



**Gembloux Agro-Bio Tech**  
Université de Liège



# **DETECTION DES PROTEINES ANIMALES TRANSFORMEES PAR SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE**

**TAIRA Aurélien**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER COMPLEMENTAIRE EN SCIENCES ET TECHNOLOGIE DES ALIMENTS**

**ANNEE ACADEMIQUE 2015-2016**

**PROMOTEUR: Vincent BAETEN (CRA-W, UCL)**

**CO-ENCADRANT: Marie-Caroline LECRENIER (CRA-W)**

## SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES .....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	iv
LISTE DES ANNEXES.....	iv
LISTE DES ABREVIATIONS .....	v
LEXIQUE.....	vi
REMERCIEMENTS .....	vii
RESUME.....	viii
ABSTRACT .....	ix
INTRODUCTION.....	1
I MATERIEL ET METHODES.....	2
I-1 Matériel.....	2
I-2 Méthodologie .....	5
I-2-1 Sélection des paramètres d'acquisition spectrale : travail bibliographique .....	6
I-2-2 Essais préliminaires .....	6
I-2-3 Analyses des échantillons par spectroscopie de fluorescence EES. ....	7
I-2-4 Extraction des données et traitement chimiométriques .....	8
II RESULTATS ET DISCUSSION .....	10
II-1 Essais préliminaires avec les standards .....	10
II-1-1 Essais préliminaires avec le DLA.....	10
II-1-2 Essais préliminaires avec le tampon phosphate.....	13
II-2 Analyses des échantillons par spectroscopie de fluorescence EES.....	16
II-2-1 Analyse des sous-produits dérivés du sang .....	16
II-2-1-1 Poudres d'hémoglobine .....	16
II-2-1-2 Farines de sang .....	17
II-2-1-3 Poudres de plasma .....	18
II-2-2 Analyse des aliments pour animaux.....	19

II-2-2-1 Aliments contenant des produits sanguins .....	19
II-2-2-2 Aliments contenant des poudres d'hémoglobine.....	20
II-2-2-3 Aliment contenant des farines de sang .....	21
II-2-2-4 Aliments ne contenant pas de produits dérivés du sang .....	22
II-3 Analyse en Composante Principale effectuée sur les spectres de fluorescence EES des aliments pour animaux.....	23
II-4 Estimation de la concentration en hémoglobine.....	24
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	29
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	30
ANNEXES .....	32

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1: Photographie des standards utilisés .....	2
Figure 2: Photographie du Broyeur et du Spectrofluorimètre .....	5
Figure 3: Schéma général de la procédure expérimentale.....	5
Figure 4: Spectres de fluorescence EES des standards dans le DLA avec l'offset de 17 nm .	11
Figure 5: Spectres de fluorescence EES des standards dans le DLA avec l'offset de 80 nm .	11
Figure 6: Spectres de fluorescence EES des standards dans le tampon phosphate avec l'offset de 17 nm.....	14
Figure 7: Spectres de fluorescence EES des standards dans le tampon phosphate avec l'offset de 80 nm.....	14
Figure 8: Spectres de fluorescence EES des poudres d'hémoglobine et du DLA .....	16
Figure 9: Spectres de fluorescence EES des farines de sang et du DLA .....	17
Figure 10: Spectres de fluorescence EES des poudres de plasma, du DLA et de l'albumine standard .....	18
Figure 11: Spectres de fluorescence EES des aliments contenant des produits sanguins, du DLA et des standards. ....	19
Figure 12: Spectres de fluorescence EES des aliments contenant des poudres d'hémoglobine et de l'hémoglobine standard de bovin .....	20
Figure 13: Spectres de fluorescence EES de l'aliment contenant des farines de sang, du DLA et des standards .....	21
Figure 14: Spectres de fluorescence EES des aliments ne contenant pas de produits dérivés du sang et des standards. ....	22
Figure 15: Graphe de l'ACP appliquée aux spectres de fluorescence EES des aliments pour animaux et loading associés à la deuxième composante.....	23
Figure 16: Spectres de fluorescence EES des solutions standards d'hémoglobine de bovin..	25
Figure 17: Spectres de fluorescence EES des solutions standards d'hémoglobine de porc....	25
Figure 18: Evolution de l'intensité et de l'aire à 484 nm fonction de la concentration d'hémoglobine bovine.....	26
Figure 19: Evolution de l'intensité et de l'aire à 484 nm fonction de la concentration d'hémoglobine porcine.....	27

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques des produits dérivés du sang.....	3
Tableau 2: Caractéristiques des aliments pour animaux .....	4
Tableau 3: Paramètres utilisés pour les essais préliminaires.....	10
Tableau 4: Paramètres retenus pour les analyses en spectroscopie de fluorescence EES.....	15
Tableau 5: Estimation de la teneur en hémoglobine des extraits (mg/l) .....	28

## LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Composition des échantillons utilisés.....	32
Annexe 2: Protocole de préparation du DLA (pour 25 ml).....	33
Annexe 3: Protocole d'extraction des protéines.....	34
Annexe 4: Dosage des protéines par la méthode de Pierce.....	35
<b>Annexe 5</b> : Résultats bruts sur l'extraction des protéines .....	36
Annexe 6: Droites d'étalonnages établies à partir des intensités à 484 nm .....	38
Annexe 7: Droites d'étalonnages à partir des aires .....	39

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**CRA-W:** Centre Wallon de Recherches Agronomiques

**DLA:** Dige labeling buffer. C'est le tampon utilisé pour l'extraction des protéines

**EURL-AP :** Laboratoire Européen de Référence pour les Protéines Animales

**Fluorescence EES :** Fluorescence en mode excitation-émission synchrone.

**PATs :** Protéines Animales Transformées

**ACP :** Analyse en Composante Principale

**PCR :** Réaction de Polymérisation en Chaîne

**UE :** Union Européenne

## LEXIQUE

**Cps/micro Amps** : coupes par seconde/micro ampères. C'est l'unité de mesure de l'intensité de fluorescence. Cps indique l'intensité mesurée par le détecteur sur l'échantillon et micro Amps le signal mesuré par le détecteur de référence sur la lampe à arc de xenon.

**Incrément** : désigne le pas de la longueur d'onde. Il sera noté  $\Delta\lambda_{\text{incr}}$  et est donné en nanomètre.

**Offset** : désigne le décalage de longueur d'onde entre l'excitation et l'émission.

**Quenching** : tout phénomène qui amène à la décroissance de la fluorescence.

**Slit d'excitation** : représente la bande passante de lumière incidente qui bombarde l'échantillon. Il sera donné en nanomètre.

**Slit émission** : désigne la fente de lumière émise qui contrôle la résolution et l'intensité du signal de fluorescence enregistré par le détecteur. Il est également donné en nanomètre.

## **REMERCIEMENTS**

J'adresse mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Il s'agit particulièrement de :

L'équipe de responsables de l'Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur (ARES) qui, à travers leur programme d'octroi de bourses d'études m'ont permis de réaliser ce travail.

Monsieur Vincent BAETEN, mon enseignant et promoteur, pour la confiance qu'il m'a témoignée en acceptant de suivre ce travail.

Madame Marie-Caroline LECRENIER, mon encadrante, celle qui m'a proposé ce sujet et m'a guidé tout au long du présent travail.

Madame Ouissam ABBAS, pour sa totale disponibilité, ses conseils et encouragements.

Madame Marie COLLARD, Messieurs Benoît SCAUT, Quentin ARNOULD, Nicaise KAYOKA et Stéphane BRICHARD, qui m'ont guidé, conseillé et accompagné tout au long de ce travail.

Toute l'équipe de l'Unité Qualité des Produits du CRA-W. Merci pour votre accueil chaleureux.

Marie Babeth EBENE, Lygens JOSEPH, Elhajjaji SOUNDOUS, Vilsaint PHILOGENE et Yuma Hélène MWENGE BINTI, mes amis et camarades stagiaires du CRA-W.



## **RESUME**

L'objectif de ce travail est de détecter l'hémoglobine dans les aliments pour animaux par spectroscopie de fluorescence. Pour atteindre cet objectif, nous avons solubilisé des poudres standards d'hémoglobine dans le tampon phosphate et le dige labeling buffer (DLA). Ensuite, nous les avons analysées en spectroscopie de fluorescence en mode excitation-émission synchrone (EES) avec deux valeurs d'offset (17 nm et 80 nm) afin de choisir les paramètres les plus appropriés. La combinaison DLA-offset de 17 nm a fourni les informations spectrales les plus intéressantes pour cette détection : la présence de l'hémoglobine a été révélée par des bandes de fluorescence à 484 nm et 538 nm. Les mêmes analyses ont ensuite été réalisées sur des extraits provenant des poudres commerciales d'hémoglobine. Elles ont toutes présenté des signatures spectrales comparables aux solutions standards d'hémoglobine. Des extraits issus de 18 aliments pour animaux, dont 5 contenant de l'hémoglobine ont également été analysés. Les spectres obtenus sur ces 5 extraits ont tous présenté les mêmes bandes de fluorescence à 484 nm et 538 nm, caractéristiques de l'hémoglobine. L'Analyse en Composante Principale (ACP) appliquée aux spectres des aliments analysés montre qu'il est possible de discriminer les extraits contenant l'hémoglobine de ceux qui n'en contiennent pas. Cela a confirmé que la détection de l'hémoglobine est possible par la spectroscopie de fluorescence EES. La quantité d'hémoglobine dans ces extraits a ensuite été estimée par deux approches : la première, a corrélié l'intensité de fluorescence à 484 nm à la concentration et la deuxième, a relié la concentration à l'aire sous la bande de fluorescence à 484 nm. Les deux approches ont donné des valeurs de concentrations différentes.

**Mot clés** : détection, hémoglobine, aliment pour animaux, spectroscopie de fluorescence en mode excitation-émission synchrone (EES).

## **ABSTRACT**

This study is based on the detection of hemoglobin in animal feed by fluorescence spectroscopy. To achieve this goal, preliminary tests were carried out by dissolving lyophilized hemoglobin powders in phosphate buffer and dige labeling buffer (DLA). The solutions obtained were analyzed with two offset values (17 nm and 80 nm) by synchronous fluorescence spectroscopy (SFS) in order to choose appropriate settings. The DLA and the offset value of 17 nm provided the most interesting spectral information: hemoglobin was detected at 484 nm and 538 nm. Then, samples of animal by-products derived from blood were analyzed by SFS. Samples containing hemoglobin exhibited the fluorescence bands at 484 nm and 538 nm identical to results obtained with lyophilized hemoglobin powders. 18 samples of animal feeds, including 5 made up with hemoglobin were also analyzed. The spectra of these 5 samples showed the same fluorescence bands at 484 nm and 538 nm, which characterizes the presence of hemoglobin. The Principal Component Analysis (PCA) applied to the spectra of 18 samples shows that it is possible to discriminate samples containing hemoglobin and samples which do not contain. This result confirmed that SFS is fit for hemoglobin detection in animal feed. Finally we tried to estimate the amount of hemoglobin in these 5 samples by to different approaches: the first correlated concentration to fluorescence intensity at 484 nm and the second relied area under band at 484 nm to the concentration. Both gave different results.

**Key words:** detection, hemoglobin, animal feed, synchronous fluorescence spectroscopy (SFS).

## INTRODUCTION

Les protéines animales transformées (PATs) et les produits sanguins issus de ruminants sont des sous-produits interdits dans l'alimentation d'animaux destinés à la consommation humaine. La détection de ces produits interdits, lors des contrôles officiels n'est autorisée que par deux méthodes : la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et la microscopie optique ([règlement UE n°51/2013](#)). Elles présentent toutes deux des limitations en termes de détection.

L'examen par le microscope optique ne permet que la différenciation entre animaux terrestres et poissons, à partir d'éléments discriminants présents dans les aliments tels que, les os, et les fibres musculaires ([Plouvier et al., 2012](#)). La PCR, bien que permettant de déterminer l'origine d'un sous-produit animal jusqu'au niveau de l'espèce, ne permet toutefois pas de savoir si le sous-produit à l'origine du signal est autorisé ou pas ([Fumière et al., 2010](#)).

Plusieurs autres méthodes sont donc investiguées pour répondre à la problématique de l'identification conjointe de l'espèce animale et du type de sous-produits. Parmi celles-ci, la spectrométrie de masse est présentée comme une technique prometteuse. Adaptée à la détection des constituants d'origine animale, elle est capable de fournir des informations sur les tissus et l'espèce d'origine ([Lecrenier et al., 2016](#)). Sa combinaison avec une méthode de détection rapide de sous-produits dérivés du sang pourrait améliorer son efficacité et compléter les méthodes actuelles. L'intérêt porté à la détection rapide des produits dérivés du sang s'explique par le fait que, contrairement aux produits sanguins issus de ruminants qui sont interdits, les farines de sang et les poudres d'hémoglobine de non ruminants sont autorisées dans l'alimentation des poissons et les poudres de plasma de non ruminants sont utilisées dans l'alimentation des porcs et volailles.

C'est donc dans ce cadre de recherche et de développement de méthode complémentaire à la spectrométrie de masse que s'inscrit ce travail qui est basé sur la détection de l'hémoglobine dans les aliments pour animaux par **spectroscopie de fluorescence**. Le présent document qui présente les résultats obtenus est structuré en trois points. Dans un premier temps, il présente les résultats des essais préliminaires effectués sur les solutions standards d'hémoglobine qui ont permis de fixer les conditions expérimentales. Il expose ensuite les résultats obtenus sur les produits dérivés du sang et les compare à ceux obtenus avec les solutions standards d'hémoglobine. En dernier lieu, il présente les résultats obtenus sur quelques aliments pour animaux sélectionnés pour cette étude.

# I MATERIEL ET METHODES

## I-1 Matériel

Deux types de produits ont été utilisés pour la réalisation de ce travail : les standards (protéines lyophilisées issues du sang d'animaux) et les échantillons (sous-produits dérivés du sang et aliments pour animaux).

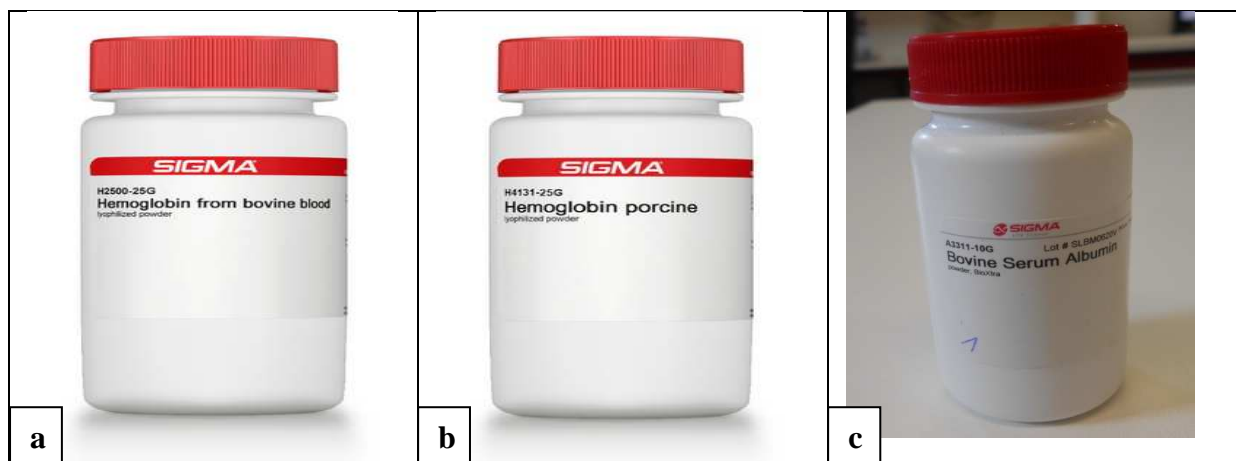
- **Les Standards** (pureté  $\geq 98\%$ )

Les standards utilisés étaient constitués des produits suivants :

- hémoglobine pure de bovin lyophilisée (Hb), référence H2500-25G (Figure 1 a) ;
- hémoglobine pure de porc lyophilisée (Hp), référence H4131-25G (Figure 1 b) ;
- albumine de sérum bovin lyophilisée (BSA), référence A3311-10G (Figure 1 c).

