

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Analyses peptidomiques/protéomiques pour la détection et l'identification de protéines animales transformées (PATs) présentes dans les farines animales

Budinger, Dimitri

Award date:
2015

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**ANALYSES PEPTIDOMIQUES/PROTÉOMIQUES POUR LA DÉTECTION ET
L'IDENTIFICATION DE PROTÉINES ANIMALES TRANSFORMÉES (PATs) PRÉSENTES
DANS LES FARINES ANIMALES**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Dimitri BUDINGER

Janvier 2015

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Analyses peptidomiques/protéomiques pour la détection et l'identification de protéines animales transformées (PATs) présentes dans les farines animales

BUDINGER Dimitri

Résumé

Les farines animales ont depuis longtemps été la source principale de protéines dans l'alimentation du bétail. Ces farines animales contiennent en effet une quantité importante de protéines animales transformées (PATs), ainsi qu'une certaine quantité de minéraux et de graisses nécessaires à la bonne alimentation de ces animaux. Cependant, l'émergence de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) ou maladie de la « vache-folle » dans les années 90 mit fin à l'utilisation des PATs dans l'alimentation du bétail. En effet, il est apparu que l'agent responsable de cette épidémie était une protéine "infectieuse", le prion, transmise via l'utilisation de farines animales infectées par cette dernière. De nombreuses interdictions ont ainsi vu le jour, celles-ci prohibant définitivement l'utilisation de ces farines animales. Grâce à ces mesures, cette maladie a presque totalement été éradiquée. Pour des raisons économiques et écologiques, la volonté de réintroduire certaines de ces farines à l'alimentation du bétail s'est intensifiée ces dernières années. Des méthodes d'analyses de ces farines ont ainsi vu le jour, la microscopie optique étant la méthode officielle d'analyse des PATs en Europe. Certaines limitations de ces méthodes nécessitent cependant le développement de nouvelles méthodes d'analyses plus robustes et plus efficaces. C'est dans ce but qu'une approche peptidomique utilisant la spectrométrie de masse a été décrite. A partir de plusieurs échantillons de farine animale provenant de plusieurs espèces, nous avons comparé différentes méthodes d'extraction protéique (HCl, TCA-Acétone & SDS-Tris), de purification, de digestion enzymatique des extraits et nous avons analysé les peptides obtenus en spectrométrie de masse. Par cette approche, nous avons pu identifier un certain nombre de peptides biomarqueurs spécifiques d'espèces, représentatifs de ces farines animales. Parmi ces peptides, certains seront ensuite utilisés pour la production d'anticorps afin de développer des tests immunologiques de type ELISA sur les farines animales. Puisque ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet financé par le SPF Santé Publique, nous avons aussi commencé à mettre au point un protocole « accéléré » adaptable pour une analyse en routine par les agences publiques de sécurité alimentaire. Dans ce but, le temps d'extraction a été fortement réduit et la digestion enzymatique accélérée par sonication, tout en préservant l'efficacité de l'analyse des peptides.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2015

Promoteur: M. Raes

Tuteur: H. Marbaix

Remerciements

C'est avec un brin d'émotion que ce mémoire touche à sa fin et que j'écris ces quelques lignes témoignant de ma gratitude envers les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.

Je tiens premièrement à remercier l'ensemble des « seniors » de l'URBC, pour m'avoir offert la possibilité de réaliser ce mémoire au sein de leur unité de recherche.

Je souhaite cependant remercier plus particulièrement le Professeur Martine Raes, ma promotrice, qui a fortement contribué à l'aboutissement de ce mémoire. Merci pour le temps – précieux – que vous m'avez accordé lors de nos différentes réunions, des corrections de ce mémoire mais surtout pour les conseils avisés et constructifs dont vous m'avez fait part.

Je remercie également Hélène, ma tutrice, celle qui m'a quasi tout appris et m'a permis de devenir « le roi de la centri ». Entre nous, une belle amitié est née, surtout après cet après-midi de mars bien arrosé. Merci pour ta bonne humeur, tes conseils, tes corrections, et surtout merci d'avoir toujours été présente pour m'épauler durant cette année (P.S. : ça fera un Ferrero !!).

Comme un peu de spiritualité ne fait jamais de mal, je tiens à remercier DIEU... DIEU, le roi du spectromètre de masse, qui règne sur le royaume URBC avec son habituel petit sourire moqueur. Merci pour tes explications sur ton appareil Ô combien précieux. Merci pour tes conseils avisés, pour tes recommandations, tes corrections et simplement merci pour ta bonne humeur quotidienne, ponctuée par tes petites moqueries que tout le monde adore tant.

