

Faculté des bioingénieurs

Du fastfood pour nourrir les insectes ?

Mise au point d'une méthode de spectrométrie de masse pour la détection des protéines de viande dans les farines d'insecte

Auteur : Marvin Aerts

Promoteur(s) : Pr. Vincent Baeten (UCL/CRA-W)
Dr. Marie-Caroline Lecrenier (CRA-W)

Lecteur(s) : Pr. Cathy Debier (UCL)
Dr. Jean Henrottin (CER)

Année académique 2022-2023

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du diplôme de Bioingénieur : bioingénieur en sciences agronomiques

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes deux promoteurs, Vincent Baeten, pour avoir rendu ce mémoire possible, et Marie-Caroline Lecrenier, pour son accompagnement, son soutien et sa précieuse guidance tout au long de la réalisation de ce mémoire. Leur expertise, leur patience et leurs conseils avisés ont été des éléments essentiels dans l'accomplissement de ce travail.

Je souhaite également remercier chaleureusement Alexandra Cordonnier, Lisa Plasman et Abigaël Anselmo qui ont contribué à la réalisation des expériences et à la collecte des données. Leur expertise technique et leur dévouement ont été indispensables.

Un grand merci à mon entourage et plus particulièrement à Florian Renaux, Julien Kohler et Laurine Bernard pour leur soutien et leur aide sans laquelle la réalisation de ce mémoire aurait été complexe. Leurs encouragements et leurs conseils ont été une source d'inspiration et de motivation.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers l'équipe du bâtiment Henseval du CRA-W pour leur accueil chaleureux et pour les événements passés à leurs côtés qui ont permis de jalonner cette aventure qu'est le mémoire via des échanges enrichissants et des moments de partage.

Ce mémoire n'aurait pas été possible sans le soutien et la collaboration de toutes ces personnes qui m'ont entouré tout au long de ce parcours. Je leur adresse mes plus sincères remerciements pour leur contribution précieuse à la réalisation de ce projet.

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Contexte actuel	1
1.1.1	<i>Hermetia illucens</i>	2
1.1.2	Normes européennes	4
1.1.3	Former foodstuffs	6
1.2	Protéomique	7
1.3	Spectrométrie de masse	7
1.3.1	Préparation de l'échantillon : différents types d'approches	7
1.3.2	Séparation des peptides	7
1.3.3	Ionisation par électrospray	8
1.3.4	Analyseurs de masse	9
2	Objectifs spécifiques du mémoire	11
3	Matériel et méthodes	12
3.1	Matériels	12
3.1.1	Aliments	12
3.1.2	Élevage de larves d' <i>Hermetia illucens</i>	15
3.2	Méthodes	18
3.2.1	Broyage	18
3.2.2	Extraction	19
3.2.3	Digestion	19
3.2.4	Purification	20
3.2.5	Évaporation	20
3.2.6	Analyse MS	21
3.2.7	Traitement de données MS	21
4	Résultats et discussion	23
4.1	Création de la liste de peptides spécifiques	23
4.1.1	Pré-sélection de peptides spécifiques	23
4.1.2	Évaluation de la liste de peptides candidats	31
4.1.3	Optimisation de l'énergie de collision	39
4.1.4	Validation de la liste de peptides spécifiques	40
4.2	Utilisation de la liste de peptides spécifiques	44
4.2.1	Résultats des échantillons de l'élevage de larves MSN	49
4.2.2	Hypothèses	54
5	Conclusion	55
	Annexes	62

Table des figures

1	Cycle de vie d' <i>Hermetia Illucens</i>	3
2	Fonctionnement schématique d'un quadripôle	9
3	Représentation des différentes viandes utilisées	13
4	Fastfood de poulet utilisé lors de l'élevage	14
5	Fastfood de porc utilisé lors de l'élevage	14
6	Mélangeur rotatif Heidolph REAX 20	14
7	Réception des larves	15
8	Tri des larves noires	15
9	Bacs utilisés pour l'élevage	16
10	Bacs couverts utilisés pour l'élevage	16
11	Mise à l'étuve des bacs	16
12	Substrat dans une boîte de Petri	17
13	Substrat passé au tamis	17
14	Ligne du temps de l'élevage	17
15	Broyeur Retsch Grindomix GM200	18
16	Séparation des larves du substrat sec	18
17	Substrat de l'élevage broyé	18
18	Broyeur IKA Tube-Mill	18
19	Multi-rotator Grant Bio	19
20	Bain à ultrason	19
21	Centrifugeuse Eppendorf 5804 R	19
22	Bain marie	20
23	Cuve Mannifold	20
24	Centrivap Cold Trap Labconco et Centrivap Concentrator Labconco	20
25	Waters Xevo TQ-XS	21
26	Schéma reprenant les étapes réalisées ainsi que leurs impacts sur la liste de protéine et de peptides spécifiques	28
27	Résultats de l'outil BLAST de NCBI sur le peptide DDPHACYSTVFDK avec les genres <i>Equus</i> , <i>Ovis</i> , <i>Capra</i> et les espèces <i>Gallus gallus</i> et <i>Sus scrofa</i>	29
28	Résultats de l'injection des échantillons de boeuf sous forme de chromatogrammes pour le peptide de boeuf DDPHACYSTVFDK	33
29	Agrandissement des résultats de l'injection de l'échantillon de boeuf cru sous forme de chromatogrammes pour le peptide de boeuf DDPHACYSTVFDK	34
30	Résultats de l'injection des échantillons de boeuf sous forme de chromatogrammes pour le peptide de boeuf TLEDQVNELK	35
31	Résultats de l'injection des échantillons de boeuf et de porc sous forme de chromatogrammes pour le peptide de boeuf DDPHACYSTVFDK	37
32	Résultats de l'injection des échantillons de poulet sous forme de chromatogrammes pour le peptide de boeuf DDPHACYSTVFDK	38

33	Représentation de la transition 614,2768 (2+) du peptide DDPHACYSTVFDK possédant une énergie de collision optimisée initialement	42
34	Représentation de la transition 696,3563 (+) du peptide DDPHACYSTVFDK possédant une énergie de collision optimisée en -2	42
35	Représentation de la transition 662,8032 (2+) du peptide DDPHACYSTVFDK possédant peut-être une énergie de collision optimisée en -5	43
36	Vérification de l'optimisation en -5 de la transition 662,8032 (2+) du peptide DDPHACYSTVFDK	43

Liste des tableaux

1	Liste des possibilités de l'utilisation d'insectes pour l'alimentation animale	6
2	Résumé de l'utilisation des différents substrats fastfood lors des expérimentations	14
3	Liste des protéines de poulet contenant des peptides spécifiques trouvées dans la littérature	24
4	Liste des protéines de porc contenant des peptides spécifiques trouvées dans la littérature	25
5	Liste des protéines de boeuf contenant des peptides spécifiques trouvées dans la littérature	26
6	Représentation des comparaisons entre différents taxons à l'aide de l'outil BLAST	29
7	Exemple de données comprises dans la méthode d'un peptide	31
8	Exemple de données complétées et optimisées comprises dans la méthode d'un peptide	40
9	Liste finale des protéines contenant des peptides spécifiques de poulet	45
10	Liste finale des protéines contenant des peptides spécifiques de porc	46
11	Liste finale des protéines contenant des peptides spécifiques de muscle de boeuf	47
12	Liste finale des protéines contenant des peptides spécifiques de sang et de lait de boeuf	48
13	Résultats de la détection des peptides spécifiques sur les échantillons provenant de l'expérience sur la MSN	51
14	Résultats de la détection des peptides spécifiques sur les échantillons provenant de l'expérience sur la MSN	53

Acronymes

N₂ Diazote.

ACN Acétonitrile.

Ar Argon.

CID Dissociation induite par collision.

cm Centimètre(s).

CRA-W Centre de Recherche Agricole Wallon.

DMSO Diméthylsulfoxyde.

EC Energie de collision.

EFSA Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire.

ESI Ionisation par électrospray.

FF Fomer foodstuff.

GC Chromatographie gazeuse.

HCOOH Acide formique.

He Hélium.

HR Humidité relative.

IPIFF International Platform of Insects for Food and Feed.

IR Ion Ratio.

LC Chromatographie liquide.

LOD Limite de détection.

m Masse.

m/z Masse sur charge.

mg Milligramme(s).

min Minute(s).

mM Millimolaire.

mm Millimètre(s).

MRM Multiple Reaction Monitoring.

MS Spectrométrie de masse.

MS/MS Spectrométrie de masse en tandem.

MSN Mouche Soldat Noire.

NCBI National Center for Biotechnology Information.

ONUAA/FAO Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.

PAP Processed Animal Protein.

Q-TOF Quadripôle-Time Of Flight.

QqQ Triple quadripôle.

SPE Extraction en phase solide.

SRM Selected Reaction Monitoring.

TOF Time Of Flight (temps de vol).

UE Union Européenne.

z Charge.

µl Microlitre(s).

1 Introduction

1.1 Contexte actuel

D'ici 2050, la population mondiale devrait atteindre neuf milliards d'individus, ce qui constitue un défi considérable pour l'alimentation. L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (ONUAA/FAO) estime qu'il faudra augmenter la production agricole globale de 60% par rapport à la période 2005/2007 pour répondre à la demande croissante en nourriture [1]. Cependant, cette augmentation de la production de viande est préoccupante en raison de l'utilisation intensive des terres agricoles pour l'élevage et la production d'aliments pour animaux. En effet, actuellement, environ un tiers de la production céréalière mondiale est destiné à nourrir les animaux [2].

Pour faire face à cette problématique, des recherches sont menées pour trouver d'autres sources de protéines durables. Parmi les alternatives prometteuses, on trouve la viande cultivée in vitro [3], les algues [4], et les insectes [5].

Les insectes ont un grand potentiel en tant qu'aliments pour animaux pour plusieurs raisons :

- Ils sont riches en protéines, en matières grasses, en vitamines et en minéraux.
- Ils se caractérisent souvent par une efficacité de conversion alimentaire élevée par rapport au bétail.
- Ils n'ont pas besoin de beaucoup d'espace pour être élevés.
- Ils sont appétant pour les volailles et les poissons dont le régime alimentaire dans la nature est en partie représenté par des insectes.
- Ils sont pour la plupart omnivores et peuvent se développer sur différents substrats.

Les insectes sont donc une solution prometteuse pour valoriser les déchets organiques de faible valeur et contribuer à la chaîne alimentaire animale et humaine [6]. En effet, ils offrent un double avantage en termes de durabilité. D'une part, ils permettent de résoudre le problème croissant des déchets organiques générés par les chaînes alimentaires agricoles, la production animale et les ménages, ce qui réduit les empreintes écologiques négatives associées [5]. D'autre part, les insectes peuvent ainsi contribuer à atténuer la pression exercée sur les ressources conventionnelles telles que les terres et l'eau, tout en réduisant les impacts environnementaux mondiaux et en préservant les écosystèmes [5][7].

Au cœur de cette exploration des opportunités et des défis de l'utilisation des protéines animales issues d'insectes dans l'alimentation du bétail, l'utilisation d'*Hermetia illucens* comme alternative prometteuse pour l'élevage d'insectes destinés à la consommation animale est intéressante. Cependant, le déploiement d'une telle pratique ne peut être dissocié

du cadre réglementaire européen en évolution et des exigences en matière de sécurité alimentaire. Ainsi, la première composante explorée se penchera sur les spécificités de cette espèce d'insecte et sur sa pertinence en tant que source de protéines pour l'alimentation animale, tout en soulignant son potentiel pour contribuer à la durabilité de la chaîne alimentaire.

En parallèle, le paysage juridique européen influence profondément la viabilité de l'utilisation de protéines animales dans l'élevage d'insectes. Les normes européennes, établies dans le but de garantir la sécurité alimentaire et la santé publique, fournissent le cadre dans lequel de telles pratiques doivent être intégrées. Ainsi, la deuxième composante explorée se penchera sur les réglementations en vigueur qui façonnent le développement de l'utilisation des protéines animales d'insectes dans le secteur de l'alimentation animale.

Cependant, pour que l'utilisation des protéines animales issues d'insectes soit plus durable, il est intéressant d'examiner les sources potentielles de ces protéines. C'est là que les former foodstuffs entrent en jeu. Ces sous-produits de l'industrie agroalimentaire présentent une opportunité à la fois écologique et économique pour nourrir les insectes destinés à l'alimentation animale. Ainsi, la troisième composante explorée se penchera sur la valorisation des former foodstuffs dans l'alimentation des insectes d'élevage.

1.1.1 *Hermetia illucens*

Hermetia illucens (L. 1758), aussi appelée la mouche soldat noire ([MSN](#)), est un diptère de la famille des Stratiomyidae de couleur noire avec une taille variant de 12 à 20 millimètres ([mm](#)). Elle est possiblement originaire du continent américain et s'est répandue sur tous les continents [\[8\]](#). Elle est un candidat particulièrement prometteur de l'industrie de l'élevage d'insectes qui est en pleine croissance.

Les larves de [MSN](#) présentent une alimentation très diversifiée, incluant une variété de matières organiques d'origine végétale et animale [\[9\]](#)[\[10\]](#). Ce qui les distingue particulièrement, c'est leur remarquable aptitude à convertir des substrats pauvres en nutriments en une biomasse riche en protéines, ce qui suscite un intérêt commercial croissant autour de ces organismes [\[6\]](#)[\[10\]](#)[\[11\]](#). Compte tenu de leurs profils nutritionnels intéressants [\[12\]](#), les larves de la [MSN](#) sont une alternative prometteuse aux sources de protéines traditionnelles telles que les aliments à base de soja et de poisson dans l'alimentation des porcs, des volailles et des espèces aquacoles [\[7\]](#). En outre, leur teneur élevée en matières grasses pourrait servir de source de biodiesel [\[13\]](#). Dû aux spécificités de la [MSN](#), l'engouement de la communauté scientifique a connu une augmentation fulgurante, se traduisant par plus d'un millier de publications au cours des cinq dernières années [\[7\]](#).

Le cycle de vie de la MSN est composé de 5 stades. Après une période d'environ 4 jours, l'œuf éclos et donne naissance à une larve qui traversera cinq stades larvaires en 13 à 18 jours. Durant ce stade, la larve est de couleur blanche et passera de quelques mm à 2.5 centimètres (cm) de longueur environ. Une fois qu'elle a accumulé assez de réserve, la larve va se transformer en pré-nymphé (stade prépupal) et devient brun foncé. La nymphé (stade pupal) s'immobilisera dans un endroit sec avant de se transformer en mouche et d'arriver au stade adulte. Les adultes ne se nourrissent plus et ont une durée de vie d'environ 5 à 8 jours, au cours desquels ils se reproduisent. Une fois fécondée, la femelle pondra alors entre 500 et 900 œufs (Fig.1) [14].

Les larves de MSN présentent une alimentation très diversifiée, incluant une variété de matières organiques d'origine végétale et animale [9] [10]. Ce qui les distingue particulièrement, c'est leur remarquable aptitude à convertir des substrats pauvres en nutriments en une biomasse riche en protéines, ce qui suscite un intérêt commercial croissant autour de ces organismes [6] [10] [11].

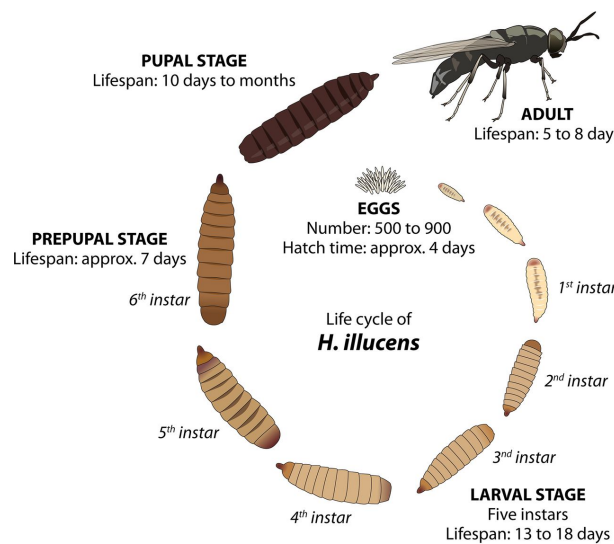


FIGURE 1 – Cycle de vie d'*Hermetia Illucens* [14]

La durée de vie de la MSN ainsi que la vitesse de développement des larves peuvent être influencées en fonction des paramètres abiotiques. Plus la température de leur milieu est élevée, plus les larves ont tendance à se développer rapidement avant d'atteindre un palier à partir duquel la température devient alors un facteur limitant. Des larves élevées à une température de 30°C ont affiché un taux de survie supérieur et un développement plus rapide par rapport à celles élevées à 27°C. Cependant, il est important de noter que les larves élevées à 30°C ont donné naissance à des adultes de taille réduite qui avaient une durée de vie plus courte [15].

Les larves de la MSN peuvent supporter une humidité relative (HR) allant de 30% jusqu'à 99% [12]. En dessous de 30% d'HR, les œufs se dessèchent ce qui entraîne une

mortalité accrue et une réduction de l'espérance de vie des larves. Les conditions de développement optimales d'*Hermetia illucens* sont une température comprise entre 25°C et 27°C associée à une [HR](#) de 60% à 70% [\[12\]](#) [\[16\]](#).

Les paramètres du substrat comme l'humidité ont aussi leurs importances dans le développement des larves. Un taux d'humidité de 50% conduit à des larves plus petites et à une croissance plus lente que si le substrat est à 70% d'humidité. Si l'humidité du substrat est diminuée à 30% cela entraîne une forte mortalité des larves et empêche les larves de passer au stade de pré-pupe. L'humidité idéale du substrat se situe donc aux alentours de 70% [\[12\]](#) [\[17\]](#).

L'impact de la lumière au cours du cycle de vie d'*Hermetia illucens* n'est pas le même en fonction du stade où elle se trouve. En effet, les larves fuient la lumière alors que les mouches en ont besoins pour se reproduire. L'intensité lumineuse optimale se situe entre 135 et 200 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ [\[12\]](#).

1.1.2 Normes européennes

Au cours des 20 dernières années, des lois européennes sur la production animale ont vu le jour afin de contrôler ce secteur. Les producteurs d'insectes doivent se conformer aux mêmes règles générales que celles qui s'appliquent aux industriels d'autres secteurs alimentaires. Ces lois régissent les conditions dans lesquelles les exploitants du secteur de l'alimentation humaine et animale, tels que les producteurs d'insectes, peuvent produire et commercialiser leurs produits dans l'Union européenne ([UE](#)). Les décideurs politiques de l'[UE](#) ont notamment adopté un ensemble de textes législatifs qui définissent des principes généraux et des normes dans le domaine de la sécurité des denrées alimentaires et des aliments pour animaux [\[18\]](#) [\[19\]](#) [\[20\]](#).

- Les producteurs d'insectes destinés à l'alimentation animale (c'est-à-dire le bétail d'élevage, l'aquaculture ou les aliments pour animaux de compagnie) doivent être enregistrés en tant qu'exploitants du secteur de l'alimentation animale auprès de leurs autorités nationales compétentes [\[20\]](#).
- Les aliments qui peuvent être donnés aux animaux dits d'élevage (c'est-à-dire aux animaux élevés pour la production de denrées alimentaires pour l'homme), aux animaux élevés afin de nourrir d'autres animaux ou aux animaux élevés pour leurs produits dérivés (par exemple, la laine ou les peaux) sont soumis à des restrictions. Celles-ci s'appliquent donc également aux insectes destinés à l'alimentation animale qui sont principalement nourris à base de matière d'origine végétale. Seul le lait, les œufs, le miel, les graisses fondues ou les produits sanguins provenant d'animaux non ruminants font office d'exceptions pour les matières d'origine animale [\[21\]](#).
- D'un point de vue du bien-être animal, les animaux invertébrés (donc les insectes) ne

font pas partie du champ d'application de la législation européenne sur le bien-être animal [22].

- Les insectes et leurs produits dérivés, à l'exclusion des insectes vivants, qui sont destinés à être utilisés dans l'alimentation animale, sont considérés comme des sous-produits animaux. Un sous-produit animal correspond à des produits issus d'animaux qui ne sont pas destinés à la consommation humaine. Cette qualification entraîne une série d'obligations pour les producteurs. Par exemple, les insectes doivent être transformés dans des établissements spécifiquement agréés à cet effet. Une telle procédure est nécessaire pour évaluer que les risques biologiques potentiels associés à ces produits sont gérés de manière appropriée par le producteur [23][24].
- Afin d'empêcher l'introduction dans l'environnement d'espèces susceptibles de menacer la biodiversité ou les écosystèmes environnants, lors de libération accidentelle d'insectes d'élevage, les producteurs européens d'insectes doivent se conformer à la législation environnementale de l'UE, notamment au règlement (UE) n° 1143/2014 qui restreint les espèces d'insectes admissibles à des fins d'élevage [25].

L'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA) a établi un profil de risque qui identifie les dangers biologiques et chimiques ainsi que l'allergénicité et les risques environnementaux associés à l'utilisation d'insectes d'élevage comme denrées alimentaires pour animaux. L'EFSA a également comparé ces risques potentiels à ceux associés aux principales sources de protéines animales. La présence éventuelle de dangers biologiques et chimiques dépendrait des méthodes de production, du substrat des insectes, du stade du cycle de vie auquel les insectes sont récoltés, de l'espèce d'insecte, ainsi que des méthodes utilisées pour la transformation des insectes [26].

En 2017, des révisions ont été apportées aux réglementations concernant l'interdiction des aliments destinés aux animaux. Ces modifications visaient à permettre l'utilisation de protéines d'insectes dans les aliments pour animaux d'élevage provenant de sept espèces d'insectes spécifiques. Ces espèces comprennent la MSN (*Hermetia illucens*), la mouche domestique commune (*Musca domestica*), le ver de farine jaune (*Tenebrio molitor*), le ver de farine mineur (*Alphitobius diaperinus*), le grillon domestique (*Acheta domesticus*), le grillon à bandes (*Gryllodes sigillatus*) et le grillon des champs (*Gryllus assimilis*). Ces protéines d'insectes étaient autorisées pour l'alimentation dans le contexte de l'aquaculture. En 2021, les États membres de l'UE ont voté en faveur de l'autorisation des protéines animales transformées d'insectes dans l'alimentation des volailles et des porcs (Fig.6). Le ver à soie (*Bombyx mori*) a été rajouté par la suite dans la réglementation datant du 05/12/2021, portant la liste des insectes à huit espèces [23].

La table 1 résume les conditions dans lesquels les insectes peuvent être utilisés pour nourrir les animaux d'élevage sous leurs différentes formes. Les graisses d'insecte et les protéines d'insecte hydrolysées sont autorisées dans l'alimentation de tous les élevages. À l'inverse, les insectes entiers morts, qu'ils soient traités ou non, sont interdits. On peut observer qu'en ce qui concerne les ruminants la législation est plus stricte que pour les autres animaux d'élevages.

TABLE 1 – Résumé des possibilités de l'utilisation d'insectes pour l'alimentation animale inspiré d'un tableau publié par l'International Platform of Insects for Food and Feed (IPIFF) (Annexe Fig.6) [21]

	Ruminants	Aquaculture	Volaille	Porcins
Protéines d'insecte				
Graisses d'insecte				
Insecte entier mort non traité				
Insecte entier mort traité : lyophilisation				
Insecte vivant				
Protéines d'insectes hydrolysées				

Légende

	Pas de restrictions sur l'espèce de l'insecte utilisée
	Utilisation limitée aux espèces <i>Hermetia illucens</i> , <i>Musca domestica</i> , <i>Tenebrio molitor</i> , <i>Alphitobius diaperinus</i> , <i>Acheta domesticus</i> , <i>Grylloides sigillatus</i> , <i>Gryllus assimilis</i> et <i>Bombyx mori</i>
	Utilisation d'insectes et de leurs sous-produits interdite

1.1.3 Former foodstuffs

Les former foodstuffs (FF) sont des aliments qui ont été fabriqués pour la consommation humaine, mais qui ne sont plus destinés à cet usage pour des raisons pratiques, logistiques ou à cause de défauts de fabrication ou d'emballage. Par exemple, un biscuit cassé ou un pain mal formé peuvent être considérés comme des FF car ils ne répondent plus aux normes commerciales pour la consommation humaine, mais ils conservent une valeur nutritionnelle pour l'alimentation animale. À l'heure actuelle, les FF dépourvus de viande ou de poisson sont couramment employés comme source alimentaire pour les animaux. Cependant, l'utilisation de FF contenant ces éléments est prohibée car ils pourraient représenter un risque sanitaire [21]. La demande mondiale croissante de trouver des sources alternatives de protéines et d'énergie a stimulé la recherche dans le domaine des ingrédients non conventionnels pour l'alimentation animale. Sur le plan de l'économie circulaire, les insectes et les FF offrent un moyen de valoriser les biomasses et les déchets alimentaires en composés intéressants pour l'alimentation animale [27] [28] [29].

