

## Rapport de l'expertise du pâté de canard

Voici tous les résultats d'analyse sur les lipides, les protides ainsi que la composition des viandes qui constituent votre pâté qui constitue le rapport d'expertise que vous nous avez demandé.

### I) Les Lipides:

Nous avons réalisé dans un premier temps une étude des lipides se trouvant dans le pâté de canard. Pour cela nous avons utilisé le principe de chromatographie sur couche mince (CCM). C'est une méthode d'absorption dont la séparation est basée sur les différences de polarité de différents composants (la phase stationnaire qui est la plaque de silice polaire et la phase mobile l'éluant, apolaire, qui progresse sur la plaque de silice par capillarité et entraîne avec lui les composants organiques ici les lipides qui sont apolaires).

Pour récupérer les lipides nous avons effectué une centrifugation qui nous a permis de séparer deux phases. La phase aqueuse (PA) qui se situe au-dessus et la phase organique (PO), dans laquelle se trouvent les lipides, qui se situe en dessous. Cette séparation si distincte est due à une différence de densité (densité PA < densité PO). Nous avons ensuite récupéré la phase organique dans le but d'extraire uniquement les lipides dont nous avons préalablement éliminé par évaporation les solvants (tel que le chloroforme). La masse obtenue est de 2.9651g. Cette masse nous permet donc de déterminer la teneur en lipides du pâté. Pour cela nous avons auparavant prélevé 8g de pâté, ce qui nous permet d'effectuer le calcul suivant  $\frac{2.9651}{8.0} * 100 = 37.6\%$ . La teneur en lipides du pâté de canard est donc d'environ 37% soit 37 g pour 100 g de pâté. Sur l'étiquette il est écrit qu'il y a 34g de lipides pour 100g de pâté, c'est donc légèrement moins que la quantité analysée.



De plus, grâce aux résultats de la chromatographie sur couche mince nous avons pu connaître la composition exacte des lipides de votre pâté de canard. Cette détermination est possible grâce aux différentes hauteurs de migration du gras sur la plaque de silice qui se lit de bas en haut. Les tâches de gras correspondent à une affinité plus ou moins importante avec la plaque de silice.

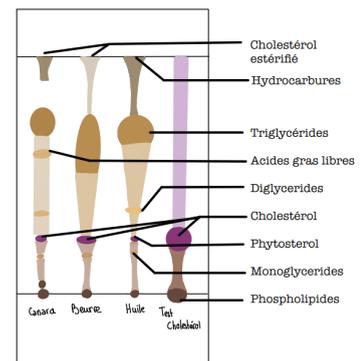


Figure 1: Photo de la CCM

Figure 2 : Dessin de la CCM

Le degré d'oxydation dépend de la présence plus ou moins importante d'oxygène (O) or les lipides sont principalement composés de carbone (C) et d'hydrogène (H). Donc un lipide très riche en C et en H ne sera que peu oxydé et migrera donc plus haut (les phospholipides ou les monoglycérides sont donc plus oxydés que les triglycérides ou encore que le cholestérol estérifié). A noter que les triglycérides sont les lipides majoritaires de ce pâté de canard. Pour être sûr de nos résultats nous avons calculé les rapports frontaux des principales tâches de gras présents sur la chromatographie. Le rapport frontal est une grandeur permettant de caractériser une espèce, ici les lipides. Si pour différentes graisses étudiées nous obtenons des rapports frontaux identiques ou proches c'est qu'il s'agit de la même espèce. Il se calcule de la manière suivante  $R_f = \frac{d}{D}$  où "d" est la distance entre le dépôt de graisse et la tâche et "D" est la distance entre le dépôt de graisse et la fin de la migration de l'éluant. Pour cela nous allons comparer les différents rapports frontaux entre le pâté de canard et le beurre par exemple.

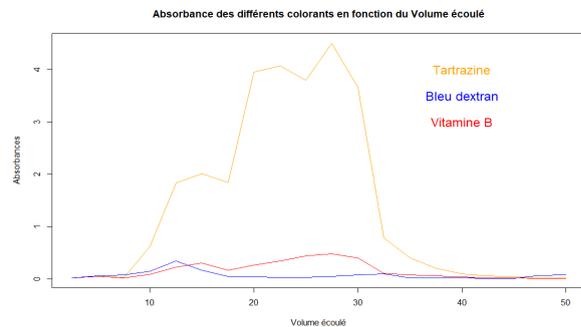
	Pâté de canard	Beurre	
monoglycérides	0.14	0.14	
cholestérol	environ 0.23	environ 0.23	
triglycérides	0.68	0.60	

Tableau 1: Comparaison des rapports frontaux entre le pâté de canard et le beurre

