



Gembloux Agro-Bio Tech
Université de Liège



DÉTECTION DES PROTÉINES ANIMALES TRANSFORMÉES PAR MICROSCOPIE PROCHE INFRAROUGE

MONIQUE TATIANA NGO NJEMBE

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER COMPLÉMENTAIRE EN SCIENCES ET TECHNOLOGIE DES ALIMENTS**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2014-2015

PROMOTEUR: Vincent BAETEN

CO-ENCADRANT : Pascal VEYS

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	III
LISTE DES TABLEAUX	IV
LISTE DES FIGURES	V
1. INTRODUCTION	1
2. MATÉRIEL ET MÉTHODE	2
2.1. APPAREILLAGE	2
2.2. ÉCHANTILLONNAGE	2
2.3. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON	3
2.4. ANALYSE DES PARTICULES ET ACQUISITION DES SPECTRES	4
2.5. EXTRACTION DES SPECTRES ET TRAITEMENT DES DONNÉES	4
3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	6
3.1. PRÉTRAITEMENT DES SPECTRES	6
3.2. ANALYSE DES SPECTRES MOYENS	7
3.2.1. Analyse des spectres des matrices végétales	7
3.2.2. Analyse des spectres des PATs de ruminants	9
3.2.3. Analyse des spectres des PATs de poissons	11
3.2.4. Analyse des spectres des PATs de porcins	14
3.2.5. Comparaison entre les caractéristiques spectrales de différents échantillons	16
3.3. ANALYSE DES COMPOSANTES PRINCIPALES DES SPECTRES DES PARTICULES DE PAT. ..	17
3.3.1. Ruminants <i>versus</i> Poissons	17
3.3.2. Porcins <i>versus</i> Poissons	19
3.3.3. Ruminants <i>versus</i> Porcins	20
4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	21
5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	22

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma gratitude et mes plus vifs remerciements aux personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation.

Ma reconnaissance s'adresse particulièrement à :

Monsieur Pierre DARDENNE, chef du Département Qualité des Productions Agricoles du Centre wallon de Recherches Agronomiques, qui m'a acceptée au sein de son service.

Monsieur Vincent BAETEN, promoteur de ce travail de fin d'études, pour la confiance qu'il m'a témoignée en me proposant ce sujet.

Monsieur Pascal VEYS, pour sa disponibilité, ainsi que ses conseils et ses critiques avisés qui m'ont été d'une aide précieuse au cours de la rédaction de ce travail.

Madame Ouissam ABBAS et Monsieur Juan FERNANDEZ, pour leur disponibilité et leurs explications.

Madame Marie COLLARD, Messieurs Benoît SCAUT, Quentin ARNOULD, Nicaise KAYOKA et Alec AGBOKANNOU, qui ont été des guides attentifs tout au long de ce travail et m'ont fait partager leurs expériences.

Monsieur Stéphane BRICHARD et toute l'équipe de l'U15 Qualité des Produits, pour l'accueil chaleureux.

Enfin et surtout, mes remerciements vont à ma famille et à tous mes proches, pour l'amour et le soutien qu'ils m'ont toujours témoigné.

RÉSUMÉ

La microscopie en proche infrarouge (NIRM) a démontré son potentiel pour discriminer les particules d'os de poisson de celles des animaux terrestres dans la fraction sédimentée des aliments composés pour animaux. L'identification de traces de protéines animales transformées (PAT) par cette technique est basée sur l'évaluation des spectres obtenus à partir des particules individuelles présentes dans l'échantillon. Les présents travaux apprécient les performances du NIRM pour la détection des particules d'origine animale dans le flottât des aliments. Premièrement, il est montré qu'il est possible de reconnaître des particules d'origine animale dans le flottât sur base de leur spectre. Deuxièmement, l'analyse de plusieurs spectres indique que le NIRM pourrait différencier des classes d'animaux.

Mots clés. Microscopie en proche infrarouge, protéines animales transformées, flottât, ACP, discrimination.

ABSTRACT

Near infrared microscopy has shown potential to discriminate bone particles of fish origin and those of terrestrial animal origin in the sediment fraction of feedstuffs. In this study, the use of this method for the detection of processed animal proteins in the flotate is investigated. First, we show that it is possible to recognize animal particles in the flotate based on a spectral analysis. Secondly, the analysis of several spectra indicates that the near infrared microscopy could differentiate classes of animals.

Keywords. Near infrared microscopy, processed animals proteins, flotate, PCA, discrimination

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1. Caractéristiques des échantillons analysés	3
Tableau 3-1. Résultats du prétraitement des spectres des particules de PATs supérieures à 250µm.	6
Tableau 3-2. Résultats du prétraitement des spectres des particules de PATs à inférieures 250µm	6
Tableau 3-3. Résultats du prétraitement des spectres de la poudre de lait et des matrices végétales	7
Tableau 3-4 : Attributions des principales bandes spectrales du spectre NIRM des matrices végétales	8
Tableau 3-5 : Attributions des principales bandes spectrales du spectre NIRM des PATs de ruminants	10
Tableau 3-6 : Attributions des principales bandes spectrales du spectre NIRM des PATs de poissons	13
Tableau 3-7 : Attributions des principales bandes spectrales du spectre NIRM des PATs de porcins	15

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1. Microscope infrarouge HYPERION 3000	2
Figure 2-2. Procédure de préparation du matériel	4
Figure 3-1 : Spectres NIRM moyens des matrices végétales	7
Figure 3-2. Spectres NIRM moyens des grosses particules de PATs de ruminants	9
Figure 3-3. Spectres NIRM moyens des petites particules de PATs de ruminants	10
Figure 3-4. Spectres NIRM moyens des grosses particules de PATs de poissons	12
Figure 3-5. Spectres NIRM moyens des petites particules de PATs de poissons	12
Figure 3-6. Spectres NIRM moyens des grosses particules de PATs de porcins	14
Figure 3-7. Spectres NIRM moyens des petites particules de PATs de porcins	15
Figure 3-8: Images des échantillons de ruminant et de poisson vues au microscope optique.	16
Figure 3-9. Spectres NIRM moyens des particules d'échantillons caractéristiques	17
Figure 3-10. ACP (PC 2 vs PC 3) appliquée aux spectres des grosses particules de PATs de ruminants et de poissons	18
Figure 3-11. ACP (PC 2 vs PC 3) appliquée aux spectres des petites particules de PATs de ruminants et de poissons	19
Figure 3-12. ACP (PC 2 vs PC 7) appliquée aux spectres des petites particules de PATs de porcins et de poissons	19
Figure 3-13. ACP (PC 2 vs PC3) Ruminants <i>versus</i> Porcins (Petites particules)	20

1. INTRODUCTION

La revue de la littérature enseigne que différentes méthodes peuvent être appliquées pour la détection des protéines animales transformées (PAT), dont deux méthodes qui sont officielles : la microscopie optique et la réaction en chaîne par polymérase (PCR). Cependant, aucune de ces méthodes n'est entièrement satisfaisante et il est important pour limiter leurs faiblesses, de les combiner.

Avec la PCR il est certes possible d'identifier des espèces ou des groupes taxonomiques mais, cette méthode est indirecte car elle s'appuie essentiellement sur l'ADN et non sur les protéines en question. La microscopie optique quant à elle est limitée uniquement à la distinction entre les animaux terrestres et les poissons ceci, principalement sur la base des os. Bien que les muscles soient observables, il est toutefois impossible d'en distinguer l'origine animale.

Différents travaux réalisés sur la microscopie en proche infrarouge ($12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) ou NIRM ont révélé que cette méthode peut permettre d'avoir une discrimination taxonomique à un niveau plus élevé (Baeten *et al.* 2000, Baeten *et al.* 2004, De la Roza *et al.* 2007, Von Holst *et al.* 2008, Fernandez Pierna *et al.* 2012). Les résultats des recherches effectuées sur les sédiments se sont par ailleurs, avérés excellents. En outre, le NIRM est une méthode objective qui s'affranchit de l'expertise humaine car basée sur la composition chimique des particules.

Pour l'heure, aucune recherche n'avait encore été effectuée sur le flottât. D'où l'intérêt de la présente étude qui pour la première fois, va appliquer le NIRM sur le flottât de plusieurs échantillons de PATs, afin d'évaluer le potentiel de cette méthode à différencier les muscles des différentes espèces ou groupes d'espèces animales. Si les résultats obtenus sont satisfaisants, cela constituerait une avancée intéressante qui aiderait à résoudre le problème de discrimination des classes, notamment celui de l'identification de l'origine des PATs.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1. Appareillage

L'instrument de microscopie proche infrarouge utilisé est un microscope HYPERION 3000 (Brüker Optik, Allemagne) dont les principales composantes (Figure 2-1) sont les suivantes :

- un interféromètre à transformée de Fourier VERTEX 70 qui génère le rayon infrarouge ;
- une plateforme motorisée d'une précision de pas d'1 μ m, sur laquelle est placé l'échantillon ;
- une caméra vidéo et un système de visionnage qui permet d'obtenir une image agrandie de l'échantillon et de la visualiser sur l'écran d'un ordinateur ;
- un logiciel appelé OPUS/LAB 7.2 qui sert à contrôler les opérations effectuées par le microscope et à collecter les spectres d'échantillons en réflexion ou en transmission.