1.2 Protéomique

Le mot protéomique est apparu en 1994 et consiste en l'étude du protéome, ce qui correspond à l'ensemble des peptides et des protéines codées par un génome à un instant donné et dans un environnement spécifique [30]. La protéomique étudie donc les protéines ainsi que leurs fonctions, leurs structures, leurs interactions et leurs modifications dans un contexte donné. Les protéines sont des molécules essentielles qui remplissent des fonctions variées pour le fonctionnement de la vie telles que le transport des molécules, la régulation de l'activité cellulaire, la catalyse des réactions chimiques, etc. La protéomique peut être appliquée à divers domaines de recherche, tels que la médecine, la biotechnologie, l'agriculture et les sciences de l'environnement. Dans l'ensemble, elle constitue un outil puissant pour étudier les fonctions complexes des protéines dans divers contextes [30] [31].

1.3 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique qui permet de détecter un large nombre de molécules dans un échantillon comme des lipides, des métaux lourds ou encore des peptides et des protéines, ce qui explique pourquoi elle est utilisée entre autres pour l'analyse protéomique. Pour ce faire, cette technique se base sur la masse (m) et la charge (z) des molécules qu'elle analyse.

La protéomique par MS comporte généralement quatre étapes principales : la préparation de l'échantillon, la séparation des peptides, l'ionisation et l'analyse de masse.

1.3.1 Préparation de l'échantillon : différents types d'approches

Pour la préparation de l'échantillon il existe deux approches d'analyses possibles appelées bottom-up et top-down. L'approche bottom-up consiste en la digestion chimique ou enzymatique de protéine extraite d'une source biologique comme des cellules ou des tissus, via l'utilisation de trypsine par exemple, avant leur introduction dans le spectromètre de masse. La détection et l'identification des peptides permettent de déduire la protéine d'origine. L'approche "top-down" quant à elle est une méthode qui consiste à analyser les protéines intactes par spectrométrie de masse sans les digérer en peptides [32].

L'approche bottom-up a été utilisée dans ce mémoire.

1.3.2 Séparation des peptides

Les spectromètres de masse sont souvent combinés avec des techniques de séparations comme la chromatographie liquide (LC), la chromatographie gazeuse (GC) ou encore l'électrophorèse capillaire.

La LC est utilisée pour séparer les molécules présentes dans un échantillon en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. En particulier, la LC en phase inverse permet de séparer les différents composants d'un mélange liquide en utilisant une phase stationnaire et une phase mobile non miscibles entre elles. Dans cette méthode, la phase mobile, qui est polaire, traverse la phase stationnaire, qui est apolaire. La phase stationnaire utilisée est une colonne C18, elle est composée de chaînes de dix-huit atomes de carbone fixées sur des billes de silice. Cette configuration permet de retenir les peptides hydrophobes contenus dans l'échantillon sur la phase stationnaire. En revanche, la phase mobile va transporter avec elle les composants dissous de l'échantillon en se déplaçant à travers la phase stationnaire. Une élution graduelle de l'échantillon est effectuée en modifiant les conditions de la phase mobile (généralement un mélange d'eau et d'un solvant organique) afin de libérer les peptides adsorbés. Cette séparation basée sur les différences d'affinité des composants de l'échantillon avec la phase stationnaire et mobile permet d'obtenir une séparation efficace des peptides, facilitant ainsi leur analyse ultérieure [33].

La LC en phase inverse a été utilisée dans ce mémoire.

1.3.3 Ionisation par électrospray

Les spectromètres de masse ne peuvent analyser que des ions gazeux, c'est pourquoi le recours à l'utilisation de méthode comme l'ionisation par électrospray (ESI) est nécessaire pour convertir les peptides de la phase liquide en ions gazeux [34].

Le principe de l'ESI repose sur la formation d'un aérosol chargé électriquement à partir d'un liquide contenant les analytes. Pour cela, on applique une haute tension entre un capillaire métallique par lequel le liquide est éjecté et une contre-électrode située à proximité. Le champ électrique induit une séparation de charges à la surface du liquide ce qui forme un cône de Taylor. Les ions de même polarité que le champ électrique sont repoussés vers l'extrémité du cône, où ils forment un jet fin et instable qui se fragmente en gouttelettes chargées [35].

Les gouttelettes sont ensuite soumises à un flux d'azote qui favorise leur évaporation. Au fur et à mesure que le solvant s'évapore, les gouttelettes diminuent de taille et augmentent de charge jusqu'à atteindre un point critique où la répulsion électrostatique entre les charges excède la tension superficielle du liquide. Ce phénomène est appelé explosion de Coulomb et conduit à la formation de gouttelettes plus petites et plus chargées qui subissent le même processus en boucle jusqu'à ce qu'il ne reste plus qu'un seul ion par gouttelette. Ces ions sont alors libérés et accélérés vers le détecteur de masse [35].

1.3.4 Analyseurs de masse

Différents types d'analyseurs existent :

- Les analyseurs de masse "Time Of Flight" (temps de vol) (**TOF**) séparent les ions sur la différence de vitesse après l'accélération et le temps d'arrivée au détecteur. Plus les ions sont lourds (rapport masse sur charge (**m/z**) élevé), plus la vitesse de ceux-ci sera faible. Un **TOF** peut détecter des différences de masse en mesurant les différences de temps de vol à une échelle inférieure à la microseconde [34].
- Les analyseurs de masse Orbitrap distinguent les ions en fonction de leur fréquence d'oscillation. Les ions sont injectés et puis piégés dans l'Orbitrap en se déplaçant le long d'un axe métallique [34].
- Les analyseurs de masse quadripolaires séparent les ions en utilisant un champ électrique oscillant entre quatre électrodes cylindriques disposées en parallèle. Pour identifier les molécules, le quadripôle va isoler les ions précurseurs sur base de leur **m/z**. Les ions possédant un rapport **m/z** spécifique adéquat ainsi qu'une énergie cinétique appropriée seront guidés le long d'une trajectoire stable à travers les électrodes jusqu'au détecteur situé à la sortie de l'analyseur. Les ions qui ne suivent pas la trajectoire désirée seront soit éjectés hors de l'analyseur, soit entreront en collision avec les électrodes, entravant ainsi leur cheminement vers le détecteur. Il devient alors possible de cibler les ions d'intérêt tout en excluant les ions indésirables. (Fig.2) [34].

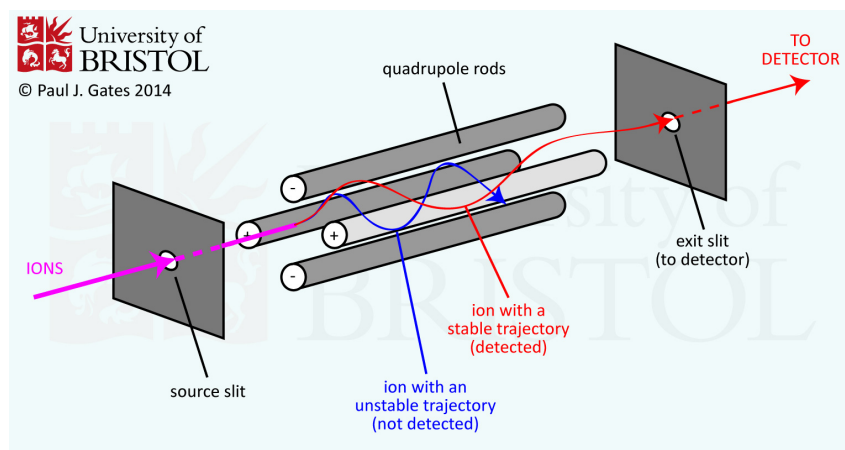


FIGURE 2 – Fonctionnement schématique d'un quadripôle [36]

Ces analyseurs peuvent être combinés afin de réaliser de la spectrométrie de masse en tandem (**MS/MS**). Il existe différents modes de fonctionnement de spectromètre de masse en tandem, mais c'est le mode Selected Reaction Monitoring (**SRM**) ou Multiple Reaction Monitoring (**MRM**) qui sera utilisé dans ce mémoire. Dans celui-ci, le premier analyseur de masse (**MS1**) va séparer les ions de l'échantillon en fonction de leur rapport masse/charge (**m/z**) et va sélectionner un ion spécifique ou une gamme d'ions à fragmenter qui seront les ions parents. Ces ions sont ensuite fragmentés dans la cellule de collision

via des méthodes comme la dissociation induite par collision (CID) où les ions entrent en collision avec un gaz inerte (N_2 , He ou Ar) ce qui produit des ions fils. La fragmentation se produit majoritairement au niveau des liaisons amides reliant les acides aminés [34]. Les ions fils sont ensuite introduits dans le second analyseur de masse (MS2), qui les filtre et les détecte en fonction de leur rapport m/z . L'étape de fragmentation fournit davantage d'informations sur la structure et l'identité des ions qui ont des rapports m/z similaires dans la spectrométrie de masse ordinaire [37]. Des exemples d'analyseurs MS/MS sont les triples quadripôles (QqQ), qui sont composés par trois analyseurs quadripolaires en séries avec celui du milieu servant de cellule de collision et les quadripôle-time of flight (Q-TOF) qui sont composés d'un double quadripôle (1er analyseur + cellule de collision) et d'un analyseur à temps de vol comme second analyseur [38] [39].

Les données résultantes sont obtenues sous forme de chromatogrammes dans lesquels des spectres sont présents. Ces spectres peuvent présenter des pics en fonction du temps de rétention des molécules dans la colonne chromatographique. Ces pics se forment lorsque des molécules ionisées sont captées par l'analyseur de masse. Cela permet d'obtenir des données spécifiques sur la molécule. Dans le contexte de la protéomique, chaque pic peut signifier la détection d'un peptide distinct ou même d'une protéine identifiable [34] [40].

2 Objectifs spécifiques du mémoire

L'utilisation de **FF** contenant des protéines animales à destination de l'alimentation des insectes pourrait représenter un risque sanitaire. La présence de protéines animales dans les insectes une fois nourris par ces FF n'a cependant pas été documentée. Ce travail a été mené afin de pouvoir répondre à une demande croissante des producteurs d'insectes pour utiliser ces déchets de l'industrie agro-alimentaire et de pouvoir déterminer si l'utilisation de FF pour nourrir des insectes représenterait réellement un danger pour l'élevage ou les consommateurs.

Le premier objectif poursuivi par ce mémoire a été de créer une liste de peptides spécifiques des viandes couramment utilisées dans l'industrie du "fastfood". Pour ce travail nous nous sommes limités à la viande de poulet, de porc et de boeuf. Pour ce faire, une recherche bibliographique a été réalisée afin de lister les protéines déjà identifiées comme possédant des peptides spécifiques lors d'autres études. Les séquences des protéines spécifiques ont été digérées théoriquement et la spécificité des peptides résultants a été évaluée théoriquement avec une banque de données puis ils ont été testés par LC/MS-MS.

Le deuxième objectif a consisté à élever des larves d'insecte sur différents substrats. La **MSN** a été choisie pour réaliser ce travail car elle est légalement utilisable dans les fermes d'insectes et présente un taux élevé de conversion de la biomasse. Les substrats utilisés ont été adultérés ou non avec des FF. Trois types de fastfood ont été utilisés, des chicken nuggets contenant du poulet, une pizza contenant du porc et un cheeseburger contenant du boeuf. Par la suite, les échantillons de substrats et de larves issus de cet élevage ont été analysés par LC/MS-MS afin de déterminer si les peptides spécifiques identifiés précédemment étaient détectés, ce qui permettrait d'affirmer qu'il n'y a plus de traces de protéines animales dans les larves.

3 Matériel et méthodes

3.1 Matériels

3.1.1 Aliments

Afin de réaliser les échantillons, les substrats viandeux ont été achetés en grande surface. Les échantillons ont été répartis selon le type de viande (poulet, porc et bœuf) (Fig. 3) et ils sont catégorisés selon qu'ils soient crus, cuit ou fastfood. Pour les viandes crues et cuites il s'agissait des mêmes substrats mais ceux-ci ont été séparés en une partie qui est restée crue et l'autre partie qui a été cuite à la poêle jusqu'à ce que la chair soit bien cuite de façon homogène. L'intérêt de cuire la viande est de déterminer si la cuisson a un impact sur la composition en protéine. Les échantillons appelés fastfood correspondent à des chicken nuggets de la marque Delhaize pour le poulet (Fig. 3d), du jambon cuit de la marque 365 pour le porc (Fig. 3e) et un cheeseburger de la marque Mora pour le bœuf (Fig. 3f). Bien que le jambon cuit ne soit pas classiquement catégorisé comme un fastfood, il est fréquemment utilisé comme ingrédient sur des pizzas, qui sont elles catégorisées comme des fastfoods.

Dans le cas du cheeseburger et des chicken nuggets utilisés pour la sélection des peptides spécifiques, une séparation manuelle a été réalisée pour isoler la viande des autres composants de ces échantillons. Cette étape visait à éliminer la plupart des éléments non liés à la viande présents dans ceux-ci.

Pour l'élevage des larves, des substrats viandeux différents ont été utilisés pour le poulet et le porc. Précédemment seules les parties de viande des échantillons étaient d'intérêt, ce qui a conduit à la séparation des composés non-viandeux présents dans les aliments fastfood. Cependant, dans le cas des larves l'objectif était d'analyser l'intégralité des aliments fastfood afin de se rapprocher au maximum d'une situation industrielle où des FF auraient été donnés aux larves.

Ainsi, un substrat de base (un aliment pour volaille composé d'un mélange de grain de maïs, de froment et de tournesol (Annexe Fig. 7) a été mélangé avec des chicken nuggets surgelés de la marque Delhaize, une pizza spéciale surgelée de la même marque, ainsi qu'un cheeseburger surgelé de la marque Mora (Fig. 4, 5, 3f). Ce mélange a été réalisé de manière à obtenir une concentration de fastfood de 10% dans le substrat.

Suite à l'analyse des étiquettes des aliments fastfoods utilisés, il a été calculé que la quantité de viande présente dans la pizza elle atteignait 78,2 g (23,7% de la pizza) et dans le cheeseburger elle se situait à 20,7 g (16% du cheeseburger). On peut aussi noter la présence de lait de vache dans la pizza et dans le cheeseburger (Annexes Fig. 8, 9).



FIGURE 3 – (a) Poulet cru, (b) Porc cru, (c) Boeuf cru,
(d) Chicken nuggets, (e) Jambon cuit, (f) Cheeseburger

En ce qui concerne la quantité de viande de poulet contenue dans les chicken nuggets du Delhaize, nous avons été contraints de réaliser une estimation en nous basant sur les informations nutritionnelles présentes sur les étiquettes de chicken nuggets d'autres marques. Cette démarche était nécessaire car les pourcentages exacts de viande contenus dans l'aliment que nous avons utilisé ne figuraient pas sur l'étiquette du produit (Annexe Fig.10), et malheureusement, Delhaize n'a pas donné suite à notre requête de partager ces informations avec nous. Les pourcentages de viandes contenus dans les chicken nuggets des marques Iglo et Picard sont respectivement de 51% et de 62,2% [41][42]. Même si il est impossible de savoir exactement la quantité de viande contenue dans les chicken nuggets du Delhaize, nous sommes partis du constat que la moyenne des pourcentages de ces deux marques devrait être une estimation envisageable. Cela nous amène donc à un pourcentage de 56,6% et à une masse de 141,5g de viande de poulet estimée dans les chicken nuggets.

En utilisant ces pourcentages, il est également possible d'estimer la quantité de viande présente dans chaque substrat adultéré. Environ 5,5g de viande de boeuf, 8,3g de viande

de porc et 19,8g de viande de poulet ont été estimés dans 350g de substrat sec modifié.

TABLE 2 – Résumé de l'utilisation des différents substrats fastfood lors des expérimentations

	Échantillons pour la sélection des peptides spécifiques	Échantillons pour l'essai d'élevage d'insecte
Chicken nuggets Delhaize frais : sans la panure	V	
Jambon cuit 365	V	
Cheeseburger Mora : uniquement le steak de boeuf	V	
Chicken nuggets Delhaize surgelés		V
Pizza Spéciale Delhaize		V
Cheeseburger Mora		V



FIGURE 4 – Chicken nuggets surgelés



FIGURE 5 – Pizza Spéciale

Afin d'homogénéiser les substrats secs le mélange a été réalisé au Retsch grindomix GM200 (Fig.15) à 500t/min pendant 15s, ils ont ensuite été humidifiés (60% d'humidité du substrat). Après avoir été humidifiés, tous les substrats ont été mélangés avec un mélangeur rotatif Heidolph REAX 20 à 12t/min pendant 2h (Fig.6).



FIGURE 6 – Heidolph REAX 20

3.1.2 Élevage de larves d'*Hermetia illucens*

Une commande de 500g de larves de MSN a été passée chez Biomimetic [43]. Le jour de la réception du colis ces larves avaient 10 jours (Fig.7). Un tri a été réalisé afin de séparer les larves blanches des larves noires car des larves noires indiquent des larves proches du stade pupal ou bien des larves mortes ce qui aurait été inintéressant car elles n'auraient pas mangé de substrat (Fig.8).



FIGURE 7 – Réception des larves



FIGURE 8 – Tri des larves noires

Sur les 500g de larves à notre disposition, 100g de larves ont directement été mis au congélateur afin d'avoir des larves qui n'ont pas été en contact avec les différents substrats d'élevage testés. Les 400g restants ont été répartis équitablement dans 4 grands bacs d'élevage en plastique de 39x29x11cm, dans lesquels les 4 différents substrats (blanc, fastfood de poulet, de porc et de boeuf) ont été répartis.

À l'intérieur de ces grands bacs, un petit bac de 15x19,5x6cm a été placé afin de récolter les larves car elles se déplacent d'elles-mêmes vers un endroit sec une fois qu'elles ont suffisamment accumulées de ressources pour se transformer en mouches. Une rampe en bois a été créée afin de permettre aux larves d'accéder au bac sec (Fig.9). Les bacs ont été recouverts d'un tissu pour empêcher les larves de s'échapper de leurs bacs respectifs (Fig.10). Ils ont ensuite été placés dans une étuve à 18°C (Fig.11). À partir du jour 2 la température de l'étuve a été augmentée à 20°C et à partir du jour 5 la température a été augmentée à 24°C.

Une routine d'observation des bacs matin(9h), midi(13h) et soir(17h) a été mise en place afin de récolter les pupes retrouvées dans le bac sec. Ces pupes ont été retirées du bac sec et placées dans un autre bac pendant 24h afin de vider leur tube digestif avant d'être congelées. Les pupes du jour 0 au jour 5 ont été placées dans un récipient commun et celles du jour 6 au jour 10 dans un autre récipient. Ces récipients ont été placés à -20°C. Les substrats ont été réhumidifiés à l'aide d'une pissette et mélangés plusieurs fois avec une cuillère durant l'expérience afin de les réhomogénéiser, de les empêcher de sédimenter et de sécher. Des échantillons de 25g de chaque substrat ont été réalisés aux jours 0, 6 et 10. Au jour 10 l'expérience a été arrêtée et toutes les larves restantes ont été séparées du



FIGURE 9 – Bac pour les insectes

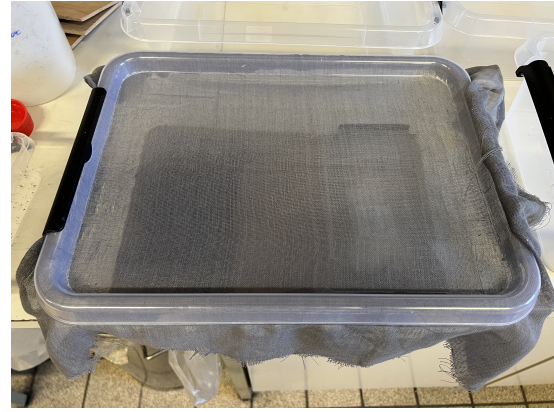


FIGURE 10 – Bac couvert



FIGURE 11 – Bacs placés dans l'étuve

substrat via l'utilisation d'un tamis et d'un jet d'eau (Fig.12). Elles ont ensuite subi un jeûne de 24h avant d'être congelées à -20°C .

Tous les échantillons réalisés pendant l'expérience ont ensuite été placés dans des boîtes de Petri en verre (Fig.13) puis dans une étuve à 40°C pendant 72 heures pour les sécher. Une fois séchées, les larves ont été séparées manuellement du substrat résiduel (Fig.16).

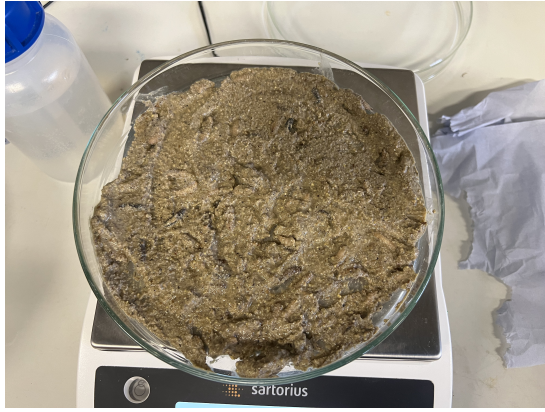


FIGURE 12 – Substrat dans une boîte de Petri



FIGURE 13 – Substrat passé au tamis

La figure 14 illustre les opérations réalisées de manière chronologique lors de l'élevage des larves.

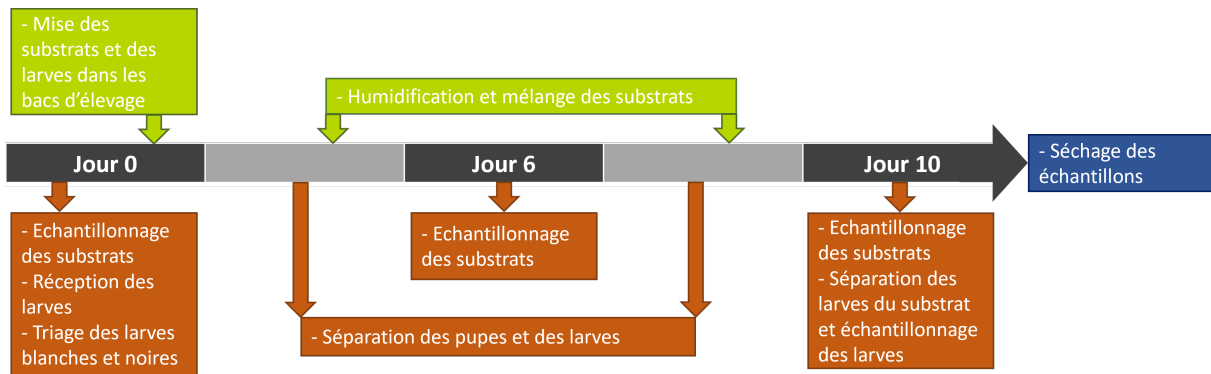


FIGURE 14 – Ligne du temps de l'élevage

3.2 Méthodes

3.2.1 Broyage

Tous les échantillons viandoux ont été broyés avec un broyeur Retsch grindomix GM200 (Fig.15) à 300t/min pendant 20s.



FIGURE 15 – Retsch Grindomix GM200

Pour ce qui est de l'élevage d'insecte, les substrats séchés obtenus ont été broyés au mortier et au pilon (Fig.17). Les larves séchées ont quant à elles subies un premier broyage au mortier et au pilon avec l'aide d'azote liquide et un deuxième broyage avec un broyeur IKA Tube-Mill (Fig.18) à 10000 t/min pendant 20s.



FIGURE 16 – Séparation des larves du substrat sec

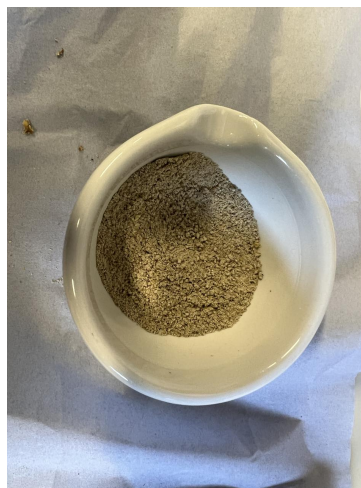


FIGURE 17 – Substrat broyé



FIGURE 18 – IKA Tube-Mill

3.2.2 Extraction

L'extraction a été effectuée sur cinq réplicats de 200 mg pour chaque échantillon de viande. Pour les échantillons de substrats et d'insectes, les extractions ont été réalisées à partir de réplicats de 1 g chacun.