Ils ont tous été achetés chez Sigma Aldrich Ltd (Saint Louis, Missouri, USA). Le choix de ces standards se justifie par fait qu'ils constituent l'essentiel des protéines du sang.

La figure ci-dessous présente la photographie de ces standards.



**Figure 1:** Photographie des standards utilisés : hémoglobine pure de bovin (a), hémoglobine pure de porc (b), albumine de sérum bovin (c)

- **Les échantillons**

Les échantillons analysés peuvent être classés en deux catégories :

### **i. Les produits dérivés du sang**

Quatorze sous-produits dérivés du sang d'animaux ont été utilisés. Ce sont principalement :

- des produits sanguins, notamment les poudres d'hémoglobine et de plasma (de porc et de bovin) ;
- des farines de sang.

### **ii. Les aliments pour animaux**

Quatre types d'aliments pour animaux ont été sélectionnés dans cette étude. Il s'agit notamment :

- des aliments pour porc contenant des produits sanguins ;
- des aliments pour poisson contenant de l'hémoglobine ;
- des aliments pour poisson contenant des farines de sang et
- des aliments pour poisson ne contenant pas de sous-produits dérivés du sang.

Tous ces échantillons ont été prélevés dans la banque d'échantillons de l'EURL-AP qui est hébergée au CRA-W ([www.eurl.craw.eu](http://www.eurl.craw.eu)). Les tableaux ci-dessous donnent leurs caractéristiques (cfr annexe 1 pour leur composition).

**Tableau 1:** Caractéristiques des produits dérivés du sang

<b>Produits dérivés du sang</b>	<b>Identification</b>
Poudre d'hémoglobine bovine	S01
Poudre d'hémoglobine bovine	S02
Farine de sang de bovin pure	S03
Farine de sang de ruminant 80%	S04
Poudre d'hémoglobine porcine	S05
Poudre d'hémoglobine porcine	S06
Poudre d'hémoglobine porcine	S07
Poudre d'hémoglobine porcine	S08
Poudre d'hémoglobine porcine	S09
Poudre d'hémoglobine porcine	S10
Farine de sang de porc	S11
Farine de sang de porc	S12
Poudre de plasma de bovin	S13
Poudre de plasma de porc	S14

**Tableau 2:** Caractéristiques des aliments pour animaux

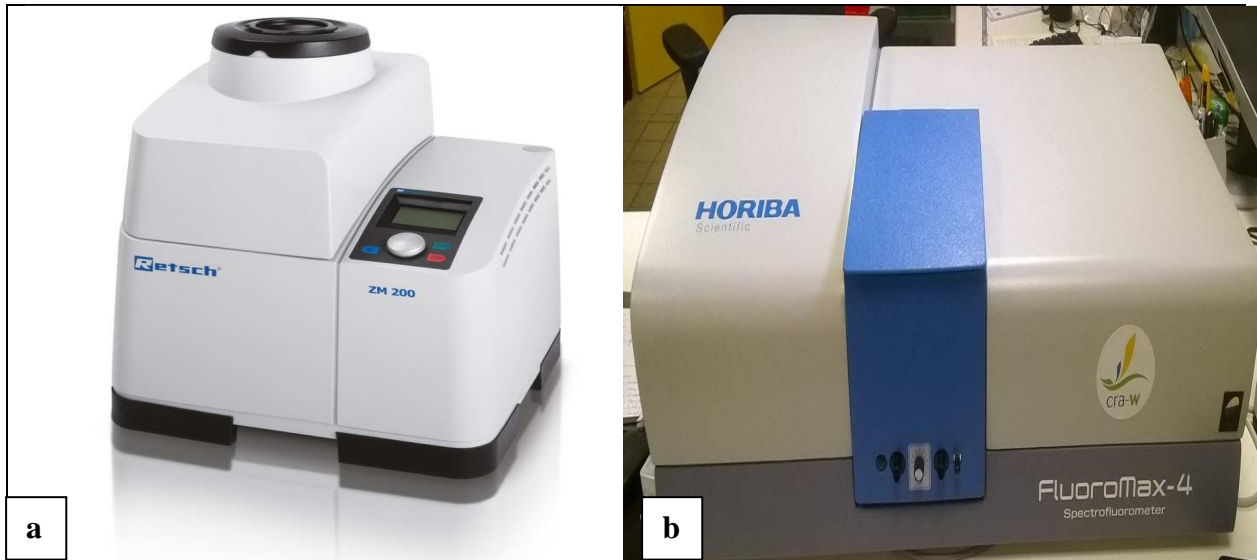
Type d'aliment	Composition	N° Echantillon
<b>Aliments pour porc contenant des produits sanguins</b>	Aliment contenant des produits sanguins	<b>E1</b>
	Aliment contenant des produits sanguins et farine de poisson	<b>E2</b>
	Aliment contenant des produits sanguins et le petit lait	<b>E3</b>
	Aliment contenant du plasma, petit lait et graisse de porc	<b>E4</b>
<b>Aliments pour poisson contenant des poudres d'hémoglobine</b>	Aliment contenant des poudres d'hémoglobine	<b>E5</b>
	Aliment contenant des poudres d'hémoglobine	<b>E6</b>
	Aliment contenant 10 % de poudre d'hémoglobine	<b>E7</b>
	Aliment contenant 10 % de poudre d'hémoglobine	<b>E8</b>
	Aliment contenant 11 % de poudre d'hémoglobine	<b>E9</b>
<b>Aliment pour poisson contenant des farines de sang</b>	Aliment contenant 7 % de farine de sang	<b>E10</b>
<b>Aliments pour poisson ne contenant pas de produits dérivés du sang</b>	Aliment ne contenant pas de produits dérivés de sang	<b>E11</b>
	Aliment ne contenant pas de produits dérivés de sang	<b>E12</b>
	Aliment ne contenant pas de produits dérivés de sang	<b>E13</b>
	Aliment ne contenant pas de produits dérivés de sang	<b>E14</b>
	Aliment ne contenant pas de produits dérivés de sang	<b>E15</b>
	Aliment ne contenant pas de produits dérivés de sang	<b>E16</b>
	Aliment ne contenant pas de produits dérivés de sang	<b>E17</b>
	Aliment ne contenant pas de produits dérivés de sang	<b>E18</b>

▪ **Instrumentation**

Les échantillons ont été broyés en utilisant le broyeur **RETSCH ZM 200** à une granulométrie  $\leq 2$  mm. L'appareil utilisé pour les analyses en spectroscopie de fluorescence est le spectrofluorimètre **FluoroMax<sup>®</sup>-4** de la marque HORIBA Scientific. Il est intégralement piloté par ordinateur, via le logiciel **FluorEssence<sup>™</sup> V3.5** (Kyoto, Japon). Les commandes sont transmises par liaison USB et le système s'étalonne automatiquement au démarrage. Toutes les analyses ont été réalisées en utilisant des tubes en quartz de 1 cm d'épaisseur. Après analyse, l'exportation et le traitement des données s'est fait avec le logiciel

**UNSCRAMBLER X 10.3** (Camo, Norvège) et le tracé des spectres par le logiciel **SIGMA Plot 10** (Systat Software Inc, USA).

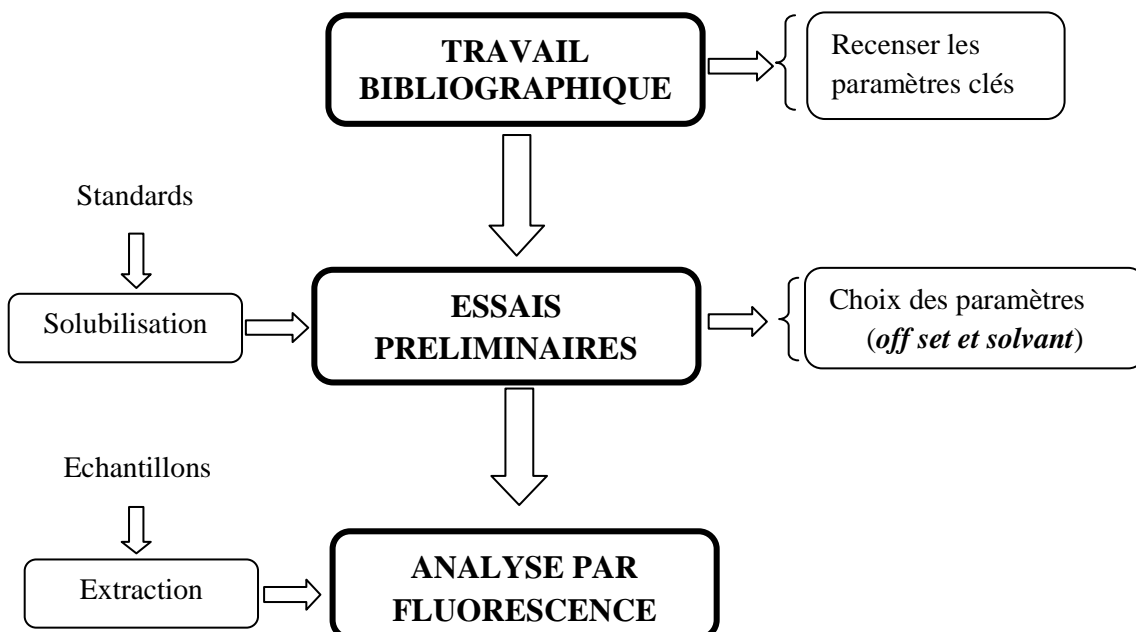
La figure ci dessous présente les photographies du broyeur et du spectrofluorimètre utilisés.



**Figure 2:** Photographie du Broyeur RETSCH ZM 200 (a) et du Spectrofluorimètre FluoroMax®-4 (b)

## I-2 Méthodologie

La méthodologie utilisée pour ce travail peut être schématisée par la figure ci-dessous



**Figure 3:** Schéma général de la procédure expérimentale

## I-2-1 Sélection des paramètres d'acquisition spectrale : travail bibliographique

Nous avons commencé ce travail par une étude bibliographique afin d'identifier les différents modes de mesure communément utilisés en spectroscopie de fluorescence. Il s'agit notamment de la spectroscopie de fluorescence en mode excitation, en mode excitation-émission, en mode de matrices d'excitation-émission 3D et en mode d'excitation-émission synchrone. Au vu de ses avantages (simplicité des spectres et resserrement des bandes) et de la complexité de la composition des échantillons à analyser, **la spectroscopie de fluorescence en mode excitation-émission synchrone (EES)** a été choisie. Ce mode présente la particularité de faire varier simultanément la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission tout en conservant entre elles un décalage constant.

Afin de mener à bien les analyses, les paramètres susceptibles d'influencer la détection de l'hémoglobine par spectroscopie de fluorescence EES ont été recensés, notamment:

- les longueurs d'onde d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ) et d'émission ( $\lambda_{em}$ ), qui varient généralement entre 200 nm et 600 nm ([Barati et al., 2015](#));
- les concentrations en hémoglobine, qui sont généralement faibles (<5  $\mu$ M) ; ce qui permet d'éviter les phénomènes d'inhibition communément appelé quenching ([Hirstch, 2003](#)) ;
- les offset qui sont le plus souvent 17 nm ou 80 nm ([Hosseinzadeh and Moosavi-Movahedi, 2016](#)) ;
- les fluorophores de l'hémoglobine ; qui sont les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et l'hème ([Peters, 1995; Hirstch, 2003](#)) ;
- l'incrément ( $\Delta\lambda_{incr}$ ) utilisé pour la mesure en spectroscopie de fluorescence EES. Il peut être égal à 1 nm, 5 nm ou 10 nm ([Hosseinzadeh and Moosavi-Movahedi, 2016; Grigoryan and Sargsyan, 2014 ; Pang et al., 2014](#)) ;
- les *slit* d'excitation et d'émission qui sont le plus souvent fixés de façon à ne pas dépasser la limite de linéarité de la réponse spectrale (c'est à dire de façon à ne pas saturer le détecteur);
- le type de solvant utilisé ; les plus couramment utilisés sont : le tampon phosphate à pH 7,2, le tampon Tris dont le pH varie entre 1,9 et 11,5 et le tampon acétate à pH 5 ([Grigoryan and Sargsyan, 2014 ; Barati et al., 2015 ; De and Girigoswami, 2006](#)). Une variation de pH influence généralement de façon significative la fluorescence. Le rendement de la photoluminescence augmente le plus souvent avec le pH ([Abbas, 2007](#)).

## I-2-2 Essais préliminaires

Les premières analyses ont été réalisées sur les standards. Elles avaient pour but de déterminer les paramètres de mesure (solvant et offset) appropriés pour cette étude. Pour ce



faire, les standards ont été solubilisés dans deux solvants (tampon phosphate<sup>1</sup> et le DLA<sup>2</sup>) et des mesures ont été effectuées par spectroscopie de fluorescence EES à deux offset (17 nm et 80 nm).

Le choix du DLA se justifie par le fait qu'il est le solvant dans lequel sont extraites les protéines des échantillons utilisés. Il présente toutefois un inconvénient : son pH n'est pas toujours stable, il varie entre 10,4 et 10,6. Le tampon phosphate a quant à lui été sélectionné car c'est le solvant le plus couramment utilisé dans la littérature. La constance du pH constitue son principal avantage.

La plage de longueur d'onde (**200-600 nm**), l'incrément (**1 nm**) et la concentration en hémoglobine (**3 µM**) ont été fixés à l'avance. Ce choix s'est justifié par le fait que la plage de 200 à 600 nm est la plage maximale généralement utilisée en spectroscopie de fluorescence. L'incrément de 1 nm est celui qui permet d'avoir la meilleure résolution spectrale possible (comparé à 5 nm et 10 nm) et la concentration de 3 µM en hémoglobine permet d'éviter des phénomènes de quenching.

Toutes les mesures et les préparations des solutions ont été effectuées à température ambiante. Le protocole de préparation du DLA est repris en annexe 2.

L'analyse des spectres collectés a permis de choisir le solvant le plus adapté et l'offset le plus approprié. Les longueurs d'onde caractéristiques de l'hémoglobine ont été déterminées à partir des bandes obtenues sur les différents spectres.

### **I-2-3 Analyses des échantillons par spectroscopie de fluorescence EES.**

Les protéines ont d'abord été extraites à partir des sous-produits dérivés du sang et des aliments pour animaux sélectionnés. L'extraction a été réalisée en 48 heures, conformément au protocole repris en annexe 3 ([Lecrenier et al., 2016](#)).

Une fois extraites, les protéines ont été dosées par la méthode de Pierce ([Marbaix et al., 2016](#)). Elle est utilisable dans une gamme de concentrations de 0,5 µg/ml à 2 mg/ml et est beaucoup plus linéaire que la méthode de Bradford. Elle est aussi plus tolérante aux détergents et agents dénaturants tel que l'urée, qui a tendance à interférer avec d'autres méthodes de quantification telle que la méthode de Lowry ([www.labome.fr](http://www.labome.fr)). Le protocole de dosage utilisé est repris en annexe 4.

---

<sup>1</sup> Tampon phosphate pH 7,2

<sup>2</sup> Dige labeling buffer. C'est le tampon utilisé pour l'extraction des protéines (pH 10, 5 ± 0,1)

L'analyse des protéines extraites a ensuite été réalisée par spectroscopie de fluorescence EES en diluant 20 µl d'échantillon (extraits protéiques) dans 2,98 ml de solvant. Cette mesure s'est faite en utilisant le solvant et l'offset choisis au terme des essais préliminaires.

Ces mesures ont été réalisées sur les échantillons dérivant du sang afin de vérifier si les résultats obtenus sur ces produits pouvaient être comparables à ceux obtenus avec les standards. Les aliments pour animaux (porcs et poissons) ont quant à eux été analysés dans le but de vérifier si l'on pouvait détecter l'hémoglobine dans une matrice réelle par spectroscopie de fluorescence EES.