## II) La teneur en protides et en protéines:

Nous allons maintenant déterminer la teneur en protides du pâté. Pour cela nous avons réalisé une chromatographie de filtration sur gel (ici le gel Sephadex) qui est une technique qui permet la séparation de molécules d'un mélange, suivant leur taille, à travers un filtre poreux. Afin de trouver cette teneur exacte, il faut d'abord trouver le domaine de fractionnement de la colonne. Ainsi, pour le trouver, trois colorants ont été utilisés: le bleu dextran ( $2 \cdot 10^6$  g/mol et  $\lambda_{max} = 615$  nm), la tartrazine (534.3 g/mol et  $\lambda_{max} = 428$  nm) et la vitamine B12 (1355.4 g/mol et  $\lambda_{max} = 550$  nm). Ils sont ensuite filtrés dans la colonne de chromatographie afin de les séparer dans les cuves de 2 mL, sachant que le domaine de fractionnement est de 100 à 5000 g/mol pour les polymères de glucose et de 1000 à 5000 g/mol pour les peptides. Avec le filtrat recueilli dans les cuves nous allons mesurer l'absorbance (A) afin de retrouver le volume mort (V0) et le volume total (Vt). Grâce au chromatogramme nous pouvons estimer que V0, se trouve aux alentours de 13 mL. Quant à Vt, il se trouve grâce aux calcul:  $V_T = \pi \times r^2 \times h = \pi \times 1,06^2 \times 15 = 52,9$  mL

Figure 3: Chromatogramme



Afin de déterminer la teneur en protides, nous avons fait une gamme étalon pour les dosages par la méthode de Bradford. Différentes masses de protides ont réagi avec du réactif de Bradford, il arbore une coloration bleue proportionnelle à la quantité de protéines (plus c'est bleu, plus il y a de protéines). Des mesures d'absorbance sont ensuite réalisées à 595 nm. Grâce à la droite obtenue, la masse de protides dans la cuve est de 28  $\mu$ g. Cependant, nous cherchons la concentration dans 200  $\mu$ L donc :  $C = \frac{n}{V} = \frac{28}{200 \cdot 10^{-3}} = 140$   $\mu$ g/mL. Nous avons dilué d'un facteur 2 avec une solution tampon, ce qui nous amène à une concentration de 280  $\mu$ g/mL. Grâce à cette concentration et au volume de phase aqueuse récupérée (8mL), nous pouvons maintenant déterminer la masse:  $m = C \cdot V = 280 \cdot 9 = 2520$   $\mu$ g soit 2.520mg. La teneur en protides est donc de 0.0315% (car  $\frac{2.520 \cdot 10^{-3}}{8} \cdot 100 = 0.0315$  %), ce qui est très faible.

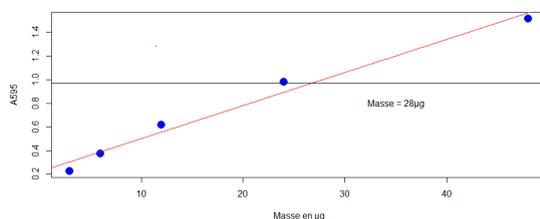
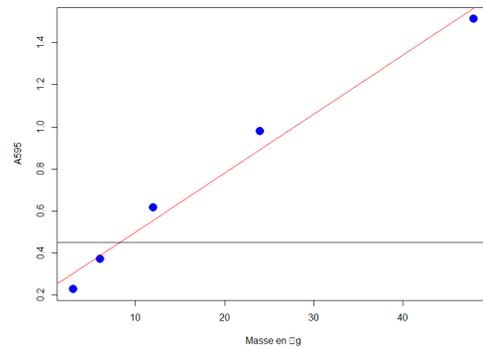


Figure 4: Masse de protides à une absorbance de 0.970 nm

Passons maintenant à la détermination de la teneur en protéine. Pour cela nous avons fait passer 1 mL de solution protéique dans la colonne de chromatographie. Sachant que les protéines ont un point moléculaire élevé, elles vont sortir en premier soit au volume mort V0. Nous avons donc récupéré les cuves contenant le V0 afin d'en mesurer l'absorbance à 595 nm aussi. La masse de protéine est elle aussi trouvée grâce à la gamme étalon, elle est donc de 8  $\mu$ g. Ce qui donne une concentration de 16  $\mu$ g/L car nous avons dilué d'un facteur 2. La masse en protéine est donc de 144  $\mu$ g soit 0.144 mg. Nous trouvons une teneur en protéines de 0.018% (teneur en protéines =  $\frac{0.44 \cdot 10^{-3}}{8} \cdot 100 = 0.0018$ %).

Figure 5: Masse de protéines à une absorbance de 0.450 nm



### III) Détection de traces de poulet ou de porc dans un pâté de canard par PCR/qPCR

On utilise deux techniques différentes, la PCR et la qPCR qui permettent de l'amplifier l'ADN des différentes viandes et de les quantifier. Suite à la PCR, nous avons pu réaliser une électrophorèse sur gel d'agarose donc nous avons déposé dans des puits l'ADN que nous avons amplifié.