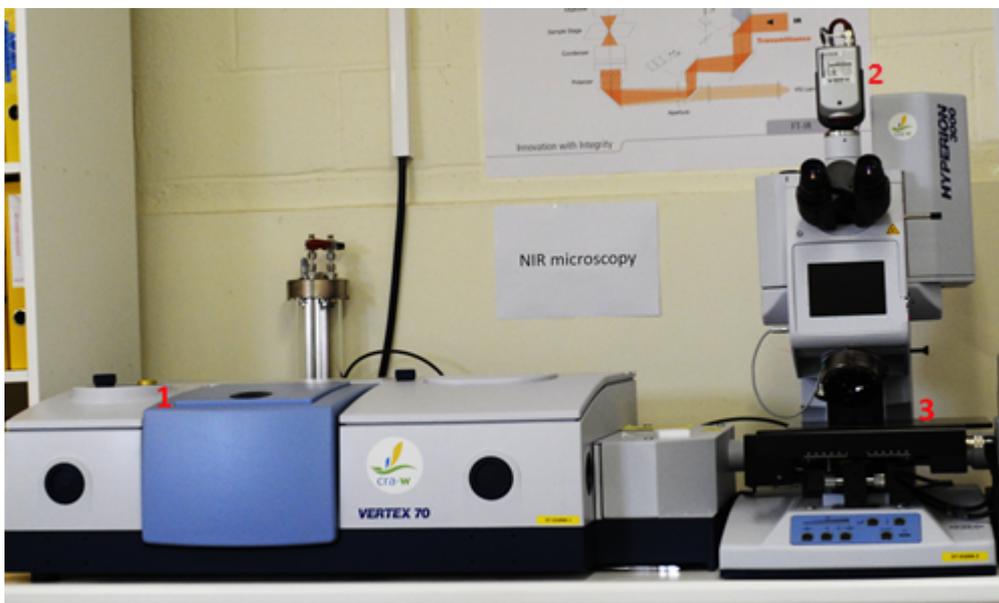


Figure 2-1 : Microscope infrarouge HYPERION 3000 : Spectromètre (1), caméra (2) et plateforme (3).

2.2. Echantillonnage

Les analyses ont été effectuées sur 32 échantillons constitués de PATs, farine de sang, farine de plumes, lait et de matrices végétales composées sans ingrédients d'origine animale tels que présentés dans le tableau 2-1.

Tableau 2-1 : Caractéristiques des échantillons analysés

Classes	Origine de l'échantillon		Composition	Nombre d'échantillons analysés	
Mammifères	Ruminants	Bovins	PAT	5	
			Poudre de lait	1	
			PAT (Farine de sang)	1	
				PAT (Farine de plasma)	1
		Ovins	PAT	1	
		Porcins	PAT	2	
			PAT (Farine de sang)	1	
	Mixte (80% Ruminant + 20% porcin)	PAT (Farine de sang)	1		
Oiseaux	Volaille	PAT	3		
		PAT (Farine de sang)	1		
		PAT (Farine de plumes)	3		
Poissons	Mixte	PAT pur saumon	1		
		PAT de poissons	6		
Matrices végétales			5		
Total				32	

PAT = Protéine animale transformée

2.3. Préparation de l'échantillon

10 g d'échantillon sont pesés, puis transvasés dans une ampoule à décanter conique en verre d'une capacité de 250 ml et traités avec 50 ml de tétrachloréthylène. Conformément aux dispositions du Règlement (CE) n° 152/2009, seulement 3 g sont utilisés pour les farines pures (PATs) d'origine bovine, ovine, porcine, de poissons et de volaille. Le mélange est ensuite remué à plusieurs reprises. 50 ml de tétrachloréthylène supplémentaire sont ajoutés de manière à faire écouler les particules restées sur les parois de l'ampoule vers sa partie centrale. Le mélange est décanté pendant cinq minutes afin de séparer le flottât du sédiment. Le flottât principalement composé de muscles est recueilli, séché et séparé en deux fractions à l'aide d'un tamis de 250 µm d'ouverture de maille. Les deux fractions ont été analysées séparément. L'étude a concerné les deux fractions (grosse et fine) des farines pures PAT et uniquement les

grosses fractions pour le reste des échantillons. La figure 2-2 présente la procédure utilisée pour la préparation des échantillons.

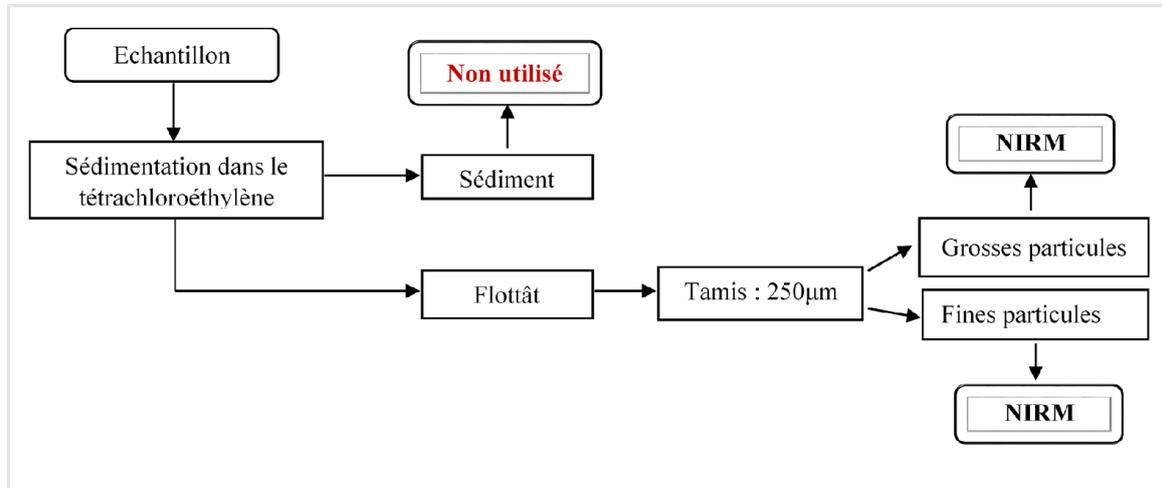


Figure 2-2 : Procédure de préparation du matériel

2.4. Analyse des particules et acquisition des spectres

Les analyses ont été réalisées en réflexion sur des particules dispersées en monocouche sur un support en téflon, avec une fenêtre d'analyse de 10 mm sur 10 mm. Une ouverture de 2,5 mm est utilisée pour les grosses particules et 5 mm pour les petites. L'option « Mapping » du logiciel OPUS a permis de sélectionner 400 points sur la fenêtre d'analyse et de collecter de manière automatique les spectres en ces points. Chaque spectre de particule obtenu est la moyenne de 8 scans. Les données ont été enregistrées sous forme de Log 1/R dans la région qui va de 9000 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} avec une résolution de 16 cm^{-1} .

2.5. Extraction des spectres et traitement des données

Afin de procéder au traitement des données, les spectres enregistrés dans le logiciel OPUS sont extraits et convertis en fichier MATLAB via le logiciel The Unscrambler X.

Un premier traitement a consisté à éliminer de l'ensemble des 400 spectres extraits, ceux qui proviendraient de l'incidence du rayon infrarouge sur le support en téflon. Pour ce faire, une règle de décision sous la forme d'un programme numérique a été utilisée. Ladite règle permet de discriminer à partir d'une observation visuelle, les spectres purs de PAT (Von Holst *et al.*, 2008). Des spectres purs PAT obtenus, une moyenne est générée pour chaque échantillon.

Par la suite, les différents spectres moyens des PAT ont été exportés du logiciel MATLAB vers le logiciel Microsoft EXCEL 2013. Puis, une comparaison entre les spectres de classes ruminants, porcins et poissons a été effectuée. Il s'agit d'une part de comparer entre eux les spectres provenant des différents échantillons appartenant à une même classe et d'autre part, de comparer ces mêmes spectres à ceux d'une classe différente.

Enfin, une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été appliquée à l'ensemble des spectres des PAT, en vue de déterminer s'il est possible d'établir une discrimination entre les différentes classes d'espèces. L'ACP est une méthode descriptive multidimensionnelle qui permet de mettre en évidence les relations globales entre plusieurs variables. Elle consiste en la détermination d'un sous-espace dans lequel sont projetés des nuages de points relatifs aux différentes variables, de manière à retirer les relations caractéristiques et à visualiser l'information.

A cet effet, deux traitements mathématiques ont d'abord été réalisés sur la totalité des spectres afin d'améliorer leur qualité et faciliter l'analyse. Il s'agit de la SNV (Standard Normal Variate) qui a servi à éliminer les effets de dispersion par centrage des spectres et de la dérivée première qui a permis de séparer plus clairement les bandes d'absorption et de faire ressortir l'information spectrale. Le traitement par l'ACP a porté sur les paires de classes suivantes :

- Ruminants *versus* Poissons ;
- Porcins *versus* Poissons ;
- Ruminants *versus* Porcins.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Prétraitement des spectres

Les tableaux 3-1 et 3-2 présentent le nombre de spectres qui ont été clairement identifiés comme purs PAT par la règle de discrimination, pour les grosses et les fines fractions respectivement.

