l'expérimentation avec des prélèvements supplémentaires entre J-26 et J-42 afin de définir à quel moment les aliments ont un impact significatif sur le développement des larves.

### 2.3.2.2 Taille des larves

La Figure 99 compare les tailles moyennes des larves obtenues en fonction des trois régimes à J-26. A ce stade de développement, aucune différence significative n'est observée sur les tailles moyennes des différents groupes, comme c'est le cas pour les données obtenues avec la pesée des larves. Les larves alimentées avec le régime HL présentent la taille moyenne la plus élevée avec 9,540 mm contre 9,500 mm pour les larves nourries avec HC et 9,506 mm pour les larves nourries avec le régime témoin.

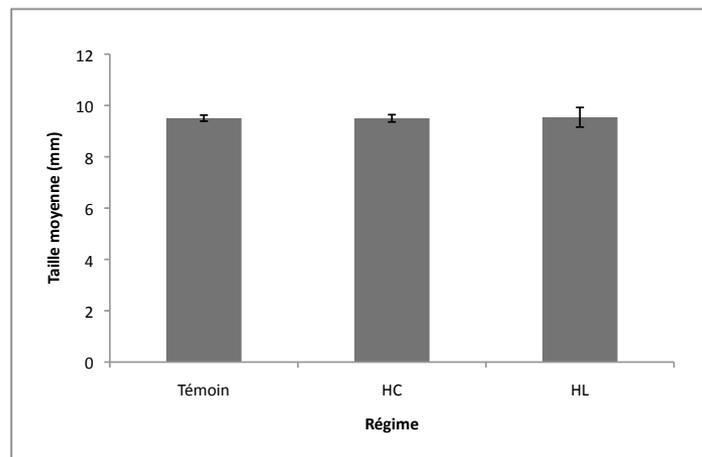


Figure 99. Comparaison des tailles moyennes des larves obtenues pour les trois différents régimes à J-26.

La Figure 100 compare les tailles moyennes des larves obtenues en fonction des trois régimes à J-42. La tendance observée à J-26 se confirme car les larves nourries avec le régime HL présentent une taille moyenne significativement plus élevée: elles sont 1,055 plus grandes que

les larves obtenues avec le régime HC et 1,047 fois plus grandes que les larves obtenues avec le régime témoin.

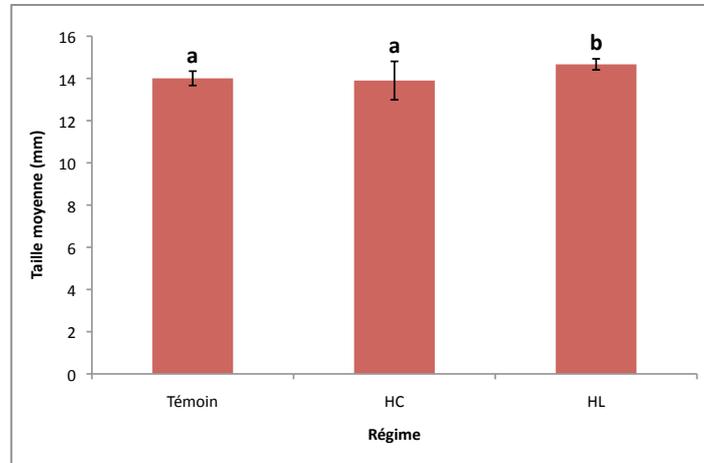


Figure 100. Comparaison des tailles moyennes des larves obtenues pour les trois différents régimes à J-42 (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Ces résultats sont en accord avec les conclusions décrites pour les données concernant le poids moyen des larves. En effet, les trois régimes n'ont pas d'influence significative sur la taille des larves à J-26 mais montrent tout de même une tendance qui est confirmée à J-42: les larves nourries avec le régime HL ont une taille moyenne significativement supérieure en comparaison avec les deux autres groupes. En revanche, tandis que la poids moyen des larves nourries avec le régime HL est comparable à celui des larves nourries avec le régime témoin, ça n'est pas le cas pour la taille moyenne des larves nourries avec le régime HL qui est supérieure à la fois à celle des larves nourries avec le régime HC et avec le régime témoin.

Dans la littérature, la mesure de la taille des larves n'est pas un paramètre pris en compte pour étudier leur croissance, et c'est la mesure du poids qui est utilisée. Cependant, c'est un paramètre qui reste un facteur représentant la croissance. On peut donc également suggérer un lien entre la taille des larves et la maturation de leur système digestif, comme ce qui a été décrit pour le poids.

### 2.3.3 Taux de survie des larves

La Figure 101 montre les taux de survie des larves observés avec chacun des régimes à la fin de l'expérimentation. La valeur la plus importante a été retrouvée pour les larves nourries avec le régime HC (73%), suivie des larves nourries avec le régime HL (66%), et enfin des larves nourries avec le régime témoin (61%). Cependant, aucune différence significative n'est observée

entre les trois régimes suggérant que l'incorporation de di- et tripeptides dans l'aliment n'a pas d'impact sur le taux de survie des larves.

Si l'on compare ces données à la littérature pour des larves nourries avec des aliments présentant des teneurs en di- et tripeptides comparables, Zambonino *et al.* (1997), Cahu *et al.* (1999) et Kotzamanis *et al.* (2007) retrouvent des taux de survie inférieurs, tandis que Skalli *et al.* (2014) et Delcroix *et al.* (2015) obtiennent des valeurs similaires. Comme pour les données obtenues pour le poids des larves, ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les lots d'œufs ne donnent pas toujours des larves aux performances zootechniques comparables (Boglione *et al.* 2013b). Cependant, (Cahu et Zambonino Infante, 1995a, b) ont décrit des taux de survie d'environ 57% pour des larves nourries avec des proies vivantes, indiquant une performance intéressante de chacun des trois aliments testés dans la présente étude.

Plus généralement, comme pour la croissance, les différents auteurs attribuent le succès du taux de survie à la maturation du système digestif des larves.

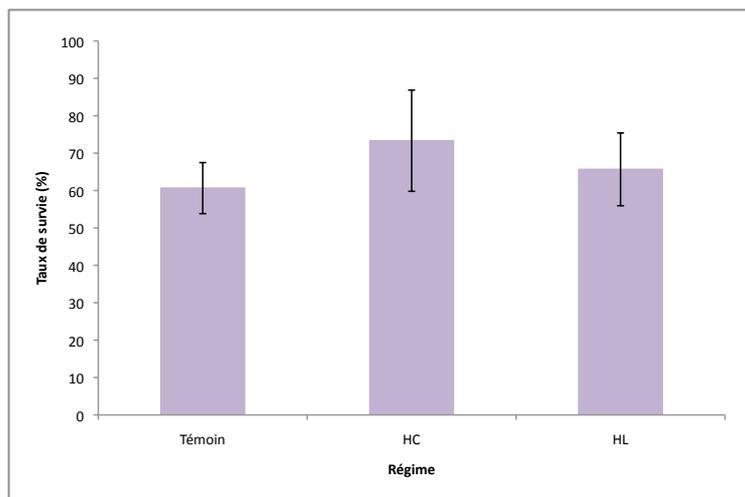


Figure 101. Taux de survie moyens des larves pour les trois différents régimes à la fin de l'expérimentation (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

#### 2.3.4 Étude des malformations du squelette des larves

La croissance et la survie des larves sont des critères intégrateurs de l'ensemble des processus métaboliques des larves, ils ont donc été étudiés avant de se pencher sur les malformations. Pour étudier ces dernières, les larves ont été scannées après avoir subi un protocole de bicoloration d'abord au bleu d'alcan, pour mettre en évidence les cartilages, suivi du rouge d'alizarine pour mettre en évidence les os (Figure 102). Le protocole choisi a permis de mettre en évidence uniquement les anomalies les plus sévères observables à la fin de l'expérimentation, soit à J-42.

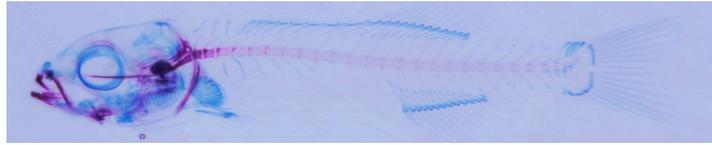


Figure 102. Observation après bicoloration d'une larve scannée présentant une morphologie normale.

#### 2.3.4.1 Malformations de la région céphalique

Les malformations observées sur la tête des larves peuvent affecter la dentition, la mâchoire, le crâne ou encore l'opercule (Boglione *et al.* 2013b). Par exemple, la Figure 103 montre une larve présentant une mâchoire prognathe. Ces différentes pathologies entraînent alors principalement des difficultés pour la larve à se nourrir.

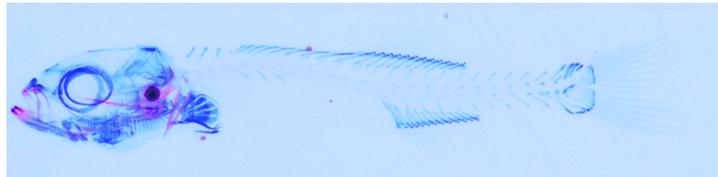


Figure 103. Observation après bicoloration d'une larve scannée présentant une mâchoire prognathe.

Dans cette étude, les différents types d'anomalies n'ont pas été distinguées et seule leur présence, ou non, a été évaluée afin d'obtenir un pourcentage moyen de malformation en fonction du régime alimentaire. Les résultats sont présentés sur la Figure 104. Le taux de malformations le plus bas a été observé pour les larves nourries avec le régime HC avec  $5,63\% \pm 2,17\%$  de larves malformées. Cette valeur est significativement plus faible que celle observée pour les larves alimentées avec le régime témoin avec  $11\% \pm 1,83\%$ , qui est la valeur la plus importante des trois groupes. Quant aux larves nourries avec le régime HL, leur taux de malformation est à comparable aux deux autres groupes ( $8,25\% \pm 1,5\%$ ). Ainsi, l'incorporation de di- et tripeptides à hauteur de 10% dans l'aliment permet une diminution significative des malformations des larves observées sur la région céphalique. En revanche, une incorporation à hauteur de 15% n'a pas d'influence sur ce type de malformations. Dans la littérature, les malformations sont généralement observées au niveau de la colonne vertébrale, les résultats seront donc comparés à d'autres études et discutés dans la section suivante.

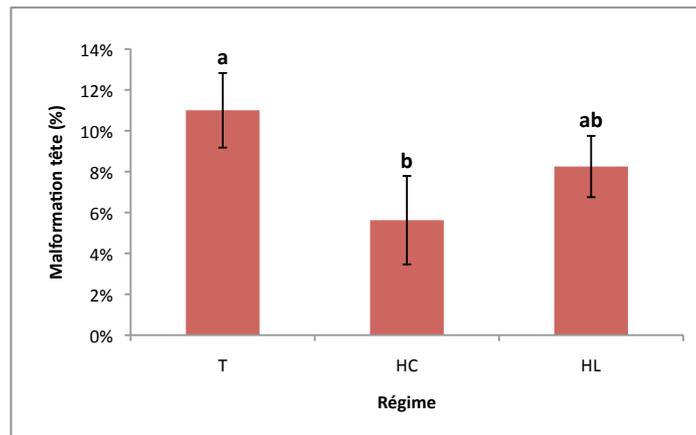


Figure 104. Pourcentage de malformations observées au niveau de la tête des larves pour les trois différents régimes à J-42 (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

#### 2.3.4.2 Malformations de la colonne vertébrale

Les malformations observées sur la colonne vertébrale peuvent prendre plusieurs formes: la lordose (malformation en V, courbe dorso-ventrale), la cyphose (malformation en A, courbe dorso-ventrale), la scoliose, un raccourcissement de la colonne ou encore une dislocation ou une fusion des vertèbres (Boglione *et al.*, 2013b). Leur terminologie et leur description sont plus approfondies que les malformations touchant le crâne. Dans cette étude, comme pour la section précédente, l'ensemble des malformations de la colonne vertébrale va être pris en compte sans distinguer les différents types. Les malformations qui ont pu être observées sont illustrées sur la Figure 105.

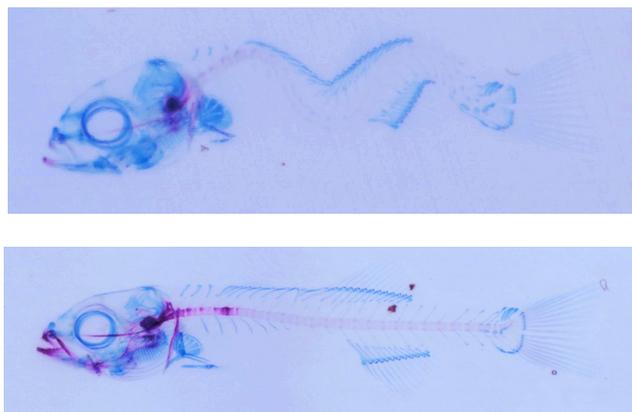


Figure 105. Observation après bicoloration de larves scannées et présentant des déformations de la colonne vertébrale.

La Figure 106 montre les taux de malformation de la colonne vertébrale obtenus pour les larves en fonction du régime alimentaire. Les larves nourries avec le régime HL montrent un taux significativement plus bas que les groupes nourris avec le régime témoin et HC, avec

13,25%±2,75% de larves malformées contre 13,88%±3,17% et 7,50%±1,29%, respectivement. En revanche, aucune différence n'est observée entre les larves nourries avec le régime témoin et celles nourries avec le régime HC. Ainsi, l'incorporation de di- et tripeptides dans l'aliment à hauteur de 15% permet de diminuer significativement les taux de malformations.

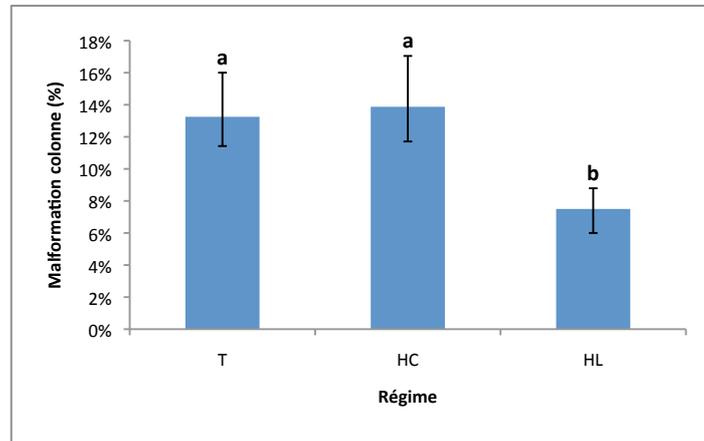


Figure 106. Pourcentage de malformations observées au niveau de la colonne vertébrale des larves pour les 3 différents régimes à J-42 (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Ces valeurs sont plus élevées que celles retrouvées dans la littérature pour des larves nourries avec un aliment formulé à partir du même hydrolysate (CPSP 90) et présentant des teneurs comparables en terme de di- et tripeptides (Cahu *et al.*, 1999). Cette différence peut, comme pour les données observées pour le poids et les taux de survie, être due aux différentes qualités des œufs (Boglione *et al.*, 2013b).

En revanche, la tendance vers une diminution des malformations des larves de bar avec l'incorporation de teneurs plus importantes en di- et tripeptides dans l'aliment confirme les résultats de Zambonino *et al.* (1997) et Cahu *et al.* (1999). Gisbert *et al.* (2012) sont également arrivés aux mêmes conclusions pour une étude concernant les larves de daurade royale. Ce phénomène serait relié, comme pour l'amélioration des performances de croissance, à une augmentation de la capacité protéolytique du pancréas et d'un développement plus précoce de la digestion intestinale (Zambonino et Cahu, 2010). En effet, la mise en place de ce dernier processus permettrait alors d'améliorer l'utilisation des nutriments contenus dans les aliments et qui influencent la squelettogenèse, contribuant ainsi à un meilleur développement du squelette (Cahu *et al.*, 2003 ; Lall et Lewis-McCrea, 2007 ; Zambonino et Cahu, 2010). Plus généralement, il résulte de l'incorporation de di- et tripeptides dans l'aliment une amélioration globale de l'état physiologique de la larve se traduisant par, une meilleure croissance, un taux de survie plus élevé, et des larves présentant moins de malformations. Cependant, comme ce qui a été discuté pour le poids, le lien direct entre les apports en peptides de l'aliment et les mécanismes mis en jeu dans la diminution des malformations n'a pas été clairement établi.

Par ailleurs, Gisbert *et al.* (2012) suggèrent une hypothèse supplémentaire pour expliquer les différences observées au niveau des malformations et évoquent une influence possible de la composition en acides aminés de l'hydrolysate incorporé dans l'aliment. En effet, le rôle exact des acides aminés dans la squelettogenèse n'a pas encore été étudié chez les poissons, mais des études concernant des vertébrés supérieurs indiquent que les acides aminés comme la leucine, la phénylalanine et la valine sont très importants dans le développement de la matrice osseuse extracellulaire. La phénylalanine serait nécessaire au maintien des propriétés morphogénétiques de l'os de la matrice osseuse (Urist et Iwata, 1973), la leucine serait un composant principal de certains protéoglycanes, les constituants les plus abondants de protéines non-collagéniques de la matrice osseuse (Robey, 2002) tandis que la valine agirait sur les teneurs en calcium dans l'os et sur les malformations du squelette chez le poussin (Farran et Thomas, 1992). Ainsi, des teneurs plus basses en ces acides aminés dans les hydrolysats pourraient entraîner des problèmes de malformations, bien que cette hypothèse reste encore à confirmer chez le poisson. Dans cette étude, cette suggestion peut être rejetée car d'une part, les hydrolysats HC et HL ont les mêmes teneurs en acides aminés et d'autre part, le CPSP 90 avec une teneur en phénylalanine de 3,6%, en leucine de 7,7% et en valine de 5,2% (Kotzamanis *et al.*, 2007) présente des teneurs plus hautes pour ces acides aminés concernés.

D'un autre côté, les résultats de l'étude De Vareilles *et al.* (2012) ne montrent pas d'impact de l'incorporation de di- et tripeptides dans l'aliment sur les malformations apparentes des larves de *Sar comminatus*. En revanche, les différents régimes testés ont une influence sur l'expression de protéines impliquées dans divers processus métaboliques. Cela laisse donc penser que, dans cette étude, des analyses supplémentaires en protéomique pourraient dévoiler des différences entre les régimes, des différences étant déjà visibles au niveau phénotypique.

#### 2.3.4.3 Malformations de la région céphalique et de la colonne vertébrale sans distinction

Plus généralement, la Figure 107 représente les moyennes des pourcentages de malformation observée au niveau de la colonne vertébrale et de la région céphalique des larves en fonction des trois régimes testés. Une différence significative est observée entre le régime témoin et le régime HL suggérant l'influence positive de l'incorporation de di- et tripeptides de 15% (au lieu de 4% pour le régime témoin) sur la diminution des malformations observées sur les larves de bar.

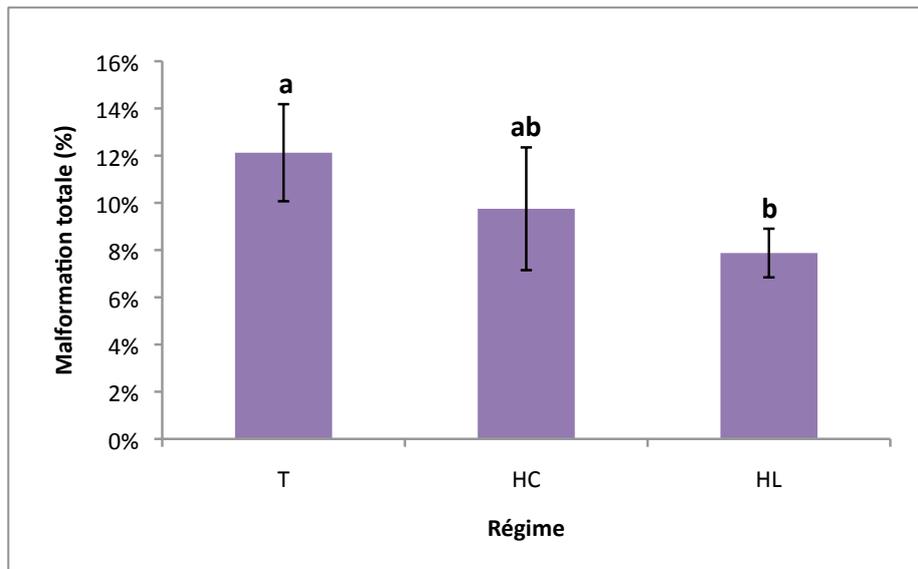


Figure 107. Moyenne entre les pourcentages de malformations observées au niveau de la colonne vertébrale et au niveau de la tête des larves pour les 3 différents régimes à J-42 (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

#### 2.3.4.4 Étude de l'ossification des larves

Différents degrés de coloration des parties osseuses des larves ont été observées, suggérant des anomalies concernant le processus d'ossification des larves entre les différents groupes, comme le montre la Figure 108. Cependant, les résultats présentés demandent encore à être confirmés par des techniques d'analyses complémentaires (expression de gènes impliqués dans les processus d'ossification) car ces observations pourraient également être dues à un problème dans le protocole de bicoloration des larves.