Un volume de 10 ml de tampon d'extraction (Tris-Urée) a été rajouté dans les 5 réplicats et un mélange connu d'hémoglobine et de collagène bovin a été ajouté dans un réplicat afin de servir de contrôle positif. Pour les échantillons de substrats et d'insectes, c'est un mélange d'hémoglobine bovine, de β -Lactoglobuline, de caséine et de collagène bovin, porcine et de volaille qui a été rajouté dans 2 réplicats et dans deux concentrations différentes (LOD : 100ppm->50 μ l, 5xLOD : 500ppm). Afin d'homogénéiser les échantillons, les tubes sont agités pendant 30 min à l'aide d'un multi-rotator Grant Bio (Fig.19). Les tubes sont ensuite placés dans un bain à ultrason (Fig.20) pendant 10 min et puis ils sont centrifugés à 4°C pendant 10 min à 3220g dans une centrifugeuse Eppendorf 5804 R (Fig.21).



FIGURE 19 – Multi-rotator Grant Bio FIGURE 20 – Bain à ultrason FIGURE 21 – Centrifugeuse Eppendorf 5804 R

Afin de réaliser un dosage protéique des échantillons ultérieurement, 500 μ l de surnageant ont été pipetés de tous les tubes et stockés dans des Eppendorf low-binding placés ensuite au congélateur

3.2.3 Digestion

Un volume de 5 ml de surnageant ont été pipetés de tous les échantillons et placés dans des nouveaux tubes contenant 5 ml de tampon de digestion ($\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$). Une pesée de 15,45 mg de dithiothréitol (DTT) par échantillon a été réalisée et mélangée avec 500 μ l de tampon de digestion ($\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$) par échantillon. Un volume de 500 μ l de cette solution a ensuite été ajouté dans chaque tube. Un temps d'incubation de 45 min à température ambiante a suivi.

Une autre pesée de 37,05 mg d'iodoacétamide (IAA) par échantillon a été réalisée et mélangée avec 500 μ l de tampon de digestion ($\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$) par échantillon. Un volume de 500 μ l de cette solution a ensuite été ajouté dans chaque tube. Un temps d'incubation de 45 min à l'abri de la lumière et à température ambiante ont suivi.

Une dernière pesée de 0,5 mg de trypsine par échantillon a été réalisée et mélangée avec 500 μ l d'acide acétique 50 mM par échantillon. Un volume de 500 μ l de cette solution a ensuite été ajouté dans chaque tube. Un temps d'incubation de 1h dans un bain marie (Fig.22) à 37°C a suivi. Afin d'arrêter l'action de la trypsine 150 μ l d'acide formique à 20% est ajouté dans chaque tube. Les tubes ont ensuite été conservés au congélateur à -20°C.

3.2.4 Purification

L'étape de purification permet non seulement de nettoyer l'échantillon des composés qui ne sont pas des peptides mais également de concentrer les peptides obtenus. Une cuve Mannifold est utilisée avec des cartouches d'extraction en phase solide (SPE) (tC18 Sep-Pack 6 cc) (Fig.23).

Pour conditionner les cartouches, il a fallu d'abord verser 9 ml d'acétonitrile (ACN) de qualité HPLC-UV, suivi de l'ajout de 9 ml d'acide formique (HCOOH) à 0,1%. Les échantillons ont ensuite été introduits dans les cartouches, et pour le rinçage, 9 ml d'HCOOH à 0,1% ont été ajoutés après le passage des échantillons. L'étape d'élution a été réalisée en utilisant 3,5 ml d'un mélange d'ACN et de HCOOH à 0,1%, avec une concentration d'ACN de 80%.



FIGURE 22 – Bain marie

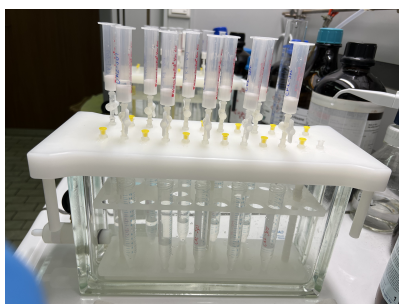


FIGURE 23 – Cuve Mannifold



FIGURE 24 – Centrivap Cold Trap Labconco et Centrivap Concentrator Labconco

3.2.5 Évaporation

Un volume de 15 μ l de diméthylsulfoxyde (DMSO) a été rajouté à chaque échantillon obtenu. Les échantillons ont ensuite été évaporés dans un Centrivap Concentrator Labconco (Fig.24) afin d'éliminer l'acétonitrile et l'eau contenus dans ceux-ci. L'évaporation se déroule à 60°C et sous vide afin d'aspirer les composés évaporés dans un Centrivap Cold Trap Labconco (Fig.24) à -84°C. Le DMSO rajouté précédemment s'évaporerait plus difficilement que l'ACN et l'eau, ce qui permet de les éliminer tout en permettant d'empêcher aux peptides de sécher, ce qui les empêcherait de se solubiliser. Un volume de 375 μ l d'un mélange de solvant ACN/HCOOH 0,1% avec une répartition 5/95 ont été ajoutés

à chaque échantillon. Ce volume ajouté permet de resolubiliser les peptides et d'obtenir un volume plus facilement récupérable à la micro-pipette. Ce volume sera placé dans des récipients spécifiques permettant l'injection dans le spectromètre de masse.

3.2.6 Analyse MS

Pour analyser les extraits obtenus, une technique de chromatographie liquide ultra haute performance (UPLC) en phase inverse a été utilisée. Cette méthode a été couplée à un QqQ (Waters Xevo TQ-XS) avec un mode d'ionisation par électrospray positif (ESI-MS/MS)(Fig.25). Pour améliorer la sélectivité des peptides ciblés, le mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) a été employé, ce qui permet de suivre plusieurs réactions de fragmentation simultanément, contrairement au mode Single Reaction Monitoring (SRM). La colonne chromatographique utilisée était une Acquity C18 de Waters, d'une longueur de 100 mm et d'un diamètre de 2,1 mm. Les échantillons ont été conservés dans le compartiment d'injection à une température de 10 °C, qui a également été maintenue lors de l'injection. Un volume de 2 μ l par échantillon a été injecté. Différents solvants ont été utilisés dans le processus d'analyse, comprenant une phase mobile d'HCOOH à 0,1% (A1), une phase mobile d'ACN avec 0,1% d'acide formique (B1), ainsi qu'un mélange 92/8 des solutions A1 et B1. De plus, une solution composée d'isopropanol, de MEOH, d'ACN et d'eau dans un ratio de 25/25/25/25 a été employée. La constitution de la phase mobile varie dans le temps en faisant un mélange des solutions A1 et B1 en fonction du moment de l'injection afin de libérer les peptides adsorbés par la colonne chromatographique.

Un débit de 0,2 mL/min a été appliqué lors de la séparation des peptides biomarqueurs.



FIGURE 25 – Waters Xevo TQ-XS

3.2.7 Traitement de données MS

Les logiciels Skyline, MassLynx et TargetLynx ont été utilisés pour traiter les données obtenues. L'utilisation du logiciel Skyline permet de découper théoriquement les protéines sélectionnées. Il permet aussi de lire les chromatogrammes obtenus après l'injection ainsi

que de déterminer les transitions avec les meilleurs pics en fonction de leur énergie de collision.

Skyline permet de visualiser les chromatogrammes, ce qui permet l'identification des protéines ou des peptides présents dans l'échantillon. Il est possible d'ajuster les fenêtres de rétention pour gagner en précision lors de l'analyse. Il permet aussi l'optimisation de l'énergie de collision des transitions, cela permet de déterminer l'énergie de collision optimale pour chaque transition. L'optimisation conduit à une amélioration significative de la sensibilité.

Le logiciel Masslynx est un logiciel de spectrométrie de masse développé par la société Waters. Il permet de piloter les instruments de spectrométrie de masse, d'acquérir et d'analyser les données issues des analyses. Il est représenté sous forme d'un tableur dans lequel les échantillons sont référencés avec leurs positions dans la grille d'injection, leurs volumes d'injection et la méthode à utiliser pour les analyser.

Le logiciel TargetLynx est une option applicative du logiciel Masslynx qui permet de réaliser des analyses quantitatives ciblées et de haute qualité en spectrométrie de masse.

4 Résultats et discussion

4.1 Création de la liste de peptides spécifiques

4.1.1 Pré-sélection de peptides spécifiques

Pour commencer ce mémoire, il a fallu trouver un moyen de détecter la présence de viandes de poulet, de porc et de bœuf. À cette fin, une recherche bibliographique a été menée dans le but de recenser des protéines contenant des peptides spécifiques à ces viandes et de les regrouper en une liste. À la fin de cette recherche bibliographique, la liste contenait 17 peptides provenant de 8 protéines pour le poulet, 30 peptides provenant de 14 protéines pour le porc et 12 peptides provenant de 11 protéines pour le bœuf (Tab. [3](#), [4](#), [5](#)).

TABLE 3 – Liste des protéines de poulet contenant des peptides spécifiques trouvées dans la littérature [44][45]

Espèce	Numéro d'accension	Protéine	Peptide	Source
Poulet	P00548	Pyruvate kinase	CLAAALIVMTESGR QPAHDWAEDVDLR EPADAMAAGAVEAFK VTLDNAFMENCDEVLVVDY	Stachniuk 2021
	P16419, Q90688	Myosin-binding protein C	IGAGGVDGYLVEWCR YCITVTNPVGEDSATLHVR VAGAAALPCAPAVK	Stachniuk 2021
	Q05623	Myosin-binding protein H	AISASGTSDPATLEQPVLR	Stachniuk 2021
	P02604, P02606	Myosin light chain 1	DQGTFEDEFVEGLR MTEEEVEELMK	Stachniuk 2021, Sentandreu 2010
	A0A8V0ZYM9	Myosin light chain 2	RAAEGSSNVFSMFDQTQIQEFK AAEGSSNVFSMFDQTQIQEFK EASGPINFTVFLT	Sentandreu 2010
	P02605	Myosin light chain 3	DQGTFEDEFVEGLR ALGQNPTNAEINK TSDVDSVFFIR LDVPISGEPAPTVTWK	Stachniuk 2021, Sentandreu 2010

TABLE 4 – Liste des protéines de porc contenant des peptides spécifiques trouvées dans la littérature [44] [45] [46] [47]

Espèce	Numéro d'accèsion	Protéine	Peptide	Source
Porc	Q1KYT0	β -enolase	NYPVVSIEDPFDQDDWK	Fornal 2019, Stachniuk 2021
	P00355	Glycéraldéhyde-3-phosphate dehydrogenase	WGDAGATYVVESTGVFTTMEK	Montowska 2018, Fornal 2019, Stachniuk 2021
	Q9TV61	Myosin 1	TLAFLFTGAAGADAEGGGK SALAHAVQSSR	Montowska 2018, Stachniuk 2021
	Q9TV63	Myosin 2	TLAFLFSGAQTGEAEAGGTK TLAFLFAER	Stachniuk 2021
	Q9TV62	Myosin 4	HKYEETQAELEASQK KLETDISIQGEMEDIVQEAR SALAHAVQSSR	Montowska 2018, Stachniuk 2021
	P79293	Myosin 7	LLSNLFANYAGADTPVEK	Fornal 2019, Stachniuk 2021
	P02189	Myoglobin	HPGDFGADAQGAMSK YLEFISEAIIQVLQSK GHHEAELTPLAQSHATK GHPETLEK	Stachniuk 2021
	P08835	Serum albumin	EVTEFAK FVIER TVLGNFAAFVQK	Stachniuk 2021
	Q5S1S4	Carbonic anydhrase 3	HDPSLLPWTSYDPPGSAK EPITVSSDQMAK SLYSSAENEPPVPLVR	Stachniuk 2021
	P00339	L-lactate dehydrogenase A	DQLIHNLK	Stachniuk 2021
	P02067	β -Hemoglobin	VNVDEVGGEALG FFESFGDLSNADAVMGNPK	Stachniuk 2021
	Q29554	Trifunctional enzyme subunit α	TVLGAPEVLLGILPGAGGTQR FAGGNLDVLK	Stachniuk 2021
	A0A8W4FJ69	Myosin light chain 1	DQGSYEDFVEGL	Sentandreu 2010
	A0A4X1U3M3	Myosin light chain 2	HFLEELLTTQCDR KHFLEELLTTQCD HFLEELLTTQCDR HVLATLGEKMT	Sentandreu 2010

TABLE 5 – Liste des protéines de boeuf contenant des peptides spécifiques trouvées dans la littérature [44][45][46][47]

Espèce	Numéro d'accension	Protéine	Peptide	Source
Boeuf	A0JNJ5	Myosin light chain 1	QQQDEFKKEAFLL	Sentandreu 2010
	Q3SZE5, Q0P571	Myosin light chain 2	EASGPINFVFLNMFGEK	Fornal 2019, Stachniuk 2021, Sentandreu 2010
	Q9BE40	Myosin 1	TLALLFSGPASGEAEGGP	Montowska 2018, Fornal 2019, Stachniuk 2021
	Q9BE41	Myosin 2	TLAFLFSGTPTGDSEASGGTK MEIDDLASNVEITISK	Montowska 2018, Fornal 2019, Stachniuk 2021
	P02192	Myoglobin	HPSDFGADAAQAAMSK	Montowska 2018, Stachniuk 2021
	P02769	Albumin	HPSDFGADAAQAAMSK	Stachniuk 2021
	P02070	β -Hemoglobin	LHVDPENFK	Stachniuk 2021
	Q3ZBZ8	Stress induced phosphoprotein 1	ALDLSNCK	Stachniuk 2021
	P02769	Carbonic anhydrase 3	LVNELTEFAK GEFQLLLDALDK	Stachniuk 2021
	P19858	L-Lactate dehydrogenase A chain	DLADEVALVDVVMEDK	Stachniuk 2021

Ces tableaux ont été réalisés sur base des informations présentes dans les différents articles utilisés. Dans certains cas, les numéros d'accessions des protéines, qui correspondent à un identifiant unique donné à une protéine enregistrée, n'étaient pas donnés et nous ne disposions que des noms des protéines. Afin d'obtenir les numéros d'accessions qui n'étaient pas en notre possession, une recherche sur la base de données protéique en ligne Uniprot [48] a été menée. De ce fait, certaines protéines ont été choisies sur leur appellation sans être sûr que ce soient celles-là qui étaient spécifiées dans les articles scientifiques. Dans le cas de certaines protéines comme l'anhydrase carbonique 3 (P02769) et la Myoglobine (P02192) présentes chez le boeuf, elles étaient même mal référencées dans l'article [45].

Une fois cette liste de protéine d'intérêt établie, il a fallu vérifier que les protéines référencées comme spécifiques dans la littérature l'étaient bien en identifiant des peptides marqueurs potentiels. Afin de ne pas se limiter aux peptides publiés dans ces études, la séquence complète des protéines a été utilisée et une digestion théorique (*in silico*) a été réalisée. Pour ce faire, les séquences de ces protéines d'intérêt ont été prises sous le format FASTA sur Uniprot [48] et digérées théoriquement à l'aide du logiciel Skyline pour obtenir les peptides. Les paramètres utilisés pour la digestion des protéines sur Skyline comprenaient l'utilisation de la trypsine en tant qu'enzyme, le maintien d'une longueur de peptides entre 8 et 25 acides aminés, l'exclusion des peptides contenant de la méthionine, l'inclusion des peptides comprenant les derniers acides aminés de la chaîne protéique et aucun clivage de la protéine manqué accepté.

Le nombre de peptides obtenus après la digestion théorique par Skyline était de 119 pour le poulet, 179 pour le porc et de 105 pour le boeuf. La figure [26] reprend les différentes étapes qui vont suivre ainsi que leurs impacts sur la liste de protéine et de peptides jusqu'à arriver à la liste finale contenant les peptides spécifiques.

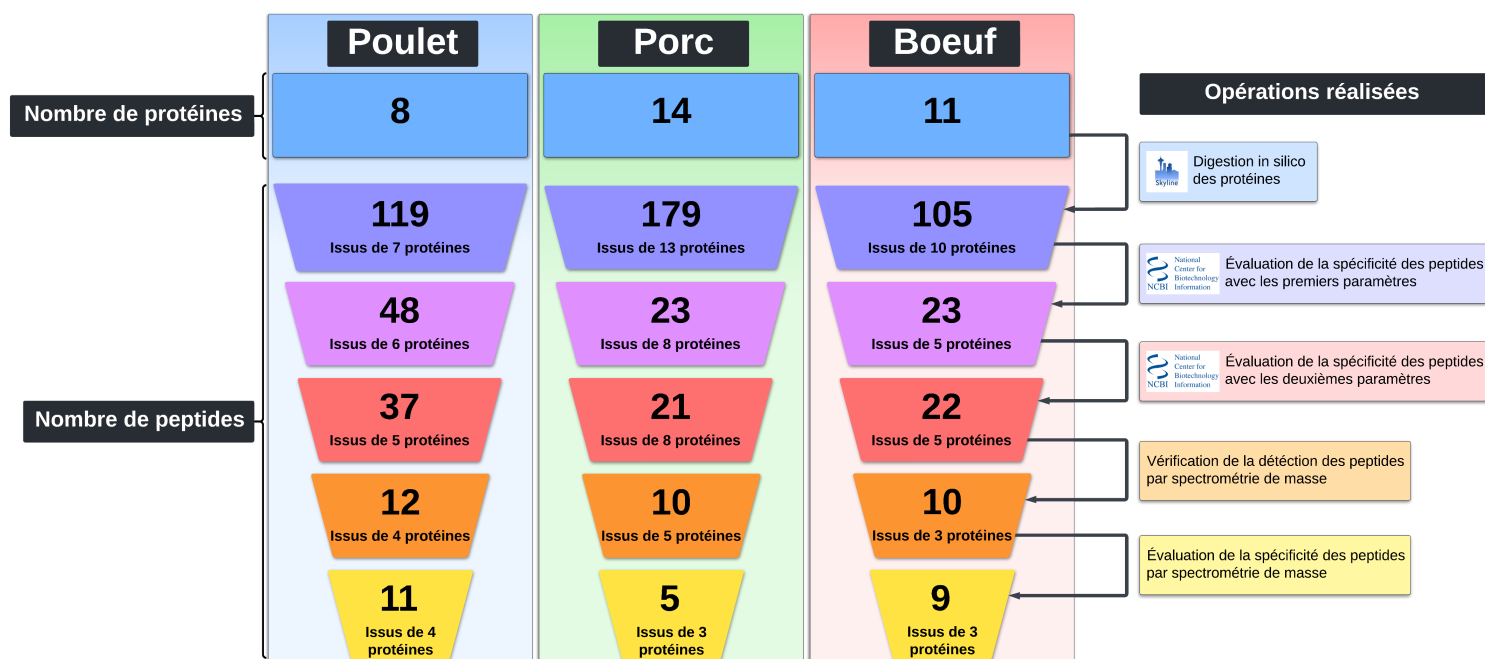


FIGURE 26 – Schéma reprenant les étapes réalisées ainsi que leurs impacts sur la liste de protéine et de peptides spécifiques

Il est intéressant de noter qu'à ce stade les protéines myosin light chain 2 du boeuf et du porc ainsi que la protéine myosin light chain 3 du poulet n'ont pas été retenues, car elles présentaient des peptides identiques à d'autres peptides contenus dans d'autres protéines présentes dans la liste.

L'outil BLAST du "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) [49] permet de trouver les régions similaires entre deux ou plusieurs séquences de nucléotides ou d'acides aminés. Sur base d'un peptide, l'outil BLAST permet de retrouver rapidement les séquences répertoriées dans des bases de données ayant des zones de similitude avec le peptide initial. En l'occurrence, nous avons utilisé cet outil pour comparer tous les peptides obtenus via la digestion théorique de Skyline avec les taxons *Equus*, *Ovis*, *Capra*, *Gallus* (et plus précisément l'espèce *Gallus gallus*), *Sus* (et plus précisément l'espèce *Sus scrofa*) et *Bos*.

Le tableau 6 présente les peptides qui ont été comparés avec divers genres et espèces. Les peptides spécifiques de chaque espèce (poulet, porc et boeuf) ont été confrontés aux autres taxons que ceux de l'espèce en question. Par exemple, les peptides provenant de protéines issues du poulet ont été comparés avec *Equus*, *Ovis*, *Capra*, *Sus scrofa* et *Bos*.

Les espèces *Gallus gallus*, *Sus scrofa* et le genre *Bos* ont été sélectionnés, car ils sont directement liés aux espèces que nous cherchons à détecter dans ce mémoire. Les autres genres (*Equus*, *Ovis* et *Capra*) ont été sélectionnés car ce sont des viandes qui peuvent

TABLE 6 – Représentation des comparaisons entre différents taxons à l'aide de l'outil BLAST [49]

	<i>Equus</i>	<i>Ovis</i>	<i>Capra</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Bos</i>
Peptides de poulet	V	V	V		V	V
Peptides de porc	V	V	V	V		V
Peptides de boeuf	V	V	V	V	V	

se retrouver dans l'alimentation humaine et que nous voulions augmenter la spécificité de nos peptides.

La figure 27 montre les résultats de l'outil BLAST de NCBI [49] sur le peptide DDPHACYSTVFDK qui provient de l'albumine de boeuf. Cette figure montre les correspondances avec différents peptides présents dans sa base de donnée. Si une correspondance à 100% était trouvée dans les colonnes "Query Cover" et "Per. Ident", le peptide était écarté. Le terme "Query Cover" indique la fraction de la séquence qui est effectivement employée pour interroger la base de données lors de l'alignement de celle-ci, tandis que le "Percentage Identity" indique si deux séquences ont les mêmes acides aminés aux mêmes positions, c'est-à-dire leur degré de similitude. Le peptide DDPHACYSTVFDK a donc été gardé.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
hypothetical protein MJG53_005803 [Ovis ammon polii x Ovis aries]	Ovis ammon polii x Ovis ar...	50.3	67.0	100%	2e-08	93.33%	1859	KAI4585569.1
hypothetical protein MJT46_005371 [Ovis ammon polii x Ovis aries]	Ovis ammon polii x Ovis ar...	47.7	64.5	100%	1e-07	86.67%	1891	KAI4572303.1
hypothetical protein MG293_006971 [Ovis ammon polii]	Ovis ammon polii	47.7	47.7	100%	1e-07	86.67%	1737	KAI4542845.1
hypothetical protein JEQ12_017500 [Ovis aries]	Ovis aries	47.7	64.5	100%	1e-07	86.67%	677	KAG5207736.1
hypothetical protein K5549_002370 [Capra hircus]	Capra hircus	47.7	47.7	100%	1e-07	86.67%	609	KAI1061083.1
PREDICTED: serum albumin [Capra hircus]	Capra hircus	47.7	47.7	100%	1e-07	86.67%	607	XP_005681801.1
albumin precursor [Ovis aries]	Ovis aries	47.7	47.7	100%	1e-07	86.67%	607	NP_001009376.1
Crystal Structure of Ovine Serum Albumin [Ovis aries]	Ovis aries	47.7	47.7	100%	1e-07	86.67%	583	4LUF_A
Structure of caprine serum albumin in orthorhombic crystal system [Capra hircus]	Capra hircus	47.7	47.7	100%	1e-07	86.67%	583	5ORL_A
albumin [Sus scrofa domesticus]	Sus scrofa domesticus	39.2	39.2	93%	1e-04	78.57%	607	ABM92961.1
albumin precursor [Sus scrofa]	Sus scrofa	39.2	39.2	93%	1e-04	78.57%	607	NP_001005208.1
albumin [Sus scrofa]	Sus scrofa	39.2	39.2	93%	1e-04	78.57%	605	AAA30988.1
albumin [Sus scrofa]	Sus scrofa	39.2	39.2	93%	1e-04	78.57%	605	CAA30970.1
albumin [Equus quagga]	Equus quagga	32.5	32.5	73%	0.037	81.82%	607	XP_046511604.1
albumin precursor [Equus asinus]	Equus asinus	32.5	32.5	73%	0.037	81.82%	607	NP_001310707.1
PREDICTED: serum albumin [Equus przewalskii]	Equus przewalskii	32.5	32.5	73%	0.037	81.82%	607	XP_008524663.1
Crystal Structure of Equine Serum Albumin in complex with Diclofenac [Equus caballus]	Equus caballus	32.5	32.5	73%	0.037	81.82%	583	4ZBQ_A
Chain A. Albumin [Equus caballus]	Equus caballus	32.5	32.5	73%	0.037	81.82%	580	7Q4X_A

FIGURE 27 – Résultats de l'outil BLAST de NCBI sur le peptide DDPHACYSTVFDK avec les genres *Equus*, *Ovis*, *Capra* et les espèces *Gallus gallus* et *Sus scrofa*

Le nombre de peptides obtenus après l'utilisation de l'outil BLAST était de 48 pour le poulet, 23 pour le porc et de 23 pour le boeuf (Annexe Tab. 1).