La concentration en hémoglobine des aliments qui en contiennent a ensuite été estimée. Pour ce faire, des courbes d'étalonnages ont été obtenues en mesurant l'intensité de fluorescence et l'aire sous la bande à la longueur d'onde de fluorescence maximale de différentes solutions standards d'hémoglobine (10 µM, 5 µM, 3,3 µM, 2,5 µM, 1,6 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,25 µM, et 0,125 µM). Pour chacune des dilutions, l'intensité correspondante au solvant a été soustraite. Les données ayant permis l'établissement de ces courbes d'étalonnages sont les moyennes de trois mesures.

#### **I-2-4 Extraction des données et traitements chimiométriques**

Les spectres ont été exportés et convertis en fichier Excel via le logiciel UNSCRAMBLER X 10.3 (Camo, Norgève). Les données extraites ont permis de retracer les spectres en utilisant le logiciel SIGMA Plot 10 (Systat Software Inc, USA). Les spectres ont été superposés les uns sur les autres afin d'avoir une appréciation globale et de vérifier si les bandes caractéristiques de l'hémoglobine pouvaient être observées.

Des traitements chimiométriques ont également été effectués sur les données spectrales. Une Analyse en Composante Principale (ACP) a été appliquée uniquement aux spectres prétraités<sup>3</sup> obtenus sur les aliments pour animaux. Elle avait pour but de vérifier s'il était possible de discriminer les aliments contenant l'hémoglobine de ceux qui n'en contiennent pas.

L'ACP est une technique qui décrit la variation dans un jeu de données multivariées au moyen d'un nombre réduit de variables non-corrélées (Composantes Principales). Elle recombine les variables originales en un jeu de nouvelles variables de telle manière qu'un maximum de l'information spectrale contenue dans les données originales soit maintenue au

---

<sup>3</sup> Normalisation de surface

sein des nouvelles variables. Cela permet de projeter les données dans un espace réduit tout en préservant un maximum de variance (Baeten, 2015).

Pour ce faire, les échantillons (aliments pour animaux) ont été regroupés en quatre classes :

- i) aliments contenant de la poudre d'hémoglobine ;
- ii) aliments contenant les produits sanguins ;
- iii) aliments contenant les farines de sang et
- iv) aliments ne contenant pas de produits dérivés de sang.

Le prétraitement utilisé ne crée pas d'informations supplémentaires, mais permet d'éliminer ou d'atténuer les variations extérieures, dues à des phénomènes physiques, et de mieux mettre en évidence les informations spectrales en relation avec la composition des échantillons (Baeten, 2015).

## II RESULTATS ET DISCUSSION

Cette partie consacrée aux résultats obtenus et aux interprétations qui en découlent est subdivisée en trois parties. Elle présente tout d'abord les résultats des essais préliminaires effectués avec les standards dans le DLA et le tampon phosphate avec l'offset 17 nm et 80 nm. Elle expose ensuite les résultats obtenus sur les sous-produits dérivés de sang et les aliments pour animaux. La dernière partie est relative à l'estimation de la teneur en hémoglobine dans certains aliments.

### II-1 Essais préliminaires avec les standards

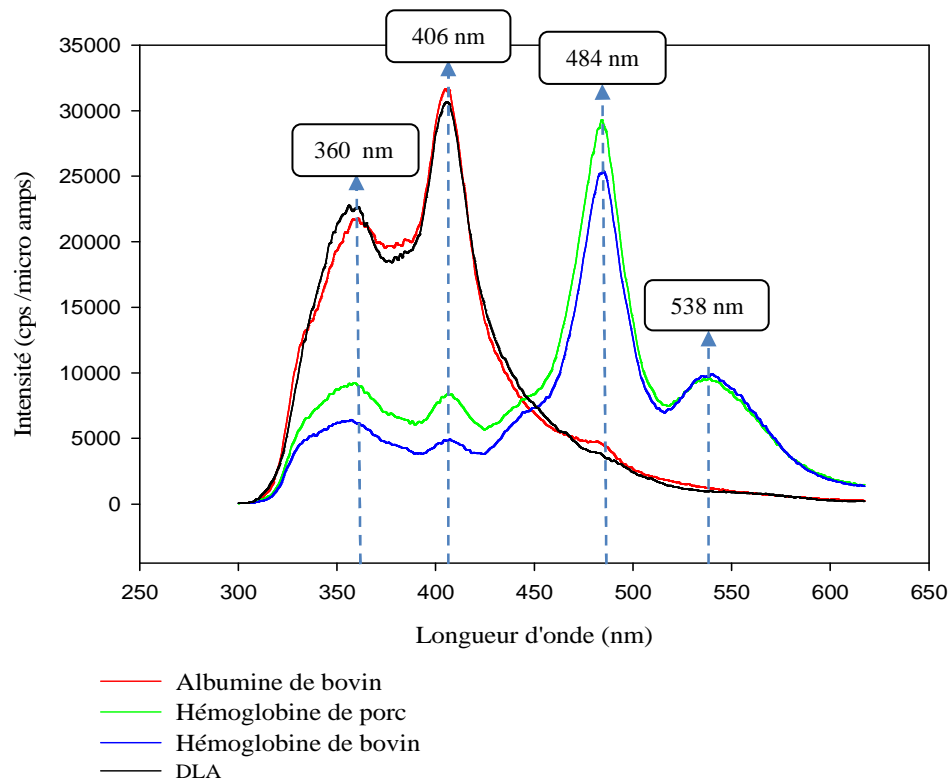
Les essais préliminaires ont été réalisés sur les standards en vue de déterminer le solvant et l'offset le plus approprié pour la détection de l'hémoglobine. Ces analyses ont été réalisées en utilisant les paramètres du tableau suivant :

**Tableau 3:** Paramètres utilisés pour les essais préliminaires

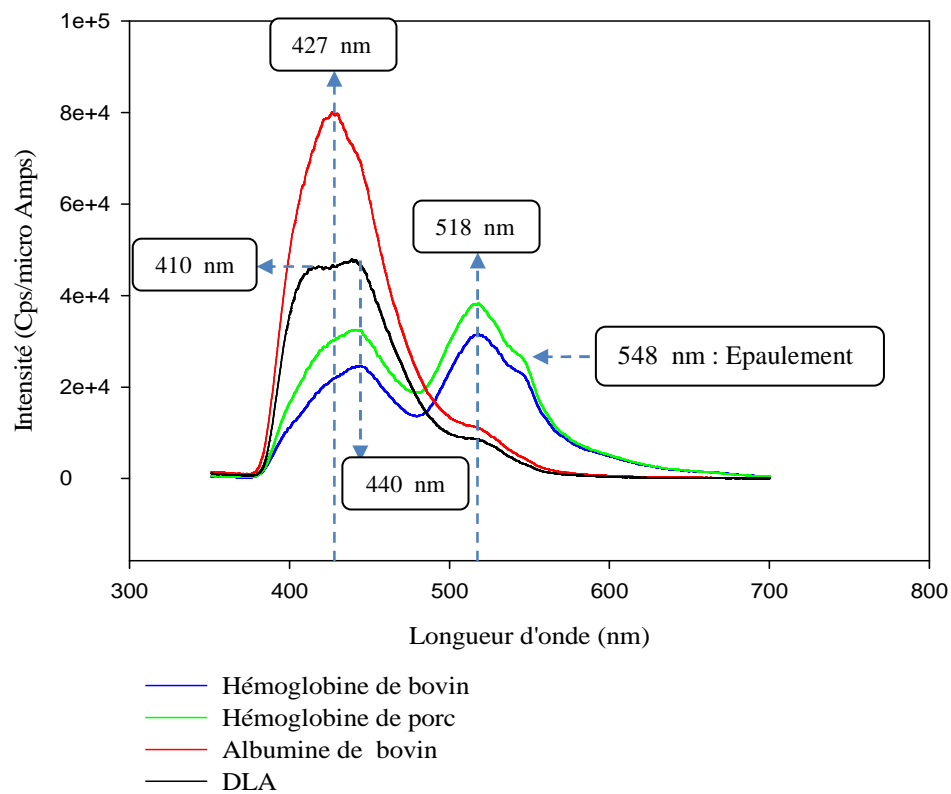
	Plage de longueur d'onde	<b>200-600 nm</b>
<b>Paramètres fixés à l'avance</b>	Slit excitation	<b>5,5 nm</b>
	Slit émission	<b>6 nm</b>
	Incrément	<b>1 nm</b>
	Concentration en hémoglobine	<b>3 <math>\mu</math>M</b>
<b>Paramètres testés</b>	Offset	<b>17 nm et 80 nm</b>
	Solvant	<b>DLA et Tampon phosphate</b>

#### II-1-1 Essais préliminaires avec le DLA (pH 10,5 $\pm$ 0,1)

Les spectres obtenus au terme de l'analyse en fluorescence EES des solutions standards (albumine et hémoglobine) dans le DLA en utilisant les valeurs d'offset de 17 nm et 80 nm sont présentés dans les figures ci-dessous.



**Figure 4:** Spectres de fluorescence EES des standards dans le DLA avec l'offset de 17 nm



**Figure 5:** Spectres de fluorescence EES des standards dans le DLA avec l'offset de 80 nm

Avec un offset de 17 nm, le spectre de l'albumine présente des bandes de fluorescence à 360 nm et 406 nm avec un petit épaulement à 484 nm. Sur les spectres de l'hémoglobine on observe quatre bandes à 360 nm, 406 nm, 484 nm et 538 nm. Le DLA présente un spectre d'allure identique à l'albumine à la seule différence qu'il ne présente pas le petit épaulement à 484 nm. Les bandes observées à 484 nm et 538 nm seraient donc caractéristiques des standards utilisés et particulièrement de l'hémoglobine pour laquelle ces bandes sont importantes.

Avec un offset de 80 nm, les spectres de l'hémoglobine présente des bandes de fluorescence à 440 nm et 518 nm avec un épaulement à 548 nm. Sur le spectre de l'albumine, une seule bande est observée à 427 nm avec un épaulement à 518 nm. Le DLA présente une large bande entre 410 et 440 nm et épaulement à 518 nm. Avec cet offset la bande caractéristique de l'hémoglobine pourrait être celle observée à 518 nm.

D'une façon générale, on remarque au vu des spectres obtenus que, l'hémoglobine présente des bandes de fluorescence à 484 nm et 538 nm (pour ce qui est de l'offset de 17 nm) et à 518 nm (avec un offset de 80 nm). L'albumine quant à elle présente des bandes caractéristiques à 360 nm et 406 nm (avec un offset de 17 nm) et 427 nm (pour un offset de 80 nm). Les signaux caractéristiques de la fluorescence de l'albumine semblent se confondre à ceux du DLA et sont difficilement distinguables (notamment avec un offset de 17 nm).

Les bandes observées sur les spectres de l'hémoglobine sont dues à des composés fluorescents présents dans sa structure. La littérature attribue la fluorescence de l'hémoglobine aux acides aminés aromatiques (principalement le tryptophane et accessoirement la tyrosine et la phénylalanine) et au groupement hémique ([Hegde et al., 2013](#); [De and Girigoswami, 2006](#)). La structure de l'hémoglobine de bovin renferme 6 résidus de tryptophanes, 10 de tyrosines, 34 de phénylalanines et 4 groupements hémiques. L'hémoglobine de porc quant à elle est constituée de 6 résidus de tryptophanes, 8 tyrosines, 30 phénylalanines et 4 groupements hémiques ([Adje, 2010](#)).

L'albumine de sérum bovin, bien que possédant aussi dans sa structure des acides aminés aromatiques (2 résidus de tryptophanes, 20 résidus de tyrosines et 27 résidus de phénylalanines), semble ne pas fluorescer aussi bien que l'hémoglobine dans le DLA. Deux hypothèses pourraient élucider cette observation.

La première serait que, les bandes de fluorescence observées sur les spectres de l'hémoglobine sont principalement dues aux groupements hémiques, les acides aminés aromatiques mis ensemble ne contribuant que de façon mineure à la fluorescence. L'albumine

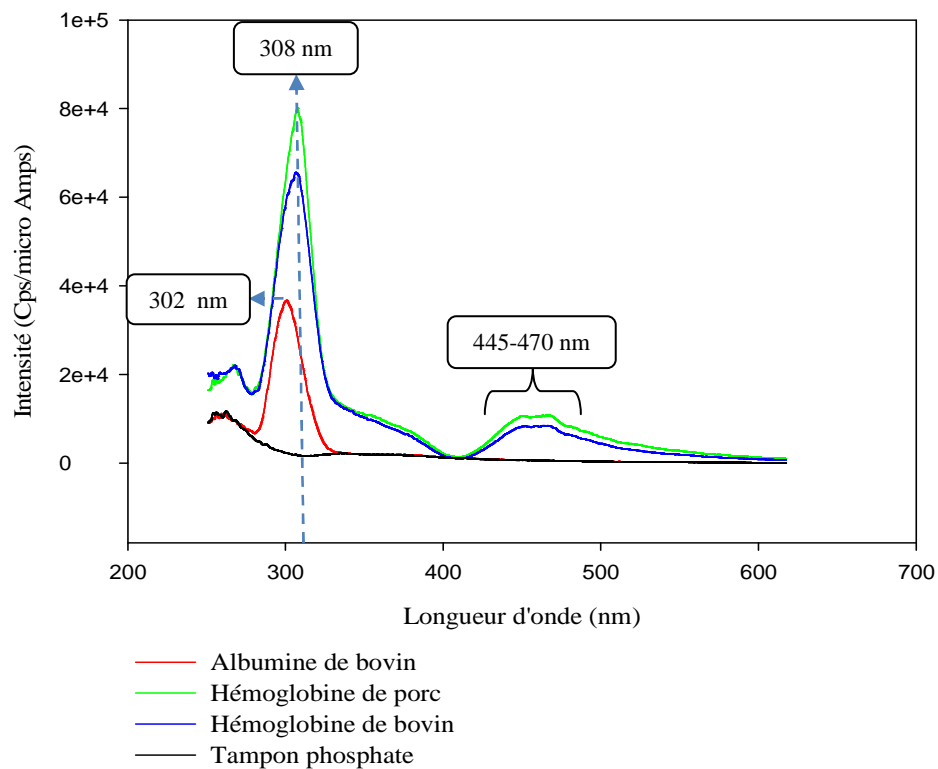
ne possédant pas de groupement hémique, cela pourrait expliquer pourquoi avec l'offset de 17 nm, elle ne présente pas de bande caractéristique mais simplement un épaulement à 484 nm. Cette hypothèse semble d'autant plus plausible dans la mesure où les bandes de fluorescence observées ne correspondent pas aux longueurs d'onde d'émissions maximales des acides aminés aromatiques présents dans l'hémoglobine et l'albumine. Selon la littérature, le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine émettent de façon maximale aux longueurs d'onde respectives de 350 nm, 303 nm et 282 nm (Ramanujam, 2000 ; Rodat, 2009).

La deuxième éventualité serait liée à l'influence du milieu, notamment le solvant sur les fluorophores. En effet, le solvant (DLA) dans lequel l'albumine est solubilisée contient en grande partie de l'urée 7 M (10,5 g pour 25 ml d'eau distillée) qui est un agent dénaturant pouvant conduire à la perte totale de la structure secondaire de l'albumine et partielle de celle de l'hémoglobine (González-Jiménez and Cortijo, 2002). Cette dénaturation par l'urée peut donc influencer la fluorescence de l'albumine tout comme celle de l'hémoglobine. En effet, la littérature renseigne que, l'ajout de l'urée à 6 M abaisse l'intensité de fluorescence de la solution d'albumine de plus 70 % mais amplifie à l'inverse celle de l'hémoglobine (Sułkowska et al., 2003; De and Girigoswami, 2006). Ces deux hypothèses pourraient expliquer pourquoi l'albumine semble ne pas aussi bien fluorescer que l'hémoglobine dans le DLA.