Figure 108. Observation après bicoloration d'une larve scannée présentant une très faible coloration des os.

La Figure 109 représente les pourcentages de larves dont le processus d'ossification a été perturbé, en fonction du régime alimentaire. Les résultats montrent une diminution significative des anomalies d'ossification avec le régime HL ( $27,75\% \pm 2,06\%$ ), donc le plus riche en di et tri-peptides en comparaison avec les deux autres groupes ( $57,94\% \pm 8,78\%$  pour HC et  $42,75\% \pm 3,50\%$  pour le témoin) tandis que le régime HC montre le taux significativement le plus élevé.

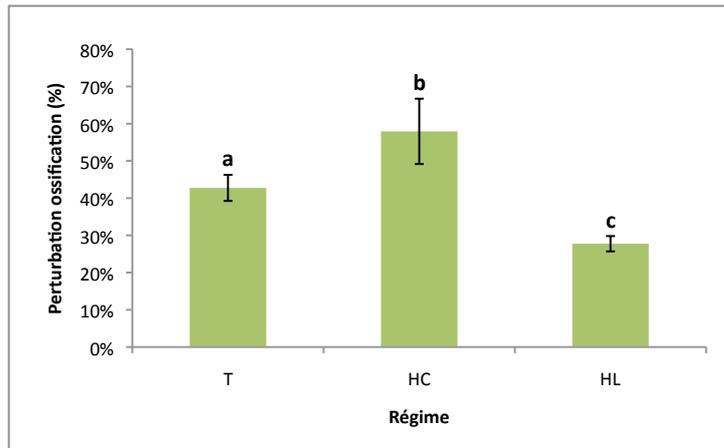


Figure 109. Pourcentage de perturbations de l'ossification observées des larves pour les 3 différents régimes (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 3. Conclusion et perspectives

#### 3.1 Caractérisation des hydrolysats

##### 3.1.1 Principaux résultats

Les deux protocoles d'hydrolyse développés dans cette étude ont permis d'obtenir deux hydrolysats dont les caractéristiques répondent à l'objectif fixé initialement, à savoir, des compositions peptidiques contrastées et plus particulièrement, concernant les pourcentages en di- et tripeptides :

- le premier hydrolysate présente 40,09% de peptides de poids moléculaire inférieur à 500 Da

- le deuxième hydrolysate présente 61,38% de peptides de poids moléculaire inférieur à 500 Da

Ils ont été obtenus grâce à l'utilisation de deux protéases, l'Alcalase et la Flavourzyme, dont les mécanismes d'action différents, endoprotéase pour la première et à la fois endoprotéase et exoprotéase pour la deuxième, ont permis l'obtention d'hydrolysats aux DH importants se traduisant par des pourcentages élevés en peptides de poids moléculaire inférieur à 500 Da, et ce, sans utiliser de méthodes d'ultrafiltration. Les protocoles d'hydrolyse ont été couplés à l'analyse des poids moléculaire en chromatographie d'exclusion stérique, permettant ainsi d'orienter les conditions expérimentales en fonction des propriétés recherchées pour les hydrolysats afin de les réaliser « à façon ». Par ailleurs, les deux hydrolysats possèdent une composition proximale et des teneurs en acides aminés comparables, des caractéristiques essentielles pour la suite de l'étude concernant l'évaluation de leurs performances *in vivo*.

### 3.1.2 Perspectives

La chromatographie d'exclusion stérique s'est imposée comme un outil clé dans le développement de ces hydrolysats, d'une part pour développer le protocole en laboratoire (choix des conditions d'hydrolyse) et d'autre part pour assurer le transfert d'échelle. Cependant, cette technique d'analyse présente des limites, et en particulier dans l'analyse des échantillons de petit poids moléculaire. Dans ce sens, des études ont travaillé sur le développement de techniques d'analyses plus approfondies des hydrolysats. C'est le cas de l'équipe de Robert *et al.* (2014), dont le travail a consisté à combiner une approche transcriptomique, qui permet l'obtention de bases de données ciblées, à une approche peptidomique (spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF et ESI-MS/MS) pour analyser la composition d'un hydrolysat issu de co-produits de crevettes. Cette stratégie a permis l'identification de plus de 1000 peptides permettant d'apporter des informations importantes quant à la diversité des peptides et concernant les catégories de protéines dont ils sont issus. Ces informations vont permettre d'expliquer et/ou de prédire leurs propriétés et ajuster leur procédé de fabrication en fonction des objectifs et des performances ciblées. Cependant, l'identification des peptides de poids moléculaire inférieure à 500 Da reste encore difficile et les auteurs imaginent alors des modèles informatiques de prédiction des séquences de peptides grâce à l'utilisation de leurs caractéristiques comme leur masse, leur temps de rétention en rp-HPLC, leur indice d'hydrophobicité (Schmelzer *et al.*, 2004). Également, une banque de spectres MS/MS regroupant tous les di, tri et tétrapeptides pourrait être envisagée sur le modèle de données métabolomiques. On peut également citer les travaux de Lassoued *et al.* (2015) qui, par une approche peptidomique, ont identifié les séquences en acides aminés de peptides avec une activité anti-ACE. Cette étude a permis de mettre en évidence la présence de certains acides aminés et leur position, retrouvée dans d'autres peptides présentant cette même activité et suggérant leur possible implication dans la bioactivité.

Ainsi, l'hydrolysat HC a fait l'objet d'une analyse plus poussée suivant le protocole de Robert *et al.* (2014), en collaboration avec cette même équipe, et dont l'analyse des résultats est encore en cours.

## 3.2 Évaluation *in vivo* des performances des hydrolysats

### 3.2.1 Principaux résultats

Le deuxième volet de cette étude a concerné l'évaluation des performances des hydrolysats *in vivo* dans des aliments aquacoles et plus précisément l'étude de l'influence de l'incorporation de

proportions croissantes en di- et tripeptides (4% pour l'aliment témoin, 10% pour l'aliment HC et 15% pour l'aliment HL) sur les malformations des larves de bar. Dans un premier temps, le travail a porté sur l'analyse des phénotypes des larves soumises aux trois différents régimes. Concernant la croissance, tandis qu'il est encore trop tôt pour observer des différences à J-26, on observe à J-42 un effet positif de l'aliment HL sur le poids de larves en comparaison avec le régime HC mais comparable au poids moyen obtenu avec le régime témoin. L'étude de la taille des larves a, elle, révélée une influence significativement positive du régime HL par rapport aux deux autres régimes. Concernant les taux de survie, ils sont comparables entre les trois groupes soumis aux différents régimes. Si l'on se penche sur les taux de malformation, le régime HC permet de diminuer significativement le taux de malformations observé dans la région céphalique des larves par rapport au régime témoin, mais il est comparable à celui retrouvé pour le régime HL. Concernant les malformations observées sur la colonne vertébrale des larves, le régime HL se distingue des deux autres en montrant des larves significativement moins impactées par ces malformations. Plus généralement, si l'on compare les moyennes des malformations observées sans distinguer les différents types, on constate une influence significativement positive sur la diminution des malformations observées avec le régime HL, en comparaison avec les deux autres. Ces résultats permettent de conclure sur l'influence positive de l'incorporation de di- et tripeptides dans l'aliment, à hauteur de 15%, sur les malformations des larves de bar. De précédentes études ont démontré un impact négatif d'une teneur trop importante en di- et tripeptides dans l'aliment (Zambonino *et al.* 1997 ; Cahu *et al.* 1999) mais ces observations, permettent d'affirmer que les teneurs utilisées préservent un état physiologique général de la larve comparable à celui observé pour le groupe témoin. Pour ce groupe, l'aliment utilisé est breveté et couramment utilisé en écloserie (Zambonino *et al.*, 2000 /brevet international WO 00/64273), permettant de valider les résultats qui sont alors considérés comme acceptables à une échelle de production.

### **3.2.2 Perspectives**

Bien que de nombreux auteurs évoquent le lien entre un retard dans la maturation du système digestif des larves provoqué par un apport protéique inadapté, et un mauvais état physiologique général, qui conduirait à l'apparition de malformations (Zambonino *et al.* 1997 ; Cahu *et al.* 1999 ; Cahu *et al.*, 2003), les mécanismes impliqués n'ont pas encore été mis en évidence (Boglione *et al.*, 2013a). Dans ce sens, les technologies « omic » se présentent comme des outils intéressants pour développer des connaissances sur ce sujet. Dans la présente étude, des

analyses en génomique et en protéomique pourraient aider à comprendre de quelle manière l'incorporation de di- et tripeptides améliore la squelettogenèse des larves.

D'une part, l'expression de gène est un mécanisme fondamental dans le processus d'ontogenèse des larves. Au cours de cette période, plusieurs processus biologiques (différenciation, prolifération cellulaire, croissance etc) sont contrôlés à différents niveaux, impliquant particulièrement l'expression de gènes associés au développement larvaire (Mazurais *et al.*, 2011). L'étude du transcriptome d'un individu, grâce à la mise au point de ressources bioinformatiques (séquences ADN et d'ADN complémentaire) et d'outils moléculaires pour l'analyse à haut débit de l'expression de gènes, permet d'identifier des gènes sur-exprimés ou sous-exprimés afin d'étudier la possible influence de différents facteurs auxquelles les individus sont soumis. Par exemple, l'étude de l'incorporation de différents niveaux de vitamine D dans l'alimentation de larves de bar a révélé qu'une déficience en vitamines était associée à la régulation de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation des cellules, plus particulièrement au sein du système nerveux (Mazurais *et al.*, 2011). Ainsi, ces mêmes auteurs indiquent que cette approche « nutriginomique » en est encore à ses débuts concernant l'étude des stades de développement des poissons. Ils soulignent alors le rôle qu'elle pourrait jouer pour comprendre comment la nutrition peut influencer les processus biologiques, y compris les voies métaboliques et ontogéniques. Dans les cas des malformations des larves de bar, leur prévalence rend nécessaire l'approfondissement des connaissances concernant les facteurs génétiques et épigénétiques responsables de ces anomalies (Boglione *et al.*, 2013 a).

D'autre part l'analyse du protéome des individus ne donne pas uniquement des informations au niveau mécanistique, comme c'est le cas pour la génomique, mais permet de détecter des changements d'activité des protéines, en mesurant des modifications apparaissant au niveau post-traductionnel. Ainsi, la protéomique pourrait apporter des informations concernant l'état physiologique de l'animal, qui n'apparaîtraient pas au niveau du transcriptome. Par exemple, les travaux menés par De Vareilles *et al.* (2012) sur les malformations squelettiques des larves de sar commun ont étudié l'influence de l'incorporation de différents teneurs de di- et tripeptides dans l'alimentation sur la croissance, le niveau de malformations, et le protéome. Les résultats ont révélé un effet du poids moléculaire des protéines incorporées dans l'aliment sur le niveau d'expression de protéines impliquées dans divers processus (dynamique cytosquelettique, métabolisme énergétique et des carbohydrates, métabolisme des lipoprotéines, métabolisme des acides aminés, métabolisme nucléotidique, chaperonnage et dégradation des protéines, signal de transduction) sans avoir observé de différences au niveau phénotypique. Cette étude permet donc un premier point de départ pour comprendre le rôle de l'incorporation d'hydrolysats dans le régime alimentaire des larves de poissons téléostes.

Il serait alors intéressant de combiner une approche « nutriginomique » à une approche « nutriprotéomique » dans le but de comprendre les mécanismes conduisant à l'expression de certains gènes et la production de certaines protéines en réponse à un régime alimentaire spécifique. Richard *et al.* (2014) utilisent ces deux approches combinées pour étudier l'influence d'un apport en vitamines K à différentes doses dans l'alimentation sur le développement de la sole sénégalaise. Les auteurs ont ainsi pu distinguer en fonction des régimes testés, d'une part, des niveaux d'expression différents de protéines impliquées dans des processus biologiques clés et, d'autre part, différents niveaux d'expression de gènes codant pour des protéines liées à des processus métaboliques mettant en jeu la vitamine K. Les résultats ont ainsi mis en évidence les mécanismes mis en jeu lors de l'ingestion de vitamine K par les larves, permettant, à terme, de moduler l'alimentation pour favoriser un développement optimal. Dans ce sens, des prélèvements ont été réalisés à J-42 au cours de cette expérimentation pour réaliser des analyses en génomique et en protéomique afin de mieux comprendre l'influence du poids moléculaire de l'apport protéique de l'aliment sur le phénotype des larves, et plus particulièrement sur l'apparition de malformations. Ces analyses complémentaires vont permettre le suivi des niveaux d'expression en RNAseq et en protéomique, afin de voir si certains gènes ou certaines protéines sont surexprimées ou au contraire, sous estimées. Ces résultats sont actuellement en cours.

Un autre aspect intéressant dans le domaine de l'élevage est l'effet probiotique que peut apporter l'aliment, et plus particulièrement, l'hydrolysate. Ainsi, en plus d'un effet positif sur les taux de malformations, certaines études comme celle de Kotzamanis *et al.* (2007) et Delcroix *et al.* (2015) concernant le bar ou de Hermannsdottir *et al.*, (2009) concernant le flétan, ont observé des effets bénéfiques de l'incorporation en di- et tripeptides dans l'aliment sur le microbiome des larves, et plus généralement sur leur statut immunitaire, suggérant un effet probiotique des hydrolysats. Dans cette étude, des prélèvements à J-42 ont été réalisés afin d'étudier le microbiome des larves soumises aux trois différents régimes. Les premiers résultats, encore préliminaires, laissent penser que l'aliment HL présenterait un avantage par rapport aux deux autres régimes.



## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Les co-produits issus du filetage de saumon Atlantique d'élevage (*Salmo salar*) sont une source d'ingrédients à haute valeur ajoutée. Le projet Pesk&Co a réuni quatre partenaires industriels (Meralliance-Thai Union, Yslab, SPF-DIANA, AGH-Socofag) et un partenaire académique (LEMAR UMR 6539, UBO) dans le but de trouver des voies de valorisation de deux types de co-produits: les peaux et les têtes. Le projet s'inscrit dans une démarche qui vise à regrouper le sourcing, la fabrication et l'analyse des ingrédients au sein d'une même région, la Bretagne, notamment par la mise en place d'un circuit court, d'une chaîne de valeur traçable et par une démarche intégrative de valorisation des co-produits de saumon, de la matière première jusqu'à la mise sur le marché des ingrédients obtenus.

Le premier co-produit étudié, la peau, est riche en collagène et la première partie du travail a consisté à développer un procédé d'extraction d'un collagène de haut poids moléculaire en conditions ménagées. Le collagène obtenu a été caractérisé, puis, la possibilité de réticulation par voie enzymatique de cet ingrédient a été explorée. Les applications visées sont actuellement la cosmétique et, dans un avenir proche, les dispositifs médicaux.

Le deuxième co-produit étudié, la tête, est une source importante de protéine. La deuxième partie du travail a consisté à obtenir par hydrolyse enzymatique deux hydrolysats aux compositions peptidiques contrastées. Leurs performances ont ensuite été évaluées *in vivo* sur la diminution des malformations des larves de bar (*Dicentrarchus labrax*), afin d'étudier leur potentiel d'application en tant qu'ingrédient fonctionnel en aquaculture.

## **1. Valorisation des peaux de saumon**

### **1.1. Développement d'un procédé d'extraction d'un collagène de haut poids moléculaire**

La première partie du travail a porté sur le développement d'un procédé d'extraction du collagène qui est alternatif aux protocoles d'extraction acide couramment utilisés. Ce protocole est adapté aux spécificités du collagène extrait de poissons d'eau froide. Il a permis d'obtenir un collagène de haut poids moléculaire ayant conservé une partie de la structure en triple hélice. Le protocole a d'abord été mis au point au LEMAR. Parallèlement, un cahier des charges des caractéristiques du collagène obtenu a été établi. Un ensemble de méthodes analytiques destinées à être transférées aux partenaires industriels a été adapté, notamment pour déterminer en routine, le poids moléculaire du collagène produit. Ensuite, le protocole d'extraction a été transposé par les partenaires industriels à l'échelle pilote, puis semi-industrielle. Pour cela, les caractéristiques des échantillons obtenus à l'issue de chaque essai ont été comparées à celles définies dans le cahier des charges. De cette manière, les différents

changements opérés ont pu être validés. Au cours des changements d'échelle, l'optimisation a porté principalement sur deux points critiques :

- (1) le pré-traitement de la matière première
- (2) le conditionnement du produit

Ces développements ont permis de lever **2 freins majeurs**: d'une part **une matière première riche en lipides** dont l'oxydation risquait d'altérer les protéines et, d'autre part, **la contamination bactérienne du produit final**, du fait de la spécificité des conditions d'extraction consistant à chauffer les peaux à 50°C pendant 1h.

Concernant l'étape de pré-traitement de la matière première, il était nécessaire de mettre au point un protocole permettant d'éliminer la plus grande partie des lipides. Pour cela, l'équipement AM2C, une séparatrice, désosseuse et dénerveuse, a été utilisé. Elle présentait l'avantage de s'affranchir de toute utilisation d'eau ou de réactif pour délipider correctement la matière première, remplaçant ainsi deux étapes du protocole initial: le dépulpage pour éliminer les restes de muscle et le lavage à l'eau salée des peaux. À ce traitement mécanique s'est ajouté un pré-lavage acide/base des peaux, qui a permis de diminuer la charge microbienne des peaux.

Un conservateur, le benzoate de sodium, a été rajouté à la solution de collagène afin de maintenir une charge microbienne faible, obtenue grâce au prétraitement acide/base des peaux de saumon. Actuellement, cette dernière étape de conditionnement n'est pas complètement aboutie. En effet, le collagène sous forme liquide fait encore l'objet d'une pré-étude de vieillissement à 4°C afin d'observer une éventuelle dégradation au cours du temps. Pour cela, le poids moléculaire du collagène est analysé et comparé à celui décrit dans les deux demandes de brevet. Les 3 formes envisagées pour la commercialisation sont les suivantes : un collagène séché par atomisation, un collagène séché par lyophilisé et enfin, un collagène sous forme liquide conservé à -18°C. Les différents essais de séchage ont en effet permis d'affirmer que le collagène séché par atomisation présentait des caractéristiques comparables à celles du collagène séché par lyophilisation. Enfin, le produit sera soumis à une étude de vieillissement suivant la réglementation en vigueur.

À l'issue du projet, il est prévu que la société Yslab prenne en charge le contrôle qualité des productions de collagènes en s'appuyant sur les méthodes de caractérisation en routine développées durant la thèse. Ainsi, cette étape permettra d'éviter une dérive du process dans le temps.

La mise au point du procédé d'extraction du collagène de peaux de saumon a fait l'objet d'une demande de brevet français déposée en mars 2015. La demande de brevet a été étendue à l'international en mars 2016.

## **1.2. Caractérisation du collagène obtenu**

La préparation commerciale de collagène marin PeskCollagène 3D Pro® obtenue a fait l'objet d'une caractérisation plus approfondie que ce qui avait pu être réalisé dans le cadre du développement du protocole industriel. Différentes méthodes analytiques ont alors été utilisées, telles que la RMN, le FTIR, la rhéologie et la microscopie électronique. Les résultats de l'étude sont présentés sous la forme d'une publication scientifique, afin de compléter les données présentées dans les deux demandes de brevet.

PeskCollagène 3D Pro® est un collagène de type I qui possède une composition en acides aminés caractéristique des collagènes marins issus d'espèces d'eau froide avec 8,20% d'Hyp, 11,48% de Pro et 27,87% de Glycine. Contrairement à la plupart des préparations de collagène marin disponibles sur le marché pour des applications en nutricosmétique, il présente la caractéristique de posséder un haut poids moléculaire (plus de 60% supérieur à 300kDa), ce qui a été confirmé par l'ensemble des résultats obtenus à l'aide de méthodes différentes: SDS-PAGE, chromatographie d'exclusion stérique et FTIR. L'étude rhéologique a révélé des températures de fusion ( $T_m=13,5^{\circ}\text{C}$ ) et de gélification ( $T_{gel}=5^{\circ}\text{C}$ ) moins élevées que celles mesurées pour les collagènes de mammifères, du fait de la teneur plus faible en acides iminés Pro et Hyp. Les observations en microscopie électronique à balayage d'une préparation lyophilisée de PeskCollagène 3D Pro® (i.e. sous forme d'éponge) révèlent une structure poreuse, avec des pores de taille supérieures à 100 $\mu\text{m}$ .