Les peptides restants après cette étape ont encore été comparés avec l'outil BLAST les taxons suivants : *Anas*, *Anser*, *Numididae*, *Perdicinae*, *Struthio*, *Columba*, *Phasianidae*. Ces taxons ont été sélectionnés car ce sont des volatiles qu'il est possible de retrouver dans l'alimentation humaine, cela permet d'augmenter la spécificité théorique de nos peptides en les comparant avec plus de taxons, plus spécifiquement ceux de *Gallus gallus* car ces volatiles ont beaucoup de peptides en commun. Cela permet aussi de discriminer les peptides identifiés chez *Gallus gallus* en trois catégories distinctes : la première catégorie (Poulet solo) se compose de peptides que l'on ne retrouve que dans les protéines de l'espèce *Gallus gallus*, la deuxième catégorie (Poulet dinde) se compose de peptides que l'on ne retrouve que dans les protéines des taxons *Gallus gallus* et *Phasianidae* et la troisième catégorie (Poulet tous) qui se compose de peptides que l'on retrouve dans tous les taxons de volatiles susmentionnés.

Le nombre de peptides obtenus après avoir utilisé l'outil BLAST une seconde fois avec d'autres paramètres était de 37 pour le poulet, 21 pour le porc et de 22 pour le boeuf (Annexe Tab.2).

4.1.2 Évaluation de la liste de peptides candidats

Les peptides obtenus jusqu'ici n'avaient subi que des méthodes de discrimination théorique, ils ont donc été analysés par spectrométrie de masse pour, premièrement, vérifier qu'ils étaient détectables et deuxièmement qu'ils étaient spécifiques entre eux.

Les peptides de chaque espèce ont été testés sur leurs échantillons de viandes respectifs (Fig. 3) avec les méthodes générées par Skyline. Ces méthodes contiennent toutes les informations théoriques des peptides comme entre autres le temps de rétention prédit auquel les ions d'un peptide sont censés être détectés, le rapport m/z des ions parents de chaque peptide ainsi que le rapport m/z des ions fils qui découle des ions parents ou encore l'énergie de collision théorique (EC). La masse est exprimée en Dalton (Da).

Le tableau 7 est un exemple de données comprises dans la méthode du peptide DDPHACYSTVFDK. Les ions fils, aussi appelés transitions, représentent les ions pouvant être produits lors de la fragmentation des ions parents. Les ions parents peuvent être chargés 2+ et 3+ tandis que les ions fils peuvent être chargés + et 2+. Skyline ne peut pas estimer le temps de rétention, étant donné que celui-ci peut varier d'une machine à l'autre en fonction des protocoles utilisés avec le spectromètre de masse. Par conséquent, la plage de temps de rétention est définie entre 2 et 10 minutes, cet intervalle correspondant à la fenêtre d'analyse de l'échantillon dans le spectromètre de masse.

TABLE 7 – Exemple de données comprises dans la méthode d'un peptide

Peptide	Temps de rétention (min)	Ions parents : m/z (z)	Ions fils : m/z (z)	EC (V)
DDPHACYSTVFDK	de 2 à 10	777,8301 (2+)	1324,5990 (+) 1090,4874 (+) 1019,4503 (+) 859,4196 (+) 662,8032 (2+) 859,3039 (+) 946,3360 (+) 1047,3836 (+)	28
DDPHACYSTVFDK	de 2 à 10	518,8892 (3+)	1324,5990 (+) 859,4196 (+) 696,3563 (+) 609,3243 (+) 662,8032 (2+) 614,2768 (2+) 545,7473 (2+) 536,2100 (+) 696,2406 (+) 859,3039 (+) 524,1955 (2+) 573,7297 (2+) 647,2639 (2+)	17

Les résultats obtenus suite à l'injection des échantillons dans un spectromètre de masse ont été traités sur Skyline. Ils sont représentés sous forme de chromatogrammes repré-

sentant l'intensité du signal en fonction du temps de rétention. Le mode opératoire de traitement pour déterminer si les peptides étaient détectés était le suivant : si les pics de minimum trois transitions d'un même ion parent étaient situés sur le même temps de rétention pour l'ion parent chargé 2+ et 3+, et que ces pics n'apparaissaient pas dans l'échantillon blanc, les peptides étaient considérés comme détectés. Il fallait aussi que ces pics affichent une intensité minimum d'environ 10^5 afin d'être sûr de pouvoir les détecter facilement par la suite.

On peut observer sur les figures 28 et 29 les résultats du peptide de boeuf DDPHA-CYSTVFDK obtenus suite à l'injection des échantillons de boeuf. Sur la figure 28 on peut observer les chromatogrammes de l'échantillon blanc et des échantillons de boeuf. Un pic est observable à 5,7 min de temps de rétention sur tous les chromatogrammes des échantillons de boeuf, mais pas sur le chromatogramme de l'échantillon blanc (qui ne contient pas de boeuf). Cela signifie que ce peptide est détectable et qu'il est donc retenu. La figure 29 représente un agrandissement du chromatogramme de l'échantillon de boeuf cru (Fig 28b) afin de mieux visualiser les transitions formant le pic au temps de rétention 5,7 min. À partir de cette étape, la fenêtre de rétention a été réduite à +/-1 min du pic détecté, dans le cas de ce peptide elle est donc de 4,7 à 6,7 min.

À l'inverse, on peut observer sur la figure 30 les résultats du peptide de boeuf TLED-QVNELK obtenus suite à l'injection des échantillons de boeuf. Ces chromatogrammes ne montrent aucun pic commun, ils sont tous différents. Cela indique que nous ne détectons pas ce peptide et qu'il n'est donc pas retenu.

Il est important de noter la différence d'échelle d'intensité (l'axe des ordonnées) lors de la lecture de ces différents chromatogrammes.

Si une transition n'indiquait aucun pic d'intensité à un temps de rétention où d'autres transitions indiquaient un pic qui permettait d'affirmer que le peptide était détectable, alors cette transition était écartée.

Le nombre de peptides détectés par spectrométrie de masse était de 12 pour le poulet, 10 pour le porc et de 10 pour le boeuf (Annexe Tab.3).

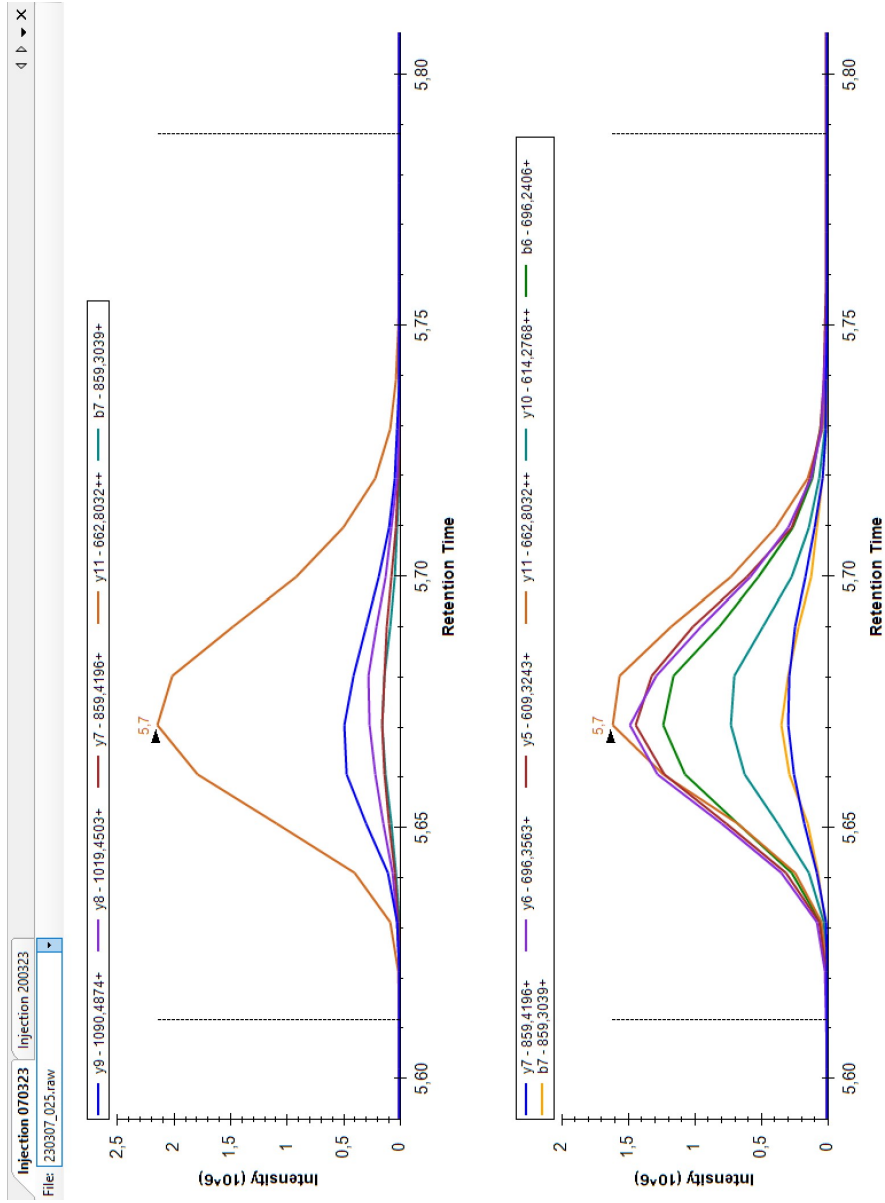


FIGURE 29 – Agrandissement des résultats de l’injection de l’échantillon de boeuf cru (fig.28b) sous forme de chromatogrammes pour le peptide de boeuf DDPHACYSTVFDK
Chaque tracé de couleur correspond à une transition différente

Afin de s'assurer de la spécificité des peptides, les peptides de chaque espèce ayant été détectés ont été testés sur les échantillons contenant les viandes des autres espèces. Par exemple, le peptide de boeuf DDPHACYSTVFDK a été analysé sur les échantillons de porc et de poulet.

Sur les figures [31](#) et [32](#) les résultats obtenus pour le peptide de boeuf DDPHACYSTVFDK peuvent être observés. La figure [31](#) montre les chromatogrammes de l'échantillon de fastfood de boeuf et des échantillons de porc, tandis que la figure [32](#) montre les chromatogrammes des échantillons de poulet. Ces chromatogrammes sont agrandis autour d'un temps de rétention compris entre 5,5 et 5,9 min afin de pouvoir plus précisément si les pics sont présents ou non. Comme vu dans la figure [28](#) un regroupement de pics au temps de rétention 5,7 min confirme la présence de ce peptide dans l'échantillon. Hors dans les figures [31](#) et [32](#) on observe ces pics uniquement dans la figure [31a](#) qui est un échantillon de fastfood de boeuf servant de contrôle positif. Ce peptide est donc bien spécifique.

Le nombre de peptides considérés comme spécifiques était de 11 pour le poulet, 5 pour le porc et de 9 pour le boeuf (Annexe Tab.[4](#)). Les peptides qui étaient détectés chez d'autres espèces n'ont pas été retenus car cela voulait dire qu'ils n'étaient pas spécifiques.

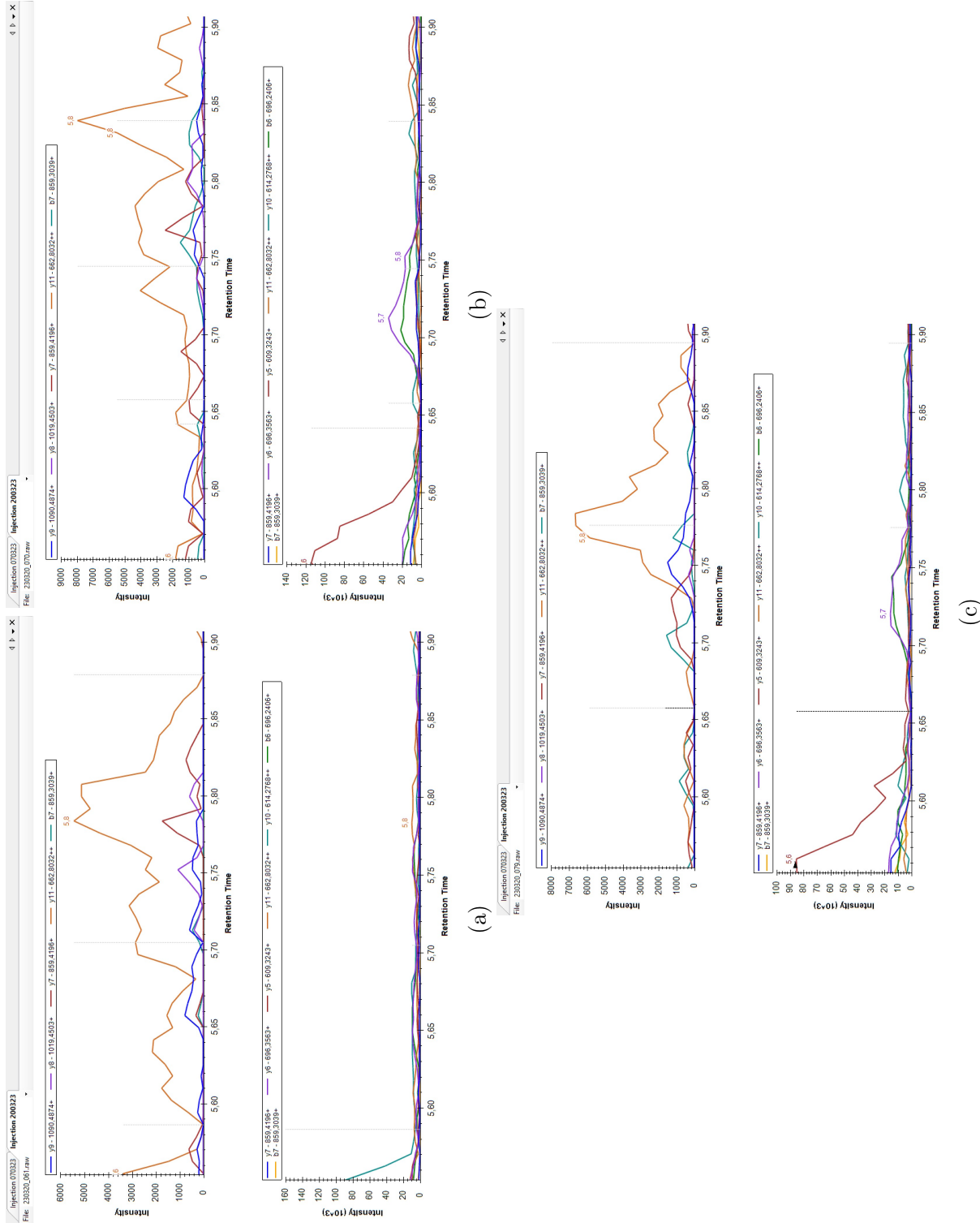


FIGURE 32 – Résultats de l'injection des échantillons de poulet sous forme de chromatogrammes pour le peptide de boeuf DDPHACYSTVFDK (a) Poulet cru, (b) Poulet cuit, (c) Fastfood de poulet

4.1.3 Optimisation de l'énergie de collision

Optimiser l'énergie de collision (EC) d'une transition permet d'obtenir une meilleure aire de pic et donc une meilleure réponse. Le logiciel Skyline propose une EC pour chaque transition, mais cette EC n'est pas toujours celle qui donne la meilleure aire de pic. Afin de déterminer la meilleure EC pour chaque transition, il a fallu expérimenter dix variations d'EC différentes (-5/+5) que celle proposée initialement par Skyline.

Les figures 33, 34, 35 et 36 représentent les résultats obtenus pour des transitions de l'ion parent chargé 3+ ($m/z=518,8892$) du peptide DDPHACYSTVFDK. Sur ces figures, on peut observer sur la partie de droite un histogramme représentant les aires de pic pour chaque transition en fonction de leur EC. La barre rouge centrale de l'histogramme indique l'EC proposée initialement par Skyline. Les barres de couleur dans l'histogramme correspondent à l'aire du pic des transitions de la même couleur dans le chromatogramme qui est sur la gauche de l'histogramme.

Sur la figure 33 on observe dans l'histogramme que la barre rouge centrale est celle qui donne la meilleure aire de pic, et on peut faire le même constat en regardant le chromatogramme qui l'accompagne. Ces transitions correspondent à l'ion fils dont le rapport $m/z=614,2768$ (2+).

Sur la figure 34 on observe dans l'histogramme que c'est la barre brune qui donne la meilleure aire de pic, celle-ci correspond à une EC diminuée de deux par rapport à celle proposée initialement par Skyline. Ces transitions correspondent à l'ion fils dont le rapport $m/z=696.3563$ (+). L'EC de cet ion-fils a été modifiée de 17 V à 15 V.

Pour les résultats de l'ion fils dont le rapport $m/z=662.8032$ (2+), la figure 35 indique que l'EC qui donne la meilleure aire de pic est la bleue (-5). Cela ne nous permet pas d'affirmer que c'est l'EC diminuée de cinq qui donne la meilleure aire de pic, car nous n'avons pas d'information sur l'EC diminuée de six ou de sept et celles-ci pourraient être plus grandes que l'EC diminuée de cinq.

La figure 36 montre un deuxième histogramme où la barre centrale (rouge) correspond à la barre -5 (bleue) du premier graphique. Nous pouvons observer que c'est bien l'EC diminuée de cinq qui donne la meilleure aire de pic pour cette transition, c'est donc celle-ci qui a été utilisée dans la méthode optimisée

Afin d'alléger les informations de chaque peptide, un choix entre les deux ions parents a été réalisé. Pour décider quel ion parent allait être gardé, nous avons sélectionné l'ion parent possédant les transitions ayant les plus grandes aires de pics. Une fois l'ion parent sélectionné, les trois transitions donnant les meilleures aires de pics ont été sélectionnées et les autres ont été supprimées. Par exemple, dans le tableau 8 qui présente les données relatives au peptide DDPHACYSTVFDK (comprenant la fenêtre de rétention du pic, les ions précurseurs du peptide, les ions produits dérivés des ions précurseurs, les EC initiales

et sélectionnées ainsi que les aires des pics pour chaque ion fils), on remarque que c'est l'ion parent chargé 3+ ($m/z=518,8892$) qui détient les aires de pics les plus grandes pour 3 transitions (4×10^6 , 10^6 et 10^6 contre 3×10^6 , $2,2 \times 10^5$ et $1,2 \times 10^5$ pour l'ion parent chargé 2+ ($m/z=777,8301$)), c'est donc celui-ci qui sera sélectionné avec les ions fils (transitions) possédant un rapport m/z de 696,3563 (+), 609,3243 (+) et 662,8032 (2+).

TABLE 8 – Exemple de données complétées et optimisées comprises dans la méthode d'un peptide

Peptide	Temps de rétention (min)	Ions parents : m/z (z)	Ions fils : m/z (z)	EC (V) initiale	EC (V) sélectionnée	Aire de pic
DDPHACYSTVFDK	de 4,7 à 6,7	777,8301 (2+)	1090,4874 (+)	28	29	$2,2 \times 10^5$
			1019,4503 (+)	28	28	$1,2 \times 10^5$
			859,4196 (+)	28	28	4×10^4
			662,8032 (2+)	28	23	3×10^6
			859,3039 (+)	28	27	5×10^4
DDPHACYSTVFDK	de 4,7 à 6,7	518,8892 (3+)	859,4196 (+)	17	16	$2,3 \times 10^5$
			696,3563 (+)	17	15	10^6
			609,3243 (+)	17	14	10^6
			662,8032 (2+)	17	12	4×10^6
			614,2768 (2+)	17	17	5×10^5
			696,2406 (+)	17	14	9×10^5
			859,3039 (+)	17	14	$2,5 \times 10^5$

4.1.4 Validation de la liste de peptides spécifiques

Jusqu'à présent, les peptides ont été testés sur des échantillons contenant de la viande pure. Dans la deuxième partie de ce mémoire, ces viandes allaient être diluées à 10% avec un autre substrat afin de nourrir les larves. Afin de pouvoir valider la liste de peptides obtenue, il fallait pouvoir confirmer que nous les détectons sur des échantillons moins concentrés en viande. Des échantillons de viandes dilués à 10% avec de l'HCOOH 0,1% ont été réalisés avec les échantillons de viandes pures. Les peptides ont été testés sur ces échantillons dilués et aucun peptide n'a été mis de côté lors de cette étape car ils étaient tous détectables.

Toutes les informations relatives aux peptides répertoriés dans les tableaux [9](#), [10](#), [11](#) et [12](#) ont été regroupées au sein d'un fichier désigné sous le nom de "méthode" dans le logiciel MassLynx. Au sein de cette méthode, les "ions ratios" ([IR](#)) de chaque peptide ont été intégrés sur base des résultats obtenus lors de la validation des peptides. Les [IR](#) ont donc été déterminés sur les échantillons de viandes pures. Les [IR](#) déterminent l'ordre d'intensité des transitions de chaque peptide.

À titre d'exemple, pour le peptide DDPHACYSTVFDK, les transitions ont été ordonnées en fonction de leur intensité, avec la transition 662,8032 (2+) en tête, suivie de la transition 609,3243 (+) et ensuite de la transition 696,3563 (+). Cette information a été incorporée à la méthode pour permettre au logiciel TargetLynx, qui permet l'analyse des

résultats, de vérifier si les transitions observées sont en accord avec cet ordre d'intensité attendu. En cas de divergence, cela indiquerait que ce n'est pas le peptide cherché qui est observé. La détermination de l'[IR](#) ajoute ainsi un critère de spécificité supplémentaire pour l'évaluation des peptides détectés.