Tableau 3-1 : Résultats du prétraitement des spectres des particules de PATs supérieures à 250 µm

Particules supérieures à 250 µm						
Origine	Nombre d'échantillons	Nombre total de spectres collectés	Spectres identifiés comme PAT		Spectres identifiés comme non PAT	
			Nombre	(%)	Nombre	(%)
Farine de poissons	7	2800	2175	77,68	625	22,32
Farine de volailles	3	1200	752	62,67	448	37,33
Farine de ruminants (bovins et ovins)	6	2400	2267	94,46	133	5,54
Farine de porcins	2	800	599	74,88	201	25,12
Farine de sang et de plasma	5	2000	1494	74,7	506	25,3
Farine de plumes	3	1200	840	70	360	30
Total	26	10400	8127	78,1	2273	21,9

Tableau 3-2 : Résultats du prétraitement des spectres des particules de PATs inférieures à 250 µm

Particules inférieures à 250µm						
Origine	Nombre d'échantillons	Nombre total de spectres collectés	Spectres identifiés comme PAT		Spectres identifiés comme non PAT	
			Nombre	(%)	Nombre	(%)
Farine de poissons	7	2800	2201	78,61	599	22,39
Farine de volailles	3	1200	787	65,58	413	34,42
Farine de ruminants (bovins et ovins)	6	2400	2137	89,04	263	10,96
Farine de porcins	2	800	793	99,12	7	0,88
Total	18	7200	5918	82,19	1282	17,81

Le tableau 3-3 présente les résultats obtenus du prétraitement de la poudre de lait et des matrices végétales.

Tableau 3-3 : Résultats du prétraitement des spectres de la poudre de lait et des matrices végétales

Particules supérieures à 250 µm						
Origine	Nombre d'échantillons	Nombre total de spectres collectés	Spectres identifiés comme PAT		Spectres identifiés comme non PAT	
			Nombre	(%)	Nombre	(%)
Poudre de lait	1	400	0	0	400	100
Matrices végétales	5	2000	0	0	2000	100
Total	6	2400	0	0	2400	100

A l'exception de la poudre de lait et des matrices végétales dans lesquelles aucune PAT n'a été détectée, les spectres obtenus des deux fractions de tous les autres échantillons ont été identifiés à des pourcentages élevés ($\pm 80\%$), comme provenant de PATs.

3.2. Analyse des spectres moyens

3.2.1. Analyse des spectres des matrices végétales

Les spectres moyens des différentes matrices végétales sont présentés dans la figure 3-1. Ces spectres proviennent des 400 spectres collectés par le NIRM et parmi lesquels aucun spectre de particule animale n'a été détecté.

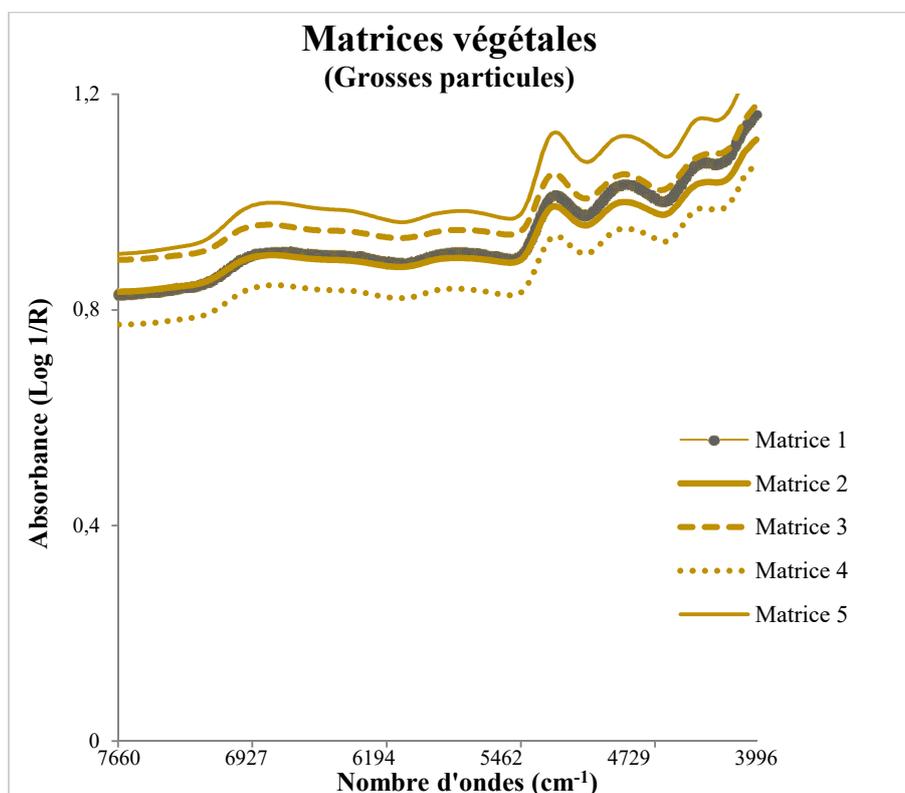


Figure 3-1 : Spectres NIRM moyens des matrices végétales.

Les spectres des matrices végétales présentent des bandes d'absorption caractéristiques des protéines et de l'amidon. Les attributions chimiques des principales bandes spectrales sont exposées dans le tableau 3-4.

Des bandes d'absorption caractéristiques des protéines végétales sont observables à 6.850 cm^{-1} (N-H first overtone¹), 5.107 cm^{-1} (combinaisons N-H) et 4.736 cm^{-1} (N-H sym. str.²). Les bandes d'absorption dues à la présence d'amidon sont visibles à 5.261, 5.017, 4.752 et 4.729 cm^{-1} . Pour toutes les matrices végétales, des bandes d'absorption sont observées à 4.304 et 4.335 cm^{-1} (combinaisons CH) dues à la présence de matières grasses.

Tableau 3-4 : Attributions des principales bandes spectrales du spectre NIRM des matrices végétales

Echantillon	Nombre d'ondes (cm^{-1})	Liaison et nature de la vibration	Structure caractéristique
Matrice 1	6.842	N-H str. first overtone	CONH ₂
	5.053	N-H asym. str. + amide	Protéine
	4.736	N-H sym. str.	CONH ₂ , CONHR
	4.335	C-H str. + C-H def.	CH ₂
Matrice 2	6.850	N-H str. first overtone	CONH ₂
	5.261	O-H str. + 2× C-O str.	Amidon
	4.736	N-H sym. str.	CONH ₂ , CONHR
	4.304	C-H str. + C-H def.	CH ₂
Matrice 3	6.850	N-H str. first overtone	CONH ₂
	5.017	2×O-H def. + C-O def.	Amidon
	4.729	2×O-H def. + 2×C-O str.	Amidon
	4.335	C-H str. + C-H def.	CH ₂
Matrice 4	6.835	N-H str. first overtone	CONH ₂
	5.107	N-H asym. str. + amide	CONH ₂
	4.752	2×O-H def. + 2×C-O str.	Amidon
	4.335	C-H str. + C-H def.	CH ₂
Matrice 5	6.842	N-H str. first overtone	CONH ₂
	5107	N-H asym. str. + amide	CONH ₂
	4.752	2×O-H def. + 2×C-O str.	Amidon
	4.335	C-H str. + C-H def.	CH ₂

str.= stretching ; asym.= asymmetric ; sym.= symmetric ; def.= deformation.

¹ 1st overtone (1^{ère} harmonique)

² Symmetric stretching (Elongation symétrique)

3.2.2. Analyse des spectres des PATs de ruminants

Les caractéristiques des spectres moyens des particules de taille supérieure à 250 μm provenant des 6 différentes farines de ruminants sont exposées dans la figure 3-2. La figure 3-3 quant à elle, présente les spectres moyens des particules de taille inférieure à 250 μm .

Il existe une grande similitude entre les spectres des différents PATs de ruminants. De même, les spectres provenant des grosses particules et ceux des petites particules présentent les mêmes profils, seules les différences entre les valeurs d'absorbance sont remarquables. Celles-ci s'expliqueraient par l'hétérogénéité de la taille des particules dans les échantillons de granulométrie supérieure à 250 μm .

En effet, les caractéristiques physiques telles que la forme des particules, leur densité, mais également leur distribution en taille influeraient sur les propriétés optiques des échantillons et pourraient être à l'origine de phénomènes tels que la diffraction de la lumière. Ceci toutefois, ne contribue pas à la différenciation des PATs de ruminants, dont la distinction se base sur la composition chimique à l'origine des principales bandes spectrales observées. A ce propos, le tableau 3-5 montre que les farines de ruminants sont principalement composées de protéines animales visibles à 6.611, 5.076 et 4.891 cm^{-1} (exemple du Ruminant 3).