Actuellement, ce type de collagène d'origine marine n'est pas disponible sur le marché : on y retrouve soit des collagènes ou des gélatines, avec des poids moléculaires inférieurs à ceux de PeskCollagène 3D Pro® ou bien des collagènes avec des poids moléculaires comparables, mais obtenus par des procédés d'extraction par voie acide ou enzymatique avec la pepsine. Dans tous les cas, il s'agit bien d'un marché de niche car au niveau mondial, l'ensemble des collagènes, des gélatines et des hydrolysats de gélatine d'origine marine ne représentent que 1,3% des parts de marché. La préparation commerciale PeskCollagène 3D Pro® est destinée à des applications non alimentaires, à haute valeur ajoutée. En ce sens, elle constitue donc une alternative aux collagènes de mammifère, sans les contraintes sanitaires et religieuses qui sont associées à ces derniers.

## **1.3. Réticulation du collagène par voie enzymatique**

Du point de vue biochimique, l'objectif de la première partie de la thèse était d'obtenir un collagène que nous avons qualifié de « natif », c'est-à-dire caractérisé par un haut poids moléculaire du fait de la conservation partielle de sa structure en triple hélice. La

thermostabilité du collagène marin étant plus faible, en comparaison avec les collagènes de mammifère, des essais de réticulation enzymatiques par la transglutaminase d'origine microbienne ont été réalisés sur le collagène obtenu. Le but était d'améliorer les propriétés mécaniques de la protéine et de permettre des applications à haute valeur ajoutée, comme son utilisation pour des dispositifs médicaux.

Deux protocoles de réticulation ont été testés : (1) un protocole de réticulation par un agent chimique, le glutaraldéhyde et (2) un protocole de réticulation par un agent enzymatique, la transglutaminase microbienne. Pour chacun des protocoles, des hydrogels ont été obtenus et caractérisés. Dans un premier temps, l'étude de la structure moléculaire en résonance magnétique et de la structure tertiaire en spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier ont montré que la réaction de réticulation a créé des liaisons covalentes intermoléculaires entre les molécules de collagène au niveau des groupements lysine et glutamine. Des mesures complémentaires en microscopie électronique à balayage et en rhéologie ont été réalisées. La microstructure du collagène réticulé, comparée à celle du collagène natif, est plus dense et présente des tailles de pores plus petites (environ 50 nm vs 200 nm pour le collagène non réticulé), du fait du rapprochement des molécules de collagène, par la création de liaisons intermoléculaires. Des mesures en rhéologie ont montré que les propriétés mécaniques du collagène sont améliorées par la réaction de réticulation. D'une part, au delà de 13,5°C c'est-à-dire la température de fusion du collagène natif, et jusqu'à 90°C, le module élastique du collagène réticulé n'est pas modifié. Cela signifie que la structure du réseau reste stable et sous forme d'hydrogel pour cette gamme de températures.

Ces résultats permettraient d'envisager des applications autres que la cosmétique, telles que les dispositifs médicaux qui exigent une stabilité des composants à 37°C, la température du corps humain. D'autre part, les valeurs du module élastique passe de  $4 \cdot 10^{-3}$  Pa pour le collagène natif à des valeurs comprises entre 35 et 650 Pa selon que le collagène soit à température ambiante ou à 4°C ou enfin qu'une étape de congélation ait été ajoutée au protocole de réticulation. Cependant, ces valeurs restent encore faibles, en particulier pour des applications en régénération osseuse. Les données sur la réticulation présentées dans cette section sont des résultats préliminaires Ils ont permis de démontrer qu'un procédé de réticulation du collagène de saumon était possible en utilisant une enzyme microbienne, la transglutaminase. Les agents chimiques de réticulation ont une efficacité largement prouvée mais ils peuvent laisser des résidus potentiellement cytotoxiques. Le travail devra être poursuivi pour évaluer précisément le potentiel d'application du PeskCollagène 3D Pro®.

## 2. Valorisation des têtes de saumon

La deuxième partie de la thèse a porté sur le développement de deux hydrolysats aux compositions peptidiques contrastées : (1) un hydrolysats contenant environ 50% de peptides de taille inférieure à 500Da et (2) un hydrolysats enrichi en di- et tripeptides avec environ 70% de peptides de taille inférieure à 500Da. L'utilisation d'un procédé d'hydrolyse enzymatique, couplé à la chromatographie d'exclusion stérique, a permis de maîtriser la réaction et d'obtenir, d'abord en laboratoire, puis à l'échelle pilote, un premier hydrolysats contenant 40% de peptides de taille inférieure à 500Da et un deuxième en contenant 61%. Plus précisément, ils ont été obtenus grâce à l'utilisation successive de deux préparations enzymatiques, l'Alcalase® et la Flavourzyme, dont les mécanismes d'action sont différents : l'Alcalase® est une endoprotéase peu spécifique tandis que Flavourzyme® contient à la fois des activités endo-et exo-protéases. Le procédé enzymatique a permis l'obtention d'hydrolysats présentant des pourcentages élevés en peptides de poids moléculaires inférieurs à 500 Da, et ce, sans utiliser de méthodes d'ultrafiltration. Ensuite, les deux hydrolysats ont été incorporés dans la formulation de granulés, afin d'évaluer leurs performances *in vivo* sur les larves de bar. Un aliment témoin, fabriqué à partir d'un hydrolysats commercialisé a également été testé. Les premiers résultats concernant l'observation phénotypique des larves ont montré une diminution des malformations squelettiques de la tête et de la colonne vertébrale pour les groupes nourris avec les régimes contenant les hydrolysats fabriqués durant la thèse, en comparaison avec le groupe nourri avec le régime témoin. Ces résultats ont donc permis de montrer l'effet positif de l'incorporation de di- et tripeptides dans l'aliment, à hauteur de 15%, sur les malformations des larves de bar. Cependant, les mécanismes physiologiques ne sont pas encore bien compris. Certains auteurs évoquent le lien entre un retard dans la maturation du système digestif des larves provoqué par un apport protéique inadapté, et un mauvais état physiologique général, qui conduiraient à l'apparition de malformations (Zambonino et al. 1997, Cahu et al. 1999, Cahu et al. 2003). Dans ce sens, les technologies « omic » se présentent comme des outils intéressants pour acquérir des connaissances sur ce sujet. Des analyses en génomique et en protéomique sont actuellement en cours afin de comprendre de quelle manière l'incorporation de di- et tripeptides pourrait améliorer la squelettogenèse des larves. D'une part, l'expression de gène est un mécanisme fondamental dans le processus d'ontogenèse des larves. L'étude du transcriptome d'un individu, grâce à la mise au point de ressources bioinformatiques (séquences ADN et d'ADN complémentaire) et d'outils moléculaires pour l'analyse à haut débit de l'expression de gènes, permet d'identifier des gènes sur-exprimés ou sous-exprimés afin d'étudier la possible influence de différents facteurs auxquelles les individus sont soumis. Dans ce cas précis, c'est l'influence du régime alimentaire qui est étudiée et on parle alors d'une approche « nutriginomique ». Les

travaux de l'équipe de José Zambonio et David Mazurais, grâce à qui les études *in vivo* ont pu être menées, indiquent que celle-ci n'en est encore qu'à ses débuts. La nutriginomique pourrait permettre de comprendre comment la nutrition peut influencer les processus biologiques, y compris les voies métaboliques et ontogéniques. D'autre part, l'analyse du protéome des individus ne donne pas uniquement des informations au niveau mécanistique, comme c'est le cas pour la génomique, mais permet de détecter des changements d'activité des protéines, en mesurant des modifications apparaissant au niveau post-traductionnel. Ainsi, la protéomique pourrait apporter des informations concernant l'état physiologique de l'animal, qui n'apparaîtraient pas au niveau du transcriptome. Il serait alors intéressant de combiner une approche « nutriginomique » à une approche « nutripotéomique » dans le but de comprendre les mécanismes conduisant à l'expression de certains gènes et la production de certaines protéines en réponse à un régime alimentaire spécifique.

### **3. Intérêt de la stratégie développée dans le cadre du projet Pesk&Co**

L'ensemble des travaux menés dans le cadre de la thèse sur la valorisation des peaux et des têtes de saumon, montre que l'implication de chacun des partenaires à différents niveaux a permis d'aboutir sur un projet combinant des approches à la fois fondamentales et appliquées.

Le développement du procédé d'extraction du produit PeskCollagène 3D Pro® est le résultat de nombreuses expérimentations au cours des changements d'échelles, que ce soit au niveau industriel par la mise en place d'outils et de techniques adaptées, que dans le cadre de la thèse, avec le développement de méthodes de caractérisation et l'analyse des produits obtenus au cours des différents essais. Plus précisément, le partenaire Meralliance-Thai Union a coordonné les différents essais en définissant les protocoles, en assurant le support technique et en mettant à disposition des installations expérimentales (avec l'aide du partenaire SPF-DIANA). En parallèle, le partenaire Yslab s'est attaché à la mise en place d'un pôle analytique en vue du contrôle qualité des productions. L'étroite collaboration entre les différents partenaires a permis de comprendre l'influence des échanges opérés dans le protocole, sur le produit final. Ainsi, les problèmes rencontrés, comme le contrôle de la charge microbienne ou l'élimination de la matière grasse des peaux, ont été résolus grâce à cette démarche intégrée qui a permis la mise en place d'un protocole efficace de pré-traitement de la matière première.

Par ailleurs, le choix s'est porté sur un collagène de haut poids moléculaire, à la fois grâce aux indications de AGH-Socofag au sujet des produits disponibles sur le marché asiatique, mais également grâce aux connaissances scientifiques orientées vers de potentielles applications futures dans le domaine des biomatériaux et apportées par le partenaire UBO.

Pour ce qui est du volet concernant le développement d'hydrolysats pour une utilisation comme aliment fonctionnel en aquaculture, ce partenariat a permis aux industriels d'accéder à des installations et des compétences du partenaire universitaire dans le domaine de la production aquacole, mais qui s'étend également à une expertise dans le domaine des sciences « omiques ». Les résultats encourageants obtenus sur les malformations des bars avec les hydrolysats obtenus dans le cadre de la thèse, soulèvent des questions qui relèvent de la physiologie du poisson et des mécanismes d'adaptation d'un individu à son environnement, avec ici le cas de l'alimentation. Ce partenariat offre alors l'opportunité d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes mis en jeu, grâce à l'utilisation des outils les plus performants en sciences « omiques », au profit d'une problématique appliquée.

Pour conclure, ce projet a permis une collaboration « gagnant-gagnant » entre les différents partenaires. Chacun a ainsi pu s'approprier de nouvelles compétences : tandis que les industriels ont pu développer un nouveau produit à haute valeur ajoutée pour un marché de niche, et acquis une vision prospective en R&D, j'ai pu développer une activité de recherche en lien avec des préoccupations industrielles, qu'elles soient d'ordre technique ou de l'ordre des contraintes du marché. Mais le succès du projet repose également sur les nombreux échanges entre les partenaires grâce à des comités scientifiques réguliers, permettant la communication des résultats et le partage de l'expertise de chacun. Le tout a pu se dérouler dans un total climat de confiance grâce à un consortium basé sur le partage d'un objectif commun, dont le calendrier et la propriété industrielle avaient précisément été définis au préalable.

## **BIBLIOGRAPHIE**

## A

- Abdul-Hamid, A., Bakar, J., Bee, G.H., 2002. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Food Chem.* 78, 69–74.
- Abou Neel, E.A., Bozec, L., Knowles, J.C., Syed, O., Mudera, V., Day, R., Hyun, J.K., 2013. Collagen — Emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 429–456. doi:10.1016/j.addr.2012.08.010
- Adler-Nissen, J., 1986. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers.
- Adler-Nissen, J., 1982. Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 32, 138–156.
- Adler-Nissen, J., 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 27, 1256–1262.
- Ahmad, M., Benjakul, S., Nalinanon, S., 2010. Compositional and physicochemical characteristics of acid solubilized collagen extracted from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Hydrocoll.* 24, 588–594. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.03.001
- Ahmad, M., Hani, N.M., Nirmal, N.P., Fazial, F.F., Mohtar, N.F., Romli, S.R., 2015. Optical and thermo-mechanical properties of composite films based on fish gelatin/rice flour fabricated by casting technique. *Prog. Org. Coat.* 84, 115–127. doi:10.1016/j.porgcoat.2015.02.016
- Ahn, C.-B., Je, J.-Y., Cho, Y.-S., 2012. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Res. Int.* 49, 92–98. doi:10.1016/j.foodres.2012.08.002
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2010. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science; 2002. Class. Textb. Its 5th Ed.
- Albu, M.G., Titorencu, I., Ghica, M.V., 2011. Collagen-based drug delivery systems for tissue engineering. *Biomater. Appl. Nanomedicine Intech Open Acces Publ. Rij.* 339–342.
- Alemán, A., Gómez-Guillén, M.C., Montero, P., 2013. Identification of ace-inhibitory peptides from squid skin collagen after in vitro gastrointestinal digestion. *Food Res. Int.* 54, 790–795. doi:10.1016/j.foodres.2013.08.027
- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M.C., Montero, P., 2011. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Res. Int.* 44, 1044–1051. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.010
- Amado, I.R., Vázquez, J.A., González, M.P., Murado, M.A., 2013. Production of antihypertensive and antioxidant activities by enzymatic hydrolysis of protein concentrates recovered by ultrafiltration from cuttlefish processing wastewaters. *Biochem. Eng. J.* 76, 43–54. doi:10.1016/j.bej.2013.04.009
- Anson, M.L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22, 79–89.

- Arnesen, J., Gildberg, A., 2007. Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresour. Technol.* 98, 53–57. doi:10.1016/j.biortech.2005.11.021
- Aspmo, S.I., Horn, S.J., Eijsink, V.G.H., 2005a. Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as components of microbial growth media. *Process Biochem.* 40, 3714–3722. doi:10.1016/j.procbio.2005.05.004
- Aspmo, S.I., Horn, S.J., Eijsink, V.G., 2005b. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochem.* 40, 1957–1966. doi:10.1016/j.procbio.2004.07.011
- Auger, F.A., 2000. Le génie tissulaire: du rêve à la réalité.

## B

- Badii, F., & Howell, N. K., 2006. Fish gelatin: structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 630–640.
- Barreras, U.S., Méndez, F.T., Martínez, R.E.M., Valencia, C.S., Rodríguez, P.R.M., Rodríguez, J.P.L., 2016. Chitosan nanoparticles enhance the antibacterial activity of chlorhexidine in collagen membranes used for periapical guided tissue regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* 58, 1182–1187. doi:10.1016/j.msec.2015.09.085
- Baskerville-Bridges, B., Kling, L.J., 2000. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. *Aquac. Nutr.* 6, 171–182.
- Bateman, J.F., Lamande, S.R., Ramshaw, J.A., 1996. 2 Collagen Superfamily. *Extracell. Matrix* 22.
- Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N.M., Nunes, M.L., 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochem.* 45, 18–24. doi:10.1016/j.procbio.2009.07.019
- Beaulieu, L., Thibodeau, J., Bonnet, C., Bryl, P., Carbonneau, M.-É., 2013. Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. *PharmaNutrition* 1, 149–157. doi:10.1016/j.phanu.2013.05.004
- Benbettaïeb, N., Karbowiak, T., Brachais, C.-H., Debeaufort, F., 2016. Impact of electron beam irradiation on fish gelatin film properties. *Food Chem.* 195, 11–18. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.034
- Benjakul, S., Morrissey, M.T., 1997. Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3423–3430. doi:10.1021/jf970294g
- Białobrzewski, I., Misiak, W., 1997. A stand for investigation of vacuum-drying kinetics: Short report. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 6, 133–138.
- Blanco, M., Sotelo, C.G., Pérez-Martín, R.I., 2015. Hydrolysis as a Valorization Strategy for Unused Marine Food Biomass: Boarfish and Small-Spotted Catshark Discards and By-Products: Hydrolysis as a Fish Valorization Strategy. *J. Food Biochem.* 39, 368–376. doi:10.1111/jfbc.12141

- Bode, F., da Silva, M.A., Drake, A.F., Ross-Murphy, S.B., Dreiss, C.A., 2011. Enzymatically Cross-Linked Tilapia Gelatin Hydrogels: Physical, Chemical, and Hybrid Networks. *Biomacromolecules* 12, 3741–3752. doi:10.1021/bm2009894
- Bodin, A., Framboisier, X., Alonso, D., Marc, I., Kapel, R., 2015. Size-exclusion HPLC as a sensitive and calibrationless method for complex peptide mixtures quantification. *J. Chromatogr. B* 1006, 71–79. doi:10.1016/j.jchromb.2015.09.035
- Boglione, C., Gavaia, P., Koumoundouros, G., Gisbert, E., Moren, M., Fontagné, S., Witten, P.E., 2013a. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: normal and anomalous skeletogenic processes. *Rev. Aquac.* 5, S99–S120. doi:10.1111/raq.12015
- Boglione, C., Gisbert, E., Gavaia, P., E. Witten, P., Moren, M., Fontagné, S., Koumoundouros, G., 2013b. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Rev. Aquac.* 5, S121–S167. doi:10.1111/raq.12016
- Borquaye, L.S., Darko, G., Ocansey, E., Ankomah, E., 2015. Antimicrobial and antioxidant properties of the crude peptide extracts of *Galatea paradoxa* and *Patella rustica*. *SpringerPlus* 4. doi:10.1186/s40064-015-1266-2
- Bourseau, P., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Massé, A., Guérard, F., Chabeaud, A., Fouchereau-Péron, M., Le Gal, Y., Ravallec-Plé, R., Bergé, J.-P., Picot, L., Piot, J.-M., Batista, I., Thorkelsson, G., Delannoy, C., Jakobsen, G., Johansson, I., 2009. Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration: impact on peptidic populations. *Desalination* 244, 303–320. doi:10.1016/j.desal.2008.05.026
- Bouvier, E.S.P., Koza, S.M., 2014. Advances in size-exclusion separations of proteins and polymers by UHPLC. *TrAC Trends Anal. Chem.* 63, 85–94. doi:10.1016/j.trac.2014.08.002
- Boza, J.J., Jiménez, J., Martínez, O., Suárez, M.D., Gil, A., 1994. Nutritional value and antigenicity of two milk protein hydrolysates in rats and guinea pigs. *J. Nutr.* 124, 1978.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Byun, H.-G., Kim, S.-K., 2001. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochem.* 36, 1155–1162.

## C

- Cahu, C.L., Infante, J.Z., 1995a. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 431–437.
- Cahu, C.L., Infante, J.Z., 1995b. Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 209–214.