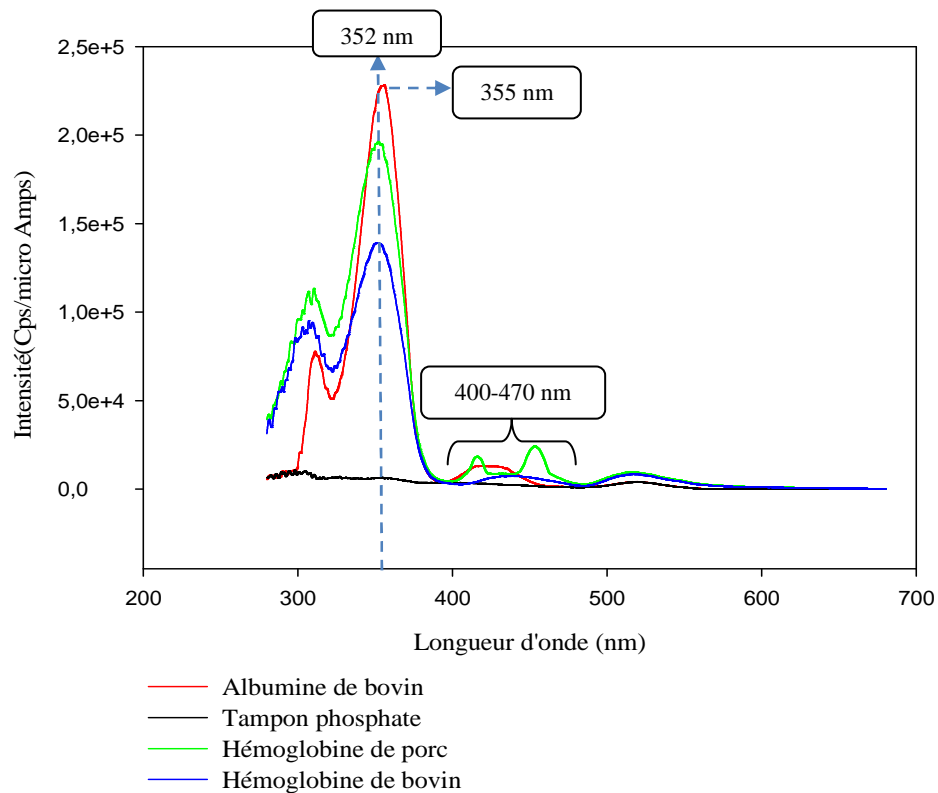
Au vu de ces résultats, l'offset de 17 nm semble plus adapté pour la détection de l'hémoglobine que l'offset de 80 nm. En effet, avec cet offset (17 nm) on observe deux bandes de fluorescence de l'hémoglobine à 484 nm et 538 nm sans influence du solvant (pas de bande ni d'épaulement du solvant à ces longueurs d'onde). Par contre avec l'offset de 80 nm, on observe un épaulement dû au solvant à 518 nm qui correspond à la bande de fluorescence de l'hémoglobine

## **II-1-2 Essais préliminaires avec le tampon phosphate (pH 7,2)**

Les mesures effectuées sur les mêmes standards en utilisant le tampon phosphate ont donné les spectres des figures suivantes.



**Figure 6:** Spectres de fluorescence EES des standards dans le tampon phosphate avec l'offset de 17 nm



**Figure 7:** Spectres de fluorescence EES des standards dans le tampon phosphate avec l'offset de 80 nm



Avec l'offset de 17 nm, l'albumine présente une bande de fluorescence à 302 nm tandis que les hémoglobines analysées fluorescent à 308 nm et présentent une faible bande entre 445 et 470 nm. La fluorescence observée avec cet offset pourrait être due aux résidus de tyrosines présents dans ces standards. En effet, les travaux de (Rodat, 2009) montrent que la tyrosine émet la lumière de façon maximale à la longueur d'onde de 303 nm.

Avec l'offset de 80 nm, les hémoglobines analysées fluorescent à 352 nm et l'albumine à 355 nm. On note aussi un chevauchement de bandes des trois standards entre 400 et 470 nm. Les bandes de fluorescence observées sur ces standards à 352 nm et 355 nm pourraient correspondre à la fluorescence des résidus de tryptophane. D'après (Ramanujam, 2000), la longueur d'onde d'émission maximale du tryptophane se situe à 350 nm.

Dans le tampon phosphate, les spectres obtenus avec l'offset de 17 nm nous semblent plus intéressants que ceux obtenus avec l'offset de 80 nm. En effet, avec l'offset de 17 nm l'albumine et l'hémoglobine présentent des bandes fluorescence à des longueurs d'onde bien distinctes sans chevauchement.

Au vu des résultats obtenus, le DLA et l'offset de 17 nm ont été retenus comme ceux qui répondent le mieux à l'objectif de ce travail qui est la détection de l'hémoglobine. La combinaison de ces deux facteurs permet de mettre en évidence des bandes fluorescence de l'hémoglobine à 484 nm et 538 nm.

Le tableau 4 résume les paramètres retenus pour la suite de ce travail. Ces conditions expérimentales seront appliquées sur les sous-produits dérivés du sang et les aliments pour animaux afin de vérifier si les mêmes signatures spectrales obtenues avec les standards pourraient être observées sur ces échantillons.

**Tableau 4:** Paramètres retenus pour les analyses en spectroscopie de fluorescence EES

<b>Plage de longueur d'onde</b>	200-600 nm
<b>Offset</b>	17 nm
<b>Slit excitation</b>	5,5 nm
<b>Slit émission</b>	6 nm
<b>Incrément</b>	1 nm
<b>Solvant</b>	DLA

## II-2 Analyses des échantillons par spectroscopie de fluorescence EES

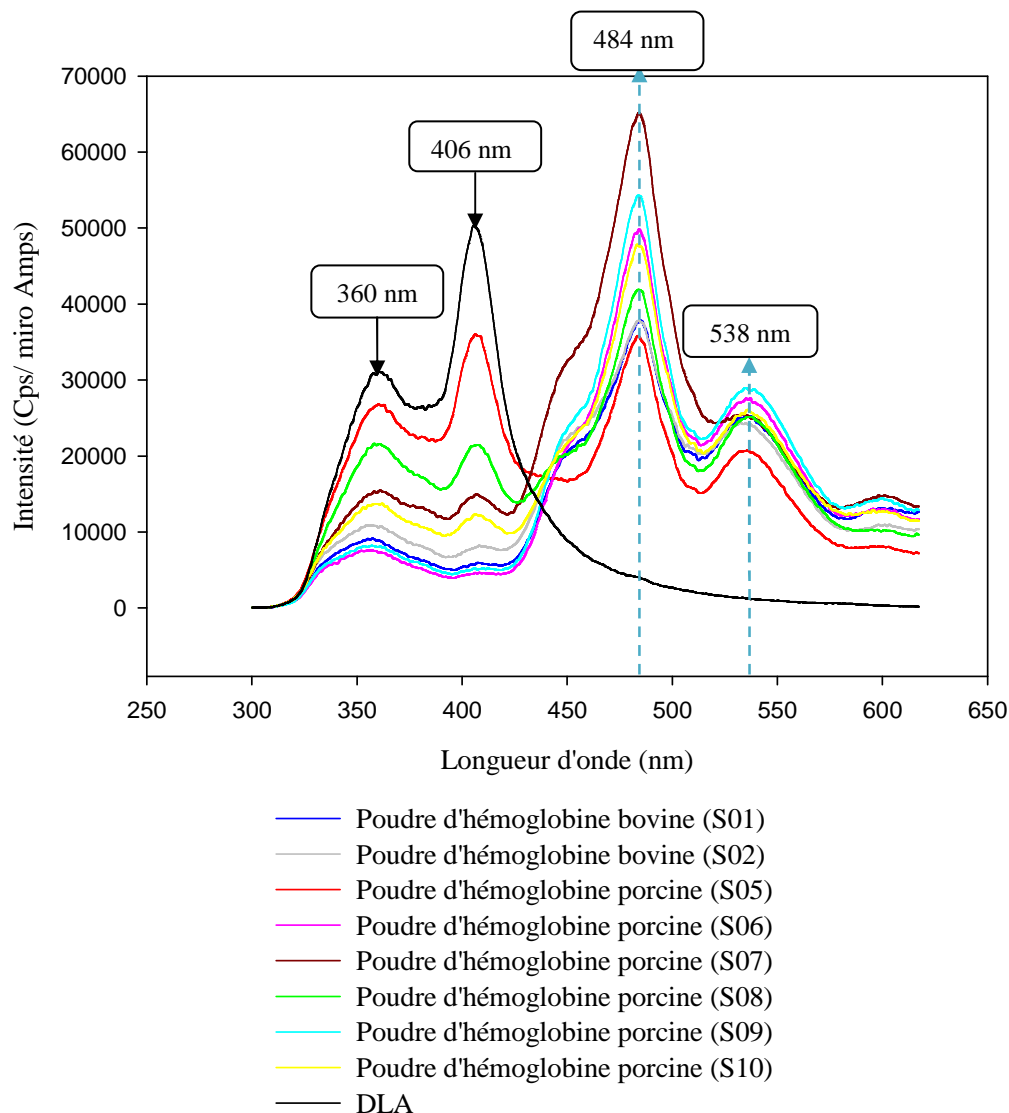
L'analyse des échantillons par spectroscopie de fluorescence EES s'est faite en diluant 20  $\mu$ l d'extrait de chaque échantillon dans 2,98 ml de DLA. Les paramètres utilisés pour cette analyse sont ceux présentés dans le tableau 4. Les résultats concernant l'extraction des protéines des différents échantillons sont répertoriés en annexe 5.

### II-2-1 Analyse des sous-produits dérivés du sang

Les analyses ont été réalisées sur les sous-produits (S01-S14) afin de vérifier si leurs signatures spectrales pouvaient être comparables à celles obtenues avec les standards. Pour ces échantillons, nous allons successivement présenter les spectres obtenus sur les poudres d'hémoglobine, les farines de sang et les poudres de plasma analysées.

#### II-2-1-1 Poudres d'hémoglobine (S01, S02, S05, S06, S07, S08, S9, S10)

La figure suivante présente les spectres obtenus sur les poudres d'hémoglobine analysées.

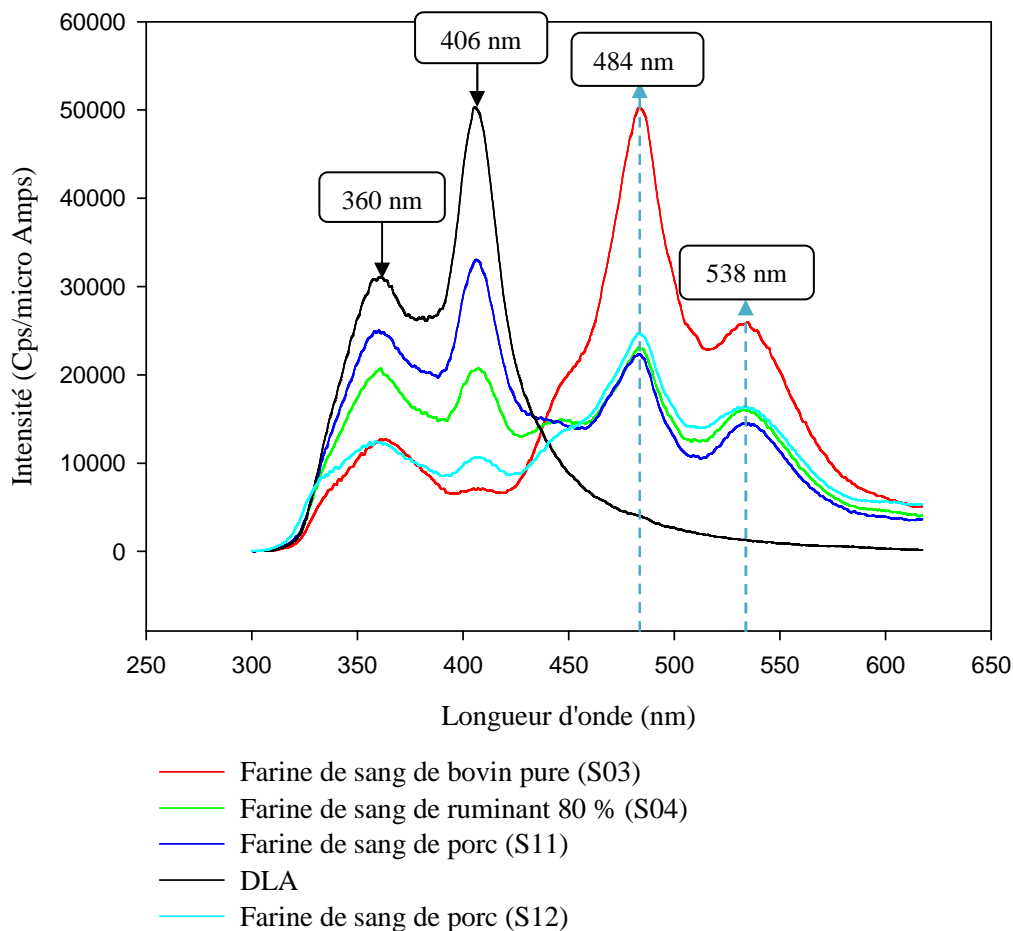


**Figure 8:** Spectres de fluorescence EES des poudres d'hémoglobine et du DLA

Sur cette figure on observe que toutes les poudres commerciales d'hémoglobine analysées ont la même signature spectrale que les solutions standards d'hémoglobine. Elles présentent toutes des bandes de fluorescence à 484 nm et 538 nm, indépendamment de l'espèce animale.

### II-2-1-2 Farines de sang (S03, S04, S11 et S12)

Après analyses des échantillons de farines de sang, nous avons superposé les spectres obtenus en plus du spectre du DLA dans la figure 9.

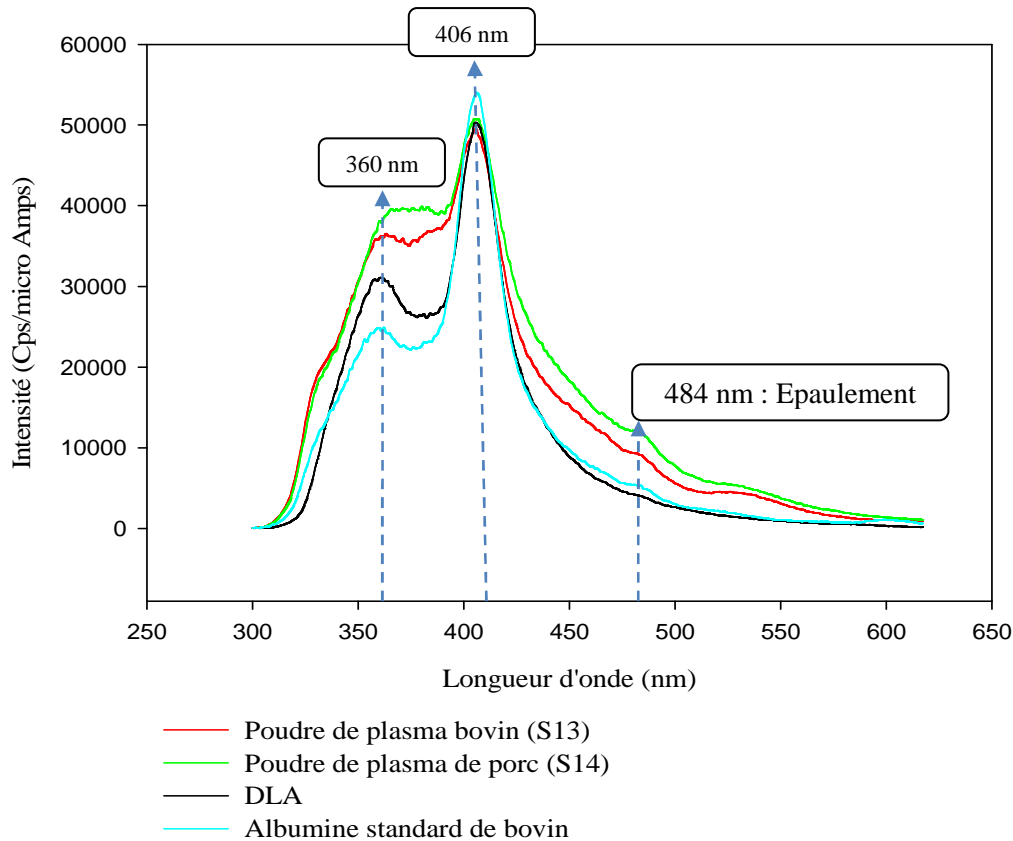


**Figure 9:** Spectres de fluorescence EES des farines de sang et du DLA

Les farines de sang issues de bovin, porc et « ruminant » présentent sur leurs spectres respectifs des bandes de fluorescence caractéristiques de l'hémoglobine à 484 nm et 538 nm. Ces bandes correspondent à celles obtenues avec les solutions standards d'hémoglobine. En comparaison aux autres échantillons, la farine de sang de bovin pure (S03) présente des bandes de fluorescence plus importantes. Sa teneur en hémoglobine serait plus importante que celle des autres échantillons.