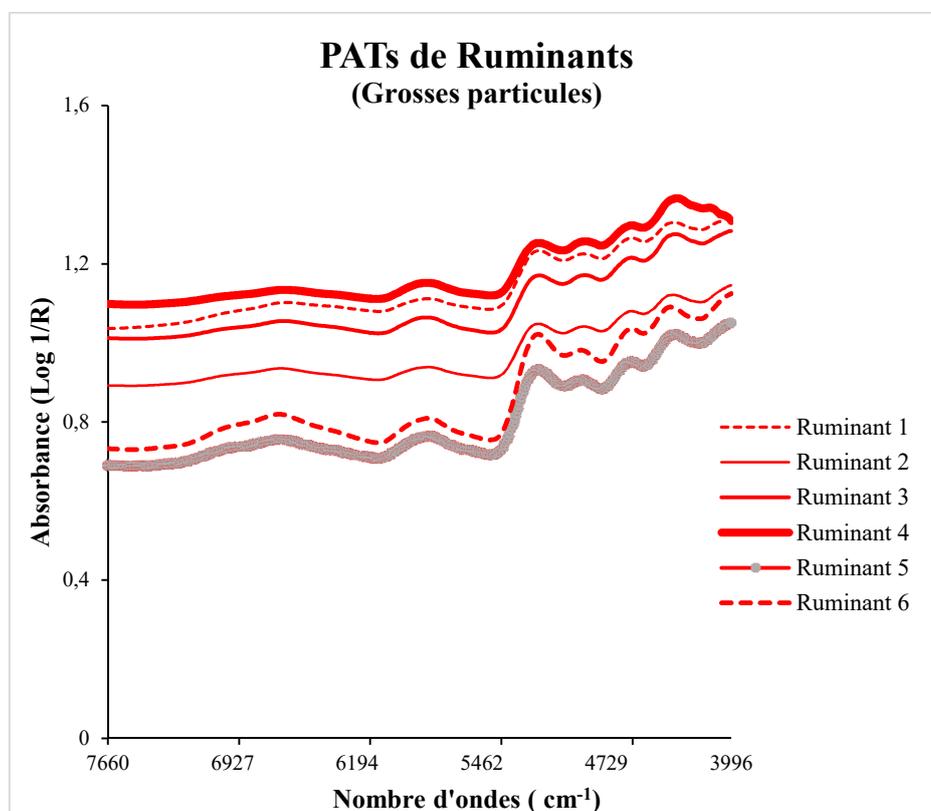


Figure 3-2 : Spectres NIRM moyens des grosses particules de PATs de ruminants.

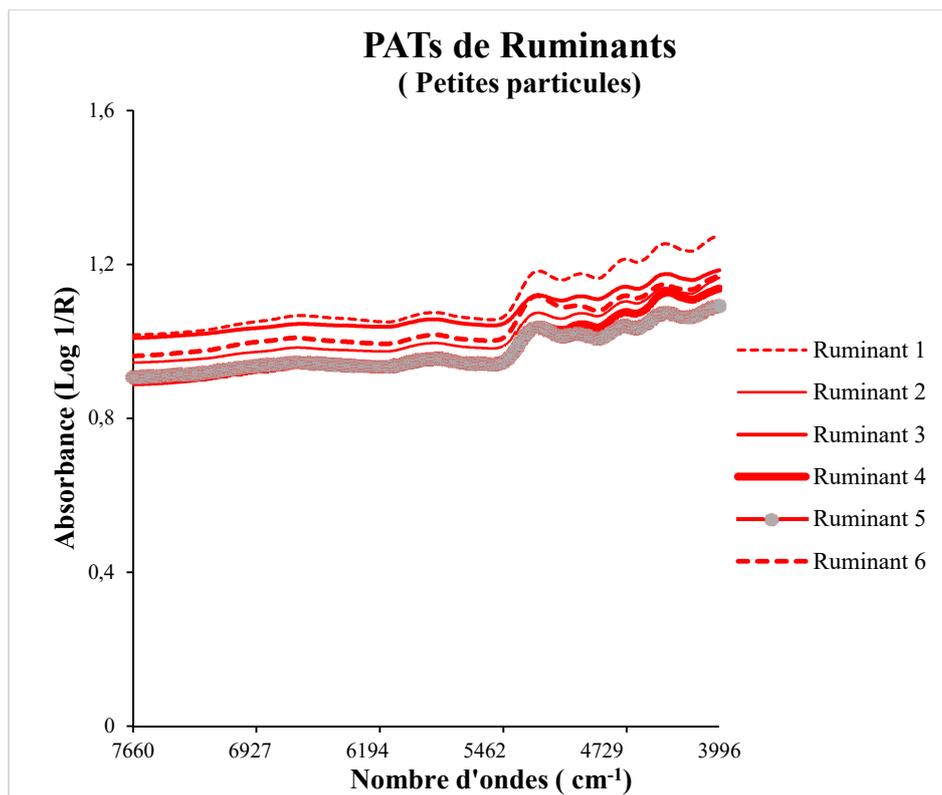


Figure 3-3 : Spectres NIRM moyens des petites particules de PATs de ruminants.

Tableau 3-5 : Attributions des principales bandes spectrales du spectre NIRM des PATs de ruminants

Echantillon	Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Liaison et nature de la vibration	Structure caractéristique
Ruminant 1	6.611	N-H str. first overtone	Protéine
	5.770	S-H str. first overtone	-SH
	5.804	C-H str. first overtone	CH ₂
	4.914	C=O str. second overtone	CONH ₂
	4.659	Amide	CONH ₂
	4.451	N-H str. + NH ₃ ⁺	Acide aminé
Ruminant 2	6.550	N-H str. first overtone	Protéine
	5.778	S-H str. first overtone	-SH
	5.138	C=O str. second overtone	-CO ₂ R
	4.875	N-H sym. str. + amide	Protéine
	4.605	Amides	Protéine
	4.320	C-H str. + C-H def.	CH ₂
Ruminant 3	6.611	N-H str. first overtone	Protéine
	5.762	S-H str. first overtone	-SH
	5.076	N-H asym. str. + amide	Protéine
	4.891	N-H sym. str. + amide	Protéine
	4.536	C-H str. + C=O str.	-CHO
	4.312	C-H str. + C-H def.	CH ₂

Tableau 3-5 : Suite

Echantillon	Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Liaison et nature de la vibration	Structure caractéristique
Ruminant 4	6.634	N-H str. first overtone	Protéine
	5.747	S-H str. first overtone	-SH
	5.138	C=O str. second overtone	-CO ₂ R
	4.875	N-H sym. str. + amide	Protéine
	4.544	C-H str. + C=O str.	-CHO
	4.335	C-H str. + C-H def.	CH ₂
Ruminant 5	6.634	N-H str. first overtone	Protéine
	5.747	S-H str. first overtone	-SH
	5.084	N-H asym. str. + amide	-CONH ₂
	4.837	N-H sym. str. + amide	Protéine
	4.544	C-H str. + C=O str.	-CHO
	4.297	C-H str. + C-H def.	CH ₂
Ruminant 6	6.626	N-H str. first overtone	Protéine
	5.739	S-H str. first overtone	-SH
	5.084	N-H asym. str. + amide	-CONH ₂
	4.898	N-H sym. str. + amide	protéine
	4.544	C-H str. + C=O str.	-CHO
	4.320	C-H str. + C-H def.	CH ₂

str.= stretching ; asym.= asymmetric ; sym.= symmetric ; def.= déformation.

3.2.3. Analyse des spectres des PATs de poissons

Les spectres représentés dans les figures 3-4 et 3-5 sont les spectres moyens respectivement des grosses et des petites particules provenant des 7 différents échantillons de PATs de poissons. Il y'a de grandes similitudes d'une part entre les spectres d'échantillons différents et d'autre part, entre les spectres des fractions différentes appartenant à un même échantillon. Tout comme chez les PATs de ruminants, l'on remarque que l'homogénéité des échantillons et la taille des particules ont une influence sur le niveau d'absorbance des spectres.

Les spectres de PATs de poissons présentent plusieurs bandes associées aux bandes spectrales des protéines et des matières grasses (Tableau 3-6). Les bandes spectrales des protéines sont visibles à 6626, 5076, 4868 et 4598 cm⁻¹. Tandis que celles des matières grasses sont observées à 5793 et 4297 cm⁻¹ (exemple du Poisson 2). Les échantillons Poissons 1, 6 et 7 sont également caractérisés par des bandes d'hydrates de carbone qui sont visibles à 4821 et 4814 cm⁻¹.