- Cahu, C.L., Infante, J.Z., 1994. Early weaning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 109, 213–222.
- Cahu, C.L., Infante, J.Z., Quazuguel, P., Le Gall, M.M., 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171, 109–119.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J., Takeuchi, T., 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227, 245–258. doi:10.1016/S0044-8486(03)00507-6
- Cahu, C., Zambonino, J.-L., 2007. Ontogenèse des fonctions digestives et besoins nutritionnels chez les larves de poissons marins. *Cybium* 31, 217–226.
- Canty, E.G., 2005. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell Sci.* 118, 1341–1353. doi:10.1242/jcs.01731
- Cao, H., Zhao, Y., Zhu, Y.B., Xu, F., Yu, J.S., Yuan, M., 2016. Antifreeze and cryoprotective activities of ice-binding collagen peptides from pig skin. *Food Chem.* 194, 1245–1253. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.102
- Carvalho, A., Sá, R., Oliva-Teles, A., Bergot, P., 2004. Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus carpio*) during early larval stages. *Aquaculture* 234, 319–333. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.01.007
- Chalamaiah, M., Dinesh kumar, B., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chem.* 135, 3020–3038. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.100
- Chandika, P., Ko, S.-C., Oh, G.-W., Heo, S.-Y., Nguyen, V.-T., Jeon, Y.-J., Lee, B., Jang, C.H., Kim, G., Park, W.S., Chang, W., Choi, I.-W., Jung, W.-K., 2015. Fish collagen/alginate/chitooligosaccharides integrated scaffold for skin tissue regeneration application. *Int. J. Biol. Macromol.* 81, 504–513. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.08.038
- Chandra, M.V., Shamasundar, B.A., 2015. Rheological properties of gelatin prepared from the swim bladders of freshwater fish *Catla catla*. *Food Hydrocoll.* 48, 47–54. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.01.022
- Chandra, M.V., Shamasundar, B.A., Kumar, P.R., 2013. Visco-Elastic and Flow Properties of Gelatin from the Bone of Freshwater Fish (*Cirrhinus mrigala*): Properties of gelatin from fish bone.... *J. Food Sci.* 78, E1009–E1016. doi:10.1111/1750-3841.12158
- Chau, D.Y.S., Collighan, R.J., Verderio, E.A.M., Addy, V.L., Griffin, M., 2005. The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen. *Biomaterials* 26, 6518–6529. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.017
- Cheirmadurai, K., Thanikaivelan, P., Murali, R., 2016. Highly biocompatible collagen–Delonix regia seed polysaccharide hybrid scaffolds for antimicrobial wound dressing. *Carbohydr. Polym.* 137, 584–593. doi:10.1016/j.carbpol.2015.11.015
- Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T., 2002. Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromol.*

- Biosci. 2, 67–77. doi:10.1002/1616-5195(20020201)2:2<67::AID-MABI67>3.0.CO;2-F
- Chen, J., Wang, Y., Zhong, Q., Wu, Y., Xia, W., 2012. Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein. *Peptides* 33, 52–58. doi:10.1016/j.peptides.2011.11.006
- Chen, M.-M., Huang, Y.-Q., Guo, H., Liu, Y., Wang, J.-H., Wu, J.-L., Zhang, Q.-Q., 2014. Preparation, characterization, and potential biomedical application of composite sponges based on collagen from silver carp skin: ARTICLE. *J. Appl. Polym. Sci.* 131, n/a–n/a. doi:10.1002/app.40998
- Chen, R.-N., Ho, H.-O., Sheu, M.-T., 2005. Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase. *Biomaterials* 26, 4229–4235. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.11.012
- Chen, S., Chen, H., Xie, Q., Hong, B., Chen, J., Hua, F., Bai, K., He, J., Yi, R., Wu, H., 2016. Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*). *Food Hydrocoll.* 52, 468–477. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.07.027
- Chen, S., Hirota, N., Okuda, M., Takeguchi, M., Kobayashi, H., Hanagata, N., Ikoma, T., 2011. Microstructures and rheological properties of tilapia fish-scale collagen hydrogels with aligned fibrils fabricated under magnetic fields. *Acta Biomater.* 7, 644–652. doi:10.1016/j.actbio.2010.09.014
- Chen, Y., Ye, R., Wang, Y., 2015. Acid-soluble and pepsin-soluble collagens from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin: a comparative study on physicochemical properties. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50, 186–193. doi:10.1111/ijfs.12675
- Chen, Y., Zhou, X., Lin, Q., Jiang, D., 2014. Bacterial cellulose/gelatin composites: in situ preparation and glutaraldehyde treatment. *Cellulose* 21, 2679–2693. doi:10.1007/s10570-014-0272-9
- Chevallay, B., Herbage, D., 2000. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med. Biol. Eng. Comput.* 38, 211–218.
- Chiou, B.-S., Avena-Bustillos, R.J., Bechtel, P.J., Jafri, H., Narayan, R., Imam, S.H., Glenn, G.M., Orts, W.J., 2008. Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties. *Eur. Polym. J.* 44, 3748–3753. doi:10.1016/j.eurpolymj.2008.08.011
- Choi, J.H., Behanm, S., Kim, S.M., 2013. Physico-biochemical Characteristics of Scallop Mantle Collagen Soluble in Pepsin. *J. Agric. Sci. Technol.* 15, 293–302.
- Clarke, S.A., Walsh, P., Maggs, C.A., Buchanan, F., 2011. Designs from the deep: Marine organisms for bone tissue engineering. *Biotechnol. Adv.* 29, 610–617. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.04.003
- Collighan, R.J., Griffin, M., 2009. Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: biological significance and medical applications. *Amino Acids* 36, 659–670. doi:10.1007/s00726-008-0190-y

- Cudennec, B., Caradec, T., Catiau, L., Ravallec, R., 2012. Upgrading of Sea By-products, in: *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier, pp. 479–494.
- Cudennec, B., Ravallec-Plé, R., Courois, E., Fouchereau-Peron, M., 2008. Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chem.* 111, 970–975. doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.016
- Cui, F., Xue, C., Li, Z., Zhang, Y., Dong, P., Fu, X., Gao, X., 2007. Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Food Chem.* 100, 1120–1125. doi:10.1016/j.foodchem.2005.11.019

## D

- Dainiak, M.B., Allan, I.U., Savina, I.N., Cornelio, L., James, E.S., James, S.L., Mikhalovsky, S.V., Jungvid, H., Galaev, I.Y., 2010. Gelatin–fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: Preparation, optimisation and in vitro study. *Biomaterials* 31, 67–76. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.029
- Dallongeville, J., 2003. Fish Consumption Is Associated With Lower Heart Rates. *Circulation* 108, 820–825. doi:10.1161/01.CIR.0000084542.64687.97
- Dalton, P.D., Woodfield, T., Hutmacher, D.W., 2009. Snapshot: Polymer scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 30, 701–702.
- Damink, L.O., Dijkstra, P.J., Van Luyn, M.J.A., Van Wachem, P.B., Nieuwenhuis, P., Feijen, J., 1995. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 6, 460–472.
- Damodaran, S., 2007. Inhibition of ice crystal growth in ice cream mix by gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 55, 10918–10923.
- Darbre, P.D., Aljarrah, A., Miller, W.R., Coldham, N.G., Sauer, M.J., Pope, G.S., 2004. Concentrations of parabens in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.* 24, 5–13. doi:10.1002/jat.958
- Darewicz, M., Borawska, J., Vegarud, G.E., Minkiewicz, P., Iwaniak, A., 2014. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and ACE inhibitory peptides of salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysates obtained by human and porcine gastrointestinal enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 14077–14101.
- Darias, M.J., Mazurais, D., Koumoundouros, G., Glynatsi, N., Christodouloupoulou, S., Huelvan, C., Desbruyeres, E., Le Gall, M.M., Quazuguel, P., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 2010. Dietary vitamin D3 affects digestive system ontogenesis and ossification in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 298, 300–307. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.11.002
- da Silva, M.A., Bode, F., Drake, A.F., Goldoni, S., Stevens, M.M., Dreiss, C.A., 2014. Enzymatically Cross-Linked Gelatin/Chitosan Hydrogels: Tuning Gel Properties and Cellular Response: Enzymatically Cross-linked Gelatin/Chitosan Hydrogels: .... *Macromol. Biosci.* 14, 817–830. doi:10.1002/mabi.201300472
- Daukšas, E., Falch, E., Šližytė, R., Rustad, T., 2005. Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem.* 40, 2659–2670. doi:10.1016/j.procbio.2004.12.012

- David, M., Ranson, M., 1995. Procédé de préparation de collagène à partir de cnidaires, et compositions obtenues utilisables en cosmétique. Google Patents.
- DeFelice, S.L., 1995. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 59–61.
- Delcroix, J., Gatesoupe, F.-J., Desbruyères, E., Huelvan, C., Le Delliou, H., Le Gall, M.-M., Quazuguel, P., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J.L., 2015. The effects of dietary marine protein hydrolysates on the development of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*, and associated microbiota. *Aquac. Nutr.* 21, 98–104. doi:10.1111/anu.12139
- Dewailly, E., Ayotte, P., Lucas, M., Blanchet, C., 2007. Risk and benefits from consuming salmon and trout: a Canadian perspective. *Food Chem. Toxicol.* 45, 1343–1348.
- Dey, S.S., Dora, K.C., 2014. Optimization of the production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology. *J. Food Sci. Technol.* 51, 16–24. doi:10.1007/s13197-011-0455-4
- Ding, J.-F., Li, Y.-Y., Xu, J.-J., Su, X.-R., Gao, X., Yue, F.-P., 2011. Study on effect of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation. *Food Hydrocoll.* 25, 1350–1353. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.12.013
- Dong, Y., Sheng, G., Fu, J., Wen, K., 2005. Chemical characterization and anti-anaemia activity of fish protein hydrolysate from *Saurida elongata*. *J. Sci. Food Agric.* 85, 2033–2039. doi:10.1002/jsfa.2219
- Dos Santos, S.D., Martins, V.G., Salas-Mellado, M., Prentice, C., 2011. Evaluation of Functional Properties in Protein Hydrolysates from Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) Obtained with Different Microbial Enzymes. *Food Bioprocess Technol.* 4, 1399–1406. doi:10.1007/s11947-009-0301-0
- Doyen, A., Saucier, L., Beaulieu, L., Pouliot, Y., Bazinet, L., 2012. Electro-separation of an antibacterial peptide fraction from snow crab by-products hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chem.* 132, 1177–1184. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.059
- Doyle, B.B., Bendit, E.G., Blout, E.R., 1975. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides. *Biopolymers* 14, 937–957.
- Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X., Konno, K., 2009. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chem.* 112, 702–706. doi:10.1016/j.foodchem.2008.06.020
- Duan, R., Zhang, J., Li, J., Zhong, X., Konno, K., Wen, H., 2012. The effect of the subunit composition on the thermostability of collagens from the scales of freshwater fish. *Food Chem.* 135, 127–132. doi:10.1016/j.foodchem.2012.04.112
- Duarte, J., Vinderola, G., Ritz, B., Perdígón, G., Matar, C., 2006. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiology* 211, 341–350. doi:10.1016/j.imbio.2005.12.002
- Dumay, J., Barthomeuf, C., Berge, J.P., 2004. How Enzymes May Be Helpful for Upgrading Fish By-Products: Enhancement of Fat Extraction. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 13, 69–84. doi:10.1300/J030v13n02\_07

Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., Bergé, J.P., 2006. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochem.* 41, 2327–2332. doi:10.1016/j.procbio.2006.04.005

## E

Eastoe, J.E., 1955. The Amino Acid Composition of Mammalian Collagen and Gelatin. *Biochem. J.* 61, 589.

El-Rashidy, A.A., Gad, A., Abu-Hussein, A.E.-H.G., Habib, S.I., Badr, N.A., Hashem, A.A., 2015. Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish scale collagen. *Int. J. Biol. Macromol.* 79, 618–626. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.05.019

Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., Discher, D.E., 2006. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126, 677–689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044

Englert, C., Blunk, T., Müller, R., von Glasser, S.S., Baumer, J., Fierlbeck, J., Heid, I.M., Nerlich, M., Hammer, J., 2007. Bonding of articular cartilage using a combination of biochemical degradation and surface cross-linking. *Arthritis Res Ther* 9, R47.

Enrione, J.I., Sáez, C., López, D., Skurtys, O., Acevedo, C., Osorio, F., MacNaughtan, W., Hill, S., 2012. Structural Relaxation of Salmon Gelatin Films in the Glassy State. *Food Bioprocess Technol.* 5, 2446–2453. doi:10.1007/s11947-011-0618-3

Espe, M., Holen, E., He, J., Provan, F., Chen, L., Øysæd, K.B., Seliussen, J., 2015. Hydrolyzed fish proteins reduced activation of caspase-3 in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stressed liver cells isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *SpringerPlus* 4, 1–9.

Espe, M., Sveier, H., Høgøy, I., Lied, E., 1999. Nutrient absorption and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed fish protein concentrate. *Aquaculture* 174, 119–137.

Eysturskarð, J., Haug, I.J., Elharfaoui, N., Djabourov, M., Draget, K.I., 2009a. Structural and mechanical properties of fish gelatin as a function of extraction conditions. *Food Hydrocoll.* 23, 1702–1711. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.01.008

Eysturskarð, J., Haug, I.J., Ulset, A.-S., Draget, K.I., 2009b. Mechanical properties of mammalian and fish gelatins based on their weight average molecular weight and molecular weight distribution. *Food Hydrocoll.* 23, 2315–2321. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.06.007

## F

Fahmi, A., Morimura, S., Guo, H., Shigematsu, T., Kida, K., Uemura, Y., 2004. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochem.* 39, 1195–1200. doi:10.1016/S0032-9592(03)00223-1

Fallah, M., Bahram, S., Javadian, S.R., 2015. Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media. *Food Sci. Nutr.* 3, 153–157. doi:10.1002/fsn3.198

Farran, M.T., Thomas, O.P., 1992. Valine deficiency. 1. The effect of feeding a valine-deficient diet during the starter period on performance and feather structure of male broiler chicks. *Poult. Sci.* 71, 1879–1884.

- Fauconneau, B., Corraze, G., Le Bail, P.-Y., Vernier, J.-M., 1990. Les lipides de dépôt chez les poissons d'élevage: contrôle cellulaire, métabolique et hormonal (1). *INRA Prod Anim* 3, 369–381.
- Fernandes-Silva, S., Moreira-Silva, J., Silva, T.H., Perez-Martin, R.I., Sotelo, C.G., Mano, J.F., Duarte, A.R.C., Reis, R.L., 2013. Porous Hydrogels From Shark Skin Collagen Crosslinked Under Dense Carbon Dioxide Atmosphere: Porous Hydrogels from Shark Skin Collagen. *Macromol. Biosci.* 13, 1621–1631. doi:10.1002/mabi.201300228
- Fernandez, X., Merck, F., Kerdudo, A., 2012. Conservateurs pour cosmétiques—Généralités et conservateurs antimicrobiens. *Tech. L'Ingénieur J* 2284.
- Ferraro, V., Cruz, I.B., Jorge, R.F., Malcata, F.X., Pintado, M.E., Castro, P.M.L., 2010. Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. *Food Res. Int.* 43, 2221–2233. doi:10.1016/j.foodres.2010.07.034
- Ferreira, A.M., Gentile, P., Chiono, V., Ciardelli, G., 2012. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 8, 3191–3200. doi:10.1016/j.actbio.2012.06.014
- Fitzgerald, A.J., 2005. Reparative properties of a commercial fish protein hydrolysate preparation. *Gut* 54, 775–781. doi:10.1136/gut.2004.060608
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department, 2014. The State of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

## G

- Gao, M.-T., Hirata, M., Toorisaka, E., Hano, T., 2006. Acid-hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation. *Bioresour. Technol.* 97, 2414–2420. doi:10.1016/j.biortech.2005.10.002
- 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. doi:10.1002/ejlt.200600081
- Gelse, K., 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1531–1546. doi:10.1016/j.addr.2003.08.002
- George, A., Malone, J.P., Veis, A., 1999. The secondary structure of type I collagen N-telopeptide as demonstrated by Fourier transform IR spectroscopy and molecular modeling, in: *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Chemical Sciences*. Springer, pp. 121–131.
- Germain, L., Auger, F., Bois A., Grandbois, E., Guignard, R., Giasson, M., Boisjoly, H., Lévesque, S.L., 1999. Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology* 67, 140–147.
- Gildberg, A., 1993. Enzymic processing of marine raw materials. *Process Biochem.* 28, 1–15.
- Gildberg, A., Stenberg, E., 2001. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochem.* 36, 809–812.

- Gilsenan, P.M., Ross-Murphy, S.B., 2000. Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocoll.* 14, 191–195.
- Girgih, A.T., Udenigwe, C.C., Hasan, F.M., Gill, T.A., Aluko, R.E., 2013. Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. *Food Res. Int.* 52, 315–322. doi:10.1016/j.foodres.2013.03.034
- Gisbert, E., Skalli, A., Fernández, I., Kotzamanis, Y., Zambonino-Infante, J.L., Fabregat, R., 2012. Protein hydrolysates from yeast and pig blood as alternative raw materials in microdiets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 338-341, 96–104. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.01.007
- Gobeaux, F., 2007. Phases denses de collagène de type I: transition isotrope/cholestérique, fibrillogenèse et minéralisation. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.E., Montero, M.P., 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocoll.* 25, 1813–1827. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.02.007
- Gómez-Guillén, M.C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., Montero, P., 2009. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 3–16. doi:10.1016/j.tifs.2008.10.002
- Gómez-Guillén, M.C., Sarabia, A.I., Solas, M.T., Montero, P., 2001. Effect of microbial transglutaminase on the functional properties of megrim (*Lepidorhombus boschii*) skin gelatin: Effect of microbial TGase on megrim skin gelatin. *J. Sci. Food Agric.* 81, 665–673. doi:10.1002/jsfa.865
- Gómez-Guillén, M., Turnay, J., Fernández-Díaz, M., Ulmo, N., Lizarbe, M., Montero, P., 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocoll.* 16, 25–34. doi:10.1016/S0268-005X(01)00035-2
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Kirchner, S., Calduch-Giner, J., Médale, F., Corraze, G., Panserat, S., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S.J., Pérez-Sánchez, J., 2003. Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 220, 749–767. doi:10.1016/S0044-8486(02)00654-3
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., others, 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177, 751–766.
- Goulet, F., Germain, L., Caron, C., Rancourt, D., Normand, A., Auger, F.A., 1997. Tissue-engineered ligament, in: *Ligaments and Ligamentoplasties*. Springer, pp. 367–377.
- Grossman, S., Bergman, M., 1992. Process for the production of gelatin from fish skins.
- Guérard, F., Decourcelle, N., Sabourin, C., Floch-Laizet, C., Le Grel, L., Le Floc'H, P., Gourlay, F., Le Delezir, R., Jaouen, P., Bourseau, P., 2010. Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: a review. *J. Sci. Halieut. Aquat.* 2, 21–27.

- Guérard, F., Dufosse, L., De La Broise, D., Binet, A., 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 11, 1051–1059.
- Guérard, F., Guimas, L., Binet, A., 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 19, 489–498.
- Guérard, F., Sellos, D., Le Gal, Y., 2005. Fish and Shellfish Upgrading, Traceability, in: Ulber, R., Le Gal, Y. (Eds.), *Marine Biotechnology I*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 127–163.
- Guerard, F., 2007. Enzymatic extraction methods for by-product recovery. *In*: F. SHAHIDI (Ed.). "Maximising the value of marine by-products", Part 2: By-products recovery and processing, Editions Woodhead (GB), ISBN 1 84569 013 3, pp. 107–143.
- Guillermine, F., Beaupied, H., Fabien-Soulé, V., Tomé, D., Benhamou, C.-L., Roux, C., Blais, A., 2010. Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: An in vitro and in vivo study. *Bone* 46, 827–834. doi:10.1016/j.bone.2009.10.035
- Gupta, R., Beg, Q., K., Lorenz, P., 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 15–32. doi:10.1007/s00253-002-0975-y
- Guzzi Plepis, A.M.D., Goissis, G., Das-Gupta, D.K., 1996. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. *Polym. Eng. Sci.* 36, 2932–2938.

## H

- Haddar, A., Sellimi, S., Ghannouchi, R., Alvarez, O.M., Nasri, M., Bougatef, A., 2012. Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with a brown algae extract. *Int. J. Biol. Macromol.* 51, 477–483. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.06.016
- Hai-Lun, H., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S., Yu-Zhong, Z., Bai-Cheng, Z., 2006. Analysis of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from protease-hydrolyzed marine shrimp *Acetes chinensis*. *J. Pept. Sci.* 12, 726–733. doi:10.1002/psc.789
- Hamilton, M.C., Hites, R.A., Schwager, S.J., Foran, J.A., Knuth, B.A., Carpenter, D.O., 2005. Lipid Composition and Contaminants in Farmed and Wild Salmon. *Environ. Sci. Technol.* 39, 8622–8629. doi:10.1021/es050898y
- Hamre, K., Næss, T., Espe, M., Holm, J.C., Lie, Ø., 2001. A formulated diet for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae. *Aquac. Nutr.* 7, 123–132.
- Harkness, R.D., 1961. Biological functions of collagen. *Biol. Rev.* 36, 399–455.
- Haug, I.J., Draget, K.I., Smidsrød, O., 2004. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocoll.* 18, 203–213.
- Heck, T., Faccio, G., Richter, M., Thöny-Meyer, L., 2013. Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 461–475. doi:10.1007/s00253-012-4569-z

- Hermannsdottir, R., Johannsdottir, J., Smaradottir, H., Sigurgisladottir, S., Gudmundsdottir, B.K., Bjornsdottir, R., 2009. Analysis of effects induced by a pollock protein hydrolysate on early development, innate immunity and the bacterial community structure of first feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 595–602. doi:10.1016/j.fsi.2009.05.007
- Herpandi, N.H., Rosma, A., Wan Nadiah, W.A., 2011. The Tuna Fishing Industry: A New Outlook on Fish Protein Hydrolysates. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10, 195–207. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00155.x
- He, S., Franco, C., Zhang, W., 2013. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Res. Int.* 50, 289–297. doi:10.1016/j.foodres.2012.10.031
- He, S., Franco, C., Zhang, W., 2012. Process optimisation and physicochemical characterisation of enzymatic hydrolysates of proteins from co-products of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*). *Int. J. Food Sci. Technol.* 47, 2397–2404. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03115.x
- He, S., Franco, C., Zhang, W., 2011. Characterisation of processing wastes of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*) harvested in Australia: Fish processing wastes characterisation. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46, 1898–1904. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02699.x
- Hevrøy, E.M., Espe, M., Waagbø, R., Sandnes, K., Ruud, M., HEMRE, G.-I., 2005. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquac. Nutr.* 11, 301–313.
- Hodge, A.J., Petruska, J.A., 1963. Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen molecule. *Asp. Protein Struct.* 289–300.
- Hong, M.Y., Lumibao, J., Mistry, P., Saleh, R., Hoh, E., 2015. Fish Oil Contaminated with Persistent Organic Pollutants Reduces Antioxidant Capacity and Induces Oxidative Stress without Affecting Its Capacity to Lower Lipid Concentrations and Systemic Inflammation in Rats. *J. Nutr.* 145, 939–944. doi:10.3945/jn.114.206607
- Hong, P., Koza, S., Bouvier, E.S., 2012. A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 35, 2923–2950.
- Hosseini, S.F., Rezaei, M., Zandi, M., Farahmandghavi, F., 2016. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. *Food Chem.* 194, 1266–1274. doi:10.1016/j.foodchem.2015.09.004
- Hough, C., 2009. Improving the sustainability of European fish aquaculture by the control of malformations, in: Oral Communication at the FINEFISH Final Workshop at 5th Fish & Shellfish Larviculture Symposium. Ghent University, Belgium.
- Hou, H., Li, B., Zhao, X., 2011. Enzymatic hydrolysis of defatted mackerel protein with low bitter taste. *J. Ocean Univ. China* 10, 85–92.