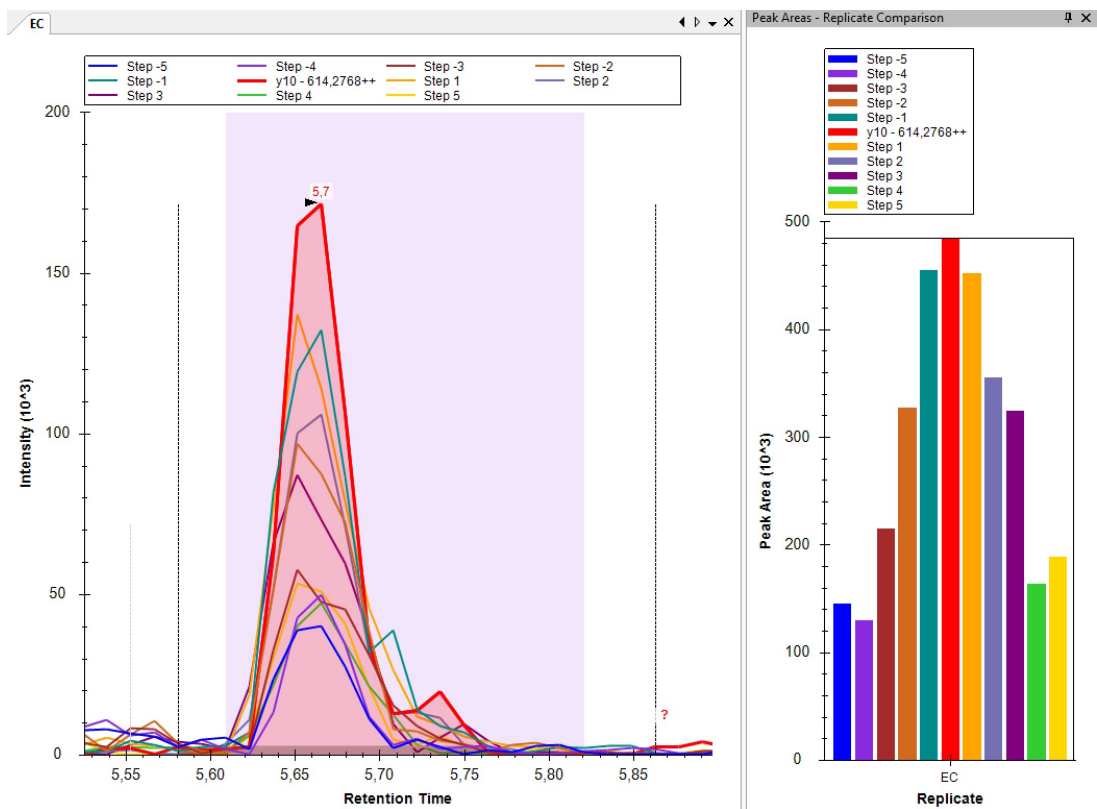


FIGURE 33 – Représentation de la transition 614,2768 (2+) du peptide DDPHACYSTVFDK possédant une énergie de collision optimisée initialement

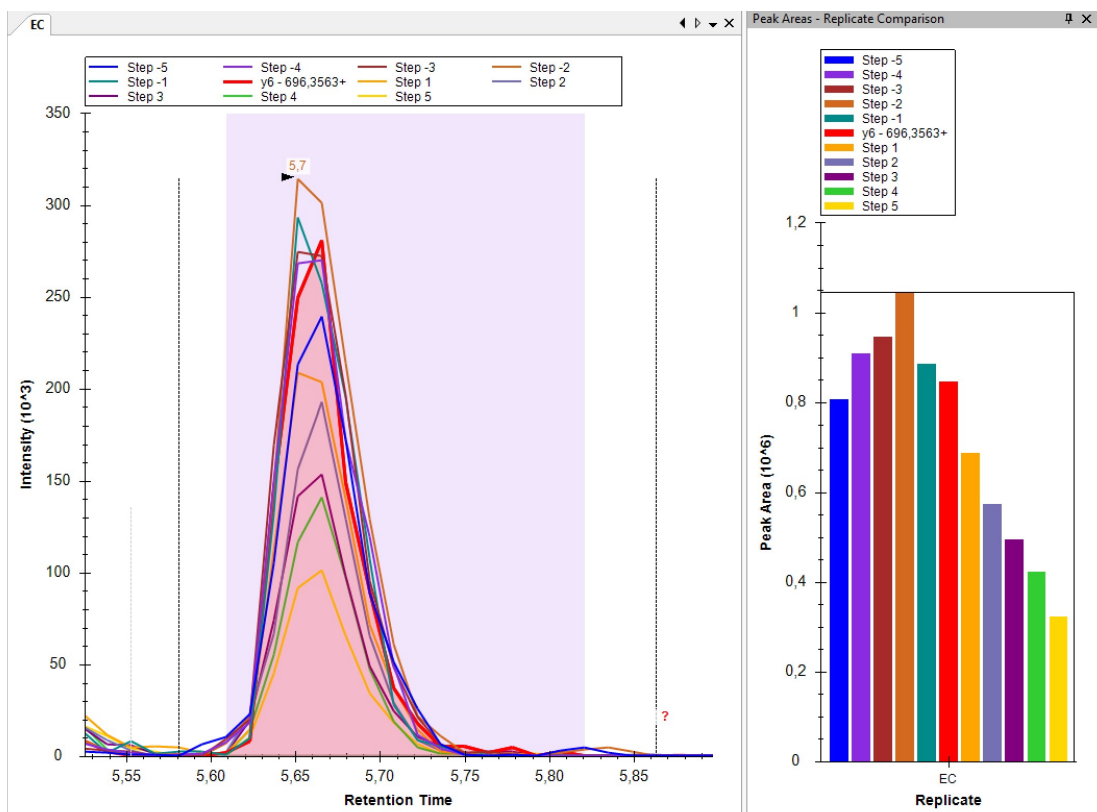


FIGURE 34 – Représentation de la transition 696,3563 (+) du peptide DDPHACYSTVFDK possédant une énergie de collision optimisée en -2

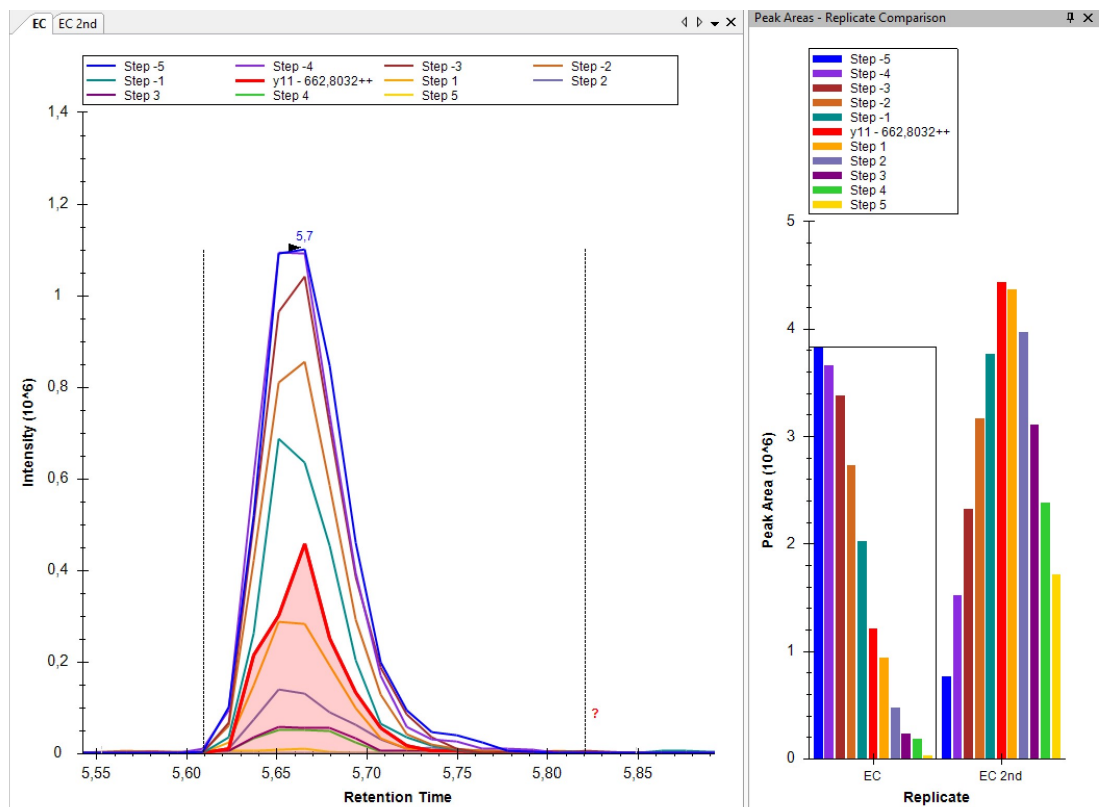


FIGURE 35 – Représentation de la transition 662,8032 (2+) du peptide DDPHACYSTVFDK possédant peut-être une énergie de collision optimisée en -5

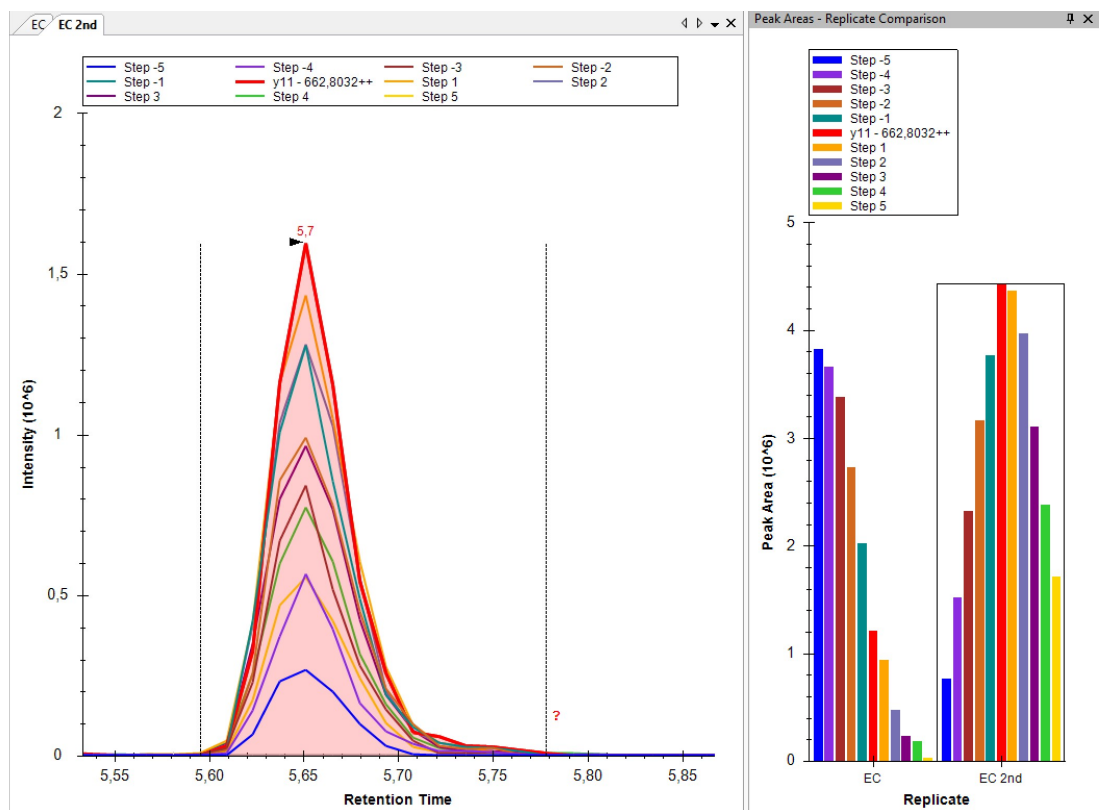


FIGURE 36 – Vérification de l'optimisation en -5 de la transition 662,8032 (2+) du peptide DDPHACYSTVFDK

4.2 Utilisation de la liste de peptides spécifiques

Des peptides qui avaient été antérieurement identifiés comme spécifiques aux trois espèces lors d'autres expériences par spectrométrie de masse menées par le Centre de Recherche agricole Wallon ([CRA-W](#)) ont été incorporés à notre liste de peptides. Cette addition a permis d'augmenter le nombre total de peptides à 41 [\[50\]](#)[\[51\]](#). Ces peptides supplémentaires sont mis en gras dans les tableaux [\[9\]](#), [\[10\]](#), [\[11\]](#) et [\[12\]](#) afin de pouvoir les différencier plus facilement de ceux identifiés lors de ce mémoire.

Les tableaux [\[9\]](#), [\[10\]](#), [\[11\]](#) et [\[12\]](#) rassemblent les données accumulées jusqu'à présent, notamment les cibles où sont localisées les protéines, les protéines elles-mêmes, les peptides associés, les temps de rétention attendus pour les pics de chaque peptide, les ions parents choisis pour chaque peptide, les trois ions fils donnant les meilleures aires de pics de chaque ion parent ainsi que les énergies de collision sélectionnées. Le tableau [\[9\]](#) présente les données relatives au poulet, le tableau [\[10\]](#) quant à lui concerne les données du porc, et les tableaux [\[11\]](#) et [\[12\]](#) recueillent les données concernant le boeuf. Les peptides en italique dans ces tableaux sont les peptides qui étaient référencés dans la littérature comme étant spécifiques et repris dans les tableaux [\[3\]](#), [\[4\]](#) et [\[5\]](#).

TABLE 9 – Liste finale des protéines contenant des peptides spécifiques de poulet

Cible	Protéine	Peptide [Position dans la protéine]	Temps de rétention (min)	Ion parent : m/z (z)	Ions fils : m/z (z)	EC (V) sélectionnée
Muscle poulet solo	Myosin-binding protein C, fast-type	R.GLEDQVVVGDR.V [345, 356]	7,2	438,8931 (3+)	446,2358 (+) 572,7833 (2+) 513,2667 (2+)	16 11 9
		K.AAENTIVVAGNK.V [541, 553]	7	429,2419 (3+)	587,3511 (+) 487,2147 (+) 600,2988 (+)	13 15 13
Muscle poulet dinde	Myosin-binding protein C, fast-type	R.TSDVDSVFFIR.S [881, 891]	7	429,2189 (3+)	681,4083 (+) 582,3398 (+)	14 13
		K.DQGTFFEDFVEGLR.V [123, 135]	8,4	756,8519 (2+)	442,2373 (2+) 518,2093 (+) 1111,5419 (+) 964,4734 (+)	16 17 24 24
	Myosin light chain 1, skeletal muscle Pyruvate kinase	R.QQFEEILR.H [392, 399]	6,5	531,7826 (2+)	835,4308 (+) 806,4407 (+)	24 19
		K.QPAHDAWAEDVDLR.V [475, 488]	6,1	541,5901 (3+)	659,3723 (+) 533,2354 (+) 817,4050 (+) 746,3679 (+) 617,3253 (+)	20 14 16 16 15
Muscle poulet tous	Myosin-binding protein C, cardiac type	K.VAGESLLK.K [168, 175]	2,6	272,8324 (3+)	373,2809 (+) 444,2089 (+)	11 11
		R.LDVPISGDPTPTVIWQK.V [668, 684]	8,4	622,6718 (3+)	557,2930 (+) 535,3057 (2+) 625,3556 (+)	10 16 12
	Pyruvate kinase	R.LDIDSEPTIAR.N [32, 42]	6,1	615,3222 (2+)	498,2558 (2+) 888,4421 (+) 773,4152 (+)	24 20 22
		R.LNFSHGTHEYHEGTTIK.N [73, 88]	9,2	623,9675 (3+)	557,3406 (+) 821,8841 (2+)	19 14
	Collagen	R.EATESFASDPITYRPVAIALDTK.G [92, 114]	7,7	832,4270 (3+)	636,3044 (2+) 755,3289 (2+) 1033,0519 (2+) 916,0016 (2+)	18 19 23 24
		K.GEIGPAGNVGPTGPAGPR.G [264, 281] [51]	5,5	802,4130 (2+)	880,4831 (2+) 809,4264 (+) 752,4050 (+)	23 32 32
		R.GLVGEPGPAGAK.G [342, 353] [51]	4,5	534,78782 (+)	624,3282 (2+) 443,2613 (+) 456,2453 (+)	27 27 13
		K.GNVGLAGPR.G [510, 518] [51]	4,5	420,7380 (2+)	613,3304 (+) 570,3358 (+)	17 15
		R.GLHGFEFGVPGPAGPR.G [573, 587] [51]	5,6	488,5845 (3+)	513,3144 (+) 441,2456 (+) 667,3522 (+) 698,3257 (+) 797,3941 (+)	10 10 13 15 10

TABLE 10 – Liste finale des protéines contenant des peptides spécifiques de porc

Cible	Protéine	Peptide [Position dans la protéine]	Temps de rétention (min)	Ion parent : m/z (z)	Ions fils : m/z (z)	EC (V) sélectionnée
Muscle porc	β -enolase	K.NYPVVSIEDPFDQDDWK.T [286, 302]	8,5	1033,9707 (2+)	1165,4796 (+) 1050,4527 (+) 895,4176 (2+)	32 38 28
	Myosin 4	K.TLAFLFAER.Q [619, 627] K.SALAHAVQSSR.H [1329, 1339]	8,6 2,4	534,2978 (2+) 376,2036 (3+)	853,4567 (+) 782,4196 (+) 635,3511 (+) 484,7672 (2+) 428,2252 (2+) 392,7067 (2+)	16 16 20 10 10 14
	Carbonic anhydrase 3	<i>K.HDPSELLPWTASYDPPGSAK.T</i> [40, 57]	7,6	647,9829 (3+)	824,3785 (+) 459,2562 (+) 663,3461 (+)	18 25 18
		K.HPDGVAVVGIFLK.I [136, 148]	8,2	451,2626 (3+)	577,3708 (+) 506,2358 (+) 676,3413 (+)	11 12 11
	Collagen	R.GFPGSPGNVGPAGK.E [451, 464] [51] R.GIPGEFGLPGPAGPR.G [574, 588] [51]	4,5 6,7	637,3122 (2+) 727,3753 (2+)	1069,5273 (+) 812,4261 (+) 372,2241 (+) 984,5261 (+) 837,4577 (+) 667,3522 (+)	21 25 31 29 29 29

TABLE 11 – Liste finale des protéines contenant des peptides spécifiques de muscle de boeuf

Cible	Protéine	Peptide [Position dans la protéine]	Temps de rétention (min)	Ion parent : m/z (z)	Ions fils : m/z (z)	EC (V) sélectionnée
Muscle boeuf	Myosin 1	<i>K.TLALLFSGPASGEAEGGPK.K</i> [619, 637]	8,2	601,3159 (3+)	744,3523 (+) 645,8017 (2+) 500,2407 (2+)	15 12 15
		<i>K.DLGEEHFK.G</i> [37, 44]	4,5	325,4908 (3+)	560,2827 (+) 430,2191 (2+) 373,6770 (2+)	11 8 8
Carbonic anhydrase 3	Albumin	<i>K.LVNELTEFAK.T</i> [66, 75]	7,1	582,3190 (2+)	837,4353 (+) 708,3927 (+)	18 19
		<i>K.YICDNQDTISSK.L</i> [286, 297]	4,3	722,3247 (2+)	595,3086 (+) 1007,4640 (+)	17 23
		<i>K.DDPHACYSTVFDK.L</i> [387, 399]	5,7		892,4371 (+) 778,3941 (+)	25 24
		<i>R.RPCFSALTPDETYVPK.A</i> [508, 523]	6,5		696,3563 (+) 609,3243 (+)	15 14
		<i>K.HADGIAVVGVFLK.I</i> [136, 148]	6,7		662,8032 (2+) 948,4673 (+)	12 14
		<i>K.GEFQLLLDALDK.I</i> [154, 165]	8,2		719,3294 (+) 933,4611 (+)	21 14
		<i>R.GSTGEIGPAGPPGPPGLR.G</i> [380, 397] [51]	9,5		840,7087 (3+)	30
		<i>R.GPPGESGAAGPTGPIGSR.G</i> [590, 607] [51]	8,2		429,2456 (+) 992,9561 (2+)	31 26
		<i>R.GEPGAVGAVGAVGPR.G</i> [977, 994] [51]	9,5		442,5907 (3+)	9
		Collagen			681,36922 (+)	565,2729 (+) 664,3413 (+) 900,5401 (+) 787,4560 (+)
			824,91812 (+)	688,3665 (+) 1047,5582 (+) 879,4683 (+)	18 24 25	
			790,8868 (2+)	822,4468 (+) 1426,6921 (+)	23 25	
			758,8970 (2+)	912,4898 (+) 841,4526 (+)	23 23	
				880,4999 (+) 781,4315 (+)	25 26	
				665,8649 (2+)	18	

TABLE 12 – Liste finale des protéines contenant des peptides spécifiques de sang et de lait de boeuf

Cible	Protéine	Peptide [Position dans la protéine]	Temps de rétention (min)	Ion parent : m/z (z)	Ions fils : m/z (z)	EC (V) sélectionnée
Sang boeuf	α -Hemoglobin	K.VGGHAAEYGAALER.M [18, 32] [50]	5	510,5829 (3+)	745,3839 (+) 617,3253 (+) 622,2944 (+)	14 16 14
	β -Hemoglobin	K.AAVTAFWGK.V [8, 16] [50] K.EFTPLQADFQK.V [120, 131] [50] K.VVAGVANALAHR.Y [132, 143] [50] K.HQGLPQEVLENLLR.F [23, 37] [50]	7 7,3 5,6 7,2	475,7584 (2+) 711,8668 (2+) 393,2315 (3+) 587,3198 (3+)	709,3668 (+) 608,3191 (+) 537,2820 (+) 1045,5677 (+) 849,4465 (+) 523,2875 (2+) 681,3791 (+) 490,2752 (2+) 454,7567 (2+) 758,4155 (+) 436,2303 (+) 790,3842 (+)	12 13 11 19 22 19 13 9 9 16 17 17
Lait boeuf	Casein	R.FFVAPFPEVFGK.E [38, 49] [50] R.LSFNPTQLEEQCHI.- [165, 178] [50]	9,5 7,5	692,8686 (2+) 858,4065 (2+)	991,5247 (+) 920,4876 (+) 676,3665 (+) 1254,5783 (+) 928,4193 (+) 627,7928 (2+)	18 18 28 26 27 27

4.2.1 Résultats des échantillons de l'élevage de larves MSN

Dans l'objectif de confirmer la présence de tous les peptides (Tab.9,10,11,12) au sein des échantillons de l'expérience menée sur la MSN, une analyse LC/MS-MS a été réalisée avec la méthode dans MassLynx. Les résultats obtenus ont été ensuite interprétés grâce à l'outil TargetLynx.

Ces échantillons étaient répartis en différentes catégories : la constitution (les échantillons de larves et de substrat), le moment où l'échantillon a été prélevé lors de l'expérience (Jour 0 et Jour 10) et l'adultération du substrat par un fastfood (substrat blanc, nuggets de poulet, pizza contenant du porc et cheeseburger de boeuf). Lors de l'extraction, chaque échantillon a été subdivisé en cinq sous-échantillons distincts. Un contrôle positif (LOD) contenant de l'hémoglobine bovine, de la caséine, de la β -lactoglobuline et du collagène de boeuf, de porc et de poulet a été rajouté à 2 des 5 sous-échantillons. Ces ajouts ont été effectués à deux concentrations différentes, soit une concentration simple (2.5 ppm pour l'hémoglobine, 100 ppm pour le lait, pour les collagènes de bovin et de porc et 100 ppm de "processed animal protein" (PAP) de poulet) et une concentration cinq fois supérieure à la concentration simple, chacune correspondant à un sous-échantillon distinct. Ce contrôle permet d'affirmer que les résultats obtenus sont conformes s'il est détecté.

La table 13 permet d'observer les résultats obtenus sur les substrats du début de l'expérience (Sub J0) pour tous les peptides de la liste. Les données qui y sont référencées sont la détection du contrôle (uniquement à forte concentration ou à forte et faible concentration) ainsi que l'aire de pic des peptides détectés. Ces substrats n'ont pas été en contact avec les larves.

Les peptides ont été placés dans la liste en deux groupes, le premier correspond aux peptides provenant d'autres expériences (BvHb_AAVTAFWVGK -> Po-Coll_GEIGPAGN VGPTGPAGPR) et le deuxième correspond aux peptides que nous avons identifiés comme spécifiques lors de ce mémoire (Bv Myosin_TLALLFSGPASGEAEGGPK -> PoTous Pyrkin_EATESFASDPITYRPVAIALDTK).

On observe qu'aucun peptide spécifique n'est détecté chez les échantillons de substrats blancs, ce qui confirme qu'ils ne détiennent pas de traces de viandes.

Les protéines de muscles ne sont pas encore incluses dans le contrôle car le seuil de détection de celles-ci doit encore être déterminé. L'absence de contrôle positif pour ces peptides ne permet donc malheureusement pas de dire si l'absence de détection des peptides identifiés dans le mémoire est due à leur absence ou à un effet matrice. Cela explique pourquoi le contrôle n'est pas détectable dans le deuxième groupe. Les contrôles détectés dans le deuxième groupe ne signifient pas la détection du contrôle mais la détection du

peptide cherché dans les échantillons où le contrôle a été rajouté.

Les peptides respectifs à chaque viande du premier groupe sont tous détectables dans les substrats mélangés avec leur viande, ce n'est pas le cas des peptides du deuxième groupe qui ne sont pas tous détectables dans leurs viandes respectives. On peut observer qu'aucun peptide de boeuf du deuxième groupe n'a été détecté, cela peut être dû à la faible quantité de viande de boeuf présente dans le substrat adultéré (environ 5,5g de viande de boeuf par rapport à 8,3g de viande de porc et 19,8g de viande de poulet selon notre estimation dans 350g de substrat sec adultéré).

Il est normal de détecter de la caséine (BvCas) et de la β -lactoglobuline (BvBLG) dans les substrats contenant du porc et du boeuf car les fastfoods utilisés contenaient du fromage composé de lait de vache et que ces protéines sont contenues dans celui-ci (Annexes Fig. 8,9).

TABLE 13 – Résultats de la détection des peptides spécifiques sur les échantillons provenant de l'expérience sur la MSN

	Sub J0 FB		Sub J0 CK		Sub J0 PC		Sub J0 BV	
	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire
BvHb_AAVTAFWGK	V		V		V		V	11 266
BvHb_EFTPVLQADFQK	V		V		V		V	9 354
BvHb_VGGHAAEYGAEALER	V		V		V		V	16 646
BvHb_VVAGVANALahr	V		V		V		V	113 402
BvCas_FFVAFFPEVFGK	V		V		V	742 100	V	325 203
BvCas_HQGLPQEVLNENLLR	V		V		V	262 300	V	160 176
BvBLG_LSFNPTQLEEQCHI	V		V		V	306 806	V	49 530
BvColl_GEPGPAGAVGPAGAVGPR_758	V		V		x5		V	275 665
BvColl_GSTGEIGPAGPP[+16]GPP[+16]GLR	V		V		V		V	37 063
BvColl_GPP[+16]GESGAAGTPGIGSR_790	V		V		V		V	41 792
Pig-Coll_GFP[+16]GSP[+16]GNVGPAGK	V		V		V	151 018	V	
Pig-Coll_GIP[+16]GEFGLP[+16]GPAGPR	V		V		V	406 169	V	
Po-Coll_GNVGLAGPR	V		V	489 584	V		V	
Po-Coll_GLHGFEFVVP[+16]GPAGPR	V		V	257 728	V		V	
Po-Coll_GLVGEP[+16]GPAGAK	V		V	222 349	V		V	
Po-Coll_GEIGPAGNVGPTGPAGPR	V		V	26 618	V		V	
Bv Myosin_TLALLFSGPASGEAEGGPK.3								
Bv Albu_DLGEHF.3								
Bv Albu_LVNELEFAK.2								
Bv Albu_YIC(+57.021464)DNQDTISSK.2								
Bv Albu_DDPHAC(+57.021464)YSTVFDK.3								
Bv Albu_RPC(+57.021464)FSALTPDETYVPK								
Bv Carb_HADGIAVVGVLK.3								
Bv Carb_EWGYADHNGPDHWHELFPNAK.3								
Bv Carb_GEFQLLDALDK.2								
Pig Beno_NYPVVSIEDPFQDDWK.2					V	8 333		
Pig Myosin_TLAFLAER.2								
Pig Myosin_SALAHAVQSSR.3					V	157 583		
Pig Carb_HDPSLLPWTASYDPGSAK.3					V	19 514		
Pig Carb_HPDGVAVVGIFLK.3								
PoSolo MyosinB_GLEDQVVVGDR.3								
PoSolo MyosinB_AAENTIVVAGNK.3			V	25 313				
PoDinde MyosinB_TSDVDSVFIR.3			V	15 430				
PoDinde MLE1_DQGTFFDFVEGLR.2			V	673 205				
PoDinde PyrKin_QQFEEILR.2								
PoDinde PyrKin_QPAHDAWAEDVDLR.3								
PoTous MyosinB_VAGESLLK.3			V	290 214				
PoTous MyosinB_LDVPISGDPTPTVIWQK.3								
PoTous PyrKin_LDIDSEPTIAR.2			V	66 680				
PoTous PyrKin_LNFSHGTHEYHEGTIK.3								
PoTous Pyrkin_EATESFASDPITYRPAIALDTK.3			V	10 499				

Légende :	Sub	Substrat	V	Les deux contrôles sont visibles
	FB	Feed Blanc	x5	Seul le contrôle concentré 5 fois est détectable
	CK	Poulet	###	Aire moyenne des pics détectés dans les échantillons sans contrôle
	PC	Porc		
	BV	Bœuf		
	J0	Jour 0		

Afin de mieux visualiser les résultats, la table [14](#) reprend uniquement les résultats obtenus pour les échantillons de larves et de substrat pour les peptides ayant été détectés dans les substrats initiaux, car les peptides n'ayant pas été détectés dans un substrat initial ne sont pas non plus détectables dans les autres échantillons (Annexe Tab. [5](#)).