### II-2-1-3 Poudres de plasma (S13 et S14)

Les analyses effectuées avec les poudres de plasma de bovin et de porc ont donné les spectres de la figure 10.



**Figure 10:** Spectres de fluorescence EES des poudres de plasma, du DLA et de l'albumine standard

On observe sur cette figure que les spectres des poudres de plasma (bovin et porc) présentent deux bandes de fluorescence à 360 nm et 406 nm avec un épaulement à 484 nm. Ces caractéristiques spectrales sont comparables à celles de l'albumine de bovin standard. Le plasma de porc présente toutefois une singularité : il présente une large bande entre 360 et 383 nm.

Après analyses des sous-produits dérivés du sang nous avons relevé que :

- tous les sous-produits contenant de la poudre d'hémoglobine (bovin ou de porc) présentent les mêmes caractéristiques spectrales que les solutions standards d'hémoglobine ;
- les échantillons contenant les farines de sang présentent tous, des signatures spectrales caractéristiques de l'hémoglobine à 484 nm et 538 nm.

- le spectre des échantillons contenant des poudres de plasma sont identique à celui de l'albumine de bovin standard.

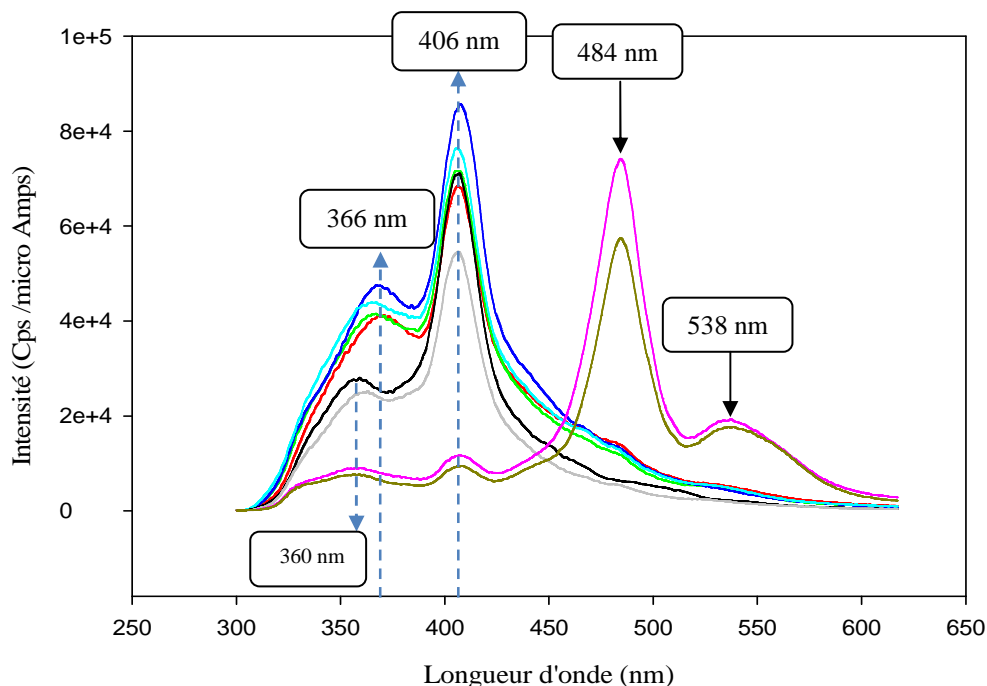
## II-2-2 Analyse des aliments pour animaux

Nous avons réalisé les analyses sur les aliments pour animaux (E01-E18) afin de vérifier s'il était possible de détecter l'hémoglobine par spectroscopie de fluorescence EES dans une matrice réelle. Elles ont été réalisées en utilisant les mêmes conditions et paramètres que ceux utilisés pour les sous-produits dérivés du sang (cfr tableau 4).

Pour ces échantillons, nous allons présenter dans l'ordre, les résultats obtenus avec les aliments contenant des produits sanguins, des poudres d'hémoglobine, des farines de sang et finir par les aliments ne contenant pas de produits dérivés du sang. Les spectres des standards ainsi que celui du DLA ont été ajoutés aux graphiques pour une meilleure comparaison.

### II-2-2-1 Aliments contenant des produits sanguins (E1, E2, E3 et E4)

La figure ci-dessous présente les spectres des quatre aliments pour porc analysés par spectroscopie de fluorescence EES.



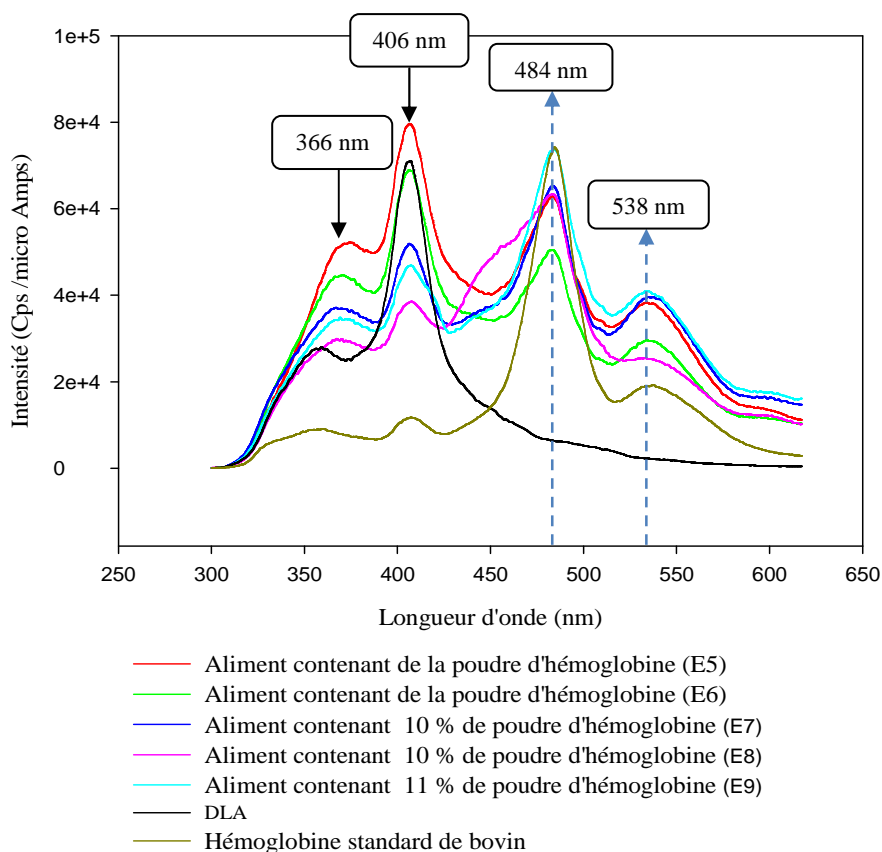
- Aliment contenant des produits sanguins (E1)
- Aliment contenant des produits sanguins et farine de poisson (E2)
- Aliment contenant des produits sanguins et du petit lait (E3)
- Aliment contenant du plasma, petit lait et graisse de porc (E4)
- DLA
- Albumine standard de bovin
- Hémoglobine standard de porc
- Hémoglobine standard de bovin

**Figure 11:** Spectres de fluorescence EES des aliments contenant des produits sanguins, du DLA et des standards.

Les spectres des aliments pour porcs (E1-E4) présentent des bandes de fluorescence à 366 nm et 406 nm. Ces bandes ne correspondent pas à celles observées sur les solutions standards hémoglobine. L'absence de bande à 484 nm et 538 nm, caractéristiques de l'hémoglobine dans les mêmes conditions serait une indication de ce que ces aliments n'en contiendraient pas ou que les quantités d'hémoglobine présentes seraient inférieures au seuil de détection. Au vu des pratiques actuelles en matière d'alimentation animale, ce résultat n'est pas illogique. Les produits sanguins issus de non ruminants utilisés dans la formulation des aliments pour porcs sont essentiellement des poudres de plasma. Elles sont utilisées pour leur effet bénéfique sur le système immunitaire de l'animal, surtout en période de sevrage (Kats et al., 1994 ; Lallès et al., 2009).

### II-2-2-2 Aliments contenant des poudres d'hémoglobine (E5, E6, E7, E8 et E9)

Après analyses des aliments pour poisson contenant des poudres d'hémoglobine, nous avons obtenu les spectres présentés dans la figure suivante.



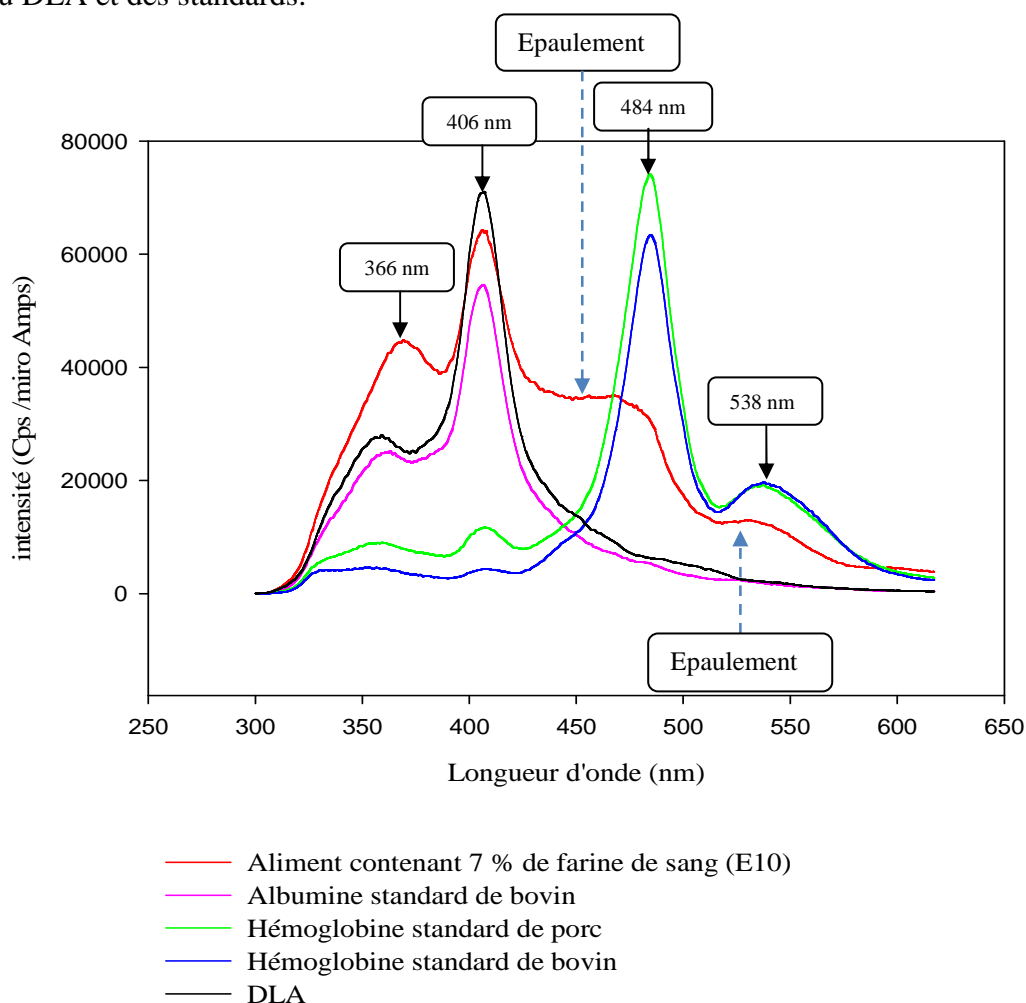
**Figure 12:** Spectres de fluorescence EES des aliments contenant des poudres d'hémoglobine et de l'hémoglobine standard de bovin

Les aliments pour poissons contenant des poudres d'hémoglobine présentent tous, à l'exception d'un échantillon (E8), des signatures spectrales identiques aux standards des poudres hémoglobine. Cette observation est une indication de ce que la spectroscopie de fluorescence EES peut détecter de l'hémoglobine dans les aliments pour animaux.

L'échantillon (E8), bien que contenant 10 % d'hémoglobine présente un spectre différent des autres échantillons. Il ne présente pas de bande de fluorescence à 538 nm, mais plutôt un épaulement. L'aire sous la bande à 484 nm est également plus étendue comparée aux autres échantillons. La contamination de cet échantillon par d'autres produits sanguins ou une mauvaise extraction pourrait être à l'origine de cette différence.

### II-2-2-3 Aliment contenant des farines de sang (E10)

Sur la figure qui suit, nous avons superposé les spectres de l'échantillon contenant des farines de sang, du DLA et des standards.

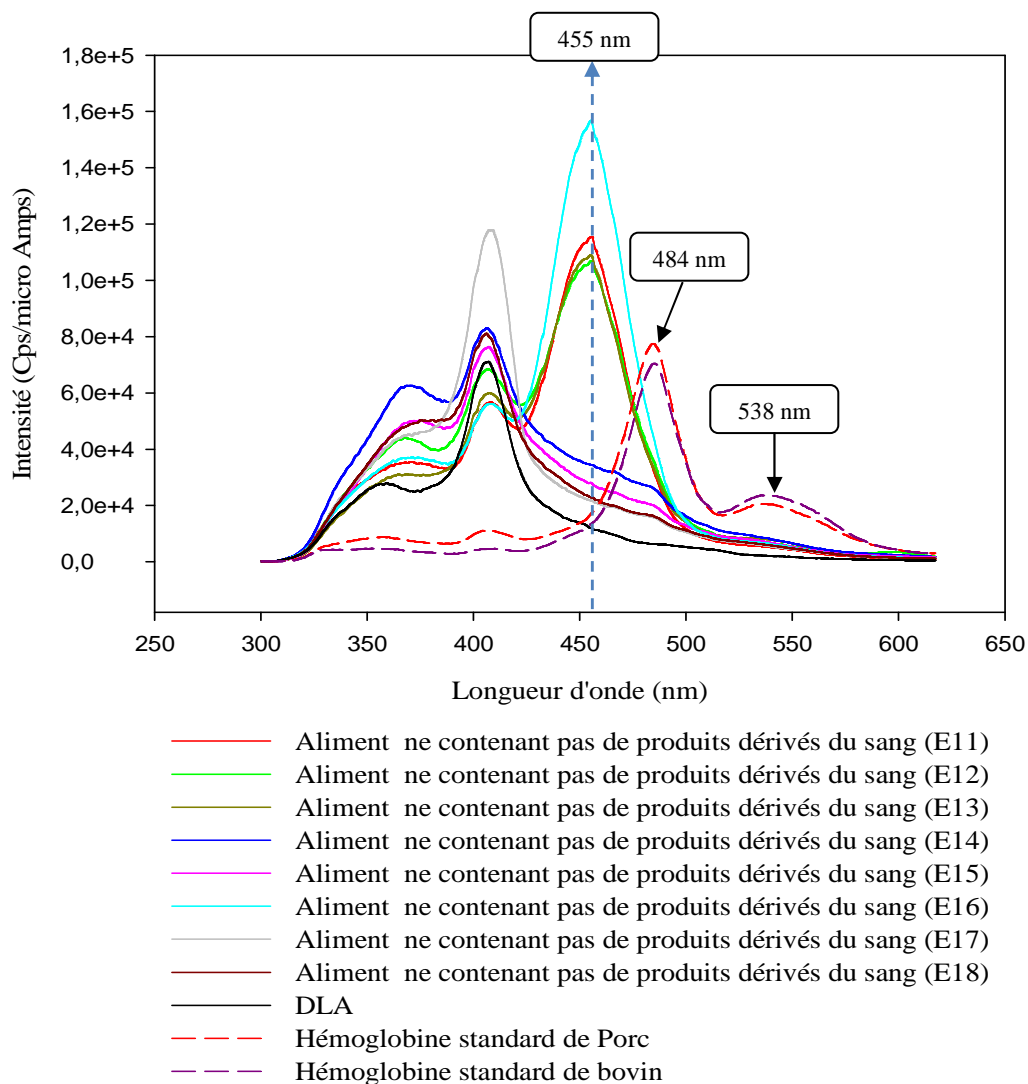


**Figure 13:** Spectres de fluorescence EES de l'aliment contenant des farines de sang, du DLA et des standards

Sur cette figure on observe que le spectre de l'échantillon contenant des farines de sang est différent des spectres des solutions standards d'hémoglobine. Il présente en effet deux épaulements autour des longueurs d'onde de fluorescence des solutions standards d'hémoglobine. L'allure de ce spectre pourrait s'expliquer par le fait les farines de sang contenues dans cet aliment sont formulées à partir du sang entier. L'hémoglobine ne constituant qu'une fraction du sang, les quantités d'hémoglobine présentes dans cet aliment pourraient être trop faibles pour être détectées convenablement. D'où la présence des épaulements et non des bandes.