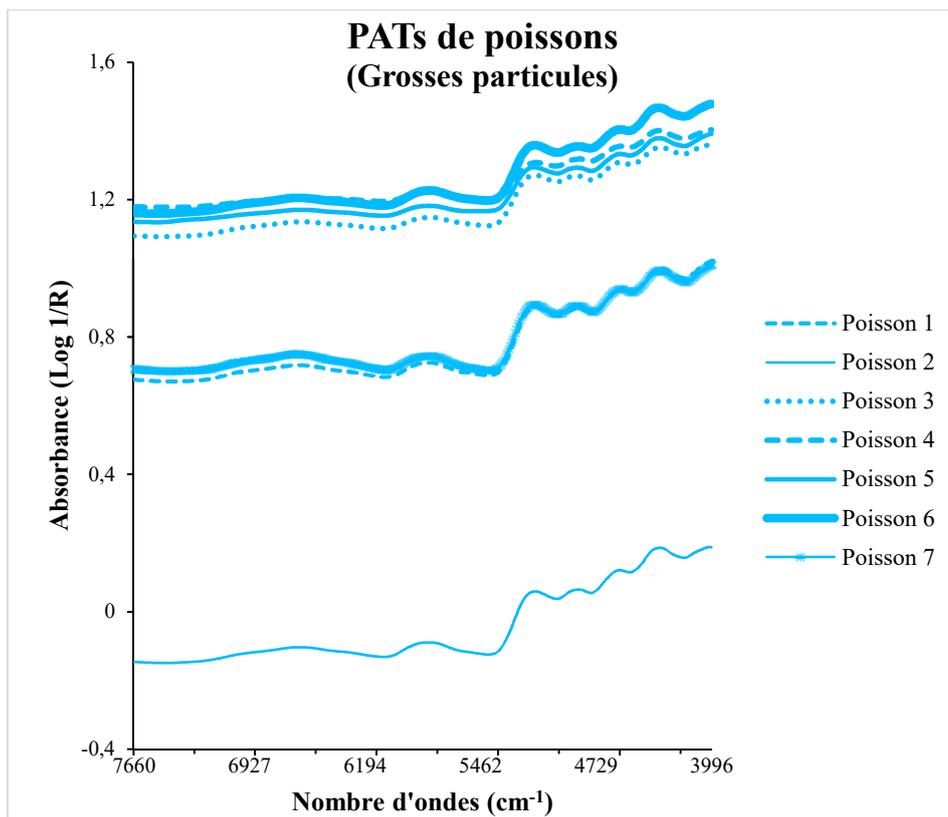


Figure 3-4 : Spectres NIRM moyens des grosses particules de PATs de poissons.

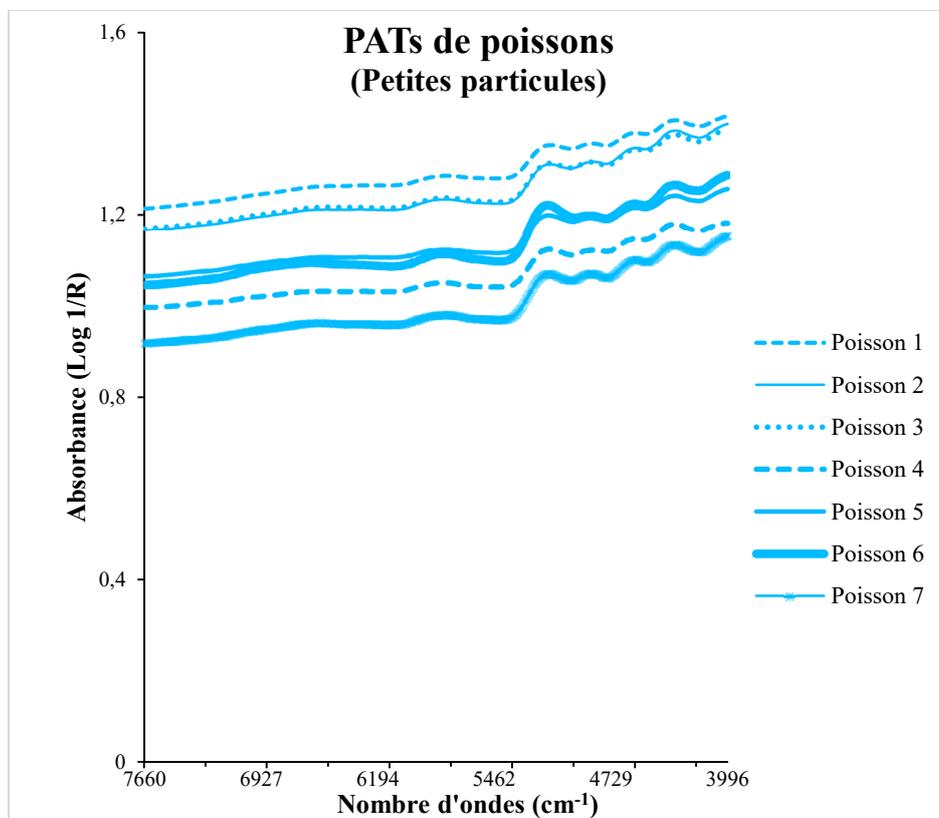


Figure 3-5 : Spectres NIRM moyens des petites particules de PATs de poissons.

Tableau 3-6 : Attributions des principales bandes spectrales du spectre NIR des PATs de poissons

Echantillons	Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Liaison et nature de la vibration	Structure caractéristique
Poisson 1	6.642	N-H str. first overtone	Protéine
	5.786	C-H str. first overtone	CH ₂
	5.068	N-H asym. Str. + amide	Protéine
	4.821	O-H str. + O-H def.	ROH
	4.544	C-H str. + C=O str.	-CHO
	4.328	C-H str. + C-H def.	CH ₂
Poisson 2	6.626	N-H str. first overtone	Protéine
	5.793	C-H str. first overtone	CH ₂
	5.076	N-H asym. str. + amide	Protéine
	4.868	N-H sym. str. + amide	Protéine
	4.598	amides	Protéine
	4.297	C-H str. + C-H def	CH ₂
Poisson 3	6.642	N-H str. first overtone	Protéine
	5.777	S-H str. first overtone	-SH
	5.199	C=O str. second overtone	CONH
	4.937	C=O str. second overtone	CONH ₂
	4.659	Amides	CONH ₂
	4.227	O-H def. Second overtone	ROH
Poisson 4	6.626	N-H str. first overtone	Protéine
	5.739	S-H str. first overtone	-SH
	5.222	C=O str. second overtone	-CONH
	4.868	N-H sym. str. + amide	Protéine
	4.698	N-H str. + C=O str.	Acide aminé
	4.466	N-H str. + NH ₃ ⁺	Acide aminé
Poisson 5	6.626	N-H str. first overtone	Protéine
	5.824	C-H str. first overtone	CH ₂
	5.068	N-H asym. str. + amide	Protéine
	4.844	N-H sym. str. + amide	Protéine
	4.721	N-H sym. str. + amide	CONH ₂ , CONHR
	4.335	C-H str. + C-H def	CH ₂
Poisson 6	6.626	N-H str. first overtone	Protéine
	5.739	S-H str. first overtone	-SH
	5.053	N-H asym. Str. + amide	Protéine
	4.814	O-H str. + O-H def.	ROH
	4.613	Amides	CONHR
	4.351	C-H str. + C-H def.	CH ₂
Poisson 7	6.619	N-H str. first overtone	Protéine
	5.770	C-H str. first overtone	-SH
	5.068	N-H asym. str. + amide	Protéine
	4.821	O-H str. + O-H def.	ROH
	4.544	C-H str. + C=O str.	-CHO
	4.328	C-H str. + C-H def.	CH ₂

str.= stretching ; asym.= asymmetric ; sym.= symetric ; def.= déformation.

3.2.4. Analyse des spectres des PATs de porcins

Les figures 3-6 et 3-7 présentent les spectres moyens respectivement des grosses particules et des petites particules de PATs de porcins. Il existe une grande ressemblance entre ces différents spectres. L'on remarque également que le niveau d'absorbance des spectres est influencé par la granulométrie des échantillons.

Le Tableau 3-7 montre que les farines de porcins étudiées sont principalement caractérisées par des bandes d'absorption des protéines et des matières grasses. En outre, l'échantillon porcine 2 aurait une teneur élevée en matières grasses dont les bandes d'absorption sont visibles à 5739, 4574 et 4297 cm^{-1} . Des bandes d'absorption des hydrates de carbone sont observables à 4814 et 4821 cm^{-1} respectivement pour les échantillons porcine 1 et 2.

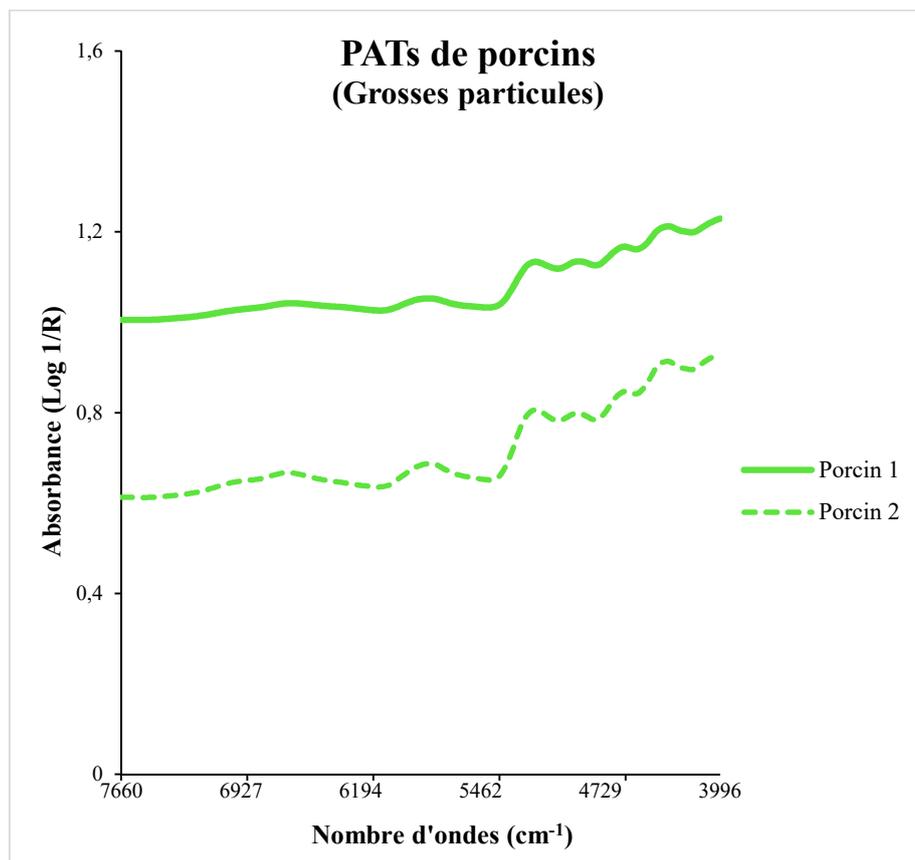


Figure 3-6 : Spectres NIRM moyens des grosses particules de PATs de porcins.