La seule exception provient du peptide Bv Albu_DLGEEHFK qui n'est pas détecté dans le substrat initial mais bien dans le substrat final de l'expérience.

De manière générale, les mêmes résultats ont été observés pour les substrats du premier groupe n'ayant pas été en contact avec les larves, tous les contrôles positifs étaient observables. Sur les substrats ayant été en contact avec les larves, seuls les contrôles des 4 mêmes peptides (BvColl_GSTGEIGPAGPP[+16]GPP[+16]GLR, BvColl_GPP[+16]GESGAAGPTGPIGSR_790, Pig-Coll_GFP[+16]GSP[+16]GNVGPAGK et Po-Coll_GLVGEP[+16]GPAGAK) étaient détectés dans tous les échantillons.

Dans les échantillons de larves, les peptides avec lesquels les contrôles sont détectés sont identiques (BvColl_GSTGEIGPAGPP[+16]GPP[+16]GLR, BvColl_GPP[+16]GESGAA GPTGPIGSR_790, Pig-Coll_GFP[+16]GSP[+16]GNVGPAGK, Pig-Coll_GIP[+16]GEFGLP[+16]GPAGPR et Po-Coll_GLVGEP[+16]GPAGAK) indépendamment du substrat utilisé pour nourrir les larves, à l'exception des échantillons de larves nourries avec le substrat contenant du porc, où aucun peptide n'a été détecté. De plus, aucun peptide n'est détecté dans les échantillons de larves.

De manière générale, les peptides détectés dans les substrats finaux ont une réponse plus faible que dans les substrats initiaux.

TABLE 14 – Résultats de la détection des peptides spécifiques sur les échantillons provenant de l'expérience sur la MSN

	Lar J0		Sub J0 FB		Lar J10 FB		Sub J0 CK		Sub J10 CK		Lar J10 CK		Sub J0 PC		Sub J10 PC		Lar J10 PC		Sub J0 BV		Sub J10 BV		Lar J10 BV	
	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire
BvHb_AAVTAFWGK	V						V						V	11 266					V					
BvHb_EFTPVLOADFQK	V						V						V	9 354					V					
BvHb_VGGHAAEYGAELER	V						V						V	16 646					V					
BvHb_VVAGVANALAHR	V						V						V	113 402					V					
BvCas_FFVAPPEVFGK	V						V						V	742 100					V					
BvCas_HQGLPOEVLINELLR	V						V						V	262 300					V					
BvBLG_LSFNPTQLEECCHI	V						V						V	306 806					V					
BvCoil_GEPGAGAVGPAGVPR_758	V						V						x5						V					
BvCoil_GSTGEIGPAGPPI(+16)GPI(+16)GLR	x5						V						V						V					
BvCoil_GPI(+16)GESGAAGTPIGSR_790	V						V						V						V					
Pig-Coll_GFPI(+16)GSP(+16)GNVGPAGK	x5						V						V	151 018					V					
Pig-Coll_GIPI(+16)GEFGLP(+16)GPAGPR	V						V						V	406 169					V					
Po-Coil_GNVGLAGPR	V						V						V						V					
Po-Coil_GLHGEFGVPI(+16)GPAGPR	V						V	489 584					V						V					
Po-Coil_GLVGEP(+16)GPAGAK	V						V	257 728					V						V					
Po-Coil_GEIGPAGNVGPTGPAGPR	x5						V						V						V					
Bv Albu_DLIGEEHFK.3							V						V						V					
Pig Beno_NYPVVSIEDPPDQDDWK.2							V						V						V					
Pig Myosin_SALAHAVQSSR.3							V						V						V					
Pig Carb_HDPSLLPWTASVDPSAK.3							V						V						V					
PoSolo MyosinB_AAENTIVVAGNK.3							V	25 313					V						V					
PoDinde MyosinB_TSDVDSVFFIR.3							V	15 430					V						V					
PoDinde MLE1_DQGTDFEVEGLR.2							V	673 205					V						V					
PoTous MyosinB_VAGESLLK.3							V	290 214					V						V					
PoTous Pyrkin_LDIDSEPTIAR.2							V	66 680					V						V					
PoTous Pyrkin_EATESFASDPITYRPVAIALDK.3							V	10 499					V						V					

Légende :		Lar	Larves
Sub	Substrat	V	Les deux contrôles sont visibles
FB	Feed Blanc	x5	Seul le contrôle concentré 5 fois est détectable
CK	Poulet	###	Aire moyenne des pics détectés dans les échantillons sans contrôle
PC	Porc		
BV	Bœuf		
J0	Jour 0		
J10	Jour 10		

4.2.2 Hypothèses

Les résultats obtenus soulèvent une piste intéressante quant à l'explication de ces observations. Il est possible que les larves, ou leur microbiote intestinal, produisent des enzymes capables de dégrader plus efficacement les peptides que ne le ferait uniquement la trypsine. En effet, les larves de MSN possèdent des sérines protéases (de la trypsine, de la chymotrypsine et de l'élastase) et de la pepsine dans leur tractus digestif. L'analyse du microbiote intestinal a révélé la présence de certaines bactéries comme des *Pseudomonadotas*, des Firmicutes et des Bacteroidètes, ainsi que d'un Ascomycète (*Issatchenkia spp.*). Une forte corrélation entre la présence de *Pediococcus spp.* et *Lactobacillus spp.* et l'activité de la trypsine a été mise en évidence, ce qui laisse supposer que ces bactéries pourraient contribuer directement à la dégradation des protéines en sécrétant des enzymes protéolytiques. *Issatchenkia spp.* quant à lui était particulièrement lié à l'activité de la pepsine, une enzyme protéolytique rarement présente dans les intestins des insectes. Le microbiote intestinal joue également un rôle important dans la dégradation de la caséine. Ces micro-organismes, en coopération avec les enzymes protéolytiques présentes dans le tractus digestif des larves, pourraient jouer un rôle crucial dans la dégradation des protéines aux côtés de la trypsine [52].

En raison de sa structure particulière, le collagène présente une résistance à la plupart des protéases courantes. Il ne peut être dégradé que par un nombre restreint de protéases collagénolytiques d'origine mammifère ou bactérienne. Parmi elles, on trouve les métalloprotéases matricielles (MMP), les protéases à cystéine et certaines protéases bactériennes comme les sérines protéases. Parmi celles rapportées jusqu'à présent, on retrouve les collagénases de *Clostridium* et les collagénases de *Vibrio* [53]. Les sérines protéases démontrent la capacité de dégrader la myosine [54]. On pourrait donc supposer la présence de ces espèces dans le tractus digestif. La présence de collagénase peut-être détectée avec l'utilisation de films d'hydrogel de poly(éthylène glycol) réticulés [55].

La piste de la spécificité des enzymes peut être envisagée. Par exemple, la trypsine hydrolyse les liaisons peptidiques impliquant la lysine ou l'arginine, tandis que la ProAla-nase, une alternative efficace à la trypsine, hydrolyse les liaisons peptidiques avec la proline ou l'alanine [56]. Si les peptides produits diffèrent de ceux produits par la trypsine, il est normal qu'ils ne soient pas détectés.

5 Conclusion

L'entomoculture se présente comme une alternative prometteuse pour réduire l'impact de l'élevage sur l'environnement en proposant une nouvelle source de protéines, notamment en valorisant des déchets alimentaires (les FF). Dans ce contexte, cette étude a cherché à identifier des peptides spécifiques de viandes de poulet, de porc et de boeuf pour les détecter dans des farines d'insectes. Une recherche bibliographique a été réalisée pour sélectionner des protéines contenant des peptides spécifiques. La spécificité de ces protéines a été évaluée d'abord théoriquement avec une base de donnée et puis LC/MS-MS, ce qui a permis d'isoler 25 peptides répondant aux critères de spécificité. Grâce à l'ajout de peptides spécifiques précédemment identifiés par le CRA-W, la liste a été élargie pour atteindre un total de 15 peptides pour le poulet, 7 pour le porc et 19 pour le boeuf, ce qui fait un total de 41 peptides spécifiques.

Cette liste a ensuite été utilisée pour analyser des échantillons de substrat et de larves provenant de l'élevage de larves de MSN nourries avec des substrats contenant des fast-foods de poulet, de porc et de boeuf. Les résultats montrent que tous les peptides n'étaient pas détectables dans ces échantillons. Néanmoins, pour les échantillons de substrats initiaux où les peptides sont détectables, on observe une diminution du signal, voir même une absence de détection de ces peptides dans les échantillons de substrats finaux qui ont été en contact avec les larves de MSN.

Quant aux échantillons de larves, aucun peptide n'a pu être détecté, et même les contrôles positifs ajoutés après l'expérience sont difficilement, voire pas du tout détectables pour certains peptides. La détection d'un plus grand nombre de peptides spécifiques au poulet par rapport à ceux spécifiques au porc et au boeuf pourrait être attribuée à la quantité inférieure de viande de porc et de boeuf contenue dans les substrats adultéré.

Cependant, il est important de souligner que l'absence de détection ne permet pas d'affirmer l'absence des peptides. Les résultats, présentés sous forme de chromatogramme, mettent en évidence la présence d'un bruit de fond matriciel. Ces signaux non spécifiques ou indésirables peuvent parfois occulter les signaux cibles ou les pics attendus, rendant leur détection plus difficile.

Ces observations soulèvent la question de la présence potentielle d'enzymes sécrétées par les larves elles-mêmes ou par leur microbiote intestinal, qui pourraient dégrader les peptides de manière plus efficace que ne le ferait simplement l'ajout de trypsine lors des manipulations.

Les prochaines étapes de cette étude pourraient impliquer l'exploration de diverses ap-

proches visant à réduire le bruit de la matrice, pour potentiellement permettre la détection d'un plus grand nombre de peptides. Une piste intéressante consisterait à reproduire l'élevage de MSN en introduisant une quantité identique de viande provenant des fastfoods dans les différents substrats, ce qui permettrait de vérifier si les peptides spécifiques à chaque type de viande deviennent plus détectables. De plus, il serait intéressant d'investiguer les capacités des larves de MSN à produire des enzymes et d'évaluer leurs capacités de protéolyse afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la dégradation des peptides.

Références

- [1] N. Alexandratos and J. Bruinsma. World agriculture towards 2030/2050 : the 2012 revision. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, pages 3–6, 2012.
- [2] Anne Mottet, Cees de Haan, Alessandra Faluccci, Giuseppe Tempio, Carolyn Opio, and Pierre Gerber. Livestock : On our plates or eating at our table? a new analysis of the feed/food debate. *Global Food Security*, 14 :1–8, 2017.
- [3] Mark J Post. Cultured meat from stem cells : Challenges and prospects. *Meat science*, 92(3) :297–301, 2012.
- [4] Harinder PS Makkar, Gilles Tran, Valérie Heuzé, Sylvie Giger-Reverdin, Michel Lesire, François Lebas, and Philippe Ankers. Seaweeds for livestock diets : A review. *Animal Feed Science and Technology*, 212 :1–17, 2016.
- [5] Arnold Van Huis and Dennis GAB Oonincx. The environmental sustainability of insects as food and feed. a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37 :1–14, 2017.
- [6] Thomas Spranghers, Matteo Ottoboni, Cindy Klootwijk, Anneke Owyn, Stefaan Deboosere, Bruno De Meulenaer, Joris Michiels, Mia Eeckhout, Patrick De Clercq, and Stefaan De Smet. Nutritional composition of black soldier fly (*hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(8) :2594–2600, 2017.
- [7] Cengiz Kaya, Tomas N. Generalovic, Gunilla Ståhls, Martin Hauser, Ana Clariza Samayoa, Carlos Gustavo NUNES-SILVA, Heather Roxburgh, Jens Wohlfahrt, Ebenezer Ato Ewusie, Marc Kenis, Yupa Hanboonsong, Jesus Orozco, Nancy Carrejo, Satoshi Nakamura, Laura Gasco, Santos Rojo, Chrysantus Mbi Tanga, Rudolf Meier, Clint Rhode, C. Picard, Chris D. Jiggins, Florian Leiber, Jeffery K. Tomberlin, Martin Hasselmann, Wolf U. Blanckenhorn, Martin Kapun, and Christoph Sandrock. Global population genetic structure and demographic trajectories of the black soldier fly, *hermetia illucens*. *BMC Biology*, 19, 2021.
- [8] S. A. Marshall, N. E. Woodley, and M. Hauser. The historical spread of the black soldier fly, *hermetia illucens* (l.) (diptera, stratiomyidae, hermetiinae), and its establishment in canada. *JESO*, 146(1), 2015.
- [9] Trinh T. X. Nguyen, Jeffery K. Tomberlin, and Sherah Vanlaerhoven. Ability of Black Soldier Fly (Diptera : Stratiomyidae) Larvae to Recycle Food Waste. *Environmental Entomology*, 44(2) :406–410, 02 2015. doi : 10.1093/ee/nvv002. URL <https://doi.org/10.1093/ee/nvv002>.

- [10] C Lalander, S Diener, C Zurbrügg, and B Vinnerås. Effects of feedstock on larval development and process efficiency in waste treatment with black soldier fly (*hermetia illucens*). *Journal of cleaner production*, 208 :211–219, 2019.
- [11] DGAB Oonincx, A Van Huis, and JJA Van Loon. Nutrient utilisation by black soldier flies fed with chicken, pig, or cow manure. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(2) :131–139, 2015.
- [12] Karol B Barragan-Fonseca, Marcel Dicke, and Joop JA van Loon. Nutritional value of the black soldier fly (*hermetia illucens* l.) and its suitability as animal feed—a review. *Journal of Insects as Food and Feed*, 3(2) :105–120, 2017.
- [13] Siew Yoong Leong, Shamsul Rahman Mohamed Kutty, Amirhossein Malakahmad, and Chew Khun Tan. Feasibility study of biodiesel production using lipids of *hermetia illucens* larva fed with organic waste. *Waste Management*, 47 :84–90, 2016.
- [14] Jeroen De Smet, Enya Wynants, Paul Cos, and Leen Van Campenhout. Microbial community dynamics during rearing of black soldier fly larvae (*hermetia illucens*) and impact on exploitation potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (9) :e02722–17, 2018.
- [15] Jeffery K Tomberlin, Peter H Adler, and Heidi M Myers. Development of the black soldier fly (diptera : Stratiomyidae) in relation to temperature. *Environmental entomology*, 38(3) :930–934, 2009.
- [16] Leslie A. Holmes. Role of abiotic factors on the development and life history of the black soldier fly, *hermetia illucens* (l.) (diptera : Stratiomyidae). 2010.
- [17] GuoHui Yu, YiPing Li, YuHuan Yang, Qiang Xia, et al. Effects of the artificial diet with low water content on the growth and development of the black soldier fly, *hermetia illucens* (diptera : Stratiomyidae). *Acta Entomologica Sinica*, 57(8) : 943–950, 2014.
- [18] Eu regulations 178/2002. 2002. URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?qid=1533115830206&uri=CELEX:02002R0178-20180701>.
- [19] Eu regulations 852/2004. 2004. URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?qid=1533116375432&uri=CELEX:02004R0852-20090420>.
- [20] Eu regulations 183/2005. 2005. URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?qid=1533116429538&uri=CELEX:02005R0183-20160423>.
- [21] Ipiiff eu legislation. 2022. URL <https://ipiff.org/insects-eu-legislation/>.
- [22] Eu regulations 98/58/ce. 1998. URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?qid=1533116881895&uri=CELEX:01998L0058-20030605>.

- [23] Eu regulations 142/2011. 2011. URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1533117126291&uri=CELEX:02011R0142-20170802>.
- [24] Eu regulations 1069/2009. 2009. URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1533117001553&uri=CELEX:02009R1069-20140101>.
- [25] Eu regulations 1143/2014. 2014. URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32014R1143>.
- [26] EFSA Scientific Committee. Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA journal*, 13(10) :4257, 2015.
- [27] Effpa, former foodstuffs part of food waste reduction. . URL <https://www.effpa.eu/former-foodstuffs-part-of-food-waste-reduction/>.
- [28] Effpa, what are former foodstuffs? . URL <https://www.effpa.eu/what-are-former-foodstuffs/>.
- [29] L Pinotti, C Giromini, M Ottoboni, M Tretola, and D Marchis. Insects and former foodstuffs for upgrading food waste biomasses/streams to feed ingredients for farm animals. *Animal*, 13(7) :1365–1375, 2019.
- [30] B. Baudin and al. Bioforma : Protéomique, spectrométrie de masse et analyses multiples, 2010. URL <https://lesbiologistesmedicaux.fr/images/cahiers/2011-Bioforma-46-Spectrom%C3%A9trie%20de%20masse-Prot%C3%A9omique.pdf>.
- [31] Candice Trocmé, Athan Baillet, and Philippe Gaudin. La protéomique : comment cela fonctionne-t-il? *Revue du rhumatisme*, 78 :S173–S177, 2011.
- [32] Adam D. Catherman, Owen S Skinner, and Neil L. Kelleher. Top down proteomics : facts and perspectives. *Biochemical and biophysical research communications*, 445 4 : 683–93, 2014.
- [33] Fonctionnement de la chromatographie liquide en phase inverse. URL <https://www.farm.ucl.ac.be/tpao/tpintegres/HPLC/documents/chapitre4.pdf>.
- [34] Ankit Sinha and Matthias Mann. A beginner’s guide to mass spectrometry–based proteomics. *The Biochemist*, 42(5) :64–69, 09 2020. ISSN 0954-982X. doi : 10.1042/BIO20200057. URL <https://doi.org/10.1042/BIO20200057>.
- [35] John B. Fenn, Matthias Mann, Chin Kai Meng, S. F. Wong, and Craig M. Whitehouse. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246 4926 :64–71, 1989.
- [36] Schéma de fonctionnement d’un quadripôle. Consulté le 28/06/2023. URL <https://www.chm.bris.ac.uk/ms/quadropole.xhtml>.

- [37] Spectrométrie de masse en tandem. Consulté le 28/06/2023. URL https://en.wikipedia.org/wiki/Tandem_mass_spectrometry.
- [38] Darren R Allen and Brett C McWhinney. Quadrupole time-of-flight mass spectrometry : a paradigm shift in toxicology screening applications. *The Clinical Biochemist Reviews*, 40(3) :135, 2019.
- [39] Triple quadripôle. Consulté le 28/06/2023. URL <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Spectrometrie-de-masse-page-5.html>.
- [40] Carol E. Parker, Maria R Esteban Warren, and Viorel Mocanu. Mass spectrometry for proteomics. 2010.
- [41] Ingrédients des chicken nuggets iglo. Consulté le 17/08/23. URL <https://www.iglo.be/fr-be/nos-produits/snacks/12-chicken-nuggets-fr#2>.
- [42] Ingrédients des chicken nuggets picard. Consulté le 17/08/23. URL <https://www.picard.fr/produits/nuggets-600g-ue-000000000000088380.html>.
- [43] Biomimetic. URL <https://biomimetic.fr/abcgreen/boutique/larves-de-mouches-soldat-noire-vivantes/>.
- [44] Miguel A Sentandreu, Paul D Fraser, John Halket, Raj Patel, and Peter M Bramley. A proteomic-based approach for detection of chicken in meat mixes. *Journal of Proteome Research*, 9(7) :3374–3383, 2010.
- [45] Anna Stachniuk, Agata Sumara, Magdalena Montowska, and Emilia Fornal. Liquid chromatography–mass spectrometry bottom-up proteomic methods in animal species analysis of processed meat for food authentication and the detection of adulterations. *Mass spectrometry reviews*, 40(1) :3–30, 2021.
- [46] Emilia Fornal and Magdalena Montowska. Species-specific peptide-based liquid chromatography–mass spectrometry monitoring of three poultry species in processed meat products. *Food chemistry*, 283 :489–498, 2019.
- [47] Magdalena Montowska and Anita Spychaj. Quantification of species-specific meat proteins in cooked and smoked sausages using infusion mass spectrometry. *Journal of Food Science and Technology*, 55 :4984 – 4993, 2018.
- [48] Uniprot. URL <https://www.uniprot.org/>.
- [49] National center for biotechnology : Protein blast. URL https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome.

- [50] Marie-Caroline Lecrenier, Mélanie Planque, Marc Dieu, Pascal Veys, Claude Saegerman, Nathalie Gillard, and Vincent Baeten. A mass spectrometry method for sensitive, specific and simultaneous detection of bovine blood meal, blood products and milk products in compound feed. *Food chemistry*, 245 :981–988, 2018. URL <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:21033310>.
- [51] Marie-Caroline Lecrenier, Lisa Plasman, Alexandra Cordonnier, and Vincent Baeten. Preliminary feed sedimentation step for the sensitive and specific detection of processed animal proteins by mass spectrometry-based proteomics, under review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023.
- [52] Yongqiang Yu, Jia Zhang, Fengling Zhu, Mingxia Fan, Jinshui Zheng, Minmin Cai, Longyu Zheng, Feng Huang, Ziniu Yu, and Jibin Zhang. Enhanced protein degradation by black soldier fly larvae (*hermetia illucens* l.) and its gut microbes. *Frontiers in Microbiology*, 13 :1095025, 2023.
- [53] Yu-Zhong Zhang, Li-Yuan Ran, Chunyang Li, and Xiu lan Chen. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Applied and Environmental Microbiology*, 81 :6098 – 6107, 2015. URL <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:206721324>.
- [54] John Kay, R F Siemankowski, L M Siemankowski, and Darrel E. Goll. Degradation of smooth-muscle myosin by trypsin-like serine proteinases. *The Biochemical journal*, 201 2 :267–78, 1982. URL <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:45114392>.
- [55] Norlaily Ahmad, Burcu Colak, De-Wen Zhang, Martin John Gibbs, Michael Watkinson, C Remzi Becer, Julien E Gautrot, and Steffi Krause. Peptide cross-linked poly (ethylene glycol) hydrogel films as biosensor coatings for the detection of collagenase. *Sensors*, 19(7) :1677, 2019.
- [56] Diana Samodova, Christopher M. Hosfield, Christian N. Cramer, Maria Valeria Giuli, Enrico Cappellini, Giulia Franciosa, Michael M. Rosenblatt, Christian D. Kelstrup, and Jesper Velgaard Olsen. Proalanase is an effective alternative to trypsin for proteomics applications and disulfide bond mapping. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 19 :2139 – 2156, 2020. URL <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:222152520>.