#### II-2-2-4 Aliments ne contenant pas de produits dérivés du sang (E11-E18)

Les analyses effectuées sur les aliments pour poissons ne contenant pas de produits dérivés du sang ont donné la représentation suivante.



**Figure 14:** Spectres de fluorescence EES des aliments ne contenant pas de produits dérivés du sang et des standards.

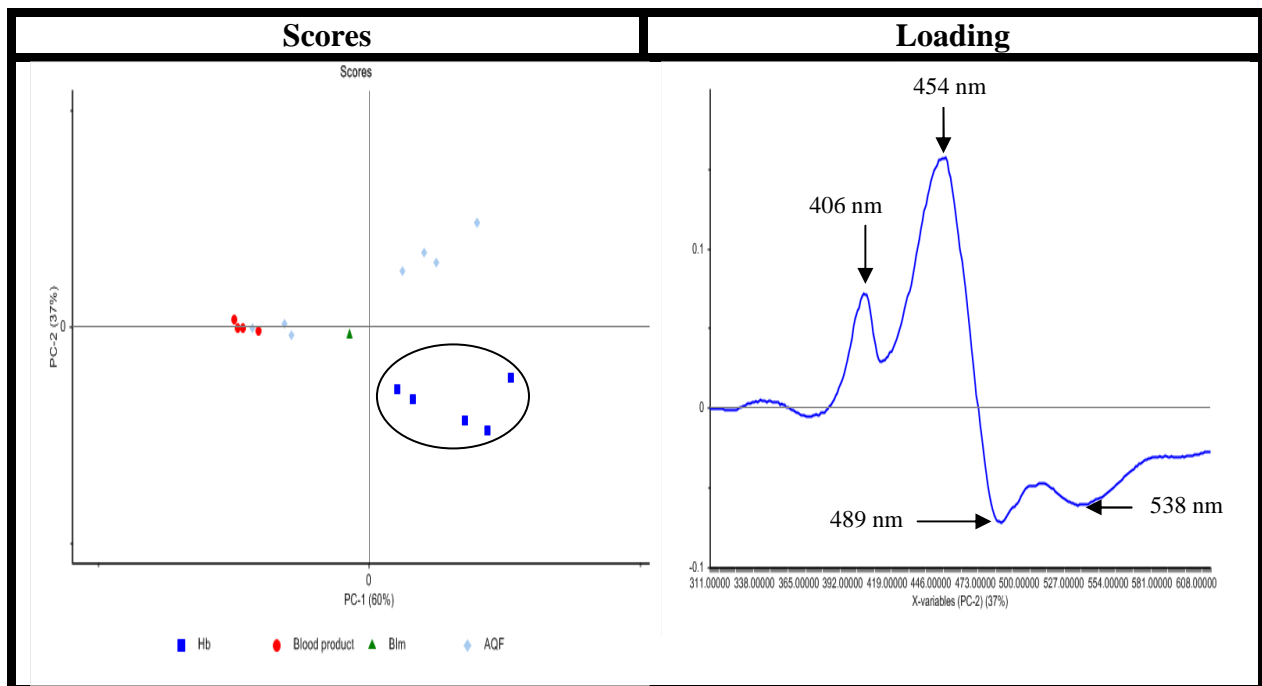


A l'observation, on constate qu'aucun des échantillons analysés ne présente de bandes aux longueurs d'onde caractéristiques de l'hémoglobine (484 nm et 538 nm). Ce qui pourrait signifier qu'ils ne contiennent pas d'hémoglobine ou alors que les quantités présentes sont inférieures au seuil de détection. Toutefois, quatre aliments de ce groupe (E11, E12, E13 et E16) se distinguent des autres et présentent une bande de fluorescence à 455 nm. Cela montre que ces échantillons n'ont pas tous la même composition. Ceux qui présentent une bande d'absorption à 455 nm contiendraient des composés fluorescents autres que ceux de l'hémoglobine.

En somme, des 18 aliments analysés, ceux qui contenaient de l'hémoglobine ont présenté des caractéristiques spectrales semblables aux solutions standards d'hémoglobine sauf un seul échantillon qui avait un profil légèrement modifié (E8). Cela prouve que la spectroscopie de fluorescence en mode synchrone pourrait être utilisée pour la détection de l'hémoglobine dans les aliments pour animaux.

### II-3 Analyse en Composante Principale effectuée sur les spectres de fluorescence EES des aliments pour animaux

L'analyse en composante principale appliquée aux spectres de fluorescence EES de l'ensemble des aliments pour animaux après normalisation de surface a donné la projection suivante :



**Figure 15:** Graphe de l'ACP appliquée aux spectres de fluorescence EES des aliments pour animaux et loading associés à la deuxième composante.

Hb : aliment contenant de l'hémoglobine ; Blm : aliment contenant des farines de sang ; Blood products : aliments contenant des produits sanguins ; AQF=Aliments ne contenant pas de produits dérivés sang

Sur cette figure on observe qu'il est possible de discriminer les 5 aliments contenant l'hémoglobine des autres qui n'en contiennent pas. Cette différenciation se fait suivant la deuxième composante (PC-2). Les échantillons contenant l'hémoglobine se retrouvent dans la partie négative de cette composante. Ceux constitués des produits sanguins, farines de sang et certains ne contenant pas de produits dérivés du sang se situent au centre et sont plutôt séparés via la première composante du reste des échantillons.

L'interprétation du profil spectral associé à la deuxième composante permet d'identifier deux longueurs d'onde discriminantes de l'hémoglobine à 489 nm et 538 nm. Néanmoins, en comparaison avec ce qui est observé sur les spectres bruts des solutions standards hémoglobine (sur lesquelles on avait deux bandes à 484 nm et 538 nm), nous constatons un shift de 5 nm sur la première longueur d'onde discriminante. Ce shift pourrait être expliqué par un effet de la matrice dans laquelle l'hémoglobine se trouve, à savoir les aliments. Une interaction entre ces derniers et l'hémoglobine aurait pu résulter en une légère perte d'énergie, d'où le shift du pic à des longueurs d'onde plus grandes.

La bande située dans la partie positive de ce profil spectral à 454 nm est caractéristique de certains aliments ne contenant pas de produits dérivés du sang. Le rapprochement avec les spectres de tous les aliments ne contenant pas de produits dérivés de sang permet de déduire qu'elle correspond aux échantillons E11, E12, E13 et E16 pour lesquels on observait une fluorescence à 455 nm.

De la même façon, la bande qui apparaît à 406 nm, dans la partie positive de cette composante est par comparaison aux spectres bruts, caractéristique de la fluorescence du DLA.

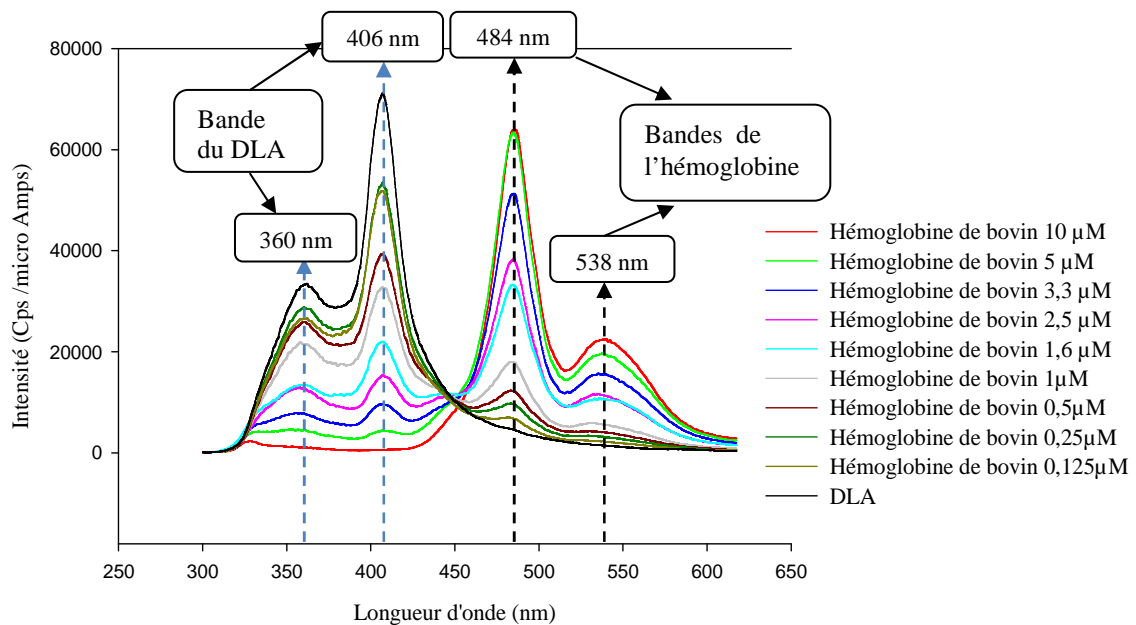
Compte tenu du nombre réduit d'échantillons utilisés pour cette analyse, il faudrait rester prudent par rapport aux observations de la figure 15 et refaire cette analyse sur un nombre plus important d'échantillons. Néanmoins, cet essai a toute fois démontré la pertinence des signaux d'hémoglobine pour caractériser les aliments

#### **II-4 Estimation de la concentration en hémoglobine.**

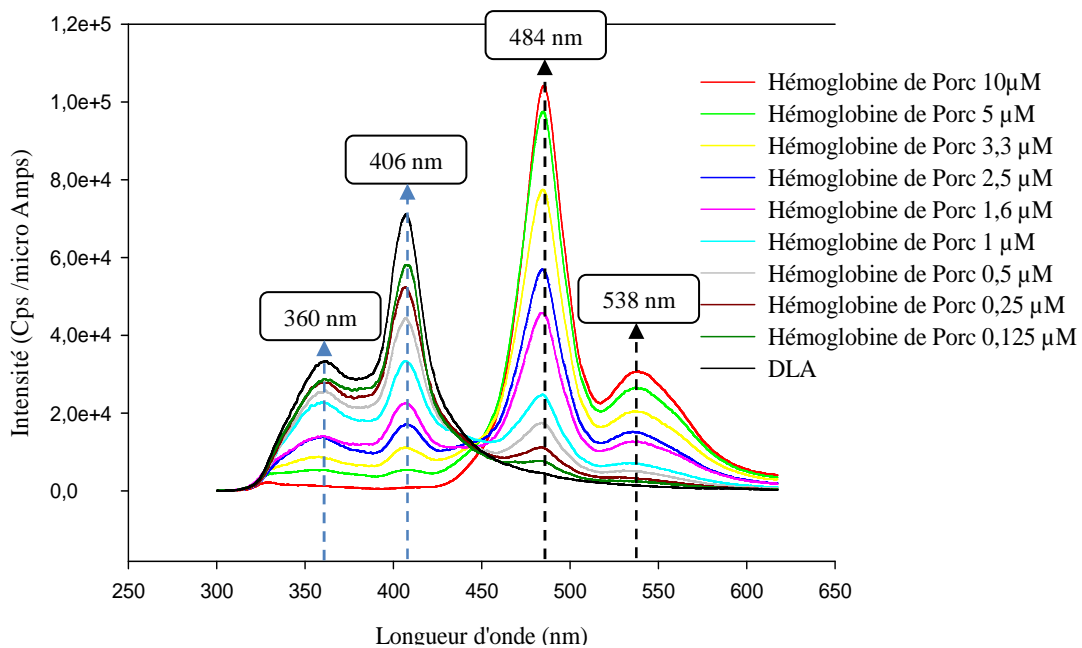
Afin de vérifier si il serait possible d'estimer la concentration d'hémoglobine dans les 5 aliments qui en contiennent, des solutions standards d'hémoglobine (porc et de bovin) à différentes concentrations ont été préparées. Les intensités de fluorescence mesurées à 484 nm et les aires sous la bande des spectres bruts à cette même longueur d'onde ont permis l'établissement des droites d'étalonnages (intensité et aire en fonction de la concentration).

Sur les spectres obtenus (figures 16 et 17), on observe qu'à concentration égale, l'intensité de fluorescence de la solution d'hémoglobine de porc est plus élevée que celle de bovin. On note

également une augmentation de l'intensité de la fluorescence avec la baisse de la concentration en hémoglobine aux longueurs d'onde caractéristiques du DLA (360 nm et 406 nm). Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'aux fortes concentrations en hémoglobine, les fonctions du DLA qui fluorescent se complexent avec l'hémoglobine inhibant leur fluorescence.