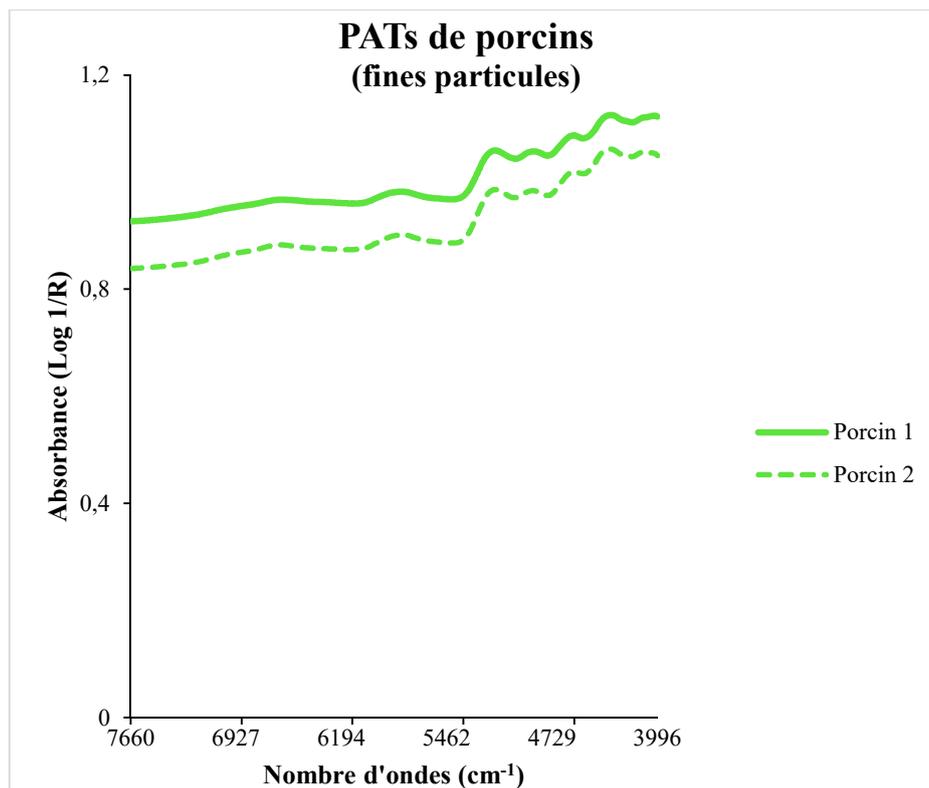


Figure 3-7 : Spectres NIRM moyens des petites particules de PATs de porcs.

Tableau 3-7 : Attributions des principales bandes spectrales du spectre NIR des PATs de porcs

Echantillon	Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Liaison et nature de la vibration	Structure caractéristique
Porcin 1	6.626	N-H str. first overtone	Protéine
	5.793	C-H str. first overtone	CH ₂
	5.091	N-H asym. str. + amide	CONH ₂
	4.814	O-H str. + O-H def.	ROH
	4.598	Amides	Protéine
	4.343	C-H str. + C-H def.	CH ₂
Porcin 2	6.611	N-H str. first overtone	Protéine
	5.739	S-H str. first overtone	-SH
	5.099	N-H asym. str. + amide	CONH ₂
	4.821	O-H str. + O-H def.	ROH
	4.574	CH ₂ asym. str. + C= str.	HC=CH
	4.297	C-H str. + C-H def.	CH ₂

str.= stretching ; asym.= asymmetric ; sym.= symmetric ; def.= déformation.

Afin de déterminer les constituants du flottât qui seraient à l'origine de la différence du niveau d'absorbance des spectres entre les deux fractions (grosse et fine) d'un même

échantillon, un examen microscopique a été réalisé sur la fine fraction d'un échantillon de ruminant et de poisson respectivement. Lesdits échantillons ont été colorés avec de la liqueur de Fehling pour mettre en évidence les particules musculaires. Les résultats obtenus de l'examen microscopique tels qu'illustrés par les photographies ci-dessous (Figure 3-8) montrent que le flottât des échantillons analysés est composé principalement de muscles. Toutefois, d'autres structures telles que du cartilage y sont également présentes notamment dans l'échantillon de ruminant. Il apparaît aussi que dans ces échantillons les particules possèdent des tailles similaires (exemple du ruminant) et présentent une distribution homogène (exemple du poisson).

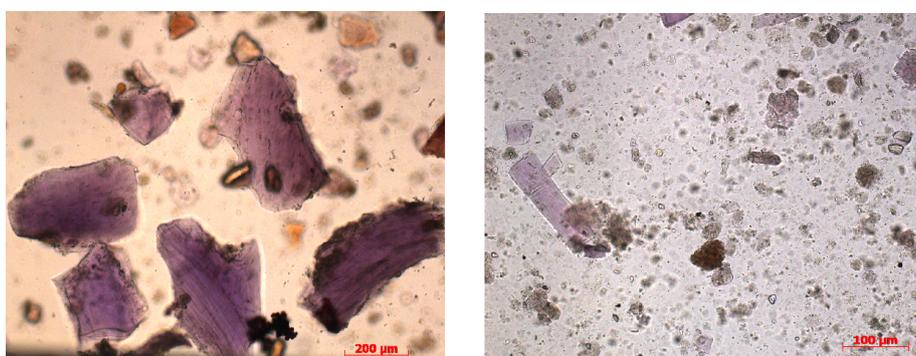


Figure 3-8: Images des échantillons de ruminant (à gauche) et de poisson (à droite) vues au microscope optique. Les muscles sont colorés en violet et des particules de cartilage apparaissent sur l'image de gauche avec une couleur rosâtre.

3.2.5. Comparaison entre les caractéristiques spectrales de différents échantillons

La fine fraction (particules < 250 µm) des matrices végétales n'ayant pas été analysée au cours de cette étude, la comparaison portera uniquement sur les spectres obtenus des grosses particules.

La figure 3-9 regroupe les spectres moyens de PATs de ruminant, poisson et de porc, ainsi qu'un spectre moyen d'un échantillon de matrice végétale. Sur cette figure, les caractéristiques du spectre moyen de la matrice végétale se différencient de celles des spectres de particules d'origine animale, qui présentent entre eux de grandes similitudes.

Bien que ces différents échantillons soient principalement composés de protéines, la matrice végétale est caractérisée par une bande d'absorption de protéines visible à 6850 cm^{-1} . Les PATs montrent des bandes d'absorption à 4312 cm^{-1} (Ruminant), 4328 cm^{-1} (Poisson) et 4297 cm^{-1} (Porcin) dues à la présence de matières grasses et plusieurs bandes d'absorption dues

à la présence de protéines dont la première est visible à 6642 cm^{-1} s'agissant du poisson et à 6611 cm^{-1} pour le ruminant et le porc.