- Hoyer, B., Bernhardt, A., Heinemann, S., Stachel, I., Meyer, M., Gelinsky, M., 2012. Biomimetically Mineralized Salmon Collagen Scaffolds for Application in Bone Tissue Engineering. *Biomacromolecules* 13, 1059–1066. doi:10.1021/bm201776r
- Hoyer, B., Bernhardt, A., Lode, A., Heinemann, S., Sewing, J., Klinger, M., Notbohm, H., Gelinsky, M., 2014. Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* 10, 883–892. doi:10.1016/j.actbio.2013.10.022
- Hoyle, N.T., Merrit, J., 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J. Food Sci.* 59, 76–79.
- Huang, Y.-R., Shiau, C.-Y., Chen, H.-H., Huang, B.-C., 2011. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). *Food Hydrocoll.* 25, 1507–1513. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.02.011
- Hulmes, D.J., Miller, A., Parry, D.A., Piez, K.A., Woodhead-Galloway, J., 1973. Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing. *J. Mol. Biol.* 79, 137–148.
- Huster, D., 2008. Solid-state NMR studies of collagen structure and dynamics in isolated fibrils and in biological tissues. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* 64, 127–159.

## I

- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W., Prodpran, T., Tanaka, M., Howell, N.K., 2007. Autolysis study of bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin and its effect on gelatin. *Food Hydrocoll.* 21, 537–544. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.05.012
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Wu, J., Visessanguan, W., 2013. Isolation of antioxidative and ACE inhibitory peptides from protein hydrolysate of skipjack (*Katsuwana pelamis*) roe. *J. Funct. Foods* 5, 1854–1862. doi:10.1016/j.jff.2013.09.006

## J

- Jeevithan, E., Jeya Shakila, R., Varatharajakumar, A., Jeyasekaran, G., Sukumar, D., 2013. Physico-functional and mechanical properties of chitosan and calcium salts incorporated fish gelatin scaffolds. *Int. J. Biol. Macromol.* 60, 262–267. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.06.012
- Je, J.-Y., Park, P.-J., Kim, S.-K., 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res. Int.* 38, 45–50. doi:10.1016/j.foodres.2004.07.005
- Je, J.-Y., Qian, Z.-J., Byun, H.-G., Kim, S.-K., 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem.* 42, 840–846. doi:10.1016/j.procbio.2007.02.006
- Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Ben Slama-Ben Salem, R., Mehiri, M., Hajji, M., Nasri, M., 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochem.* 49, 963–972. doi:10.1016/j.procbio.2014.03.004

- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., Tanaka, M., 2005. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). Food Chem. 93, 475–484. doi:10.1016/j.foodchem.2004.10.026
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M., 2006. Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: Chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. Food Hydrocoll. 20, 1216–1222. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.01.006
- Jung, W.-K., Mendis, E., Je, J.-Y., Park, P.-J., Son, B.W., Kim, H.C., Choi, Y.K., Kim, S.-K., 2006. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. Food Chem. 94, 26–32. doi:10.1016/j.foodchem.2004.09.048
- Jurgensen, H.J., Madsen, D.H., Ingvarsen, S., Melander, M.C., Gardsvoll, H., Patthy, L., Engelholm, L.H., Behrendt, N., 2011. A Novel Functional Role of Collagen Glycosylation: Interaction with the endocytic collagen receptor uparap/endo180. J. Biol. Chem. 286, 32736–32748. doi:10.1074/jbc.M111.266692
- Jus, S., Stachel, I., Schloegl, W., Pretzler, M., Friess, W., Meyer, M., Birner-Gruenberger, R., Guebitz, G.M., 2011. Cross-linking of collagen with laccases and tyrosinases. Mater. Sci. Eng. C 31, 1068–1077. doi:10.1016/j.msec.2011.03.007

## K

- Kapel, R., Klingenberg, F., Framboisier, X., Dhulster, P., Marc, I., 2011. An original use of size exclusion-HPLC for predicting the performances of batch ultrafiltration implemented to enrich a complex protein hydrolysate in a targeted bioactive peptide. J. Membr. Sci. 383, 26–34. doi:10.1016/j.memsci.2011.08.025
- Katano, S., Oki, T., Matsuo, Y., Yoshihira, K., Nara, Y., Miki, T., Matsui, T., Matsumoto, K., 2003. Antihypertensive effect of alkaline protease hydrolysate of the pearl oyster *Pinctada fucata martencii* & separation and identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides. Nippon Suisan Gakkaishi 69, 975–980.
- Kawaguchi, N., Hatta, K., Nakanishi, T., 2013. 3D-Culture System for Heart Regeneration and Cardiac Medicine. BioMed Res. Int. 2013, 1–6. doi:10.1155/2013/895967
- Ketnawa, S., Benjakul, S., Martínez-Alvarez, O., Rawdkuen, S., 2016. Physical, chemical, and microbiological properties of fish tofu containing shrimp hydrolysate. Fish. Sci. 82, 379–389. doi:10.1007/s12562-015-0954-8
- Kim, E.-K., Hwang, J.-W., Kim, Y.-S., Ahn, C.-B., Jeon, Y.-J., Kweon, H.J., Bahk, Y.Y., Moon, S.-H., Jeon, B.-T., Park, P.-J., 2013. A novel bioactive peptide derived from enzymatic hydrolysis of *Ruditapes philippinarum*: Purification and investigation of its free-radical quenching potential. Process Biochem. 48, 325–330. doi:10.1016/j.procbio.2012.10.016
- Kim, S.-K., Mendis, E., 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. Food Res. Int. 39, 383–393. doi:10.1016/j.foodres.2005.10.010
- Kim, S.-K., Wijesekara, I., 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. J. Funct. Foods 2, 1–9. doi:10.1016/j.jff.2010.01.003

- Kim, S.-Y., Je, J.-Y., Kim, S.-K., 2007. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *J. Nutr. Biochem.* 18, 31–38. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.02.006
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Shahidi, F., 2010. Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chem.* 119, 1519–1526. doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.037
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Shahidi, F., 2013. Inhibition of angiotensin converting enzyme, human LDL cholesterol and DNA oxidation by hydrolysates from blacktip shark gelatin. *LWT - Food Sci. Technol.* 51, 177–182. doi:10.1016/j.lwt.2012.10.011
- Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan, W., Shahidi, F., Hayes, K.D., 2009. Amino Acid Composition and Antioxidative Peptides from Protein Hydrolysates of Yellow Stripe Trevally (*Selaroides leptolepis*). *J. Food Sci.* 74, C126–C133. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01047.x
- Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.W., Gertler, A., 1993. The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*, *Sparidae*, *Linnaeus*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 12, 203–209.
- Kołodziejaska, I., Skierka, E., Sadowska, M., Kołodziejcki, W., Niecikowska, C., 2008. Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. *Food Chem.* 107, 700–706. doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.071
- Komsa-Penkova, R., Spirova, R., Bechev, B., 1996. Modification of Lowry's method for collagen concentration measurement. *J. Biochem. Biophys. Methods* 32, 33–43.
- Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Zambonino Infante, J., Cahu, C., 2007. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 147, 205–214. doi:10.1016/j.cbpa.2006.12.037
- Kreger, S.T., Bell, B.J., Bailey, J., Stites, E., Kuske, J., Waisner, B., Voytik-Harbin, S.L., 2010. Polymerization and matrix physical properties as important design considerations for soluble collagen formulations. *Biopolymers* NA-NA. doi:10.1002/bip.21431
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., 2012. Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. *Chem. Eng. Res. Des.* 90, 622–632. doi:10.1016/j.cherd.2011.09.003
- Kristinsson, H.G., Rasco, B.A., 2000a. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40, 43–81. doi:10.1080/10408690091189266
- Kristinsson, H.G., Rasco, B.A., 2000b. Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkaline Proteases. *J. Agric. Food Chem.* 48, 657–666. doi:10.1021/jf990447v

Kristinsson, H.G., Rasco, B.A., 2000c. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochem.* 36, 131–139.

## L

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi:10.1038/227680a0

Lall, S.P., Lewis-McCrea, L.M., 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish — An overview. *Aquaculture* 267, 3–19. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.02.053

Lambrecht, M.A., Rombouts, I., Van Kelst, L., Delcour, J.A., 2015. Impact of extraction and elution media on non-size effects in size exclusion chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A* 1415, 100–107. doi:10.1016/j.chroma.2015.08.070

Lassoued, I., Mora, L., Barkia, A., Aristoy, M.-C., Nasri, M., Toldrá, F., 2015. Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Proteomics* 128, 8–17. doi:10.1016/j.jprot.2015.06.016

Ledward, D.A., 1986. Gelation of gelatin. *Funct. Prop. Food Macromol.* 171–201.

Lee, C.H., Singla, A., Lee, Y., 2001. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.* 221, 1–22.

Lee, J.K., Jeon, J.-K., Byun, H.-G., 2014. Antihypertensive effect of novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin in spontaneously hypertensive rats. *J. Funct. Foods* 7, 381–389. doi:10.1016/j.jff.2014.01.021

Lee, J.K., Jeon, J.-K., Byun, H.-G., 2011. Effect of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide purified from skate skin hydrolysate. *Food Chem.* 125, 495–499. doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.039

Lee, S.-H., Qian, Z.-J., Kim, S.-K., 2010. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* 118, 96–102. doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.086

Liang, Q., Wang, L., Sun, W., Wang, Z., Xu, J., Ma, H., 2014. Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Process Biochem.* 49, 318–323. doi:10.1016/j.procbio.2013.12.003

Liaset, B., Julshamn, K., Espe, M., 2003. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex™. *Process Biochem.* 38, 1747–1759. doi:10.1016/S0032-9592(02)00251-0

Liaset, B., Lied, E., Espe, M., 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *J. Sci. Food Agric.* 80, 581–589.

Liceaga-Gesualdo, A.M., Li-Chan, E.C.Y., 1999. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *J. Food Sci.* 64, 1000–1004.

- Li-Chan, E.C.Y., Hunag, S.-L., Jao, C.-L., Ho, K.-P., Hsu, K.-C., 2012. Peptides Derived from Atlantic Salmon Skin Gelatin as Dipeptidyl-peptidase IV Inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 60, 973–978. doi:10.1021/jf204720q
- Li, G.Y., Fukunaga, S., Takenouchi, K., Nakamura, F., 2005. Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials. *Int. J. Cosmet. Sci.* 27, 101–106.
- Li, H., Liu, B., Gao, L., Chen, H., 2004. Studies on bullfrog skin collagen. *Food Chem.* 84, 65–69. doi:10.1016/S0308-8146(03)00167-5
- Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M., 2005. Proteolytic Extraction of Salmon Oil and PUFA Concentration by Lipases. *Mar. Biotechnol.* 7, 70–76. doi:10.1007/s10126-004-0149-2
- Lin, Y.K., Liu, D.C., 2006. Comparison of physical–chemical properties of type I collagen from different species. *Food Chem.* 99, 244–251. doi:10.1016/j.foodchem.2005.06.053
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., Wu, G., 2009. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* 37, 43–53. doi:10.1007/s00726-008-0171-1
- Liu, D., Liang, L., Regenstein, J.M., Zhou, P., 2012. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chem.* 133, 1441–1448. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.032
- Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., Regenstein, J.M., 2015. Collagen and Gelatin. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 6, 527–557. doi:10.1146/annurev-food-031414-111800
- Liu, G.-M., Cao, M.-J., Yu, H.-L., Hu, Y.-H., Zhang, L.-J., Su, W.-J., 2010. Optimisation of enzymatic hydrolysis of the by-products of marine crab processing using mixed enzymes: Hydrolysis of crab processing by-products. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45, 1198–1204. doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02255.x
- Liu, Z., Dong, S., Xu, J., Zeng, M., Song, H., Zhao, Y., 2008. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. *Food Control* 19, 231–235. doi:10.1016/j.foodcont.2007.03.004
- Li, Y., Asadi, A., Monroe, M.R., Douglas, E.P., 2009. pH effects on collagen fibrillogenesis in vitro: Electrostatic interactions and phosphate binding. *Mater. Sci. Eng. C* 29, 1643–1649. doi:10.1016/j.msec.2009.01.001
- Li, Z., Paulson, A.T., Gill, T.A., 2015. Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *J. Funct. Foods* 19, 733–743. doi:10.1016/j.jff.2015.09.058
- Li, Z.-R., Wang, B., Chi, C., Zhang, Q.-H., Gong, Y., Tang, J.-J., Luo, H., Ding, G., 2013a. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). *Food Hydrocoll.* 31, 103–113. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.10.001
- Lorand, L., Graham, R.M., 2003. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 140–156.

- Lores, M., Llompарт, M., Alvarez-Rivera, G., Guerra, E., Vila, M., Celeiro, M., Lamas, J.P., Garcia-Jares, C., 2016. Positive lists of cosmetic ingredients: Analytical methodology for regulatory and safety controls – A review. *Anal. Chim. Acta* 915, 1–26. doi:10.1016/j.aca.2016.02.033
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., others, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.
- Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Plieva, F.M., Savina, I.N., Jungvid, H., Mattiasson, B., 2003. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends Biotechnol.* 21, 445–451. doi:10.1016/j.tibtech.2003.08.002

## M

- Ma, L., 2003. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* 24, 4833–4841. doi:10.1016/S0142-9612(03)00374-0
- Mamelona, J., Saint-Louis, R., Pelletier, É., 2009. Nutritional composition and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from echinoderm byproducts: Protein hydrolysates from echinoderm byproducts. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45, 147–154. doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02114.x
- Margot, A., Flaschel, E., Renken, A., 1998. Development of a continuously operated reactor for the limited hydrolysis of whey protein by trypsin. *Process Biochem.* 33, 125–131.
- Martínez-Alvarez, O., Batista, I., Ramos, C., Montero, P., 2016. Enhancement of ACE and prolyl oligopeptidase inhibitory potency of protein hydrolysates from sardine and tuna by-products by simulated gastrointestinal digestion. *Food Funct* 7, 2066–2073. doi:10.1039/C5FO01603G
- Masters, K., 1972. Spray drying.
- Mazurais, D., Darias, M., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C.L., 2011. Transcriptomics for understanding marine fish larval development <sup>1 1</sup> This review is part of a virtual symposium on current topics in aquaculture of marine fish and shellfish. *Can. J. Zool.* 89, 599–611. doi:10.1139/z11-036
- Mbatia, B., Adlercreutz, D., Adlercreutz, P., Mahadhy, A., Mulaa, F., Mattiasson, B., 2010. Enzymatic oil extraction and positional analysis of  $\omega$ -3 fatty acids in Nile perch and salmon heads. *Process Biochem.* 45, 815–819. doi:10.1016/j.procbio.2010.02.010
- McCormick, R.J., 2009. Collagen. *Appl. Muscle Biol. Meat Sci.* M RJ McCormick Ed CRC Press Lond. UK 129–148.
- Meisel, H., 1997. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livest. Prod. Sci.* 50, 125–138.
- Mellander, O., 1950. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. 2. Peroral calcium dosage of infants. Some aspects of the pathogenesis of rickets. *Acta Soc. Bot. Pol.* 55, 247–55.

- Mellinas, C., Valdés, A., Ramos, M., Burgos, N., Garrigós, M. del C., Jiménez, A., 2016. Active edible films: Current state and future trends. *J. Appl. Polym. Sci.* 133.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S.-K., 2005. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 53, 581–587.
- Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., Stressler, T., Fischer, L., 2015. Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 63, 5682–5693. doi:10.1021/acs.jafc.5b01665
- Mine, Y., Li-Chan, E.C., Jiang, B., 2010. Biologically active food proteins and peptides in health: an overview. *Bioact. Proteins Pept. Funct. Foods Nutraceuticals* 5–11.
- Minh Thuy, L.T., Okazaki, E., Osako, K., 2014. Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. *Food Chem.* 149, 264–270. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.094
- Minjarez-Osorio, C., Castillo-Alvarado, S., Gatlin, D.M., González-Félix, M.L., Perez-Velazquez, M., Rossi, W., 2016. Plant protein sources in the diets of the sciaenids red drum (*Sciaenops ocellatus*) and shortfin corvina (*Cynoscion parvipinnis*): A comparative study. *Aquaculture* 453, 122–129. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.11.042
- Miura, S., Kimura, S., 1985. Jellyfish mesogloea collagen. Characterization of molecules as alpha 1 alpha 2 alpha 3 heterotrimers. *J. Biol. Chem.* 260, 15352–15356.
- Mohr, V., 1980. Enzymes technology in the meat and fish industries. *Process Biochem.*
- Morales-Medina, R., Tamm, F., Guadix, A.M., Guadix, E.M., Drusch, S., 2016. Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. *Food Chem.* 194, 1208–1216. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.122
- Moreno, H.M., Montero, M.P., Gómez-Guillén, M.C., Fernández-Martín, F., Mørkøre, T., Borderías, J., 2012. Collagen characteristics of farmed Atlantic salmon with firm and soft fillet texture. *Food Chem.* 134, 678–685. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.160
- Moreno, M.M., Cuadrado, V.F., 1993. Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochem.* 28, 481–490.
- Morimura, S., Nagata, H., Uemura, Y., Fahmi, A., Shigematsu, T., Kida, K., 2002. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. *Process Biochem.* 37, 1403–1412.
- Muthukumar, T., Prabu, P., Ghosh, K., Sastry, T.P., 2014. Fish scale collagen sponge incorporated with *Macrotyloma uniflorum* plant extract as a possible wound/burn dressing material. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 113, 207–212. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.09.019

Muyonga, J., Cole, C.G., Duodu, K., 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). Food Chem. 86, 325–332. doi:10.1016/j.foodchem.2003.09.038

Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., Duodu, K.G., 2004. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). Food Chem. 85, 81–89. doi:10.1016/j.foodchem.2003.06.006

## N

Nagai, T., Suzuki, N., 2000. Isolation of collagen from fish waste material—skin, bone and fins. Food Chem. 68, 277–281.

Nagai, T., Suzuki, N., Nagashima, T., 2008. Collagen from common minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) unesu. Food Chem. 111, 296–301. doi:10.1016/j.foodchem.2008.03.087

Nagarajan, M., Benjakul, S., Prodpran, T., Songtipya, P., 2015. Effects of bio-nanocomposite films from tilapia and squid skin gelatins incorporated with ethanolic extract from coconut husk on storage stability of mackerel meat powder. Food Packag. Shelf Life 6, 42–52. doi:10.1016/j.fpsl.2015.09.001

Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., Osako, K., 2011. Type I collagen from the skin of ornate threadfin bream (*Nemipterus hexodon*): Characteristics and effect of pepsin hydrolysis. Food Chem. 125, 500–507. doi:10.1016/j.foodchem.2010.09.040

Nchienzia, H.A., Morawicki, R.O., Gadang, V.P., 2010. Enzymatic hydrolysis of poultry meal with endo- and exopeptidases. Poult. Sci. 89, 2273–2280. doi:10.3382/ps.2008-00558

Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C., 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. J. Food Sci. 66, 642–646.

Nikoo, M., Benjakul, S., Ehsani, A., Li, J., Wu, F., Yang, N., Xu, B., Jin, Z., Xu, X., 2014. Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin. J. Funct. Foods 7, 609–620. doi:10.1016/j.jff.2013.12.024

Noble, J.E., Bailey, M.J.A., 2009. Chapter 8 Quantitation of Protein, in: Methods in Enzymology. Elsevier, pp. 73–95.

Nolsøe, H., Undeland, I., 2009. The Acid and Alkaline Solubilization Process for the Isolation of Muscle Proteins: State of the Art. Food Bioprocess Technol. 2, 1–27. doi:10.1007/s11947-008-0088-4

Nomura, Y., Oohashi, K., Watanabe, M., Kasugai, S., 2005. Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats. Nutrition 21, 1120–1126. doi:10.1016/j.nut.2005.03.007

Nomura, Y., Toki, S., Ishii, Y., Shirai, K., 2001a. Effect of transglutaminase on reconstruction and physicochemical properties of collagen gel from shark type I collagen. Biomacromolecules 2, 105–110.