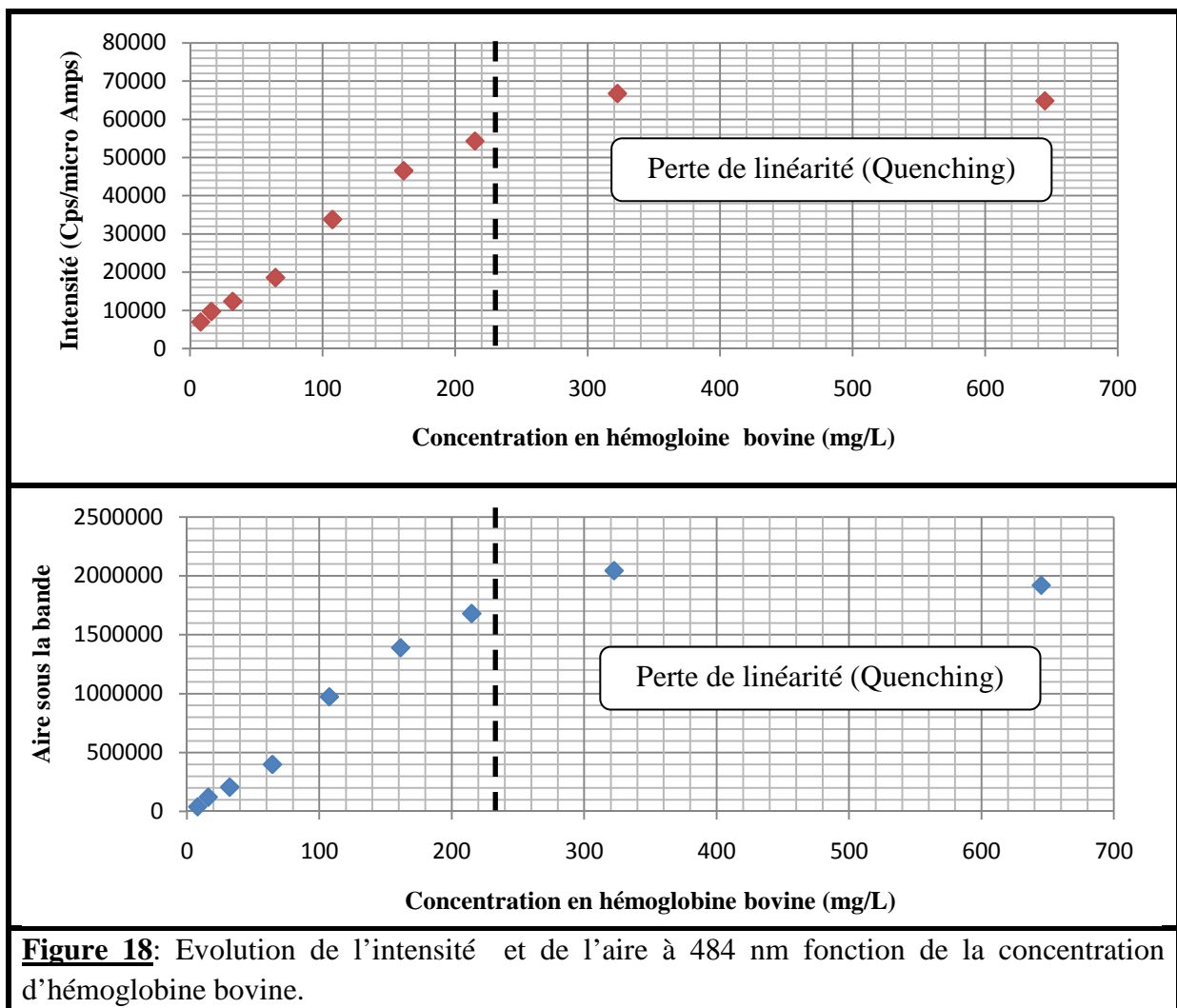
**Figure 16:** Spectres de fluorescence EES des solutions standards d'hémoglobine de bovin



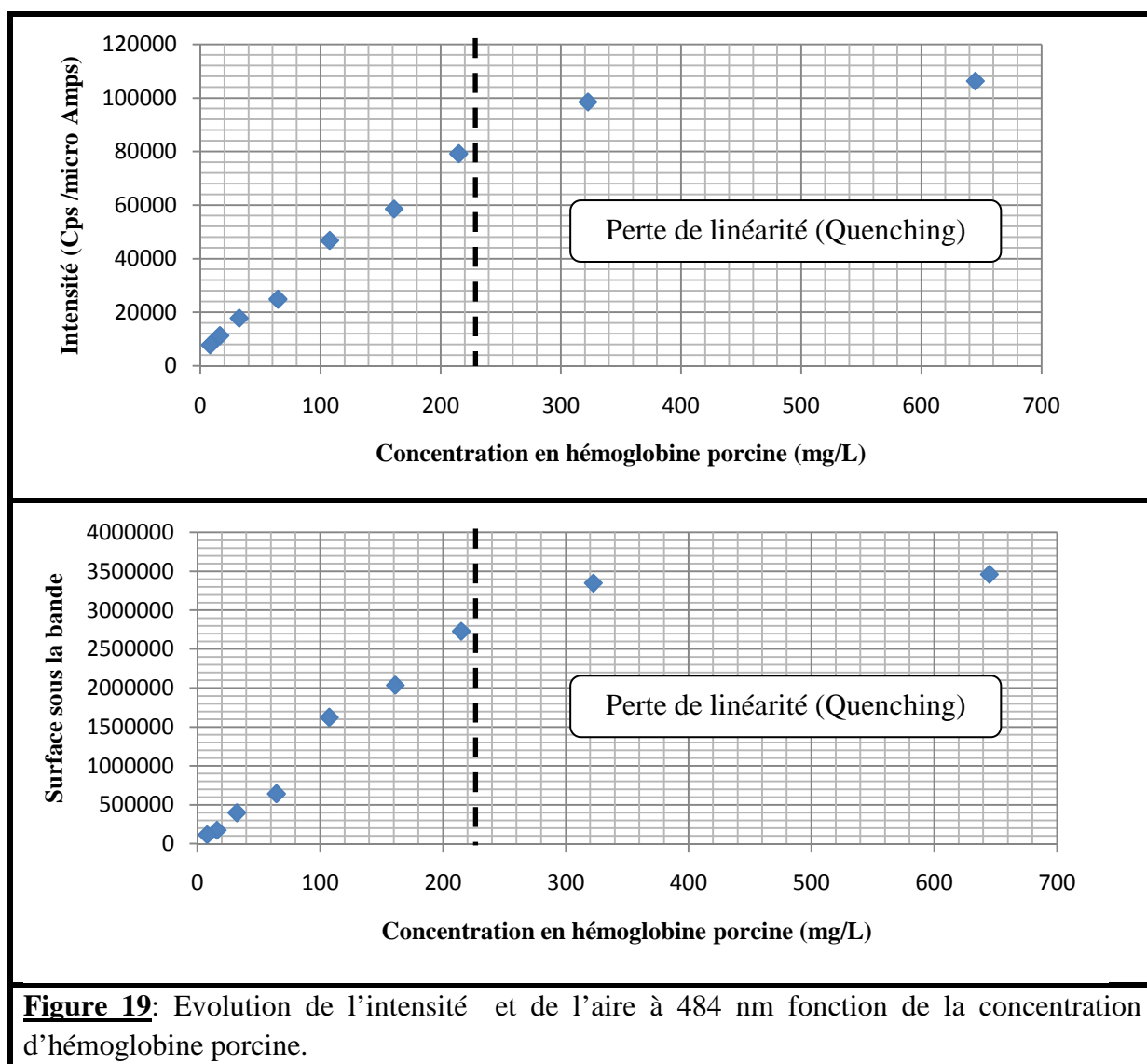
**Figure 17:** Spectres de fluorescence EES des solutions standards d'hémoglobine de porc

On observe aussi qu'aux longueurs d'onde correspondantes à la fluorescence de l'hémoglobine (484 nm et 538 nm), l'intensité s'accroît avec l'augmentation de la concentration de cette dernière. Cela se traduit par une linéarité entre l'intensité de fluorescence et la concentration en hémoglobine. Toutefois, cette linéarité n'est valable que pour des concentrations inférieures ou égales à 3,3  $\mu\text{M}$  (215 mg/L). Cette perte de linéarité pourrait s'expliquer par un quenching (extinction) qui est un phénomène d'inhibition conduisant à la décroissance de la fluorescence au profit d'autres phénomènes physiques. En effet, aux fortes concentrations, l'augmentation des collisions entre les fluorophores excités et les autres molécules en solution entraîne la désactivation des fluorophores et précipite leur retour à l'état fondamental. Cela conduit à des pertes d'énergie non radiatives et donc une baisse de la fluorescence (Lakowicz, 2006).

Les figures suivantes, obtenues en considérant l'intensité et l'aire sous la bande à 484 nm donnent une illustration du phénomène de quenching.



**Figure 18:** Evolution de l'intensité et de l'aire à 484 nm fonction de la concentration d'hémoglobine bovine.



**Figure 19:** Evolution de l'intensité et de l'aire à 484 nm fonction de la concentration d'hémoglobine porcine.

Les droites d'étalonnages (cfr annexe 6 et 7) établies sur les parties linéaires des figures 18 et 19 ont permis de donner une estimation de la teneur en hémoglobine dans les échantillons.

A l'observation de ces valeurs (tableau 5), on relève que, pour une même espèce animale, les valeurs de concentrations obtenues avec les intensités sont différentes de celles obtenues avec les aires. L'estimation par l'intensité donne systématiquement des valeurs plus élevées, sauf pour un seul échantillon (E8). Cet échantillon s'est démarqué des autres en présentant une surface sous la bande anormalement élevée. Les méthodes semblent ne pas avoir la même précision.

**Tableau 5:** Estimation de la teneur en hémoglobine des extraits (mg/l)

Echantillon	Teneur en hémoglobine bovine		Teneur en hémoglobine porcine	
	par :		par :	
	l'intensité	l'aire	l'intensité	l'aire
E5	200,50	144,44	124,52	91,63
E6	174,38	117,68	108,30	74,43
E7	241,46	206,22	149,96	131,33
E8	240,57	420,95	149,40	269,32
E9	268,34	249,54	166,65	159,17

Sur un plan pratique, l'approche utilisant les intensités nous semble plus adaptée en comparaison à celle qui se base sur les aires. En effet, pour des faibles concentrations, la délimitation de l'aire sous la bande devient difficile et le risque d'erreur est plus élevé.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au terme de ce travail dont l'objectif était la détection de l'hémoglobine dans les aliments pour animaux par spectroscopie de fluorescence, nous avons observé que le DLA et la valeur d'offset de 17 nm fournissent les informations spectrales les plus intéressantes pour la mise en évidence de l'hémoglobine. La combinaison DLA-offset de 17 nm permet en effet de révéler des bandes de fluorescence de l'hémoglobine dans les aliments pour animaux à 484 nm et 538 nm.

L'Analyse en Composante Principale appliquée aux données spectrales issues des aliments pour animaux analysés montre qu'il est possible de discriminer ceux qui contiennent l'hémoglobine de ceux qui n'en contiennent pas.

Toutefois, ce travail n'a porté que sur un nombre réduit d'échantillons (18), et nécessite que ce travail soit continué. Pour la suite, il conviendrait de réaliser les mêmes études sur nombre plus important d'échantillon afin d'évaluer son réel potentiel à discriminer les échantillons comportant de l'hémoglobine de ceux qui n'en contiennent pas.

L'approche quantitative devra également être améliorée en utilisant des solutions standards de concentration plus proches que celles utilisées afin d'établir des équations plus précises pouvant mieux estimer l'hémoglobine.

Ces travaux complémentaires devront d'abord être réalisés et se révéler concluants avant qu'elle ne puisse être présentée comme une technique apte à détecter l'hémoglobine dans les matrices alimentaires réelles. Dans ce, cas une combinaison éventuelle avec la spectrométrie de masse pourrait être envisagée dans la détection des PATs.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) **Abbas, O.** (2007). Vieillesse simulé ou naturel de la matière organique. Apport du traitement chimométrique des données spectroscopiques. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'Université Paul CEZANNE Aix-Marseille III.
- 2) **Adje, Y. E.** (2010). Hydrolyse ménagée de l'hémoglobine bovine par la pepsine porcine en mélanges hydro-alcoolique et obtention d'une nouvelle famille de peptides anti microbiens. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade du Docteur en sciences. Université de Lille 1.
- 3) **Baeten, V.** (2015). Contrôle technologique de qualité, module V : chimométrie. Support de cours, Université Catholique de Louvain-la-Neuve, version 2015-2016.
- 4) **Barati, A., Shamsipur, M., Abdollahi, A.** (2015). Hemoglobin detection using carbon dots as a fluorescence probe. *Biosensors and Bioelectronics* 71, 470–475.
- 5) **De, S., Girigoswami, A.** (2006). A fluorimetric and circular dichroism study of hemoglobin—Effect of pH and anionic amphiphiles. *J. Colloid Interface Sci.* 296, 324–331.
- 6) **Fumière, O., Marien, A., Fernández Pierna, J. A., Baeten, V., Berben, G.** (2010). Development of a real-time PCR protocol for the species origin confirmation of isolated animal particles detected by NIRM. *Food Addit. Contam.* 27, 1118–1127.
- 7) **González-Jiménez, J., Cortijo, M.** (2002). Urea-induced denaturation of human serum albumin labeled with acrylodan. *Journal of Protein Chemistry* 21, 75-79.
- 8) **Grigoryan, K. R., Sargsyan, L. S.** (2014). Denaturation of hemoglobin in the presence of tannic acid. *Chemistry and Biology* 1, 22-27.
- 9) **Hedge, A. H., Sandhya, B., Seetharamappa, J.** (2013). Investigations to reveal the nature of interactions of human hemoglobin with curcumin using optical techniques. *International Journal of Biological Macromolecules* 52, 133– 138.
- 10) **Hirsch, R. E.** (2003). Hemoglobin fluorescence, *in: Methods Mol. Med.* 82, 133-54.
- 11) **Hosseinzadeh, R., Moosavi-Movahedi, A. A.** (2016). Human hemoglobin structural and functional alterations and heme degradation upon interaction with benzene: A spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 157, 41–49.
- 12) **Kats, L. J., Nelssen, J. L., Tokach, M. D., Goodband, R. D., Hansen, J. A., & Laurin, J. L.** (1994). The effect of spray-dried porcine plasma on growth performance in the early-weaned pig. *Journal of Animal Science*, 72(8), 2075–2081.
- 13) **Lakowicz, J. R.** (2006). Principles of fluorescence spectroscopy; 3rd edition 2006 Springer



- 14) **Lallès, J. P., Bosi, P., Janczyk, P., Koopmans, S. J., & Torrallardona, D.** (2009). Impact of bioactive substances on the gastrointestinal tract and performance of weaned piglets: A review. *Animal*, 3(12), 1625–1643.
- 15) **Lecrenier, M. C., Marbaix, H., Dieu, M., Veys, P., Saegerman, C., Reas, M., Baeten, V.** (2016). Identification of specific bovine blood biomarkers with a non-targeted approach using HPLC ESI tandem mass spectrometry. *Food Chem* 231,417-424.
- 16) **Marbaix, H., Budinger, D., Dieu, M., Fumière, O., Gillard, N., Delahaut, P., Mauro, S., Raes, M.** (2016). Identification of Proteins and Peptide Biomarkers for Detecting Banned Processed Animal Proteins (PAPs) in Meat and Bone Meal by Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 64, 2405–2414.
- 17) **Pang, S., Liu, S., Su, X.** (2014). A novel fluorescence assay for the detection of hemoglobin based on the G-quadruplex/hemin complex. *Talanta* 118, 118–122.
- 18) **Peters, T. Jr.** (1995). *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Academic Press.
- 19) **Plouvier, B. M., Baeten, V., Maudoux, J. P., Vanopdenbosch, E., Berkvens, D., Degand, G., Saegerman, C.** (2012). Détection des protéines animales transformées: expérience et perspectives européennes. *Rev Sci Tech Int Epizoot* 31, 1011–1031.
- 20) **Ramanujam, N.** (2000). Fluorescence Spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia*. 2, 89-117.
- 21) **Rodat, O.** (2009). *Mise au point d'un système CE-LIF intégré et application à l'analyse de Biomolécules*. Thèse en vue de l'obtention du doctorat de l'Université de Toulouse.
- 22) **Sułkowska, A., Bojko, B., Równicka, J., Sułkowski, W.** (2003). Effect of urea on serum albumin complex with antithyroid drugs: fluorescence study. *Journal of molecular structure*. Volume 651-653, P 237-243.
- 23) **Union Européenne.** (2013). Règlement (UE) n° 51/2013 du 16 janvier 2013 modifiant le règlement (CE) n°152/2009 en ce qui concerne les méthodes d'analyse applicables en matière d'identification des constituants d'origine animale pour le contrôle officiel des aliments pour animaux. *Journal officiel des communautés européennes* **L 20**, 33-43.