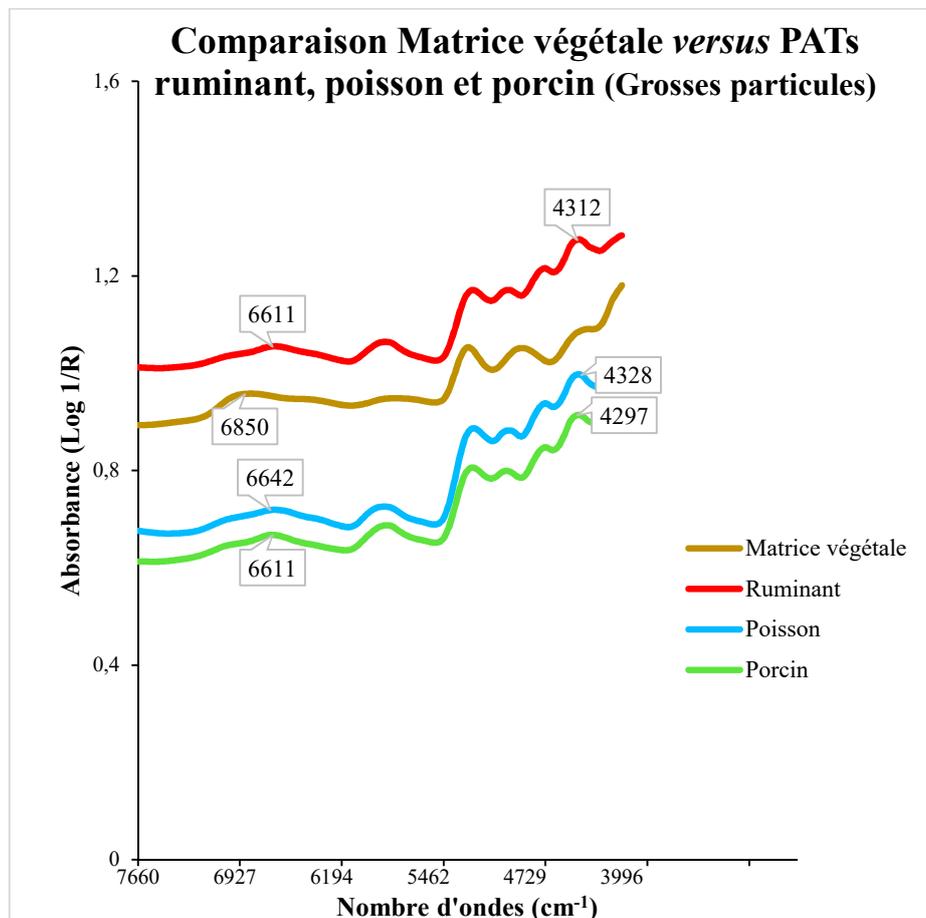


Figure 3-9 : Spectres NIRM moyens des particules d'échantillon caractéristiques.

L'analyse des spectres moyens aura permis à partir des caractéristiques spectrales, d'avoir une idée sur la nature chimique des différents échantillons étudiés. Les échantillons d'origine animale présentent des bandes d'absorption similaires (ou légèrement décalées) associées principalement aux protéines et aux matières grasses. Ce qui les rend difficiles à différencier à l'aide d'un simple examen visuel. Le recours à la chimiométrie, notamment à l'ACP est indispensable si l'on veut les distinguer.

3.3. Analyse des Composantes Principales des spectres des particules de PAT.

3.3.1. Ruminants versus Poissons

Les résultats du traitement des données spectrales par l'ACP montrent que les particules des échantillons de PATs de ruminants se répartissent dans l'espace de la 2^{ème} et de la 3^{ème} composantes « PC 2 (8,71%) vs PC 3 (5,11%) ». Sur la figure 3-10, les particules de poissons

se séparent de celles des ruminants en fonction de la composante PC 2. L'allure générale du graphique montre que la variabilité au sein du groupe des PATs de ruminants étudiées est plus grande que celle avec les poissons. Parmi les ruminants, un échantillon notamment Ruminant 4 qui est composé de PAT de bovin, se démarque des autres. Aucune explication n'a été trouvée à cela. Par contre, l'échantillon d'ovin ne se distingue pas des autres ruminants.

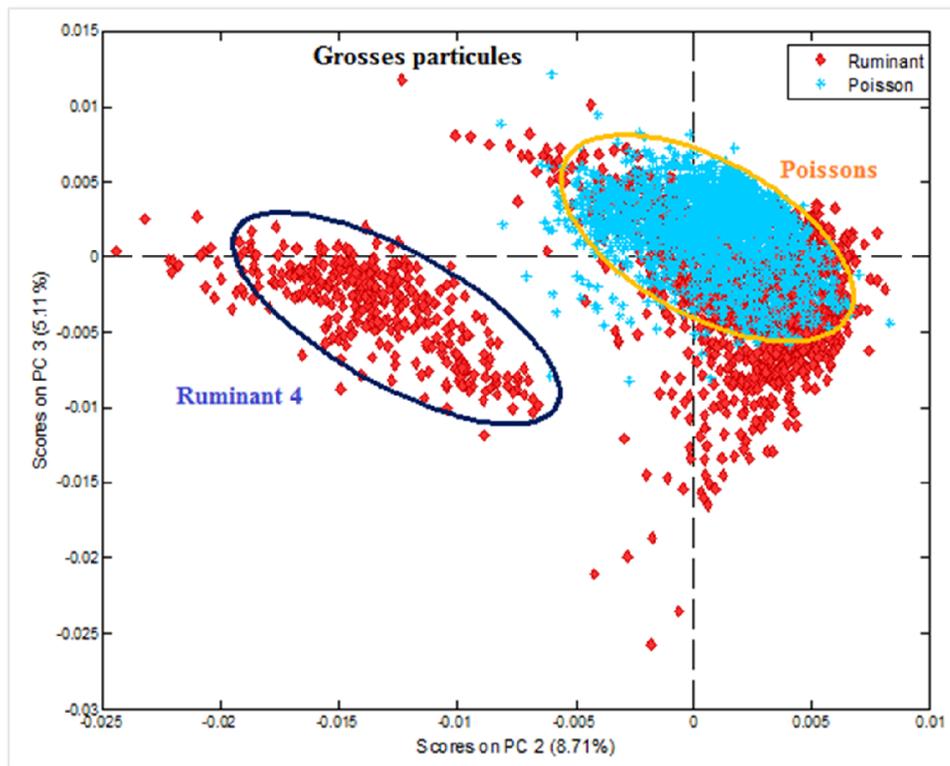


Figure 3-10 : ACP (PC 2 vs PC 3) appliquée aux spectres des grosses particules de PATs de ruminants et de poissons. L'ovale orange reprend l'ensemble des données relatives aux poissons et l'ovale bleu celles relatives au Ruminant 4 qui se dégage des autres échantillons de ruminants.

De même, il existe une diversification dans le groupe des poissons au sein duquel, l'échantillon Poisson 6 dont l'origine est mixte, se sépare du reste du groupe (Figure 3-11). Cette différenciation se fait en fonction des composantes PC 2 (6,73%) et PC 3 (2,46%). Aucune explication n'a également été trouvée à cela. Il y a lieu de signaler également que l'échantillon de pur saumon ne se distingue pas des autres échantillons de poissons.

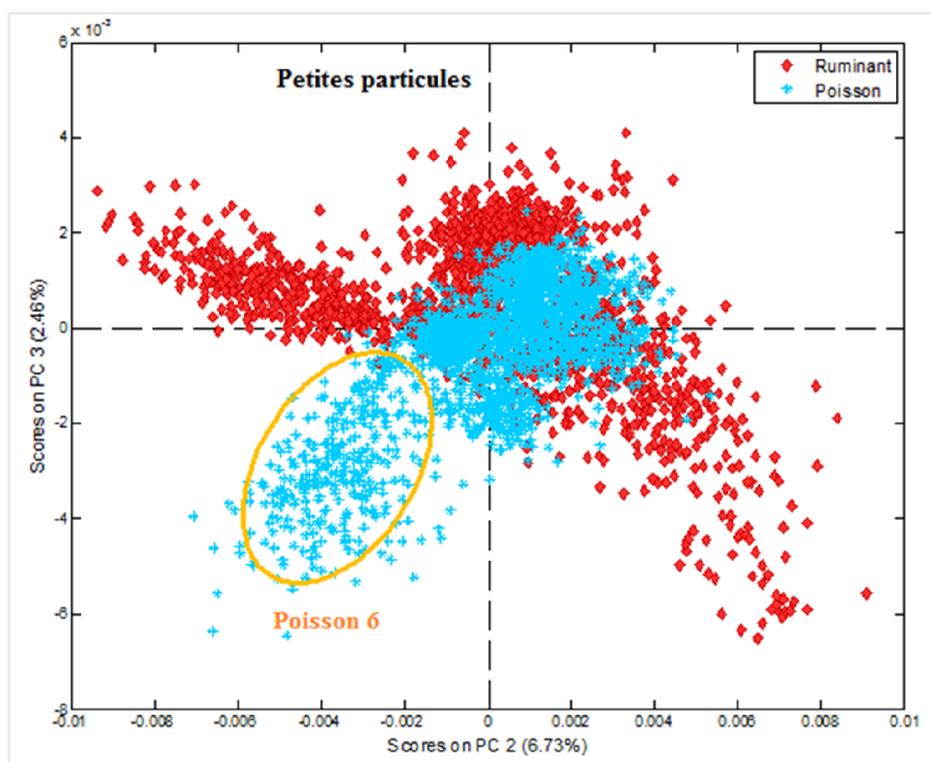


Figure 3-11 : ACP (PC 2 vs PC 3) appliquée aux spectres des petites particules de PATs de ruminants et de poissons. L'ovale orange regroupe les données relatives à l'échantillon Poisson 6 qui se dégage du groupe des poissons.

3.3.2. Porcins *versus* Poissons

Seuls les résultats obtenus des petites particules ont été satisfaisants et seront présentés dans cette section.

Sur la figure 3-12, l'on observe une discrimination entre les spectres de porcins et ceux des poissons suivant la composante PC 2 (9,37%). L'on remarque également que les spectres forment quatre blocs. Tout d'abord les deux échantillons de porcins qui se différencient l'un de l'autre. Puis, l'échantillon Poisson 4 dont l'origine est mixte, qui se distingue des autres échantillons de poissons. Les deux regroupements se font suivant la PC 7 (0.36%).