Nomura, Y., Toki, S., Ishii, Y., Shirai, K., 2001b. Improvement of shark type I collagen with microbial transglutaminase in urea. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65, 982–985.

## O

- Oh, H.H., Uemura, T., Yamaguchi, I., Ikoma, T., Tanaka, J., 2015. Effect of enzymatically cross-linked tilapia scale collagen for osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Bioact. Compat. Polym. Biomed. Appl.* 0883911515595240.
- Oishi, S., 2002. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem. Toxicol.* 40, 1807–1813.
- Olsen, R.L., Toppe, J., Karunasagar, I., 2014. Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends Food Sci. Technol.* 36, 144–151. doi:10.1016/j.tifs.2014.01.007
- Opheim, M., Šližytė, R., Sterten, H., Provan, F., Larssen, E., Kjos, N.P., 2015. Hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) rest raw materials—Effect of raw material and processing on composition, nutritional value, and potential bioactive peptides in the hydrolysates. *Process Biochem.* 50, 1247–1257. doi:10.1016/j.procbio.2015.04.017
- Orban, J.M., Wilson, L.B., Kofroth, J.A., El-Kurdi, M.S., Maul, T.M., Vorp, D.A., 2004. Crosslinking of collagen gels by transglutaminase. *J. Biomed. Mater. Res. A* 68, 756–762.
- Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., Shahiri, H., 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chem.* 115, 238–242. doi:10.1016/j.foodchem.2008.12.013
- Ovsianikov, A., Deiwick, A., Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Möller, L., Dräger, G., Chichkov, B., 2011. Laser Fabrication of Three-Dimensional CAD Scaffolds from Photosensitive Gelatin for Applications in Tissue Engineering. *Biomacromolecules* 12, 851–858. doi:10.1021/bm1015305

## P

- Pacheco-Aguilar, R., Mazorra-Manzano, M.A., Ramírez-Suárez, J.C., 2008. Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chem.* 109, 782–789. doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.047
- Palazzolo, G., Broguiere, N., Cenciarelli, O., Dermutz, H., Zenobi-Wong, M., 2015. Ultrasoft Alginate Hydrogels Support Long-Term Three-Dimensional Functional Neuronal Networks. *Tissue Eng. Part A* 21, 2177–2185. doi:10.1089/ten.tea.2014.0518
- Pal, G.K., Nidheesh, T., Suresh, P.V., 2015. Comparative study on characteristics and in vitro fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*). *Food Res. Int.* 76, 804–812. doi:10.1016/j.foodres.2015.07.018
- Pallela, R., Bojja, S., Janapala, V.R., 2011. Biochemical and biophysical characterization of collagens of marine sponge, *Ircinia fusca* (*Porifera: Demospongiae: Irciniidae*). *Int. J. Biol. Macromol.* 49, 85–92. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.03.019

- Panasiuk, R., Amarowicz, R., Kostyra, H., Sijtsma, L., 1998. Determination of  $\alpha$ -amino nitrogen in pea protein hydrolysates: a comparison of three analytical methods. *Food Chem.* 62, 363–367.
- Paquette, J.S., Goulet, F., Boulet, L.P., Laviolette, M., Tremblay, N., Chakir, J., Gennain, L., Auger, F.A., 1998. Three-dimensional production of bronchi in vitro. *Can. Respir. J. J. Can. Thorac. Soc.* 5, 43.
- Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., Berthod, F., 2010. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials* 3, 1863–1887. doi:10.3390/ma3031863
- Park, P.-J., Jung, W.-K., Kim, S.-K., Jun, S.-Y., 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Eur. Food Res. Technol.* 219, 20–26. doi:10.1007/s00217-004-0882-9
- Pati, F., Adhikari, B., Dhara, S., 2010. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresour. Technol.* 101, 3737–3742. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.133
- Payne, K.J., Veis, A., 1988. Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies. *Biopolymers* 27, 1749–1760. doi:10.1002/bip.360271105
- Pei, X., Yang, R., Zhang, Z., Gao, L., Wang, J., Xu, Y., Zhao, M., Han, X., Liu, Z., Li, Y., 2010. Marine collagen peptide isolated from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) skin facilitates learning and memory in aged C57BL/6J mice. *Food Chem.* 118, 333–340. doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.120
- Peng, Y., Glattauer, V., Werkmeister, J.A., Ramshaw, J.A.M., 2004. Evaluation for collagen products for cosmetic application. *Int. J. Cosmet. Sci.* 26, 313–313.
- Penven, A., Gálvez, R.P., Bergé, J.-P., 2013. By-products from Fish Processing: Focus on French Industry. *Util. Fish Waste* 1.
- Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., 2000. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 27–46.
- Péres, A., Cahu, C.L., Infante, J.Z., Le Gall, M.M., Quazuguel, P., 1996. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 237–242.
- Picot, L., Bordenave, S., Didelot, S., Fruitier-Arnaudin, I., Sannier, F., Thorkelsson, G., Bergé, J.P., Guérard, F., Chabeaud, A., Piot, J.M., 2006. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochem.* 41, 1217–1222. doi:10.1016/j.procbio.2005.11.024
- Pihlanto-Leppälä, A., 2000. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci. Technol.* 11, 347–356.
- Porracchia, J., 2006. Microbiological limit testing: microbial specifications for finished products. *Cosmet. Sci. Technol. Ser.* 31, 233.

Proksch, E., Schunck, M., Zague, V., Segger, D., Degwert, J., Oesser, S., 2014a. Oral Intake of Specific Bioactive Collagen Peptides Reduces Skin Wrinkles and Increases Dermal Matrix Synthesis. *Skin Pharmacol. Physiol.* 27, 113–119. doi:10.1159/000355523

Proksch, E., Segger, D., Degwert, J., Schunck, M., Zague, V., Oesser, S., 2014b. Oral Supplementation of Specific Collagen Peptides Has Beneficial Effects on Human Skin Physiology: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Skin Pharmacol. Physiol.* 27, 47–55. doi:10.1159/000351376

## Q

Quaglia, G.B., Orban, E., 1987. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Sci. Food Agric.* 38, 271–276.

## R

Rajapakse, N., Jung, W.-K., Mendis, E., Moon, S.-H., Kim, S.-K., 2005a. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIIa and platelet aggregation. *Life Sci.* 76, 2607–2619. doi:10.1016/j.lfs.2004.12.010

Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.-G., Kim, S.-K., 2005b. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *J. Nutr. Biochem.* 16, 562–569. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.02.005

Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W.-K., Je, J.-Y., Kim, S.-K., 2005c. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res. Int.* 38, 175–182. doi:10.1016/j.foodres.2004.10.002

Raspe, C., Czeslick, E., Leimert, A., Hofman, B., Simm, A., Weimann, A., Sablotzki, A., 2013. Amino acid and dipeptide combination strongly attenuates endotoxemic cytokine production in human whole blood monocytes. *Int J Cytokine Mediat Res* 5, 1–10.

Ratner, B.D., Bryant, S.J., 2004. Biomaterials: Where We Have Been and Where We are Going. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 6, 41–75. doi:10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027

Ravallec-Plé, R., Charlot, C., Pires, C., Braga, V., Batista, I., Van Wormhoudt, A., Le Gal, Y., Fouchereau-Péron, M., 2001. The presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from processing waste of sardine (*Sardina pilchardus*): Bioactive peptides in sardine hydrolysates. *J. Sci. Food Agric.* 81, 1120–1125. doi:10.1002/jsfa.921

Ravallec-Plé, R., Van Wormhoudt, A., 2003. Secretagogue activities in cod (*Gadus morhua*) and shrimp (*Penaeus aztecus*) extracts and alcalase hydrolysates determined in AR4-2J pancreatic tumour cells. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 134, 669–679. doi:10.1016/S1096-4959(03)00026-5

Refstie, S., Olli, J.J., Standal, H., 2004. Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture* 239, 331–349. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.06.015

- Richards, M.P., Kelleher, S.D., Hultin, H.O., 1998. Effect of washing with or without antioxidants on quality retention of mackerel fillets during refrigerated and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4363–4371.
- Robert, M., Zatylny-Gaudin, C., Fournier, V., Corre, E., Le Corguillé, G., Bernay, B., Henry, J., 2014. Transcriptomic and peptidomic analysis of protein hydrolysates from the white shrimp (*L. vannamei*). *J. Biotechnol.* 186, 30–37. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.06.020
- Robey, P.G., 2002. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. *Princ. Bone Biol.* 1, 225–237.
- Rønnestad, I., Yúfera, M., Ueberschär, B., Ribeiro, L., Saele, Ø., Boglione, C., 2013. Feeding behaviour and digestive physiology in larval fish: current knowledge, and gaps and bottlenecks in research. *Rev. Aquac.* 5, S59–S98. doi:10.1111/raq.12010
- Rossert, J., De Crombrughe, B., 1996. Type I collagen: structure, synthesis, and regulation. *Princ. Bone Biol.* 2, 189–210.
- Rousseau, M., Batista, I., Le Gal, Y., Fouchereau-Peron, M., 2001. Purification of a functional competitive antagonist for calcitonin gene related peptide action from sardine hydrolysates. *Electron. J. Biotechnol.* 4, 9–110.
- Rustad, T., 2003. Utilisation of marine by-products. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* 2, 458–463.
- Ruzzin, J., Petersen, R., Meugnier, E., Madsen, L., Lock, E.-J., Lillefosse, H., Ma, T., Pesenti, S., Sonne, S.B., Marstrand, T.T., Malde, M.K., Du, Z.-Y., Chavey, C., Fajas, L., Lundebye, A.-K., Brand, C.L., Vidal, H., Kristiansen, K., Frøyland, L., 2009. Persistent Organic Pollutant Exposure Leads to Insulin Resistance Syndrome. *Environ. Health Perspect.* 118, 465–471. doi:10.1289/ehp.0901321

## S

- Sáez-Plaza, P., Michałowski, T., Navas, M.J., Asuero, A.G., Wybraniec, S., 2013. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 43, 178–223.
- Saha, B.C., Hayashi, K., 2001. Debittering of protein hydrolyzates. *Biotechnol. Adv.* 19, 355–370.
- Saiga, A., Iwai, K., Hayakawa, T., Takahata, Y., Kitamura, S., Nishimura, T., Morimatsu, F., 2008. Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory Peptides Obtained from Chicken Collagen Hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9586–9591. doi:10.1021/jf072669w
- Saitô, H., 1986. Conformation-dependent <sup>13</sup>C chemical shifts: A new means of conformational characterization as obtained by high-resolution solid-state <sup>13</sup>C NMR. *Magn. Reson. Chem.* 24, 835–852.

- Salampessy, J., Phillips, M., Seneweera, S., Kailasapathy, K., 2010. Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (*Meuschenia sp.*) insoluble proteins. *Food Chem.* 120, 556–560. doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.054
- Santos, M.H., Silva, R.M., Dumont, V.C., Neves, J.S., Mansur, H.S., Heneine, L.G.D., 2013. Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 790–800. doi:10.1016/j.msec.2012.11.003
- Sato, K., Ebihara, T., Adachi, E., Kawashima, S., Hattori, S., Irie, S., 2000. Possible Involvement of Aminotelopeptide in Self-assembly and Thermal Stability of Collagen I as Revealed by Its Removal with Proteases. *J. Biol. Chem.* 275, 25870–25875. doi:10.1074/jbc.M003700200
- Schmelzer, C.E.H., Schöps, R., Ulbrich-Hofmann, R., Neubert, R.H.H., Raith, K., 2004. Mass spectrometric characterization of peptides derived by peptic cleavage of bovine  $\beta$ -casein. *J. Chromatogr. A* 1055, 87–92. doi:10.1016/j.chroma.2004.09.003
- Schuetz, T., Richmond, N., Harmon, M.E., Schuetz, J., Castaneda, L., Slowinska, K., 2013. The microstructure of collagen type I gel cross-linked with gold nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 101, 118–125. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.06.006
- Secchi, G., 2008. Role of protein in cosmetics. *Clin. Dermatol.* 26, 321–325. doi:10.1016/j.clindermatol.2008.04.004
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Novel functional food ingredients from marine sources. *Curr. Opin. Food Sci.* 2, 123–129. doi:10.1016/j.cofs.2014.12.009
- Shahidi, F., Han, X.-Q., Synowiecki, J., 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.* 53, 285–293.
- Shen, Q., Guo, R., Dai, Z., Zhang, Y., 2012. Investigation of Enzymatic Hydrolysis Conditions on the Properties of Protein Hydrolysate from Fish Muscle (*Collichthys niveatus*) and Evaluation of Its Functional Properties. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5192–5198. doi:10.1021/jf205258f
- Shimizu, J., Shimizu, H., Nagashima, K., Yamada, K., Takamatsu, M., 2005. Collagene de poisson et methode de production connexe. Google Patents.
- Shyni, K., Hema, G.S., Ninan, G., Mathew, S., Joshy, C.G., Lakshmanan, P.T., 2014. Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). *Food Hydrocoll.* 39, 68–76. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.12.008
- Siemensma, A.D., Weijer, W.J., Bak, H.J., 1993. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends Food Sci. Technol.* 4, 16–21.
- Silva, C., Sousa, F., Gubitz, G., Cavaco-Paulo, A., 2004a. Chemical modifications on proteins using glutaraldehyde. *Food Technol. Biotechnol.* 42, 51–56.
- Silva, T., Moreira-Silva, J., Marques, A., Domingues, A., Bayon, Y., Reis, R., 2014. Marine Origin Collagens and Its Potential Applications. *Mar. Drugs* 12, 5881–5901. doi:10.3390/md12125881

- Silvestre, M.P.C., 1997. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem.* 60, 263–271.
- Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., Kishimura, H., 2011. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chem.* 124, 97–105. doi:10.1016/j.foodchem.2010.05.111
- Sinthusamran, S., Benjakul, S., Kishimura, H., 2013. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chem.* 138, 2435–2441. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.136
- Sirbu, R., Negreanu-Pirjol, T., Leca, M., Bechir, A., Maris, M., Maris, D., 2008. Rheological Characterisation of Collagen Gels from Marine Resources of Black Sea and Chlohexidine Salt for using in Dental Medicine. *World Acad. Sci. Eng. Technol. Int. J. Med. Health Biomed. Bioeng. Pharm. Eng.* 2, 239–244.
- Skalli, A., Zambonino-Infante, J.-L., Kotzamanis, Y., Fabregat, R., Gisbert, E., 2014. Peptide molecular weight distribution of soluble protein fraction affects growth performance and quality in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquac. Nutr.* 20, 118–131. doi:10.1111/anu.12058
- Šližytė, R., Daukšas, E., Falch, E., Storrø, I., Rustad, T., 2005a. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem.* 40, 2021–2033. doi:10.1016/j.procbio.2004.07.016
- Šližytė, R., Rustad, T., Storrø, I., 2005b. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem.* 40, 3680–3692. doi:10.1016/j.procbio.2005.04.007
- Söderhäll, C., Marenholz, I., Kerscher, T., Rüschen-dorf, F., Esparza-Gordillo, J., Worm, M., Gruber, C., Mayr, G., Albrecht, M., Rohde, K., Schulz, H., Wahn, U., Hubner, N., Lee, Y.-A., 2007. Variants in a Novel Epidermal Collagen Gene (COL29A1) Are Associated with Atopic Dermatitis. *PLoS Biol.* 5, e242. doi:10.1371/journal.pbio.0050242
- Song, E., Yeon Kim, S., Chun, T., Byun, H.-J., Lee, Y.M., 2006. Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials* 27, 2951–2961. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.015
- Souguir, H., Ronsin, O., Larreta-Garde, V., Narita, T., Caroli, C., Baumberger, T., 2012. Chemo-osmotically driven inhomogeneity growth during the enzymatic gelation of gelatin. *Soft Matter* 8, 3363. doi:10.1039/c2sm07234c
- Spurlin, T.A., Bhadriraju, K., Chung, K.-H., Tona, A., Plant, A.L., 2009. The treatment of collagen fibrils by tissue transglutaminase to promote vascular smooth muscle cell contractile signaling. *Biomaterials* 30, 5486–5496. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.014
- Stachel, I., Schwarzenbolz, U., Henle, T., Meyer, M., 2010. Cross-Linking of Type I Collagen with Microbial Transglutaminase: Identification of Cross-Linking Sites. *Biomacromolecules* 11, 698–705. doi:10.1021/bm901284x
- Stainsby, G., 1977. The physical chemistry of gelatin in solution. *Sci. Technol. Gelatin* 109–135.

Sugni, M., Fassini, D., Barbaglio, A., Biressi, A., Di Benedetto, C., Tricarico, S., Bonasoro, F., Wilkie, I.C., Candia Carnevali, M.D., 2014. Comparing dynamic connective tissue in echinoderms and sponges: Morphological and mechanical aspects and environmental sensitivity. *Mar. Environ. Res.* 93, 123–132. doi:10.1016/j.marenvres.2013.07.010

Swatschek, D., Schatton, W., Kellermann, J., Müller, W.E., Kreuter, J., 2002. Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53, 107–113. doi:10.1016/S0939-6411(01)00192-8

## T

Tamilmozhi, S., Veeruraj, A., Arumugam, M., 2013. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Res. Int.* 54, 1499–1505. doi:10.1016/j.foodres.2013.10.002

Tanaka, M., Koyama, Y., Nomura, Y., 2009. Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-induced skin damage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 930–932.

Taylor, W.H., 1957. Formol titration: an evaluation of its various modifications. *Analyst* 82, 488–498.

Tharanathan, R., 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends Food Sci. Technol.* 14, 71–78. doi:10.1016/S0924-2244(02)00280-7

Tharanathan, R.N., Saroja, N., 2001. Hydrocolloid-based packaging films-alternate to synthetic plastics. *J. Sci. Ind. Res.* 60, 547–559.

Trepos, R., Cervin, G., Pile, C., Pavia, H., Hellio, C., Svenson, J., 2015. Evaluation of cationic micropeptides derived from the innate immune system as inhibitors of marine biofouling. *Biofouling* 31, 393–403. doi:10.1080/08927014.2015.1048238

Tsai, J.-S., Chen, J.-L., Pan, B.S., 2008. ACE-inhibitory peptides identified from the muscle protein hydrolysate of hard clam (*Meretrix lusoria*). *Process Biochem.* 43, 743–747. doi:10.1016/j.procbio.2008.02.019

## U

Uchisawa, H., Okuzaki, B., Ichita, J., Matsue, H., 2001. Binding between calcium ions and chondroitin sulfate chains of salmon nasal cartilage glycosaminoglycan, in: *International Congress Series*. Elsevier, pp. 205–220.

Uriarte-Montoya, M.H., Arias-Moscoso, J.L., Plascencia-Jatomea, M., Santacruz-Ortega, H., Rouzaud-Sández, O., Cardenas-Lopez, J.L., Marquez-Rios, E., Ezquerra-Brauer, J.M., 2010. Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle collagen: Extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan–collagen biofilms. *Bioresour. Technol.* 101, 4212–4219. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.008

Urist, M.R., Iwata, H., 1973. Preservation and biodegradation of the morphogenetic property of bone matrix. *J. Theor. Biol.* 38, 155–167.

## V

- Valente, L.M.P., Cabral, E.M., Sousa, V., Cunha, L.M., Fernandes, J.M.O., 2016. Plant protein blends in diets for Senegalese sole affect skeletal muscle growth, flesh texture and the expression of related genes. *Aquaculture* 453, 77–85. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.11.034
- Vandanjon, L., Grignon, M., Courois, E., Bourseau, P., Jaouen, P., 2009. Fractionating white fish fillet hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration. *J. Food Eng.* 95, 36–44. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.04.007
- Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Schacht, E., 2011. Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules* 12, 1387–1408. doi:10.1021/bm200083n
- Veeruraj, A., Arumugam, M., Ajithkumar, T., Balasubramanian, T., 2015. Isolation and characterization of collagen from the outer skin of squid (*Doryteuthis singhalensis*). *Food Hydrocoll.* 43, 708–716. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.07.025
- Veeruraj, A., Arumugam, M., Balasubramanian, T., 2013. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). *Process Biochem.* 48, 1592–1602. doi:10.1016/j.procbio.2013.07.011
- Veis, A., 1964. The macromolecular chemistry of gelatin.
- Venkatesan, J., Lowe, B., Manivasagan, P., Kang, K.-H., Chalisserry, E.P., Anil, S., Kim, D.G., Kim, S.-K., 2015. Isolation and Characterization of Nano-Hydroxyapatite from Salmon Fish Bone. *Materials* 8, 5426–5439.