## ANNEXES

### Annexe 1: Composition des échantillons utilisés

Echantillon	Type d'aliment	Composition
E1	Aliment pour porc contenant des produits sanguins	Maïs, son de blé, pellicule de soja, aliment de gluten de blé, mélasse de betterave, carbonate de calcium, aliment de gluten de maïs, chlorure de sodium
E2	Aliment pour porc contenant des produits sanguins et farine de poisson	Maïs, dextrose, protéine de soja, concentré, farine de poisson (5%), le blé, plasma porcin (3%), pré-mélange, carbonate de calcium, phosphate dicalcique, acides aminés, le sel
E3	Aliment pour porc contenant des produits sanguins et le petit lait	Graines de soja toastées, lactoserum en poudre, produits de biscuiterie, blé, Avoine, farines à base de blé, blé floconné, maïs floconné, huile de colza, fructose, produits sanguins, dextrose, protéines de pomme de terre, huile de palme, lactose, lait en poudre, levure inactivée, carbonate de calcium, huile de coprah, huile de poisson, phosphate monocalcique, caséine, mono et diglycérides d'acides gras alimentaires.
E4	Aliment pour porc contenant du plasma, petit lait et graisse de porc	Blé extrudé, blé, maïs extrudé, matière grasse de soja, poudre de lactosérum (5,7%), farine de poisson (4%), farine de soja, le plasma porcin (2%), l'huile de soja, concentré de protéines de soja, hydrolysate de l'intestin de porc, lactosérum en poudre mélangé de graisse (lard) (1%), phosphate monocalcique, pré-mélange, antibiotiques, acides aminés, du carbonate de calcium, pré-mélange de zinc, liant de mycotoxines, arômes, sel
E5	Aliment pour poisson contenant des poudres d'hémoglobine	
E6	Aliment pour poisson contenant des poudres d'hémoglobine	
E7	Aliment pour poisson contenant 10 % de poudre d'hémoglobine	Acides aminés, féverole, farine de poisson, huile de poisson, l'hémoglobine (10%), l'huile de lin, autres micro-ingrédients, vitamines pré mélangées, farine de soja, huile de soja, concentré de soja, farine de tournesol, blé, gluten de blé
E8	Aliment pour poisson contenant 10 % de poudre d'hémoglobine	Drêches de distillerie, farine de poisson, huile de poisson, protéine de farine de guar, hémoglobine (10%), l'huile de lin, vitamines, colza, farine de soja, huile de soja, farine de tournesol, blé, gluten de blé
E9	Aliment pour poisson contenant 11 % de poudre d'hémoglobine	Huile de colza, protéines de soja, blé, farine de poisson, hémoglobine (11%), huile de poisson, (5%), féveroles, du gluten de blé, soja grillées, mono phosphate de calcium, méthionine, rovimix (Vitamines), Barox (antiox), ethoxyguin
E10	Aliment pour poisson contenant 7 % de farine de sang	farine de poisson, farines de thon, le recyclage (10%), l'huile de colza, mélange de vitamines et de minéraux, farines de sang séchés (7%), tourteau de soja, gluten de maïs, tourteau de colza, pois de grande culture, l'huile de poisson, mono phosphate de calcium, méthionine

E11	Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	Protéine de soja, l'huile de colza, blé, l'huile de poisson, farine de poisson, farine de graines de tournesol, de féverole, de gluten de blé, du phosphate d'ammonium
E12	Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	Farine de soja, blé, farine de poisson, graines de tournesol, maïs, de gluten, Arôme autorisés, l'huile de poisson, l'huile de colza, les vitamines, phosphate d'ammonium, anti-oxydant et anti-fongiques autorisés, les levures, les minéraux, les algues, bétaine, l'astaxanthine
E13	Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	La farine de poisson, huile de poisson, de tournesol, blé, farine de soja, féveroles, gluten de maïs, drêches de distillerie sombres, huile végétale, levures et les produits similaires, la farine de grains.
E14	Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	farine de poisson , faines de thon , le recyclage (7 % ), l'huile de colza , mélange de vitamines et de minéraux, tourteau de soja , gluten de blé , tourteau de colza , tourteau d'arachide , blé entier , huile de poisson, mono phosphate de calcium , Méthionine , lysine
E15	Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	farine de poisson du chili 40%, soja, gluten de maïs, huile de poisson, blé, vitamine E
E16	Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	Farine de hareng 78,5%, farine 15%, huile de poisson 4,5%, compléments
E17	Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	Farine de hareng 78,5%, farine 15%, huile de poisson 4,5%, compléments
E18	Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	Farines de poisson, gluten de blé, huile de poisson, farines de soja, gluten de maïs, blé, protéine de poisson hydrolysé, fèverole, vitamines, levure arômes, lysine, methionine

**Annexe 2:** Protocole de préparation du DLA (pour 25 ml)

- Peser 10,5g d'urée 7 M et 3,8 g de thiouré 2M
- Rajouter 20mL d'eau distillée
- Agiter (agitateur magnétique) jusqu'à dissolution complète
- Rajouter 91mg de Tris 30 mM et 1g de CHAPS 4%
- Agiter jusqu'à solubilisation complète
- Rajouter 5mL d'eau distillée
- Mélanger, aliquoter et stocker à -20°C.

### **Annexe 3:** Protocole d'extraction des protéines

#### **Préparation des solutions**

**Solution 1** (Solution à 10 % TCA) : Dissoudre 10 g d'acide trichloracétique (TCA) dans 100 ml d'acétone + 0,3 g de dithiothreitol (DTT).

**Solution 2** (Solution à 100 % d'acétone) : Dissoudre 0,3 g de DTT dans 100 ml d'acétone.

**Solution 3** (Solution à 90 % d'acétone) : Dissoudre 0,3 g de DTT dans 90 ml d'acétone + 10 ml d'eau milli Q.

Stocker les solutions à -20°C 1H au moins avant utilisation. La solution 1 doit être préparée fraîchement (le jour de l'extraction).

#### **Protocole d'extraction**

##### **- Premier Jour**

-Peser 200 mg d'échantillon (PATs), y ajouter 1,8ml de TCA/acétone (solution 1) et vortexer. Mettre en over night en vortexant tous les 10 minutes pendant les premières 30minutes.

##### **- Deuxième jour**

1) Centrifuger à 16000 g pendant 10 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée (°4 C), puis retirer le surnageant. Ajouter ensuite 1,8 ml de la solution 2 au culot, puis vortexer et garder à -20 °C pendant 1H.

2) Centrifuger à 16000 g à 4°C pendant 10 minutes, retirer le surnageant et rajouter 1,8mL de la solution 2 au culot, puis vortexer et mettre à -20°C pendant 30 minutes.

3) Centrifuger à 16000 g à 4°C pendant 10 minutes, retirer le surnageant et rajouter 1,8 ml de solution 3 au culot, puis vortexer et mettre à -20 °C pendant 30 minutes.

4) Centrifuger à 16000 g à 4°C pendant 10 minutes, puis retirer le surnageant et laisser à l'air libre 2 à 3 minutes pour évaporer l'acétone.

5) Ajouter ensuite 1mL de DLA au culot, puis vortexer et soniquer trois fois en mettant dans de la glace entre chaque sonication (amplitude 70, cycle pulsé 0,5).

6) Agiter pendant 1H à 1400 rpm à 12°C, puis centrifuger à 16000 g à 12 °C pendant 10 minutes, récupérer le surnageant obtenu et estimer le volume (extrait), puis garder à -20°C.

#### **Annexe 4:** Dosage des protéines par la méthode de Pierce.

Le dosage s'est fait dans des plaques rectangulaires comportant 8 lignes de puits (A à H) et 12 colonnes de puits (1 à 12). La droite d'étalonnage est établie en utilisant des solutions étalons de concentration croissante (0,125 à 2,5 µg/µl). Ces solutions étalons ont été réparties dans la première colonne, le tampon (DLA) dans la deuxième et les 10 autres colonnes ont servis pour les extraits (les extraits utilisés ont été dilués 5 fois).

De façon pratique, la procédure à suivre est suivante

##### **1) Préparation de la plaque**

- Incliner légèrement la plaque vers l'avant.

- **1<sup>ère</sup> colonne** = droite étalon

##### ***Standards pré-dilués :***

Ligne A : ajouter 10 µl H<sub>2</sub>O milli Q

Ligne B : ajouter 10 µl d'étalon à 0,125 µg/µl

Ligne C : ajouter 10 µl d'étalon à 0,250 µg/µl

Ligne D : ajouter 10 µl d'étalon à 0,500 µg/µl

Ligne E : ajouter 10 µl d'étalon à 0,750 µg/µl

Ligne F : ajouter 10 µl d'étalon à 1 µg/µl

Ligne G : ajouter 10 µl d'étalon à 1,5 µg/µl

Ligne H : ajouter 10 µl d'étalon à 2 µg/µl

- **2<sup>ème</sup> colonne** : blanc (= tampon d'extraction (DLA) )

Ligne A : ajouter 9 µl H<sub>2</sub>O milli Q + 1 µl de tampon d'extraction

Ligne B : ajouter 9 µl H<sub>2</sub>O milli Q + 1 µl de tampon d'extraction

- **Colonnes suivantes** : échantillons (extraits)

Ligne A : ajouter 9 µl H<sub>2</sub>O milli Q + 1 µl d'échantillon (dilué 5 fois)

Ligne B : ajouter 9 µl H<sub>2</sub>O milli Q + 1 µl d'échantillon (dilué 5 fois)

Faire 2 puits par échantillon.

- Rajouter 150 µl de solution Pierce dans chaque puits et laisser la plaque 5 minutes à l'abri de la lumière.

##### **2) Analyse de la plaque**

Une fois la plaque prête, il faut la mettre dans le lecteur de plaque et aller sur le logiciel qui pilote le spectrophotomètre (abrégié MPM6). Sur l'interface, choisir le chemin d'accès suivant « File – New experiment – Template), puis encoder le contenu de la plaque sur feuille qui apparait. Il faut ensuite choisir les paramètres de mesures suivants :

-Longueur d'onde : 655nm

-Temps d'agitation: 20 sec

Vitesse d'agitation: Moyenne.

Une fois tous ces paramètres encodés il faut procéder à la lecture.

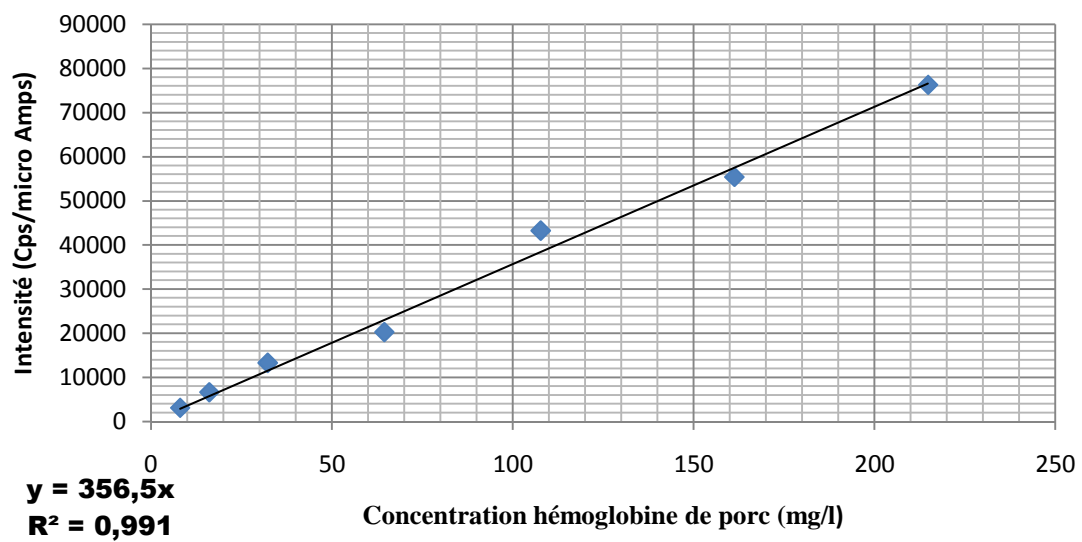
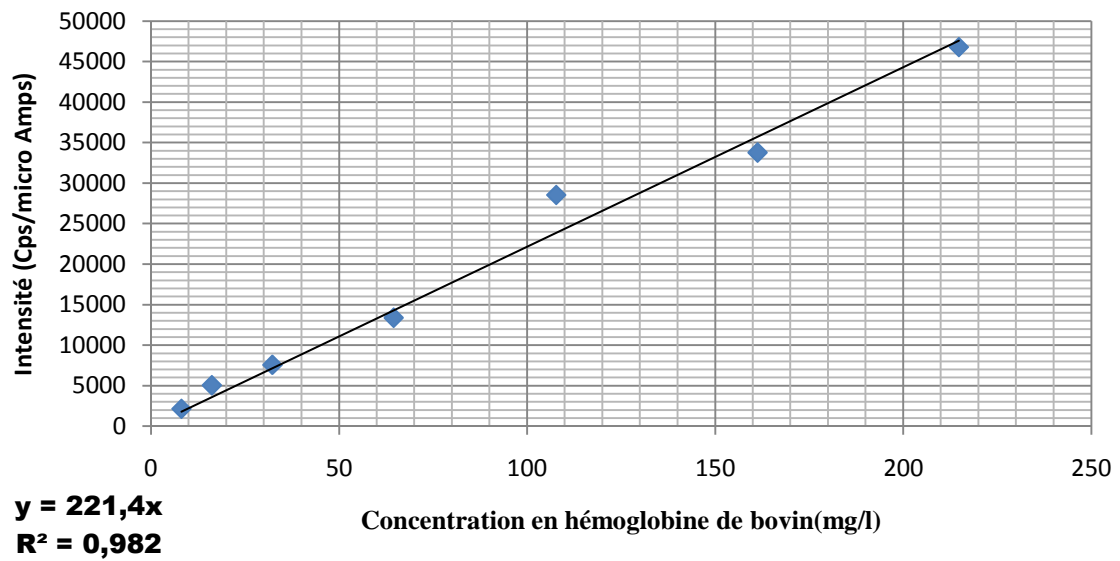
**Annexe 5**: Résultats bruts sur l'extraction des protéines

**Extraction protéines des produits dérivés du sang**

<b>Produits dérivés du sang</b>	<b>Identification</b>	<b>Concentration (µg/µL)</b>
Poudre d'hémoglobine bovine	S01	4,09
Poudre d'hémoglobine bovine	S02	3,07
Farine de sang de bovin pure	S03	3,848
Farine de ruminant 80%	S04	1,335
Poudre d'hémoglobine porcine	S05	0,757
Poudre d'hémoglobine porcine	S06	4,279
Poudre d'hémoglobine porcine	S07	2,87
Poudre d'hémoglobine porcine	S08	1,609
Poudre d'hémoglobine porcine	S9	4,227
Poudre d'hémoglobine porcine	S10	2,881
Farine de sang de porc	S11	0,652
Farine de sang de bovin pure	S12	0,873

<b>Aliments pour animaux</b>	<b>Echantillon</b>	<b>Concentration (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>)</b>
Aliment pour porc contenant des produits sanguins	E1	18,07 $\pm$ 1,31
Aliment pour porc contenant des produits sanguins et farine de poisson	E2	14,69 $\pm$ 0,4
Aliment pour porc contenant des produits sanguins et petit lait	E3	16,85 $\pm$ 0,3
Aliment pour porc contenant du plasma, petit lait et graisse de porc	E4	13,19 $\pm$ 0,4
Aliment pour poisson contenant des poudres d'hémoglobine	E5	21,18 $\pm$ 0,3
Aliment pour poisson contenant des poudres d'hémoglobine	E6	29,45 $\pm$ 0,17
Aliment pour poisson contenant 10 % de poudre d'hémoglobine	E7	28,34 $\pm$ 0,9
Aliment pour poisson contenant 10 % de poudre d'hémoglobine	E8	39,21 $\pm$ 0,6
Aliment pour poisson contenant 11 % de poudre d'hémoglobine	E9	37,38 $\pm$ 0,0
Aliment pour poisson contenant 7 % de farine de sang	E10	33,05 $\pm$ 1,1
Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	E11	13,04 $\pm$ 2,4
Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	E12	17,02 $\pm$ 0,0
Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	E13	9,68 $\pm$ 0,0
Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	E14	33,93 $\pm$ 0,9
Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	E15	13,10 $\pm$ 0,5
Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	E16	14,50 $\pm$ 0,2
Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	E17	11,02 $\pm$ 0,03
Aliment pour poisson contenant des farines de poisson	E18	9,46 $\pm$ 0,4

**Annexe 6:** Droites d'étalonnages établies à partir des intensités à 484 nm





**Annexe 7:** Droites d'étalonnages à partir des aires