Annexes

Tableau 1: Liste des protéines contenant des peptides spécifiques obtenus suite à la comparaison entre les taxons *Equus*, *Ovis*, *Capra*, *Gallus gallus*, *Sus scrofa* et *Bos* avec l'utilisation de l'outil BLAST

Espèce	Protéine	Peptide [Position dans la protéine]
Poulet	Myosin-binding protein C, cardiac-type	R.AGTEITDSEK.Y [45, 54] K.HSLTISNVGK.D [64, 73] K.DDEVTYAVIAGTSK.V [74, 87] K.VAGESLLK.K [168, 175] K.HLQLHDNYDR.N [196, 205] K.NGQEIQVSGSK.Y [398, 408] K.SFTELFVK.E [442, 449] K.EDSGHYTVK.T [519, 527] R.LDVPISGDPTPTVIWQK.V [668, 684] K.LLFESEGR.V [715, 722] K.VIDVPDPPEAPK.I [766, 777] K.DGSAEWTPALPGLTER.T [909, 924] K.AINLAGESGAAIK.E [944, 957] K.DGQTLDSK.D [1008, 1015] K.TGTTYKPPSYK.E [1161, 1171] K.EHDFSEPPK.F [1172, 1180] K.FTHPLVNR.S [1181, 1188] K.VDLSGDAK.Y [1217, 1224]
	Myosin-binding protein C, fast-type	K.VHTFELTITK.V [112, 121] K.LVVELSDPDLPLK.W [270, 282] K.NGQLLKPSTK.Y [286, 295] K.EPPVTVVR.G [337, 344] R.GLEDQQVVVGDR.V [345, 356] K.AAENTIVVAGNK.V [541, 553] R.VHIDSQADLSSFVIESAER.S [584, 602] R.VVDVPDPPQSVR.V [627, 638] K.LNFEVFPDTTYESTK.M [680, 694] R.EGSNEWVAANTELVER.C [770, 785] R.EGGALPAEVQTR.T [869, 880] R.TSDVDSVFFIR.S [881, 891] R.VVERPGPPQAVR.V [920, 931] K.DDGNAEISGYTVQK.A [949, 962] R.AAPQFLTPLVDR.S [1037, 1048] K.NSVEIGADPK.F [1075, 1084] R.HGLGVLSLLIR.R [1089, 1099]
	Myosin light chain 1, skeletal muscle	K.ITLSQVGDIVR.A [68, 78] R.ALGQNPTNAEINK.I [79, 91] K.DQGTFFEDFVEGLR.V [123, 135]
	Myosin light chain 1, cardiac muscle	K.VEFTPDQIEEFK.E [43, 54] R.LTEEEVDK.L [163, 170]
	Myosin light chain 2	R.DTFAALGR.L [93, 100] K.GADPEETILNAFK.V [134, 146] K.NLVHVITHGEEK.D [195, 206]
	Pyruvate kinase	R.LDIDSEPTIAR.N [32, 42] R.LNFSHGTHEYHEGTIK.N [73, 88] R.EATESFASDPITYRPVAIALDTK.G [92, 114] R.QQFEEILR.H [392, 399] K.QPAHDAWAEDVDLR.V [475, 488]

Porc	<i>β</i> -enolase	K.NYPVVSIEDPFDQDDWK.T [286, 302]
	Myosin 1	K.VEAHFSLIHYAGTVDYNITGWLDK.N [576, 599] K.DTLVSQLSR.G [1299, 1307]
	Myosin 2	K.TSVFVAEPK.E [36, 44]
	Myosin 4	K.TEAGATLTVK.E [64, 73] K.TLAFLEAER.Q [619, 627] K.SALAHAVQSSR.H [1329, 1339]
	Myosin 7	R.INTTLETK.Q [443, 450] K.LLSNLFANYAGADTPVEK.G [616, 633] R.ADIAESQVNK.L [1914, 1923]
	Myoglobin	K.YLEFISEAIIQVLQSK.H [104, 119]
	Carbonic anydhrase 3	K.HDPSLLPWTASYDPGSAK.T [40, 57] R.GGPLTAAAYR.L [81, 89] K.YNSFATALK.H [127, 135] K.HPDGVAVVGIFLK.I [136, 148] K.GEFQLVLDALDK.I [154, 165] R.SLYSSAENEPVPLVR.N [227, 242]
	Trifunctional enzyme subunit α	K.DASLPALGR.G [391, 399] R.DSLFSNLTGQLDYQGFEK.A [423, 440] K.DSTASAVEVGLK.Q [520, 531] R.FAGGNLDVLK.Q [611, 620] K.GFYVYQEGVK.N [635, 644] K.IPSRPDISSDEDIQYR.L [661, 676]
Boeuf	Myosin 1	K.TLALLFSGPASGEAEGGPK.K [619, 637] K.LLASIDVDHTQYK.F [748, 760]
	Myosin 2	R.TLEDQVNELK.S [1256, 1265] K.YEETHAELEAAQK.E [1465, 1477]
	Albumin	K.DLGEEHFK.G [37, 44] K.LVNELTEFAK.T [66, 75] K.TCVADESHAGCEK.S [76, 88] K.LKPDPTLTCDEFK.A [139, 151] K.AEFVEVTK.L [249, 256] K.YICDNQDTISSK.L [286, 297] K.SHCIAEVEK.D [310, 318] K.DAIPENLPPLTADFAEDK.D [319, 336] K.EYEATLEECAK.D [375, 386] K.DDPHACYSTVFDK.L [387, 399] K.QNCDQFEK.L [413, 420] K.VPQVSTPTLVEVSR.S [438, 451] R.CCTKPESER.M [460, 468] R.RPCFSALTPDETYVPK.A [508, 523] K.LVVSTQTALA.- [598, 607]
	Stress induced phosphoprotein 1	K.ALDLDSNCK.E [454, 462]
	Carbonic anhydrase 3	K.EWGYADHNGPDHWHELFPNAK.G [4, 24] K.HADGIAVVGVFLK.I [136, 148] K.GEFQLLLDALDK.I [154, 165]

Tableau 2: Liste des protéines contenant des peptides spécifiques obtenus suite à la comparaison entre les taxons *Anas*, *Anser*, *Numididae*, *Perdicinae*, *Struthio*, *Columba*, *Phasianidae*, *Gallus gallus*, *Sus scrofa* et *Bos* avec l'utilisation de l'outil BLAST

Espèce	Protéine	Peptide [Position dans la protéine]
Poulet solo	Myosin-binding protein C, cardiac-type	K.DDEVTYAVIAGTSK.V [74, 87]
	Myosin-binding protein C, fast-type	K.LVVELSDPDLPLK.W [270, 282] K.NGQLLKPSTK.Y [286, 295] K.EPPVTVVR.G [337, 344] R.GLEDQQVVVGDR.V [345, 356] K.AAENTIVVAGNK.V [541, 553] R.VHIDSQADLSSFVIESAER.S [584, 602] R.VVDVPDPPQSVR.V [627, 638] K.LNFEVFPDTTYESTK.M [680, 694] R.EGSNEWVAANTELV.R [770, 785] R.EGGALPAEVQTR.T [869, 880] R.VVERPGPPQAVR.V [920, 931] R.AAPQFLTPLVDR.S [1037, 1048] R.HGLGVLSLLIR.R [1089, 1099]
Poulet dinde	Myosin-binding protein C, cardiac-type	K.HSLTISNVGK.D [64, 73] K.HLQLHDNYDR.N [196, 205] K.DGSAEWTPALPGLTER.T [909, 924]
	Myosin-binding protein C, fast-type	R.TSDVDSVFFIR.S [881, 891] K.DDGNAEISGYTVQK.A [949, 962] K.NSVEIGADPK.F [1075, 1084]
	Myosin light chain 1, skeletal muscle	K.DQGTFFEDFVEGLR.V [123, 135]
	Myosin light chain 2	R.DTFAALGR.L [93, 100] K.GADPEETILNAFK.V [134, 146] K.NLVHVITHGEEK.D [195, 206]
	Pyruvate kinase	R.QQFEEILR.H [392, 399] K.QPAHDAWAEDVDLR.V [475, 488]
Poulet tous	Myosin-binding protein C, cardiac type	K.VAGESLLK.K [168, 175] K.SFTELFVK.E [442, 449] K.EDSGHYTVK.T [519, 527] R.LDVPISGDPTPTVIWQK.V [668, 684] K.LLFESEGR.V [715, 722] K.VIDVPDPPEAPK.I [766, 777] K.AINLAGESGAIIK.E [944, 957] K.FTHPLVNR.S [1181, 1188]
	Pyruvate kinase	R.LDIDSEPTIAR.N [32, 42] R.LNFSHGTHEYHEGTIK.N [73, 88] R.EATESFASDPITYRPVAIALDTK.G [92, 114]

Porc	<p><i>β</i>-enolase</p> <p>Myosin 1</p> <p>Myosin 2</p> <p>Myosin 4</p> <p>Myosin 7</p> <p>Myoglobin</p> <p>Carbonic anydhrase 3</p> <p>Trifunctional enzyme subunit α</p>	<p>K.NYPVVSIEDPFDQDDWK.T [286, 302]</p> <p>K.VEAHFSLIHYAGTVDYNITGWLDK.N [576, 599] K.DTLVSQLSR.G [1299, 1307]</p> <p>K.TSVFVAEPK.E [36, 44]</p> <p>K.TEAGATLTVK.E [64, 73] K.TLAFLFAER.Q [619, 627] K.SALAHAVQSSR.H [1329, 1339]</p> <p>R.INTTLETK.Q [443, 450] K.LLSNLFANYAGADTPVEK.G [616, 633]</p> <p>K.YLEFISEAIIQVLQSK.H [104, 119]</p> <p>K.HDPSLLPWTASYDPGSAK.T [40, 57] R.GGPLTAAAYR.L [81, 89] K.YNSFATALK.H [127, 135] K.HPDGVAVVGIFLK.I [136, 148] K.GEFQLVLDALDK.I [154, 165] R.SLYSSAENEPPVPLVR.N [227, 242]</p> <p>K.DASLPALGR.G [391, 399] R.DSLFSNLTGQLDYQGFEK.A [423, 440] K.DSTASAVEVGLK.Q [520, 531] R.FAGGNLDVLK.Q [611, 620] K.IPSRPDISSDEDIQYR.L [661, 676]</p>
Boeuf	<p>Myosin 1</p> <p>Myosin 2</p> <p>Albumin</p> <p>Stress induced phosphoprotein 1</p> <p>Carbonic anhydrase 3</p>	<p>K.TLALLFSGPASGEAEGGPK.K [619, 637]</p> <p>R.TLEDQVNELK.S [1256, 1265] K.YEETHAELEAAQK.E [1465, 1477]</p> <p>K.DLGEEHFK.G [37, 44] K.LVNELTEFAK.T [66, 75] K.TCVADESHAGCEK.S [76, 88] K.LKPDNTLCDEFK.A [139, 151] K.AEFVEVTK.L [249, 256] K.YICDNQDTISSK.L [286, 297] K.SHCIAEVEK.D [310, 318] K.DAIPENLPPLTADFAEDK.D [319, 336] K.EYEATLEECCA.K.D [375, 386] K.DDPHACYSTVFDK.L [387, 399] K.QNCDQFEK.L [413, 420] K.VPQVSTPTLVEVSR.S [438, 451] R.CCTKPESER.M [460, 468] R.RPCFSALTPDETYVPK.A [508, 523] K.LVVSTQTALA.- [598, 607]</p> <p>K.ALDLDSNCK.E [454, 462]</p> <p>K.EWGYADHNGPDHWHELFPNAK.G [4, 24] K.HADGIAVVGVFLK.I [136, 148] K.GEFQLLLDALDK.I [154, 165]</p>

Tableau 3: Liste des protéines contenant des peptides spécifiques détectés par spectrométrie de masse

Espèce	Protéine	Peptide
Poulet solo	Myosin-binding protein C, fast-type	K.LVVELSDPDLPLK.W [270, 282] R.GLEDQQVVGDR.V [345, 356] K.AAENTIVVAGNK.V [541, 553]
Poulet dinde	Myosin-binding protein C, fast-type Myosin light chain 1, skeletal muscle Pyruvate kinase	R.TSDVDSVFFIR.S [881, 891] K.DQGTFFEDFVEGLR.V [123, 135] R.QQFEEILR.H [392, 399] K.QPAHDAWAEDVDLR.V [475, 488]
Poulet tous	Myosin-binding protein C, cardiac type Pyruvate kinase	K.VAGESLLK.K [168, 175] K.SFTELFVK.E [442, 449] R.LDVPISGDPTPTVIWQK.V [668, 684] R.LDIDSEPTIAR.N [32, 42] R.LNFSGHTHEYHEGTIK.N [73, 88] R.EATESFASDPITYRPVAIALDTK.G [92, 114]
Porc	β -enolase Myosin 2 Myosin 4 Carbonic anhydrase 3 Trifunctional enzyme subunit α	K.NYPVVSIEDPFDQDDWK.T [286, 302] K.TSVFVAEPK.E [36, 44] K.TLAFLFAER.Q [619, 627] K.SALAHAVQSSR.H [1329, 1339] K.HDPSLLPWTASYDPGSAK.T [40, 57] K.YNSFATALK.H [127, 135] K.HPDGVAVVGIFLK.I [136, 148] R.SLYSSAENEPPVPLVR.N [227, 242] K.DASLPALGR.G [391, 399] K.DSTASAVEVGLK.Q [520, 531]
Boeuf	Myosin 1 Albumin Carbonic anhydrase 3	K.TLALLFSGPASGEAEGGPK.K [619, 637] K.DLGEEHFK.G [37, 44] K.LVNELTEFAK.T [66, 75] K.YICDNQDTISSK.L [286, 297] K.DAIPENLPPLTADFAEDK.D [319, 336] K.DDPHACYSTVFDK.L [387, 399] R.RPCFSALTPDETYVPK.A [508, 523] K.EWGYADHNGPDHWHELFPNAK.G [4, 24] K.HADGIAVVGVFLK.I [136, 148] K.GEFQLLLDALDK.I [154, 165]











Tableau 4: Liste finale des protéines contenant des peptides spécifiques

Espèce	Protéine	Peptide [Position dans la protéine]
Poulet solo	Myosin-binding protein C, fast-type	R.GLEDQQVVVGDR.V [345, 356] K.AAENTIVVVAGNK.V [541, 553]
Poulet dinde	Myosin-binding protein C, fast-type Myosin light chain 1, skeletal muscle Pyruvate kinase	R.TSDVDSVFFIR.S [881, 891] K.DQGTFFEDFVEGLR.V [123, 135] R.QQFEEILR.H [392, 399] K.QPAHDAWAEDVDLR.V [475, 488]
Poulet tous	Myosin-binding protein C, cardiac type Pyruvate kinase	K.VAGESLLK.K [168, 175] K.SFTELFVK.E [442, 449] R.LDVPISGDPTPTVIWQK.V [668, 684] R.LDIDSEPTIAR.N [32, 42] R.LNFSGHTHEYHEGTIK.N [73, 88] R.EATESFASDPITYRPVAIALDTK.G [92, 114]
Porc	β -enolase Myosin 4 Carbonic anydhrase 3	K.NYPVVSIEDPFDQDDWK.T [286, 302] K.TLAFLFAER.Q [619, 627] K.SALAHAVQSSR.H [1329, 1339] K.HDPSLLPWTASYDPGSAK.T [40, 57] K.HPDGVAVVGIFLK.I [136, 148]
Boeuf	Myosin 1 Albumin Carbonic anhydrase 3	K.TLALLFSGPASGEAEGGPK.K [619, 637] K.DLGEEHFK.G [37, 44] K.LVNELTEFAK.T [66, 75] K.YICDNQDTISSK.L [286, 297] K.DDPHACYSTVFDK.L [387, 399] R.RPCFSALTPDETYVVK.A [508, 523] K.EWGYADHNGPDHWHELFPNAK.G [4, 24] K.HADGIAVVGIVFLK.I [136, 148] K.GEFQLLLDALDK.I [154, 165]

Tableau 5: Résultats de la détection des peptides spécifiques sur les échantillons provenant de l'expérience sur la MSN

	Lar J0		Sub J0 FB		Lar J10 FB		Sub J0 CK		Sub J10 CK		Lar J10 CK		Sub J0 PC		Sub J10 PC		Lar J10 PC		Sub J0 BV		Sub J10 BV		Lar J10 BV	
	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire	LOD	Aire
BvHb_AAVTAFWGK	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
BvHb_EFTVLOADFK	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
BvHb_VGGHAAEYGAELER	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
BvHb_VWAGVANALAH	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
BvCas_FFVAPPEVFGK	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
BvCas_HQGIPOEVINENLR	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
BvBLG_LSFNPTQLEEQCHI	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
BvColl_GEPGPAGAVGAGVGR_758	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
BvColl_GSTGEIGPAGPPI(+16)GPI(+16)GLR	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
BvColl_GPP(+16)GESGAAGTPIGSR_790	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Pig_Coll_GPI(+16)GSP(+16)GNVGPAGK	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Pig_Coll_GPI(+16)GEGFLP(+16)GPAGPR	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Po_Coll_GNVGLAGPR	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Po_Coll_GLHGEFGVPI(+16)GPAGPR	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Po_Coll_GLVGEP(+16)GPAGAK	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Po_Coll_GEIGPAGNVGTGPAGPR	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Bv Myosin_TLALFSGPASGEAGGPK.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Bv Albu_DLGEHFHK.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Bv Albu_LVNLTEFAK.2	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Bv Albu_YIC(+57.021464)DNQDTISSK.2	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Bv Albu_DDPHAC(+57.021464)YSTVFDK.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Bv Albu_RPC(+57.021464)FSALTPDETYPVK	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Bv Carb_HADGIADVGVFLK.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Bv Carb_EWGYADHNGPDHWHHELPNAK.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Bv Carb_GEFQLLDALDK.2	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Pig Beno_NYPVNSIEDPFDQDDWK.2	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Pig Myosin_TLAFLEAER.2	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Pig Myosin_SALAHAVQSSR.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Pig Carb_HDPSLLPWTASYDPGSAK.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
Pig Carb_HPDGVAVGVFLK.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
PoSolo MyosinB_GLEDQVWVGR.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
PoSolo MyosinB_AAENTIVVAVAGNK.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
PoDinde MyosinB_TSDVDSVFFR.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
PoDinde MLE1_DQGTFFEDVEGLR.2	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
PoDinde PyrKin_QQFEELR.2	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
PoDinde PyrKin_OPAHDAWAEDVDLR.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
PoTous MyosinB_VAGESLK.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
PoTous MyosinB_LDVPISGDPTPTVWQK.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
PoTous PyrKin_LDIDSEPTIAR.2	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
PoTous PyrKin_INFSGTHEYEGTIK.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	
PoTous PyrKin_EATESFASDPITYRVAIALDK.3	V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V		V	

Lar		Larves		Légende :	
Sub	Substrat	Sub	Lar	Sub	Lar
FB	Feed Blanc	FB	Feed	V	Les deux contrôles sont visibles
CK	Poulet	CK	Poulet	x5	Seul le contrôle concentré 5 fois est détectable
PC	Porc	PC	Porc	###	Aire moyenne des pics détectés dans les échantillons sans contrôle
BV	Bœuf	BV	Bœuf		
J0	Jour 0	J0	Jour 0		
J10	Jour 10	J10	Jour 10		

							
Insects as feed - Regulation (EU) No 68/2013 on the Catalogue of feed materials and in accordance with Regulation (EC) No 999/2001 and Regulation (EC) No 1069/2009	Ruminant animals 	Aquaculture 	Poultry 	Pigs 	Pets 	Fur and other animals (e.g. zoo) 	Technical uses (e.g. cosmetic industry, bio-based fuels, production of other bio-based materials such as bioplastics) 
Insect proteins (under entry 9.4.1. 'Processed animal protein')	✗	✓ **	✓ **	✓ **	✓	✓	✓
Insect fats (under entry 9.2.1 'animal fat')	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Whole insects (untreated) (under entry 9.16.2. 'terrestrial invertebrates, dead')	✗	✗	✗	✗	✓ ***	✓ ***	✓
Whole insects (treated- e.g. Freeze drying) (under entry 9.16.2. 'terrestrial invertebrates, dead')	✗	✗	✗	✗	✓ ***	✓ ***	✓
Live insects (under entry 9.16.1 'terrestrial invertebrates, live')	✗	✓ *	✓ *	✓ *	✓ ***	✓ ***	✓
Hydrolysed insect proteins (under entry 9.6.1. 'Hydrolysed animal proteins')	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

*if authorised by the national competent authority of the Member State where the product is being commercialised
 ** Limited to Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*), Common Housefly (*Musca domestica*), Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*), Lesser Mealworm (*Alphitobius diaperinus*), House cricket (*Acheta domesticus*), Banded cricket (*Gryllobes sigillatus*), Field Cricket (*Gryllus assimilis*) and Silkworm (*Bombyx mori*).
 *** if authorised by the national competent authority of the Member State where the product is being commercialised, under the specific conditions applicable to processed pet food (in case the product is intended for use as processed pet food)

Restriction to insect species (insect PAPs for aqua feed)- Regulation (EU) No 142/2011; Annex X Chapter 2 Section 1, A, (2). - Insect PAPs must be produced in processing plants approved in accordance with Article 24(1)(a) of Regulation (EC) No 1069/2009 and dedicated exclusively to the production of products derived from farmed insects Regulation (EC) No 999/2001; annex IV, chapter IV, Section F, 1 (a) . - Insect PAPs must be produced according to processing methods 1 to 5 or processing method 7 (Regulation (EU) No 142/2011, Annex X, Chapter II, Section 1, B (2).	
No restriction as to the insect species (provided that these are not pathogenic to humans and animals)	

Tableau 6: [Liste des possibilités de l'utilisation d'insectes pour l'alimentation animale]Liste des possibilités de l'utilisation d'insectes pour l'alimentation animale [21]

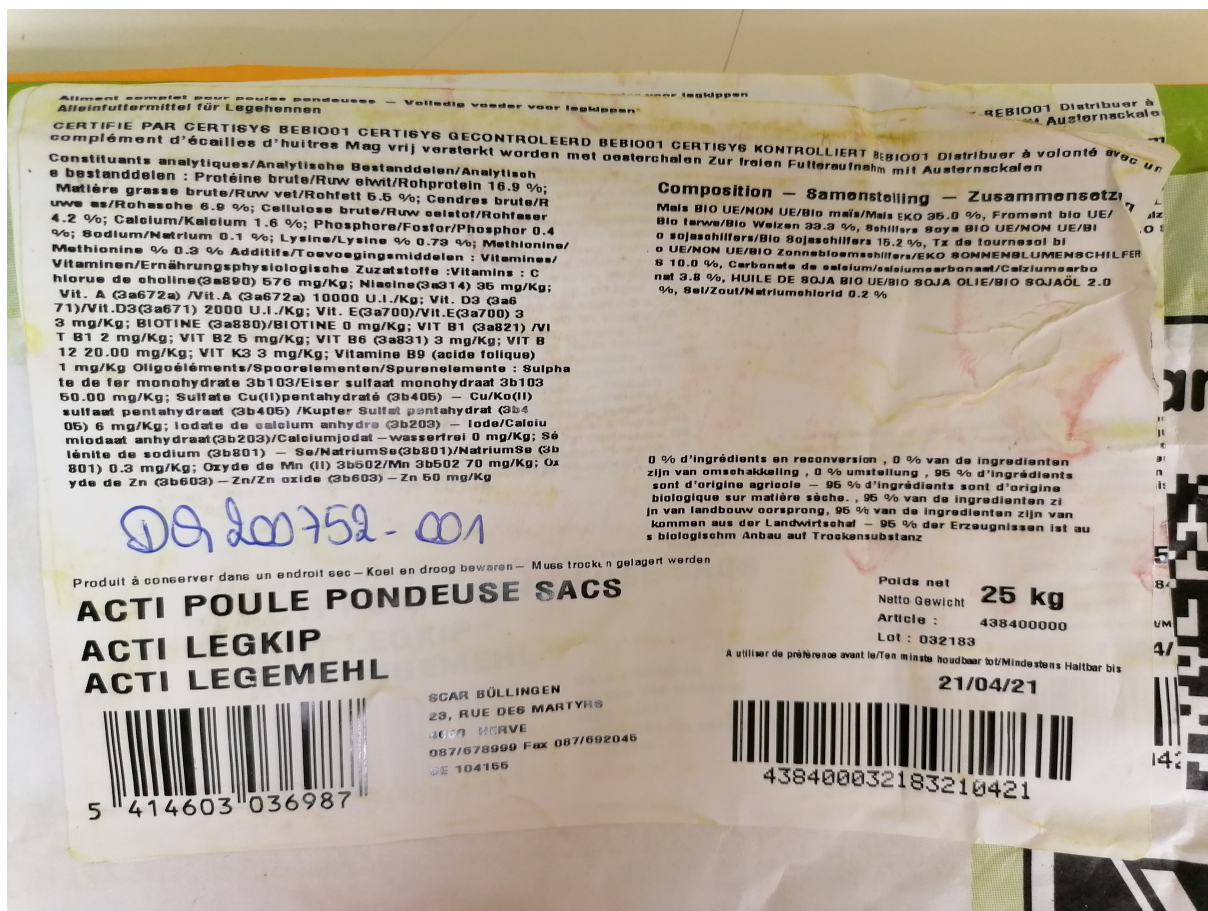


Tableau 7: Composition de l'aliment pour volaille



Diepvries - Surgelè - Tiefgefroren

PIZZA MET GOUDA, GEROOKTE SALAMI, CHAMPIGNONS, GEROOKTE GEKOOKTE HAM EN GEROOKTE PEPPERONI.