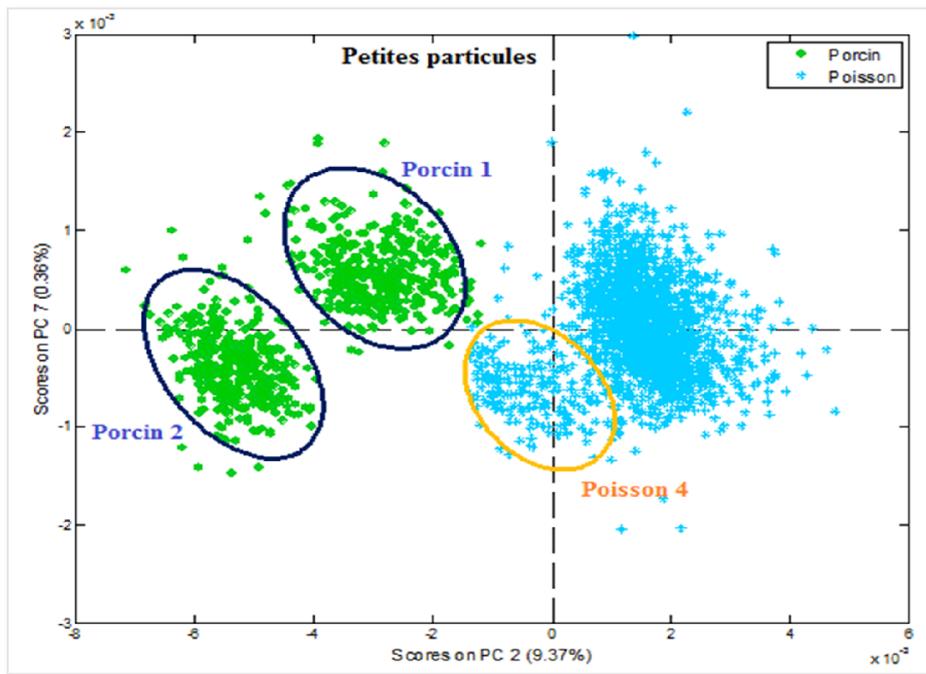


Figure 3-12 : ACP (PC 2 vs PC 7) appliquée aux spectres des petites particules de PATs de porcins et de poissons. Les ovales bleus regroupent les données relatives aux échantillons de porcins et l'ovale orange, celles relatives à l'échantillon Poisson 4 qui se distingue de son groupe.

3.3.3. Ruminants *versus* Porcins

Dans cette section également, ne sont présentés que les résultats obtenus avec les petites particules. L'ACP appliquée aux spectres des ruminants et des porcins permet de distinguer les deux différentes classes en fonction des composantes PC 2 (9,74%) et PC 3 (5,31%).

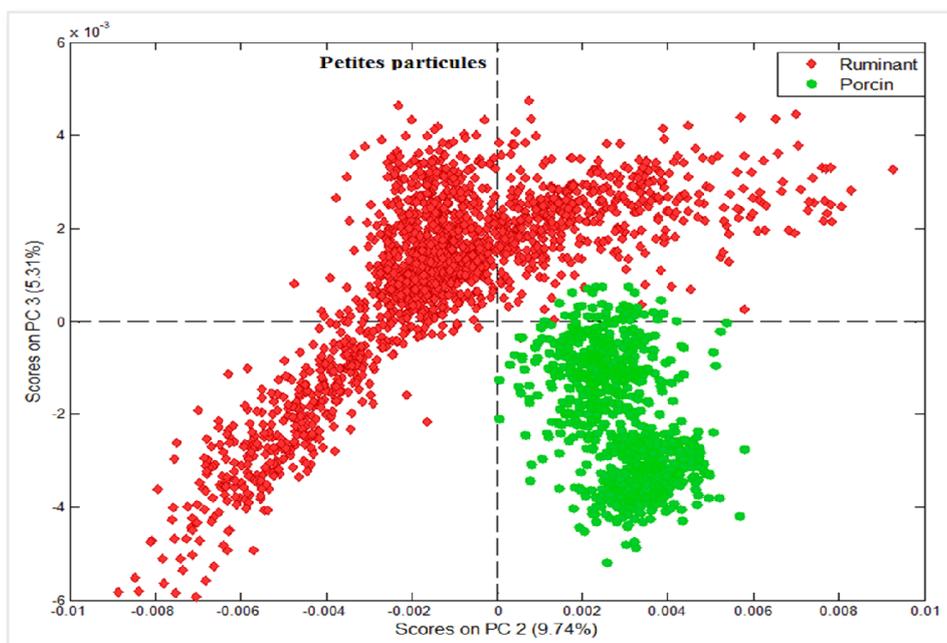


Figure 3-13: ACP (PC 2 vs PC3) Ruminants *versus* Porcins (Petites particules)

L'ACP appliquée à la totalité des spectres de PATs d'origine animale a servi à mieux apprécier les caractéristiques spectrales et à déceler les dissimilarités qui existent au sein d'une même classe et entre les différentes classes. En plus de ce qui a déjà été démontré par les études du NIRM réalisées sur le sédiment, à savoir la discrimination entre les groupes d'animaux terrestres et les poissons (ruminants *versus* poissons ; porcins *versus* poissons), la méthode NIRM appliquée sur le flottât a permis de différencier les ruminants des porcins.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats de notre étude démontrent le potentiel du NIRM pour la détection des PATs dans les aliments composés pour animaux. Ce travail a permis de développer un protocole d'analyse du flottât par microscopie proche infrarouge et d'acquérir des spectres tant sur le pattern végétal qu'animal. En plus d'obtenir la signature spectrale caractéristique de la nature chimique des échantillons, il a été possible par l'application de l'ACP, de visualiser les ressemblances et les différences entre les échantillons étudiés. L'atout majeur du NIRM, outre d'être une méthode non destructive, repose sur sa rapidité d'acquisition d'un nombre élevé de spectres et son objectivité. Toutefois, la difficulté de l'interprétation spectrale nécessite d'utiliser des méthodes chimiométriques pour extraire l'information significative, afin de discriminer les échantillons en fonction de leurs origines.

Les résultats de l'ACP obtenus des particules provenant du flottât des PATs d'origines différentes montrent qu'il semble possible de discriminer, au moyen de la microscopie NIR, les classes animales. Non seulement les résultats obtenus sont comparables à ceux des études qui ont été réalisées sur le sédiment, mais on observe également un niveau de discrimination plus élevé que par le passé, par la différenciation des spectres NIRM des ruminants de ceux des porcins.

Il faut cependant signaler que les échantillons étudiés provenaient des usines de transformation des sous-produits animaux et pour certains, nous ne disposions pas de la composition exacte. De ce fait, certaines PATs notamment du groupe des ruminants, au sein duquel nous avons noté une grande variabilité, mériteraient d'être investiguées. De plus, notre travail s'étant concentré sur les farines pures PATs de ruminants, porcins et de poissons, il serait envisageable de poursuivre l'analyse sur une large gamme d'échantillons tels que les farines de sang, plumes etc.

5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Commission Européenne. (2009). Règlement (CE) n° 152/2009 du 27 janvier 2009 portant fixation des méthodes d'échantillonnage et d'analyse destinées au contrôle officiel des aliments pour animaux. *Journal officiel des communautés européennes* **L54**, 26.2.2009, 1-130.

Baeten V., Michotte-Renier A., Sinnaeve G., Dardenne P. (2000). Analyses of feedingstuffs by near infrared microscopy (NIRM) : detection and quantification of meat and bone meal (MBM). *Proceeding of the Sixth International Symposium on Food Authenticity and Safety, Nantes (France)*, 1-11(28-30 November).

Baeten V., von Holst C., Fissiaux I., Michotte-Renier A., Murray I., Dardenne P. (2004). The near infrared microscopic (NIRM) method : combination of the advantages of optical microscopy and near-infrared spectroscopy (WP5-NIRM). *In : Strategies and method to detect and quantify mammalian tissues in feedingstuffs, Brussels, European Commission*, 14 p.

De la Roza Delgado B., Soldado A., Martinez Fernandez A., Vicente F., Garrido Varo A., Perez Marin D., de la Haba M.J., Guerrero Ginel J.E. (2007). Application of near-infrared microscopy (NIRM) for the detection of meat and bone meals in animal feeds : A tool food and feed safety. *Food Chemistry*, **105**, 1164-1170.

Fernandez Pierna J.A., Baeten V., Boix A., Von Holst C., Perez Marin D., Garrido Varo A. (2012). Near Infrared microscopy (NIRM). *In: Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs, Jorgensen J.S., Baeten V. Namur, Les presses Universitaires de Namur*, 81-91.

Von Holst C., Baeten V., Boix A., Slowikowski B., Fernández Pierna J. A., Tirendi S., Dardenne P. (2008). Transferability Study of a near-infrared microscopic method for the detection of banned meat and bone meal in feedingstuffs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **392**, 313-317.