## W

- Wang, J., Hu, J., Cui, J., Bai, X., Du, Y., Miyaguchi, Y., Lin, B., 2008. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* 111, 302–308. doi:10.1016/j.foodchem.2008.03.059
- Wang, L., Liang, Q., Wang, Z., Xu, J., Liu, Y., Ma, H., 2014. Preparation and characterisation of type I and V collagens from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Chem.* 148, 410–414. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.074
- Wang, L., Wang, Q., Liang, Q., He, Y., Wang, Z., He, S., Xu, J., Ma, H., 2015. Determination of bioavailability and identification of collagen peptide in blood after oral ingestion of gelatin: Bioavailability and bioavailable forms of gelatin. *J. Sci. Food Agric.* 95, 2712–2717. doi:10.1002/jsfa.7008
- Wasswa, J., Tang, J., Gu, X., Yuan, X., 2007. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chem.* 104, 1698–1704. doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.044
- Weadock, K.S., Miller, E.J., Bellincampi, L.D., Zawadsky, J.P., Dunn, M.G., 1995. Physical crosslinking of collagen fibers: comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment. *J. Biomed. Mater. Res.* 29, 1373–1379.

- Weber, F., Böhme, J., Scheidt, H.A., Gründer, W., Rammelt, S., Hacker, M., Schulz-Siegmund, M., Huster, D., 2012. 31P and 13C solid-state NMR spectroscopy to study collagen synthesis and biomineralization in polymer-based bone implants. *NMR Biomed.* 25, 464–475. doi:10.1002/nbm.1649
- Wichterle, O., Lim, D., 1960. Hydrophilic gels for biological use.
- Wijesekara, I., Qian, Z.-J., Ryu, B., Ngo, D.-H., Kim, S.-K., 2011. Purification and identification of antihypertensive peptides from seaweed pipefish (*Syngnathus schlegelii*) muscle protein hydrolysate. *Food Res. Int.* 44, 703–707. doi:10.1016/j.foodres.2010.12.022
- Williams, D.F., 2009. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30, 5897–5909. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.027
- Wolff, E., Gibert, H., 1988. Développements technologiques nouveaux en lyophilisation. *J. Food Eng.* 8, 91–108.
- Woo, J.-W., Yu, S.-J., Cho, S.-M., Lee, Y.-B., Kim, S.-B., 2008. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. *Food Hydrocoll.* 22, 879–887. doi:10.1016/j.foodhyd.2007.04.015
- Wu, H.-C., Chen, H.-M., Shiau, C.-Y., 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Int.* 36, 949–957. doi:10.1016/S0963-9969(03)00104-2
- Wu, J., Liu, H., Ge, S., Wang, S., Qin, Z., Chen, L., Zheng, Q., Liu, Q., Zhang, Q., 2015. The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. *Food Hydrocoll.* 43, 427–435. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.06.017
- Y**
- Yamada, S., Yamamoto, K., Ikeda, T., Yanagiguchi, K., Hayashi, Y., 2014. Potency of Fish Collagen as a Scaffold for Regenerative Medicine. *BioMed Res. Int.* 2014.
- Yang, S., Leong, K.-F., Du, Z., Chua, C.-K., 2001. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng.* 7, 679–689.
- Yan, M., Li, B., Zhao, X., Ren, G., Zhuang, Y., Hou, H., Zhang, X., Chen, L., Fan, Y., 2008. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chem.* 107, 1581–1586. doi:10.1016/j.foodchem.2007.10.027
- Yata, M., Yoshida, C., Fujisawa, S., Mizuta, S., Yoshinaka, R., 2001. Identification and characterization of molecular species of collagen in fish skin. *J. Food Sci.* 66, 247–251.
- Yaylaoglu, M.B., Yildiz, C., Korkusuz, F., Hasirci, V., 1999. A novel osteochondral implant. *Biomaterials* 20, 1513–1520.
- Yunoki, S., Mori, K., Suzuki, T., Nagai, N., Munekata, M., 2007. Novel elastic material from collagen for tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18, 1369–1375. doi:10.1007/s10856-007-0121-6

Yunoki, S., Nagai, N., Suzuki, T., Munekata, M., 2004. Novel biomaterial from reinforced salmon collagen gel prepared by fibril formation and cross-linking. *J. Biosci. Bioeng.* 98, 40–47.

## Z

Zague, V., de Freitas, V., Rosa, M. da C., de Castro, G.Á., Jaeger, R.G., Machado-Santelli, G.M., 2011. Collagen hydrolysate intake increases skin collagen expression and suppresses matrix metalloproteinase 2 activity. *J. Med. Food* 14, 618–624.

Zambonino Infante, J.L.Z., Cahu, C.L., Peres, A., 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *J. Nutr.* 127, 608–614.

ZAMBONINO, J., Cahu, C., Quazuguel, P., Bergot, P., 2000. Aliment complet pour larves de poissons et procede pour sa preparation. Google Patents.

Zambonino, J.-L., Cahu, C., 2010. Effect of nutrition on marine fish development and quality.

Zanaboni, G., Rossi, A., Onana, A.M.T., Tenni, R., 2000. Stability and networks of hydrogen bonds of the collagen triple helical structure: influence of pH and chaotropic nature of three anions. *Matrix Biol.* 19, 511–520.

Zeng, S., Yin, J., Yang, S., Zhang, C., Yang, P., Wu, W., 2012. Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (*Rachycentron canadum*). *Food Chem.* 135, 1975–1984. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.086

Zeugolis, D.I., Paul, G.R., Attenburrow, G., 2009. Cross-linking of extruded collagen fibers- A biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* 89A, 895–908. doi:10.1002/jbm.a.32031

Zhang, L., Liu, Y., Tian, X., Tian, Z., 2015. Antimicrobial Capacity and Antioxidant Activity of Enzymatic Hydrolysates of Protein from Rushan Bay Oyster (*Crassostrea gigas*): Bioactivity of Enzymatic Hydrolysates for Oyster. *J. Food Process. Preserv.* 39, 404–412. doi:10.1111/jfpp.12245

Zhang, Y., Liu, W., Li, G., Shi, B., Miao, Y., Wu, X., 2007. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chem.* 103, 906–912. doi:10.1016/j.foodchem.2006.09.053

Zhou, P., Regenstein, J.M., 2007. Comparison of Water Gel Desserts from Fish Skin and Pork Gelatins Using Instrumental Measurements. *J. Food Sci.* 72, C196–C201. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00320.x

Zhu, Y., Tramper, J., 2008. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. *Trends Biotechnol.* 26, 559–565. doi:10.1016/j.tibtech.2008.06.006

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.

### Encadré I : Protocole de préparation des hydrogels de collagène réticulés par la mTG

1. Préparer une solution de collagène 40 g/L dans du tampon phosphate 50mM, pH 7.  
 Préchauffer la quantité nécessaire de tampon à 37°C  
 Dissoudre le collagène dans le tampon tiède à température ambiante
2. Préparer une solution d'enzyme à 13 760 U/L (soit 137.6 g/L d'Activa WM®) à 4°C dans du tampon phosphate 50mM, pH 7  
*On veut réticuler à 400 U mTG/g de protéines collagéniques  
 [protéines collagéniques] = 8.6 g/g de collagène lyophilisé  
 [collagène]in fine = 20 g/L soit 17.2 g de prot/L  
 Pour réticuler 1L de solution de collagène à 20 g/L il faut donc :  $400 \times 17.2 = 6\ 880$   
 U mTG  
 Or on prépare une solution d'enzyme 2x plus concentrée, donc à 13 760 U/L  
 [mTG] = 100 U/g d'Activa WM®  
 Donc on prépare une solution d'Activa WM® à 137.6 g/L*
3. **Sous agitation magnétique**, et à température ambiante, verser la solution d'enzyme dans la solution de collagène. Le plus rapidement possible, car la prise en gel est très rapide, pipeter le volume désiré pour remplir les moules (si moules en silicone et gels de 2 mm d'épaisseur, couler 9 mL/puits)
4. Incuber minimum 2h à 40°C (sans agitation)
5. Congeler à -20°C

### Encadré II : Protocole de préparation des hydrogels de collagène réticulés par le GTA

1. Préparer une solution de collagène 40 g/L dans du tampon phosphate 50mM, pH 7.  
 Préchauffer la quantité nécessaire de tampon à 37°C  
 Dissoudre le collagène dans le tampon tiède à température ambiante
2. Préparer une solution de GTA à 3% (soit /ex 1.8 mL de GTA à 25% + 13.2 mL de TP50mM) dans du tampon phosphate 50mM, pH 7
3. Sous agitation magnétique, et à température ambiante, verser la solution de GTA dans la solution de collagène, puis arrêter l'agitation.
4. Incuber minimum 2h à 20°C (**sans agitation**)

## TECHNIQUE DE COLORATION DU SQUELETTE DE LARVES (LS <20mm)

### Matériel :

- Formol 4-5%
- Eau milliQ
- Bleu d'Alcian (pour solution à 10%)
- Ethanol absolu
- Acide acétique
- Eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 3%
- Solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 1%
- Borate de sodium (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O)
- Trypsine
- Rouge d'Alizarine S (solution à 0,5% diluée dans du KOH 1%)
- Glycérol 87 %

### Précautions :

- Travailler sous hotte.
- Les colorations se font sur une semaine.
- Cette technique est extraite de « The early life history of fish » édité par Eugène K. BALON, page 46
- Voir aussi « A technique for the combination of clearing, staining and injecting small mammals » de Kathleen M. DUBZINSKY and Nancy A. NEFF, Stain Technology Vol. 65 N°3, Pages : 113-118

### Protocole :

#### A L'AVANCE :

- Fixer les larves dans du formol à 5-10 %.
  - Les larves peuvent ainsi être conservées pendant plusieurs mois avant d'être colorées.
- Préparer 500 mL de **solution de coloration des cartilages** (ou environ 10 vol. solution pour 1 vol. larves) :
  - Peser 50 mg de bleu d'Alcian
  - Ajouter 400 mL d'éthanol à 95% (20 mL H<sub>2</sub>O + 380 mL éthanol absolu)
  - Homogénéiser légèrement
  - Ajouter 100 mL d'acide acétique
  - Homogénéiser (*le bleu d'Alcian est difficile à dissoudre en totalité*)
- Préparer 1 L de **solution de borate de sodium saturée** :
  - Peser 65 g de borate de sodium
  - Ajouter 1 L d'eau milliQ
  - Placer la solution sur un agitateur et laisser dissoudre (*Remarque le Borate de Sodium ne se dissoudra pas en totalité*)
- Préparer 2 \* 1 L de **solution d'hydroxyde potassium (KOH) à 1%** :
  - Peser 10 g d'hydroxyde de potassium

---

*Protocoles de coloration du squelette des larves de bar*


---

- Ajouter 1 L d'eau milliQ
- Placer la solution sur un agitateur et laisser dissoudre
- Préparer 50 mL de **solution mère de rouge d'Alizarine S** :
  - Peser 250 mg de rouge d'Alizarine S
  - Ajouter 50 mL de KOH 1%
  - Homogénéiser la solution
- Préparer 500 mL de **solution d'eau oxygénée à 3%** :
  - Mélanger 50 mL d'eau oxygénée à 30% avec 450 mL d'eau milliQ
  - Homogénéiser la solution
  -
- **LE LUNDI :**
- **08h30 → 08h45 :**
- **Rincer les larves** : *Durée : ~ 15 minutes*
  - Eliminer le formol dans une poubelle à solvant
  - Plonger les larves dans 500 mL d'eau milliQ : 2\* 5 minutes
- **09h15 :**
- **Colorer le cartilage** : *Durée : ~ 24 heures (ou jusqu'à coloration modérément bleue des tissus)*
  - Transférer les larves dans 500 mL de solution de coloration des cartilages
  - Couvrir avec une feuille de papier aluminium pour éviter l'évaporation
  - Laisser en contact pendant 24 heures.
  -
- **LE MARDI :**
- **09h30 → 12h30 :**
- **Réhydrater** : *Durée : ~ 3 heures*  
 Transférer successivement les larves dans des solutions de 500 mL d'Ethanol. A chaque solution, laisser en contact pendant 30 minutes. Couvrir avec une feuille de papier aluminium pour éviter l'évaporation.
 

○ 500 mL de solution à 95% d'éthanol (25 mL H <sub>2</sub> O + 475 mL d'éthanol 100 %)	30
<i>minutes</i>	
○ 500 mL de solution à 95% d'éthanol (25 mL H <sub>2</sub> O + 475 mL d'éthanol 100 %)	30
<i>minutes</i>	
○ 500 mL de solution à 70% d'éthanol (150 mL H <sub>2</sub> O + 350 mL d'éthanol 100 %)	30
<i>minutes</i>	
○ 500 mL de solution à 40% d'éthanol (300 mL H <sub>2</sub> O + 200 mL d'éthanol 100 %)	30
<i>minutes</i>	
○ 500 mL de solution à 15% d'éthanol (425 mL H <sub>2</sub> O + 75 mL d'éthanol 100 %)	30
<i>minutes</i>	

Transférer les larves dans 500 mL d'eau MilliQ: 30 minutes (jusqu'à ce que le poisson coule).

- **13h00 → 15h00 :**
- **Blanchir** : *Durée : ~ 10 minutes à 2 heures (1 heure pour des larves de bar à J45). La durée dépend de la quantité de pigment.*

*Protocoles de coloration du squelette des larves de bar*

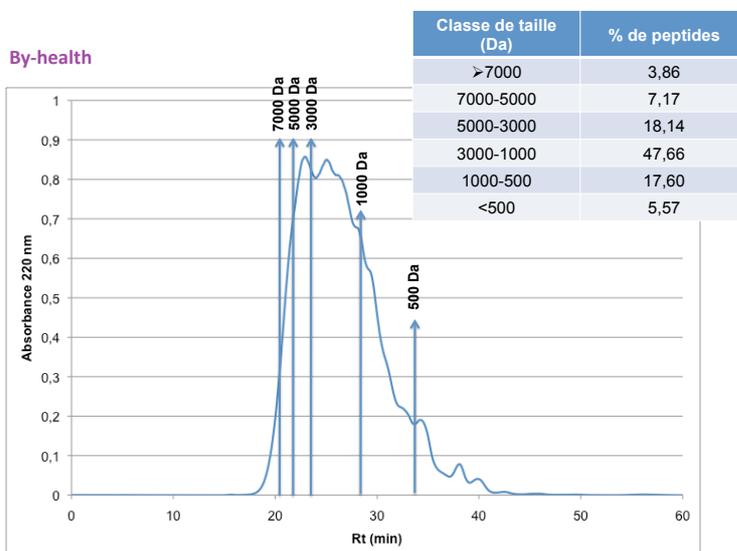
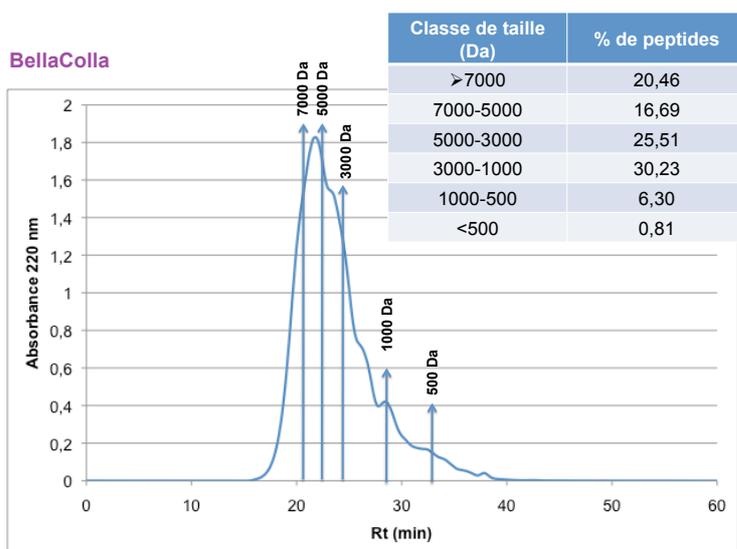
- Transférer les larves dans 500 mL d'une solution à 1 volume d'eau oxygénée à 3% + 9 volumes de KOH à 1%
- Laisser en contact : - 1 heure pour des larves de bar à J45  
- 2 heures pour des larves de sole à J45
- **15h00 :**
- **Eclaircir :** *Durée : ~ 20 heures (ou jusqu'à l'approche de la transparence)*
  - Transférer les larves dans une solution d'eau milliQ (7 volumes) + surnageant de la solution de borate de sodium saturée (3 volumes) + Trypsine à 25 ‰. *Attention la trypsine mousse.*
  - Laisser en contact pendant 20 heures. *Mettre à 4°C pendant la nuit.*
- **LE MERCREDI :**
- **12h00 :**
- **Colorer les os :** *Durée : ~ 20 heures*
  - Transférer les larves dans 500 mL d'une solution de KOH à 1% + 10 mL de solution mère de rouge d'Alizarine S
  - Laisser en contact pendant 20 heures.
- **LE JEUDI :**
- **08h30 :**
- **Rincer :** *Durée : ~ 10 minutes*
  - Transférer les larves dans 500 mL d'eau MilliQ : 5 minutes.
- **08h45 → 09h00 :**
- **Imbiber :** *Durée : ~ 15 minutes (jusqu'à extraction totale du colorant autre que le bleu du cartilage et le rouge des os. Parfois la chair reste bleutée et ne s'éclaircit qu'à l'étape suivante)*
  - Transférer les larves dans 300 mL de solution de KOH à 1% : 2 \* 5 minutes.
- **09h00 → 16h00 :**
- **Stocker :** *Durée : ~ 7 heures*
  - Transférer les larves dans 300 mL d'une solution à 40% de glycérol + 60% de KOH à 1% : 2 heures.
  - Transférer les larves dans 300 mL d'une solution à 70% de glycérol + 30% de KOH à 1% : 2 heures.
  - Stocker dans du glycérol jusqu'à la lecture des malformations.