Ingrediënten: tarwebloem, tomatenpuree, gouda (melk) 14,8%, salami 6,4% [varkensvlees, varkensvet, zout, specerijenextracten, dextrose, glucosestroop, specerijen, suiker, antioxidanten (extracten van rozemarijn, natriumerythorbaat), conserveermiddel (natriumnitriet), natuurlijke rook], water, champignons 5,6%, gerookte gekookte ham 5,6% [varkensvlees, zout, dextrose, suiker, antioxidanten (natriumascorbaat en extracten van rozemarijn), conserveermiddel (natriumnitriet), natuurlijke rook], ongehardete koolzaadolie, gerookte pepperoni 3,3% [varkensvlees, varkensvet, zout, specerijenextracten, dextrose, specerijen, glucosestroop, suiker, antioxidanten (extracten van rozemarijn, natriumerythorbaat), conserveermiddel (natriumnitriet), natuurlijke rook], gist, suiker, zout, aromatische planten, specerijen, niet-gemodificeerd aardappelzetmeel, niet-gemodificeerd tarvezetmeel, knoflook.
Bereiding: In the oven: verwarm voor op 225°C (conventionele oven) of 200°C (heteluchtoven). Haal de pizza uit de doos en verwijder de folie. Plaats de bevroren pizza in het midden van de oven en bak gedurende 10-12 minuten. De pizza is klaar om te serveren als de kaas gesmolten is en de korst goudbruin is.
Baktijd varieert naargelang van de oven. Dit zijn enkel richtlijnen. Verkort de baktijd als het product al ontdooid is. Het product moet goed doorbakken zijn. Controleer of het product door en door verhit is alvorens te serveren.

PIZZA À BASE DE GOUDA, SALAMI FUMÉ, CHAMPIGNONS, JAMBON CUIT FUMÉ ET PEPPERONI FUMÉ.

Ingrédients: farine de blé, purée de tomates, gouda (lait) 14,8%, salami 6,4% [viande de porc, gras de porc, sel, extraits d'épices, dextrose, sirop de glucose, épices, sucre, antioxydants (extraits de romarin, erythorbate de sodium), conservateur (nitrite de sodium), fumée naturelle], eau, champignons 5,6%, jambon cuit fumé 5,6% [viande de porc, sel, dextrose, sucre, antioxydants (ascorbate de sodium et extraits de romarin), conservateur (nitrite de sodium), fumée naturelle], huile de colza non hydrogénée, pepperoni fumé 3,3% [viande de porc, gras de porc, sel, extraits d'épices, dextrose, épices, sirop de glucose, sucre, antioxydants (extraits de romarin, erythorbate de sodium), conservateur (nitrite de sodium), fumée naturelle], levure, sucre, sel, plantes aromatiques, épices, amidon modifié de pomme de terre, amidon non modifié de blé, oil.
Préparation: Au four: préchauffez le four à 225°C (four traditionnel) ou 200°C (chaleur tournante). Retirez la pizza de la boîte carton, puis enlevez le film plastique. Placez la pizza surgelée sur la grille, à mi-hauteur du four et faites cuire durant 10 à 12 minutes. La pizza est prête à être servie lorsque les fromages sont bien fondus et la croûte est dorée. Le temps de cuisson varie en fonction des performances du four. Il ne s'agit ici que d'indications. Si le produit est décongelé, réduisez le temps de cuisson. Faites cuire à point. Vérifiez que le produit soit bien chaud avant de servir.

PIZZA MIT GOUDA, GERÄUCHERTER SALAMI, CHAMPIGNONS, GERÄUCHERTEM GEKOCHEM SCHINKEN UND GERÄUCHERTE PEPPERONISALAMI.

Zutaten: Weizenmehl, Tomatenpüree, Gouda (Milch) 14,8%, Salami 6,4% [Schweinefleisch, Schweinefett, Salz, Gewürzextrakte, Dextrose, Glucosesirup, Gewürze, Zucker, Antioxidationsmittel (Extrakte aus Rosmarin, Natriumerythorbat), Konservierungsstoff (Natriumnitrit), natürlicher Rauch], Wasser, Champignons 5,6%, geräucherter gekochter Schinken 5,6% [Schweinefleisch, Salz, Dextrose, Zucker, Antioxidationsmittel (Natriumascorbat und Extrakte aus Rosmarin), Konservierungsstoff (Natriumnitrit), natürlicher Rauch], ungehärtetes Rapsöl, geräucherte Pepperonisalami 3,3% [Schweinefleisch, Schweinefett, Salz, Gewürzextrakte, Dextrose, Gewürze, Glucosesirup, Zucker, Antioxidationsmittel (Extrakte aus Rosmarin, Natriumerythorbat), Konservierungsstoff (Natriumnitrit), natürlicher Rauch], Hefe, Zucker, Salz, Kräuter, Gewürze, nicht modifizierte Kartoffelstärke, nicht modifizierte Weizenstärke, Knoblauch.
Zubereitung: Im Backofen: bei 225°C vorheizen (konventionellen Backofen) oder 200°C (Umluftofen). Nehmen Sie die Pizza aus dem Karton und entfernen Sie die Folie. Die tiefgefrorene Pizza auf der mittleren Schiene des Backofens 10-12 Minuten backen. Die Pizza ist servierfertig, wenn der Käse gut verlaufen und der Rand knusprig braun ist. Die Backzeit hängt von der Leistung des Backofens ab. Hierbei handelt es sich nur um Richtlinien. Wenn das Produkt bereits aufgetaut ist, die Zubereitungszeit verkürzen. Gut durchgaren. Vor dem Servieren prüfen, ob das Produkt gut heiß ist.

Gemaakt in een bedrijf waar ook selderij wort verwerkt.

Fabriqué dans un atelier qui utilise aussi: céleri.

Hergestellt in einem Betrieb, der auch Sellerie verwendet.

DIIEPVRIESINSTRUCTIES INSTRUCTIONS DE CONGÉLATION HIINWEISE ZUM EINFRIEREN
In de koelkast: (<7°C) - 1 dag
In de diepvriezer: * (-6°C): 1 week / ** (-12°C): 2 weken
*** (-18°C): ten minste houdbaar tot: zie houdbaarheidsdatum op zijkant doos.
NA ONTDOOIING, NIET OPNIEUW INVRIEZEN!
Au réfrigérateur: (<7°C) - 1 jour
Dans le congélateur: * (-6°C): 1 semaine / ** (-12°C): 2 semaines / *** (-18°C): à consommer de préférence avant le: voir la date de durabilité minimale sur le côté de la boîte.
NE PAS RECONGELER, APRÈS DÉCONGÉLATION!
Im Kühlschrank: (<7°C) - 1 Tag
Im Tiefkühlschrank: * (-6°C): 1 Woche / ** (-12°C): 2 Wochen / *** (-18°C): mindestens haltbar bis: siehe Mindesthaltbarkeitsdatum auf der Seite des Kartons.
NACH DEM AUFTAUEN, NICHT WIEDER EINFRIEREN!

Table with 4 columns: Component, 100g, 330g, %RI*. Rows include Energie, Vetten/Matières grasses/Fett, Koolhydraten/Glucides/Kohlenhydrate, etc.

* Referentie-inname van een gemiddelde volwassene (8400 kJ/2000 kcal). / Apport de référence pour un adulte-type (8400 kJ/2000 kcal). / Referenzmenge für einen durchschnittlichen Erwachsenen (8400 kJ/2000 kcal).
Deze verpakking bevat 1 portie van 330 g. / Cet emballage contient 1 portion de 330 g. / Diese Verpackung enthält 1 Portion von 330 g.

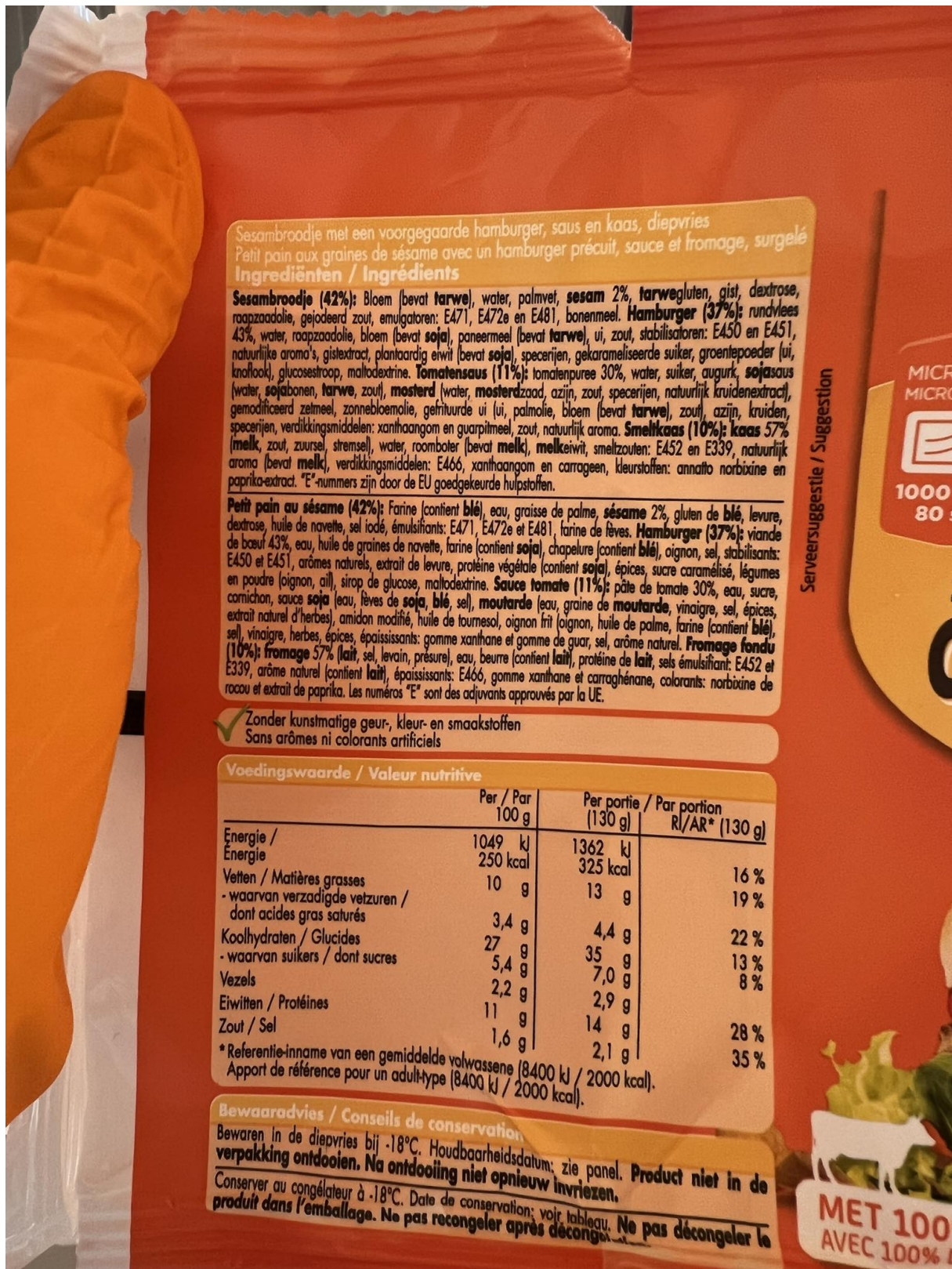
Delhaize Le Lion/De Leeuw Brusselsesteenweg 347 B-1730 Asse www.delhaize.be 0800/95 713 00800/33 54 24 93



Nettogewicht / Poids net 330g e



Tableau 8: Composition de la pizza spéciale Delhaize



Sesambroodje met een voorgegaarde hamburger, saus en kaas, diepvries
 Petit pain aux graines de sésame avec un hamburger précuit, sauce et fromage, surgelé

Ingrediënten / Ingrédients
Sesambroodje (42%): Bloem (bevat tarwe), water, palmvet, sesam 2%, tarwegluten, gist, dextrose, raapzaadolie, geïodeerd zout, emulgatoren: E471, E472e en E481, bonenmeel. **Hamburger (37%)**: rundvlees 43%, water, raapzaadolie, bloem (bevat soja), paneermeel (bevat tarwe), ui, zout, stabilisatoren: E450 en E451, natuurlijke aroma's, gistextract, plantaardig eiwit (bevat soja), specerijen, gekarameliseerde suiker, groentepoeder (ui, knoflook), glucoseroop, maltodextrine. **Tomatensaus (11%)**: tomatenpuree 30%, water, suiker, augurk, sojasaus (water, sojabonen, tarwe, zout), mosterd (water, mosterdzaad, azijn, zout, specerijen, natuurlijk kruidenextract), gemodificeerd zetmeel, zonnebloemolie, gefrituurde ui (ui, palmolie, bloem (bevat tarwe), zout), azijn, kruiden, specerijen, verdikkingsmiddelen: xanthaangom en guarpijmel, zout, natuurlijk aroma. **Smelkkaas (10%)**: kaas 57% (melk, zout, zuursel, stremsel), water, roomboter (bevat melk), melkeiwit, smeltzouten: E452 en E339, natuurlijk aroma (bevat melk), verdikkingsmiddelen: E466, xanthaangom en carrageen, kleurstoffen: annatto norbixine en paprika-extract. *E-nummers zijn door de EU goedgekeurde hulpstoffen.

Petit pain au sésame (42%): Farine (contient blé), eau, graisse de palme, sésame 2%, gluten de blé, levure, dextrose, huile de navette, sel iodé, émulsifiants: E471, E472e et E481, farine de fèves. **Hamburger (37%)**: viande de bœuf 43%, eau, huile de graines de navette, farine (contient soja), chapelure (contient blé), oignon, sel, stabilisants: E450 et E451, arômes naturels, extrait de levure, protéine végétale (contient soja), épices, sucre caramélisé, légumes en poudre (oignon, ail), sirop de glucose, maltodextrine. **Sauce tomate (11%)**: pâte de tomate 30%, eau, sucre, cornichon, sauce soja (eau, fèves de soja, blé, sel), moutarde (eau, graine de moutarde, vinaigre, sel, épices, extrait naturel d'herbes), amidon modifié, huile de tournesol, oignon frit (oignon, huile de palme, farine (contient blé), sel), vinaigre, herbes, épices, épaississants: gomme xanthane et gomme de guar, sel, arôme naturel. **Fromage fondu (10%)**: fromage 57% (lait, sel, levain, présure), eau, beurre (contient lait), protéine de lait, sels émulsifiants: E452 et E339, arôme naturel (contient lait), épaississants: E466, gomme xanthane et carraghénane, colorants: norbixine de rocou et extrait de paprika. Les numéros "E" sont des adjuvants approuvés par la UE.

✓ Zonder kunstmatige geur-, kleur- en smaakstoffen
 Sans arômes ni colorants artificiels

Voedingswaarde / Valeur nutritive

	Per / Par 100 g	Per portie / Par portion (130 g)	Rl/AR* (130 g)
Energie / Énergie	1049 kJ 250 kcal	1362 kJ 325 kcal	
Vetten / Matières grasses	10 g	13 g	16 %
- waarvan verzadigde vetzuren / dont acides gras saturés	3,4 g	4,4 g	19 %
Koolhydraten / Glucides	27 g	35 g	22 %
- waarvan suikers / dont sucres	5,4 g	7,0 g	13 %
Vezels	2,2 g	2,9 g	8 %
Eiwitten / Protéines	11 g	14 g	28 %
Zout / Sel	1,6 g	2,1 g	35 %

* Referentie-inname van een gemiddelde volwassene (8400 kJ / 2000 kcal).
 Apport de référence pour un adulte-type (8400 kJ / 2000 kcal).

Bewaardadvies / Conseils de conservation
 Bewaren in de diepvries bij -18°C. Houdbaarheidsdatum: zie panel. Product niet in de verpakking ontdooien. Na ontdooiing niet opnieuw invriezen.
 Conserver au congélateur à -18°C. Date de conservation: voir tableau. Ne pas décongeler le produit dans l'emballage. Ne pas recongeler après décongélation.

Tableau 9: Composition du cheeseburger Mora

— Diepvries / Surgelé / Tiefgefroren —

BEVROREN, GEMARINEERDE KIPPENBORST.

INGREDIËNTEN: kip, beslag (water, beslagmix (**tarwebloem**, zetmeel (maïs, **tarwe**, tapioca), rijsmiddelen (natriumzuurpyrofosfaat, natriumbicarbonaat), suiker, zout, palmolie, specerijen (witte peper, zwarte peper), maltodextrine, uienpoeder, gistextract, knoflookpoeder, kleurstof (paprikaextract)), **tarwebloem**), marinade (water, suiker, zout, gemodificeerd tapiocazetmeel), voorbemeler (**tarwebloem**, **tarwezetmeel**, gemodificeerd maïszetmeel, zout). // Gefrituurd in geraffineerd palmolievet.

OVEN: neem de nuggets zonder te ontdooien uit de verpakking en bak ze 14 tot 16 minuten in een voorverwarmde oven op 200 °C voor een conventionele oven of op 180°C voor een convectieoven. / **PAN:** neem de nuggets zonder te ontdooien uit de verpakking en bak ze op laag vuur 10 tot 12 minuten onder regelmatig omdraaien goudbruin in een pan met antiaanbaklaag zonder vet. / **FRITEUSE:** neem de nuggets zonder te ontdooien uit de verpakking en frituur ze 2-3 minuten op 175°C.

POITRINE DE POULET MARINÉE SURGELÉE.

INGRÉDIENTS: poulet, pâte à frire [eau, mélange pour pâte à frire (**farine de blé**, amidon (maïs, **blé**, manioc), poudres à lever (pyrophosphate acide de sodium, bicarbonate de sodium), sucre, sel, huile de palme, épices (poivre blanc, poivre noir), maltodextrine, poudre d'ognon, extrait de levure, poudre d'ail, colorant (extrait de paprika)), **farine de blé**], marinade (eau, sucre, sel, amidon modifié de manioc), enduit (**farine de blé**, **amidon de blé**, amidon modifié de maïs, sel). // Frit dans l'oléine de palme raffinée.

FOUR: Retirez les nuggets de leur emballage sans les dégeler et faites-les cuire 14 à 16 minutes au four préchauffé à 200°C (four traditionnel) ou à 180°C (four à chaleur tournante). / **POELE:** Retirez les nuggets de leur emballage sans les dégeler et faites-les légèrement brunir pendant 10 à 12 minutes dans une poêle antiadhésive sans matière grasse à feu doux, en les retournant régulièrement. / **FRITEUSE:** Retirez les nuggets de leur emballage sans les dégeler et faites-les frire pendant 2 à 3 minutes à 175°C.

GEFRORENE, MARINIERTE HÜHNERBRUST.

ZUTATEN: Hühnerfleisch, Teig [Wasser, Teigmischung (**Weizenmehl**, Stärke (Mais, **Weizen**, Tapioka), Backtriebmittel (Natriumhydrogenpyrophosphat, Natriumhydrogencarbonat), Zucker, Salz, Palmöl, Gewürze (weißer Pfeffer, schwarzer Pfeffer), Maltodextrin, Zwiebelpulver, Hefeextrakt, Knoblauchpulver, Farbstoff (Paprikaextrakt)), **Weizenmehl**], Marinade (Wasser, Zucker, Salz, modifizierte Tapiokastärke), Vormehl (**Weizenmehl**, **Weizenstärke**, modifizierte Maïsstärke, Salz). // In raffiniertem Palmolein frittiert.

BACKOFEN: die Nuggets noch gefroren aus der Verpackung nehmen und 14 bis 16 Minuten im vorgeheizten Backofen bei 200°C bzw. mit Umluft bei 180°C backen. / **PFANNE:** die Nuggets noch gefroren aus der Verpackung nehmen und in einer Pfanne mit Anti-Haft-Beschichtung ohne Fettzugabe 10 bis 12 Minuten bei schwacher Hitze leicht anbraten, dabei regelmäßig wenden. / **FRITEUSE:** Die Nuggets noch gefroren aus der Verpackung nehmen und 2-3 Minuten bei 175°C frittieren.

! **Bevat: gluten.**

! **Contient: gluten.**

! **Enthält: Gluten.**

DIEPVRIESINSTRUCTIES
INSTRUCTIONS DE CONGÉLATION
HINWEISE ZUM EINFRIEREN

In de diepvriezer:
* (-6 °C): 2-3 dagen
** (-12 °C): 2 weken
***(-18 °C): ten minste houdbaar tot einde: zie houdbaarheidsdatum.
NA ONTDOOIING, NIET OPNIEUW INVRIEZEN!

Dans le congélateur:
* (-6 °C): 2-3 jours
** (-12 °C): 2 semaines
***(-18 °C): à consommer de préférence avant fin: voir date limite de consommation.
NE PAS RECONGELER, APRÈS DÉCONGÉLATION!

Im Tiefkühlschrank:
* (-6 °C): 2-3 Tage
** (-12 °C): 2 Wochen
***(-18 °C): mindestens haltbar bis Ende: Siehe Mindesthaltbarkeitsdatum.
NACH DEM AUFTAUEN, NICHT WIEDER EINFRIEREN!

! **Goed verhitten tot in de kern voor consumptie.**
Bien cuire à cœur avant consommation.
Vor dem Verzehr gründlich durchgaren.

GEMIDDELDE VOEDINGSWAARDE PER VALEUR NUTRITIVE MOYENNE PAR DURCHSCHNITTLICHER NÄHRWERT PRO	100 g	Portie/Portion 125 g
Energie	873 kJ 209 kcal	1094 kJ 261 kcal
Vetten/Matières grasses/Fett	8,9 g	11,1 g
- waarvan verzadigde/dont saturés/davon gesättigte	3,6 g	4,5 g
Koolhydraten/Glucides/Kohlenhydrate	14,3 g	17,9 g
- waarvan suikers/dont sucres/davon Zucker	0,4 g	0,5 g
Voedingsvezels/Fibres alimentaires/Ballaststoffe	<0,5 g	<0,5 g
Eiwitten/Protéines/Eiweiß	17,9 g	22,4 g
Zout/Sel/Salz	1,0 g	1,1 g

* Referentie-inname van een gemiddelde volwassene (8400 kJ/2000 kcal) / Apport de référence pour un adulte-type (8400 kJ/2000 kcal) / Referenzmenge für einen durchschnittlichen Erwachsenen (8400 kJ/2000 kcal).

Deze verpakking bevat 2 porties van 125 g. / Cet emballage contient 2 portions de 125 g. / Diese Verpackung enthält Portionen von 125 g.



Delhaize Le Lion/De Leeuw
Brusselssesteenweg 347
B-1730 Asse
www.delhaize.be
info
tel. 0800/95 713
int. 00800/33 54 24 93

250g e



Tableau 10: Composition des chicken nuggets Delhaize

Du fastfood pour nourrir les insectes ? Mise au point d'une méthode de spectrométrie de masse pour la détection des protéines de viande dans les farines d'insecte

L'entomoculture, l'élevage d'insectes à des fins alimentaires, offre une voie prometteuse pour répondre aux enjeux de durabilité alimentaire. Cependant, l'utilisation de former foodstuffs à base de viande pour nourrir les insectes soulève des préoccupations quant aux risques sanitaires. Ce mémoire vise à explorer ces implications et à élucider la présence potentielle de protéines animales dans les larves d'*Hermetia illucens* (la mouche soldat noire) nourries avec des former foodstuffs contenant de la viande de poulet, de porc et de boeuf.

Dans un premier volet, une liste de peptides spécifiques pour les viandes de poulet, de porc et de bœuf est établie. Des recherches bibliographiques ont permis d'identifier des protéines possédant des peptides spécifiques et la spécificité de ces protéines a été évaluée d'abord avec l'outil BLAST de NCBI et puis par spectrométrie de masse. La liste de protéines spécifiques obtenues contenait 41 peptides réparties entre les trois viandes.

Le deuxième volet se concentre sur l'élevage des larves d'*Hermetia illucens*. Des substrats contenant des former foodstuffs de poulet, de porc et de bœuf ont été utilisés pour nourrir les larves. Les échantillons de substrats et de larves obtenus suite à cet élevage ont été analysés par spectrométrie de masse pour vérifier si les peptides spécifiques précédemment identifiés étaient détectables. Tous les peptides n'étaient pas détectables mais ces résultats ne nous permettent pas d'affirmer que tous les peptides ont été digérés. Malgré cela, la diminution des signaux dans les échantillons en contact avec les larves suggère une possible dégradation des peptides. Cette observation amène à envisager l'existence d'enzymes sécrétées par les larves ou leur microbiote intestinal.

Les résultats soulèvent des questions intrigantes sur les capacités de dégradation des peptides et sur les capacités enzymatiques des larves. Les futures étapes pourraient impliquer des approches pour réduire le bruit de la matrice, afin d'améliorer la détection des peptides. De plus, l'étude des capacités enzymatiques des larves pourrait fournir des informations cruciales sur leur rôle dans la dégradation des peptides.