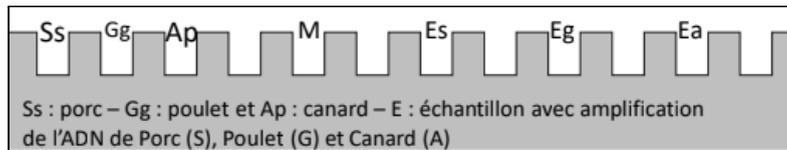


Figure 6: Disposition des puits sur le gel d'électrophorèse

Quand l'électrophorèse est terminée nous plaçons le gel dans un transilluminateur afin de vérifier la présence ou non de porc, de poulet et de canard.



Figure 7: Photo de la migration du gel d'électrophorèse

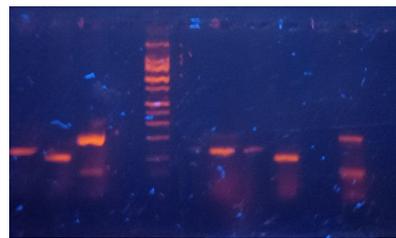


Figure 8: Photo du gel sous le transilluminateur

Nous avons ensuite réalisé une qPCR qui nous permet d'amplifier et de quantifier l'ADN. Pour cela il faut réaliser trois gammes de dilution des trois ADN étudiés témoin (poulet, porc et canard). L'appareil utilisé permet de suivre l'amplification avec de la fluorescence proportionnelle. Grâce à cela nous pouvons tracer une courbe de tendance avec les Ct (ce sont les valeurs qui se trouvent au-dessus du bruit de fond). Pour retrouver la concentration des trois ADN étudiés, on reporte les valeurs que nous avons obtenues. Ci-dessous les courbes de tendances avec les Ct obtenus avec l'ADN contenu dans le pâté (de la droite vers la gauche : Canard = 25, Poulet = 17 ; Porc : 15)

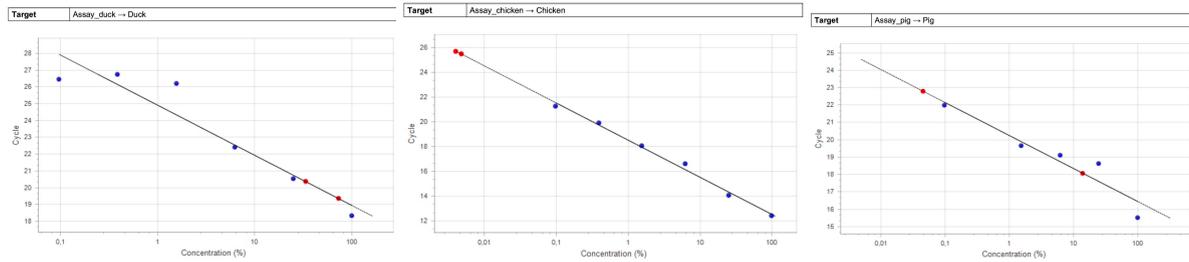


Figure 9: Courbe de tendance obtenues par la qPCR

Sachant que les valeurs de Ct sont proportionnelles au logarithme de la concentration en ADN nous pouvons maintenant déterminer les pourcentages d'ADN des différentes viandes du pâté: 3.4% de canard, 8% de poulet et 10% de porc. Nous allons rédiger une conclusion de ce rapport, en comparant nos résultats avec l'étiquette sous la forme d'un tableau:

	Données de l'emballage (en %)	Données expérimentales (en %)
Matières Grasses (Lipides)	34	37.6
Protéines	13	0.0018
Porc	66	10
Canard	22	3.4
Poulet	???	8

Tableau 2: Comparaison des données expérimentales avec les données inscrites sur l'emballage

Nous pouvons également ajouter que la présence des trois types de viandes que ce soit le porc, le canard ou le poulet sont bien inscrites sur l'étiquette de votre pâté. Ce produit est donc conforme.

De plus, nous avons trouvé une teneur en lipides proche (légèrement plus élevée) de celle annoncée sur l'emballage. Pour ce qui est des protéines, nous obtenons une teneur bien inférieure à celle de l'étiquette mais cela est dû à des problèmes dans lors des manipulations.

Enfin la méthode PCR et qPCR ont permis de vérifier et de confirmer la présence de canard, de poulet et de porc. Cependant les quantités de sont pas les mêmes ou proches. Ces résultats peuvent être l'objet d'une fraude.

En espérant que la rédaction de ce rapport permettra de vous éclaircir sur la composition de votre pâté et ainsi de gérer la fraude dont fait objet ce produit.