**Protocole d'analyse :**

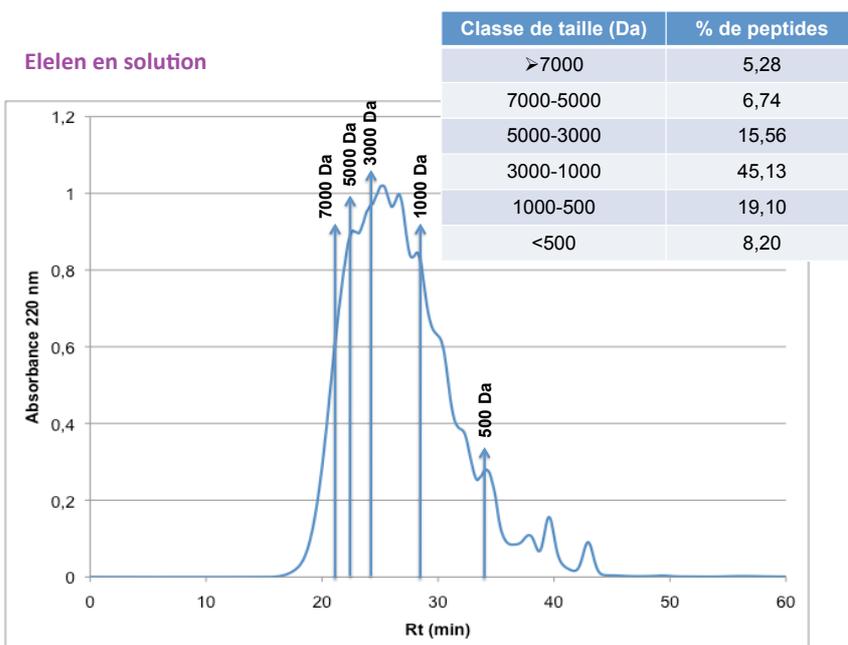
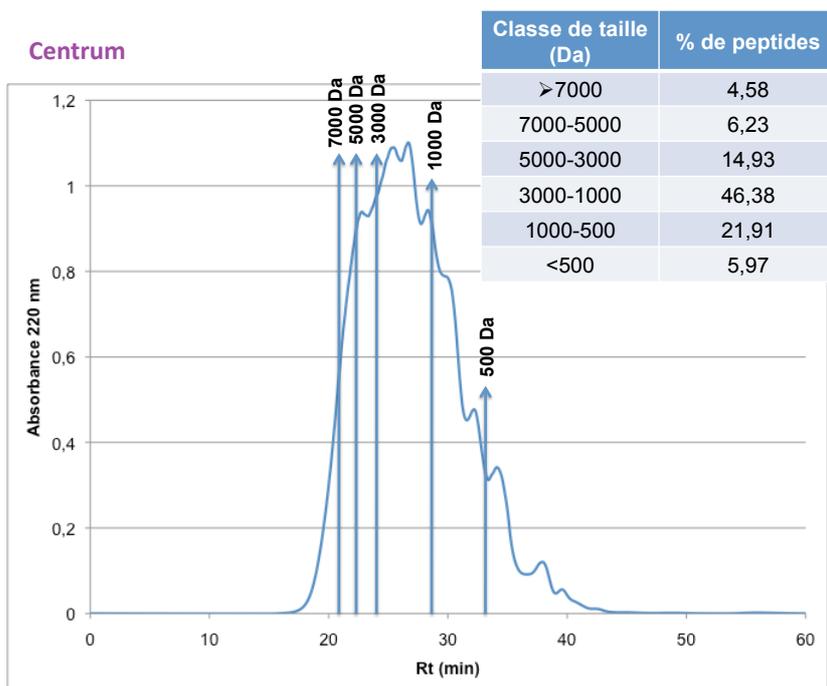
Superdex Peptide 10/300 GL

Conditions d'élution: 30% acétonitrile / 70% eau + acide trifluoroacétique 0,1%

Préparation des échantillons : 10mg de protéines par mL de protéines

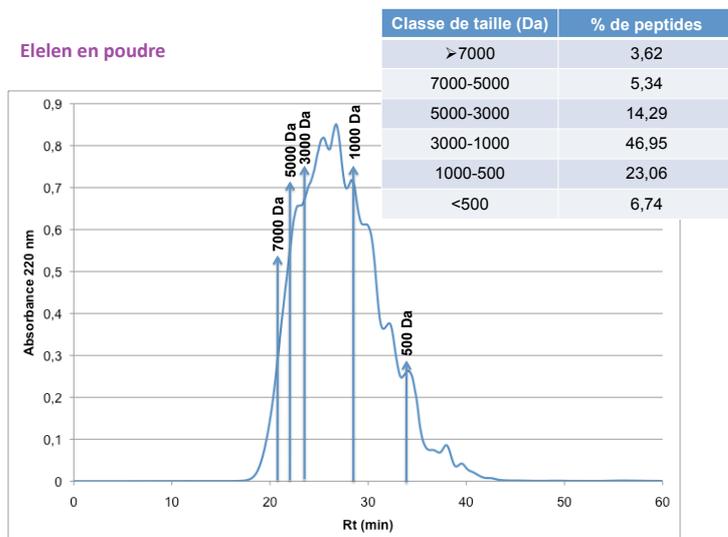


Analyses en SEC-FPLC des produits de la concurrence pour le collagène

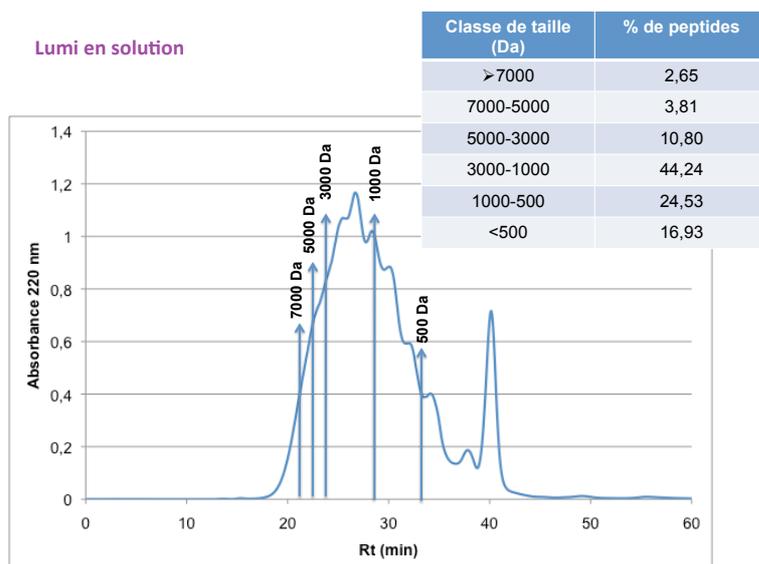


## Analyses en SEC-FPLC des produits de la concurrence pour le collagène

## Elen en poudre

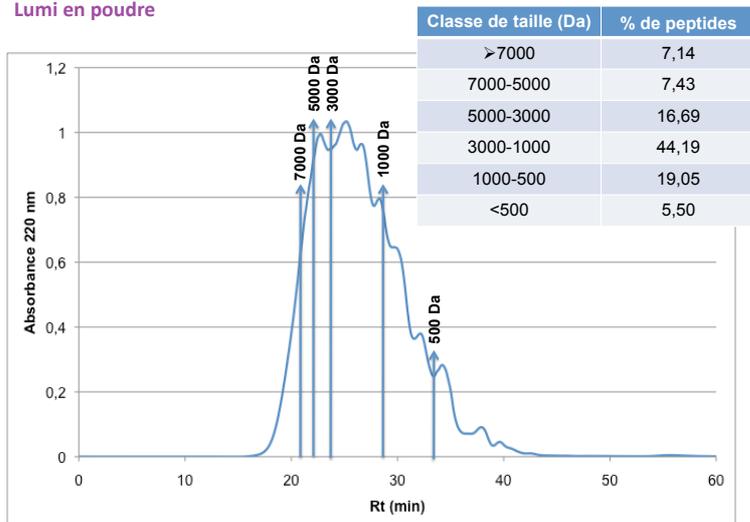


## Lumi en solution

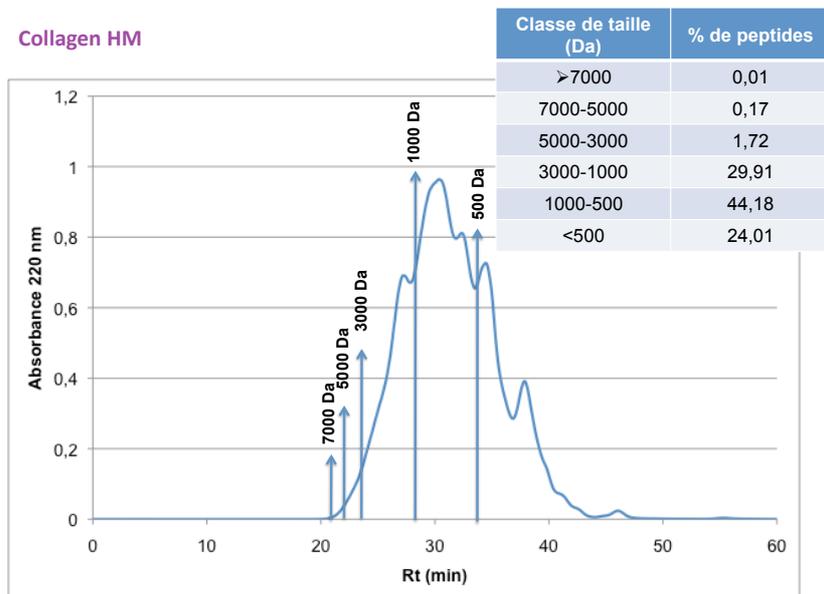


Analyses en SEC-FPLC des produits de la concurrence pour le collagène

Lumi en poudre

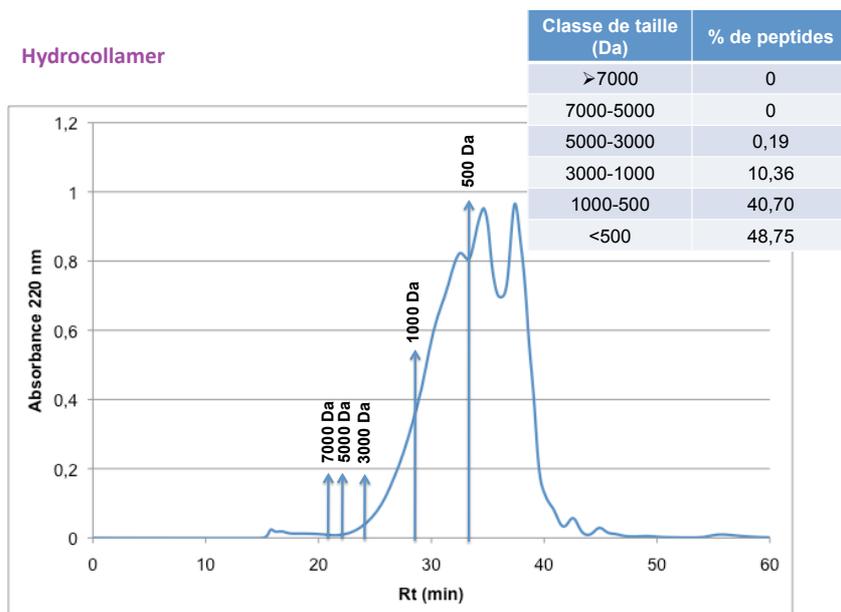


Collagen HM



## Analyses en SEC-FPLC des produits de la concurrence pour le collagène

## Hydrocollamer





**Origine Bretagne**

**Une filière bretonne d'excellence de biotechnologie marine**

A la frontière entre la Manche et l'océan Atlantique, la Bretagne est mondialement connue pour sa biodiversité marine et ses activités liées à la mer. Depuis longtemps, l'homme a cherché à extraire de l'environnement marin les nouvelles ressources pour lui assurer son avenir.

Les industriels constituant la filière de production **PESK & CO** sont implantés dans un pôle d'innovation soutenu par la région Bretagne et Quimper Cornouaille. Cet environnement est un lieu idéal pour la maturation de nouveaux projets dans les domaines des biotechnologies et des activités émergentes liées à la mer.

**PESKCOLLAGÈNE 3D PRO** bénéficie de la certification BIOTECH inside qui respecte une éthique rigoureuse tant dans la conception que dans la fabrication du produit. Cette certification est la garantie d'un produit haut de gamme.

**UNE FILIÈRE ORGANISÉE DE LA MOLECULE AU MARCHÉ**

- SOURCING**  
d'une matière première de qualité
- RECHERCHE FONDAMENTALE**  
Caractérisation physique des ingrédients identifiés
- RECHERCHE APPLIQUÉE**  
Caractérisation des propriétés physiologiques et fonctionnelles
- CERTIFICATION**
- PRODUCTION D'INGRÉDIENTS**
- MISE EN MARCHÉ**

**CONSORTIUM PESK & CO**








**PARTENAIRES**



**PESK & CO**

**PESKCOLLAGÈNE 3D PRO**  
COLLAGÈNE NATIF MARIN

**Origine Bretagne**

Le collagène, est une protéine naturellement présente dans la peau, les tendons, les cartilages, les os, les ligaments et les tissus conjonctifs. Il représente 1/3 des protéines totales du corps humain et assure la cohésion, la résistance, et la régénération des tissus. Aujourd'hui, on sait extraire de différentes façons, le collagène à l'origine de ses effets réparateurs sur la peau et les os.



LE COLLAGÈNE NATIF MARIN

LE COLLAGÈNE ORIGINAL AUX PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES MISES EN VALEUR PAR LA BIOTECHNOLOGIE MARINE



## GÉNÈSE MARINE

- Un collagène 100 % marin
- Une seule origine, *Salmo salar* (Saumon d'Atlantique)
- Une matière première certifiée Haute qualité
- Une filière bromée structurée
- Une pêche écologiquement responsable
- Un engagement au respect des normes européennes
- Une traçabilité assurée

### PEKCOLLAGÈNE 3D PRO une origine sûre, maîtrisée et valorisée

La qualité du produit est attestée par les analyses de contaminants chimiques et microbiologiques.

PRÉSENCE DE CONTAMINANTS	
Arsenic	< 1 mg/Kg
Plomb	< 3 mg/Kg
Mercure	< 0.1 mg/Kg
Chrome	< 2 mg/Kg
Amines biogènes	< 100 mg/Kg

MICROBIOLOGIE	
Développement des Germes Aérobie Totaux	< 1000/g
Développement des Moisissures / Levures Totales (DMT)	< 100/g
Staphylocoques aуреus	Absence/g
Pséudomonas aeruginosa	Absence/g
Salmonelle	Absence/g
Listeria	Abs. dans 25g

Son origine marine permet de remédier aux problèmes de transmission de certaines maladies comme ce peut être le cas avec le collagène d'origine bovine.

## UNE MOLÉCULE A FORTÉ VALEUR AJOUTÉE

Le collagène est une macromolécule fibreuse de type glycoprotéine, insoluble. Ses trois chaînes alpha polypeptidiques se positionnent pour former une triple hélice stabilisée par des ponts hydrogène. Cette caractéristique se retrouve aussi bien dans le collagène néo-synthétisé que dans celui d'origine marine.

COMPOSITION EN PROTÉINES	
Protéines Kjeldahl / totales Lowry	90 - 100 g / 100 g de collagène lyophilisé
Protéines collagéniques	60 - 100 g / 100 g de protéines

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS	
Hydroxyproline	7 à 9 Res/100g Res
Glycine	24 à 28 Res/100g Res
Proline	11 à 13 Res/100g Res

### Caractéristiques physiques de la matière

ASPECT, COULEUR, ODEUR :  
sous forme de poudre blanche ou sous forme liquide, sans odeur.  
pH : 7,5 +/- 1  
Solubilité : soluble dans l'eau

**Propriétés et applications**  
Le collagène marin natif se rapproche de façon intégrable du collagène néo-synthétisé au niveau du tissu dermique de l'être humain. Ainsi PEKCOLLAGÈNE 3D PRO peut être utilisé dans des formulations pour une action hydratante et relaxante, et de par ses propriétés hémostatiques et cicatrisantes comme actif de biomatériaux (pansements, éponges hémostatiques, etc).

Date d'une très bonne biocompatibilité, il favorise le développement cellulaire et la régénération tissulaire et peut ainsi servir de matrice polymérique pour le développement de nouvelles générations de composites.

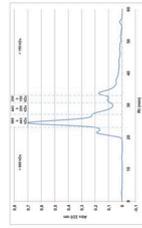
## LA BIOTECHNOLOGIE MARINE MAÎTRISÉE, UN PROCESS INNOVANT

**Processus de fabrication**  
PEKCOLLAGÈNE 3D PRO est extrait du saumon d'Atlantique par la biotechnologie marine adaptée à cette espèce. La température et le temps d'extraction sont ajustés afin de ne pas dénaturer le collagène et lui conserver sa configuration en triple hélice : la chaîne du froid et l'alimentarité du produit sont respectés tout au long du processus.



### Un collagène extrait au plus proche de sa forme originale

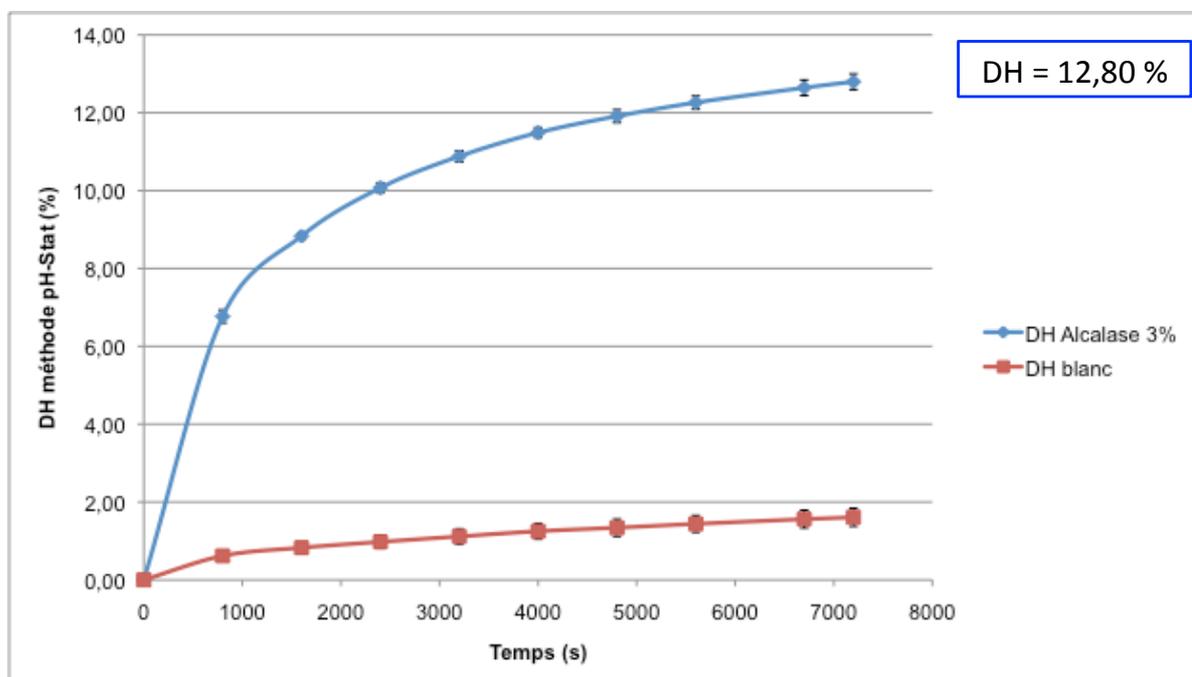
PROFIL DE POIDS MOLÉCULAIRE OBTENU PAR SÉPARATION EN SÉCIFIC



Le respect scrupuleux de la chaîne du froid permet d'obtenir, dans le produit fini, du collagène pur, sous sa forme native. Une hydrolyse enzymatique pourra ainsi être réalisée ultérieurement pour utiliser ce collagène à des fins alimentaires ou autres.

PEKCOLLAGÈNE 3D PRO peut être aussi bien conditionné sous forme de poudre que sous forme de liquide. De pH neutre, il est facile à transformer, à incorporer au sein de formulations. Enfin, il est conditionné dans un emballage mis au point et testé pour garantir la parfaite stabilité du produit.

Alcalase:  
-E/S= 3%  
-72 AU/kg de protéine  
-pH 8, 50°C, 2h



## Résumé

Les co-produits sont les parties non utilisées et récupérables lors des opérations de transformation du poisson, comme les têtes, les peaux, les os ou la pulpe. L'industrie de transformation du saumon Atlantique d'élevage (*Salmo salar*) génère environ 50% de co-produits qui constituent une source de protéines de haute qualité. Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet Pesk&Co, qui réunit quatre partenaires industriels (Meralliance-Thai Union, Yslab, SPF-DIANA, AGH-Socofag) et un partenaire académique (LEMAR UMR 6539, UBO) dans le but d'extraire et de caractériser des ingrédients à haute valeur ajoutée issus des co-produits de saumon Atlantique d'élevage (*Salmo salar*). Le premier objectif de la thèse visait à développer un procédé d'extraction du collagène à partir des peaux de saumon. Un procédé non conventionnel a été mis au point au LEMAR puis développé au stade pilote puis industriel. Le collagène obtenu a reçu le nom commercial « PeskCollagène 3D Pro® ». Il a été caractérisé par différentes méthodes analytiques (SEC-FPLC, SDS-PAGE, FTIR, rhéologie, microscopie). C'est un collagène de type I dont on distingue les sous-unités  $\alpha_1$ - $\alpha_2$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . L'analyse en SEC-FPLC montre que 60% du collagène a un poids moléculaire supérieur à 300kDa. Il présente une composition en acides aminés caractéristique des collagènes marins extraits d'espèces d'eau froide avec 8,20% d'Hyp, 11,48% de Pro et 27,87% de Gly. Il en résulte une température de fusion de 13,5°C et une température de gélification de 5°C. Enfin, il possède, sous sa forme lyophilisée, une microstructure poreuse. La réticulation du collagène par voie enzymatique avec une transglutaminase microbienne a conduit à l'obtention d'un hydrogel qui possède une élasticité de 650 Pa contre  $4.10^{-3}$  Pa pour le collagène initial en solution. Après lyophilisation, l'hydrogel réticulé présente une microstructure plus dense que celle du collagène initial.

Le deuxième objectif de ce travail a porté sur l'hydrolyse en conditions contrôlées des têtes de saumon pour générer des peptides fonctionnels pour l'aquaculture. Deux protocoles d'hydrolyse enzymatique ont été développés et transposés à l'échelle pilote. L'utilisation de deux préparations enzymatiques, l'Alcalase® et la Flavourzyme®, dont les mécanismes d'action sont différents, a permis d'obtenir deux hydrolysats enrichis en di-et tripeptides : (1) un premier hydrolysats contenant environ 40% de peptides de poids moléculaires inférieurs à 500 Da et (2) un deuxième hydrolysats contenant environ 60% de peptides de poids moléculaires inférieurs à 500 Da. Les hydrolysats ont été incorporés à hauteur de 15% dans des aliments aquacoles afin d'être testés sur des larves de bar (*Dicentrarchus labrax*) dès l'ouverture de la bouche. Après 45 jours d'élevage, les premiers résultats ont montré une réduction de 2 à 5% des malformations squelettiques par rapport au régime témoin testé. Cependant, les mécanismes physiologiques mis en jeu restent à élucider et des analyses en nutriginomique et protéomique sont en cours.

Les objectifs de deux sous-projets programmés dans la thèse ont été atteints. Le collagène « PeskCollagène 3D Pro® » est destiné en première intention au marché de la cosmétique mais il pourrait trouver d'autres applications notamment dans le secteur de l'ingénierie tissulaire.