Je tiens également à remercier tous les autres membres de l'URBC, cette grande famille avec laquelle j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Petit clin d'œil à « Pinocchio », son « Salut m'fi » et son petit bisou quotidien.

Je souhaite remercier les autres mémorants, avec qui j'ai beaucoup rigolé durant cette année. Nous avons partagé des joies, du stress, de la frustration parfois, mais nous nous sommes donné la force pour y arriver jusqu'au bout. Une dédicace toute particulière aux deux mouffettes du bureau, avec qui j'ai passé les meilleurs moments (du cri du paon à la danse des sardines, ce fut une réussite totale !).

Je voudrais aussi dire un grand merci aux autres Bios, avec qui j'ai passé cinq années exceptionnelles. Je pense plus particulièrement à Delphine, Gaby et Damien, ceux avec qui tout a commencé et sans lesquels ces cinq années n'auraient pas eu la même saveur.

Enfin, je souhaiterais remercier ma famille, et plus particulièrement ma maman, pour m'avoir permis de réaliser ces études et d'avoir fortement contribué au façonnement du chemin sur lequel je me retrouve aujourd'hui.

Dimitri

« In every end, there is a new beginning »

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
BSA	Bovine serum Albumin
CaCl ₂	Chlorure de Calcium
CAD	Collision-Activated Dissociation
CID	Collision-Induced Dissociation
CJD (ou MCJ)	Creutzfeld-Jakob disease (ou Maladie de Creutzfeld-Jakob)
CRA-W	Centre Wallon de Recherches Agronomiques de Gembloux
CER	Centre d'Economie Rurale
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
DLA	DIGE labelling buffer
DTT	Dithiothréitol
ECD	Electron-Capture Dissociation
EFPPRA	European Fat Processors and Renderers Association
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Like Immunosorbent Assay
ESB	Encéphalopathie Spongiforme Bovine
ESI	Electrospray Ionization
EST	Encéphalopathie Spongiforme Transmissible
ETD	Electron-Transfer Dissociation
FDR	False Discovery Rate
FT-ICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
FVO	Farine de Viande et d'Os
FWH	Full width at half maximum
g	Gramme ou force gravitationnelle
g/mol	Gramme / mole
Gel ID	Gel d'électrophorèse monodimensionnel
h	Heure
HCl	Acide chlorhydrique
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
IAA	Iodoacétamide
IDCR	Ionic Detergent Compatibility Reagent
kDa	Kilo Dalton
kV	Kilovolts
Log	Logarithme
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
M	Molaire
MBM	Meat and Bone Meal
mg	Milligramme

Min	Minutes
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
MS	Mass Spectrometry
m/z	masse / charge
N	Azote
NIFES	National Institute of Nutrition and Seafood Research (Norvège)
NIR	Near Infrared
NIRM	Near Infrared Microscopy
nm	Nanomètre
OIE	Organisation Mondiale de la Santé Animale ¹
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAT	Protéines Animales Transformées
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFF	Peptide Fragment Fingerprinting
PK	Protéinase K
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
ppm	Parts-per-million
Prion	Proteinaceous Infectious Only Particle
PrP	Protéine Prion
PrP ^C	Protéine Prion Cellulaire
PrP ^{Sc}	Protéine Prion infectieuse (Sc : Scrapie)
Q	Quadrupôle
Q-PCR	Quantitative PCR
rpm	Rotations par minute
RT	Retention Time (Temps de rétention)
SDS	Sodium Docecyl Sulfate
SNC	Système Nerveux Central
TCA	Acide trichloroacétique
TFA	Acide trifluoroacétique
TOF	Time-Of-Flight (Temps de vol)
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
UV	Ultraviolets
V	Volts
µg	microgramme
µl	microlitre

¹ Anciennement "Office International des Epizooties"

Liste des acides-aminés

Acide glutamique	Glu	E
Acide aspartique	Asp	D
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I

Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Table des matières

Avant-propos	1
1. Introduction	2
1.1. Historique.....	2
1.2. Emergence de l'ESB.....	3
1.2.1. Bref historique	3
1.2.2. Le prion	4
1.2.3. Symptômes et lésions	4
1.2.4. Corrélation entre l'ESB et les farines animales	5
1.3. Interdictions des farines animales	5
1.3.1. Législation et régulations	5
1.3.2. Réintroduction de certaines farines animales	6
1.4. Méthodes de détection des protéines animales transformées	7
1.4.1. Microscopie optique	7
1.4.2. Microscopie proche infrarouge	8
1.4.3. Réaction en chaîne par polymérase	8
1.4.4. Méthode immuno-enzymatique ELISA	9
1.5. Méthode peptidomique/protéomique	10
1.5.1. Techniques d'ionisation	11
1.5.1.1. Ionisation par électrospray	11
1.5.1.2. Ionisation laser assistée par matrice	11
1.5.2. Analyseurs de masse	12
1.5.2.1. Quadrupôle	12
1.5.2.2. Temps de vol	12
1.5.2.3. Trappe ionique	13
1.5.2.4. « Orbitrap »	13
1.5.2.5. Spectromètre de masse à transformation de Fourier (FT-ICR).....	13
1.5.3. Spectromètres de masse hydrides	14
1.5.3.1. Q-TOF	14
1.5.3.2. TOF-TOF	14
1.5.3.3. Triple Q.....	14
1.5.4. Identification et analyses des protéines	15
1.5.4.1. Approche « Bottom-up »	15
1.5.4.2. Approche « Top-down »	15
1.5.6. Analyses bioinformatiques – recherche en bases de données	16
1.5.6.1. Peptide Mass Fingerprinting	16
1.5.6.2. Peptide Fragment Fingerprinting	16
1.5.6.3. Interprétation des résultats	17
1.5.7. Exemples d'application d'analyses protéomiques particulières	17
Objectifs du mémoire	19

2. Matériel et méthodes	20
2.1. Echantillons	20
2.2. Extraction protéique	20
2.2.1. Extraction TCA-Acétone	20
2.2.1.1. Principe :	20
2.2.1.2. Matériel :	20
2.2.1.3. Méthode :	21
2.2.2. Extraction SDS-Tris	21
2.2.2.1. Principe :	21
2.2.2.2. Matériel :	22
2.2.2.3. Méthode :	22
2.2.3. Extraction HCl	22
2.2.3.1. Principe :	22
2.2.3.2. Matériel :	22
2.2.3.3. Méthode :	22
2.3. Dosage de la concentration en protéines	23
2.4. Purification des protéines par la méthode de "Clean-Up"	23
2.5. Analyse du profil protéique sur gel	24
2.5.1. Electrophorèse	24
2.5.1.1. Principe :	24
2.5.1.2. Matériel:	24
2.5.1.3. Méthode :	24
2.5.2. Coloration du gel et révélation	25
2.6. Digestion en milieu liquide	25
2.7. Analyse des échantillons par spectrométrie de masse en tandem	26
2.7.1. ESI-Q-TOF couplé à une nano HPLC	26
2.7.1.1. Principe :	26
2.7.1.2. Matériel :	27
2.7.1.3. Méthode :	27
2.7.2. Analyse des résultats	27
2.8. Tests immuno-enzymatiques ELISA	28
3. Résultats et Discussion	29
Partie A – Analyse sans <i>a priori</i> de farines animales dans le but d’identifier des peptides marqueurs spécifiques selon différentes méthodes d’extraction protéique	29
3A. 1. Analyse préliminaire : microscopie optique	29
3A. 2. Principe de la méthode peptidomique/protéomique	29
3A. 3. Etude comparative des méthodes d’extraction protéique	30
3A. 3.1. Rendement d’extraction	30
3A. 3.2. Profil protéique sur gel	31
3A. 4. Analyses en spectrométrie de masse	32
3A. 5. Identification de peptides marqueurs spécifiques de porc et de bovin	34
3A. 6. Identification de peptides marqueurs spécifiques de volaille et de mouton	35
3A. 6.1. Peptides marqueurs de volaille (<i>Gallus gallus</i>)	35

3A. 6.2. Peptides marqueurs de mouton (<i>Ovis aries</i>).....	36
3A. 7. Etude de la sensibilité et limite de détection.....	36
3A. 7.1. Profil protéique sur gel des "mix" de farines.....	36
3A. 7.2. Analyse MS des échantillons « mix »	37
3A. 8. Résumé.....	38
Partie B – Adaptations de l’approche peptidomique/protéomique en vue d’un protocole de routine court, efficace et flexible	38
3B. 1. Etude de l’efficacité de l’étape de "Clean-Up"	39
3B. 2. Réduction et alkylation des protéines	39
3B. 3. Diminution du temps de digestion enzymatique.....	40
3B. 4. Diminution du temps d’extraction protéique	41
3B. 4.1. Réduction du temps d’extraction TCA-Acétone	42
3B. 4.2. Réduction du temps d’extraction HCl	42
3B. 5. Résumé.....	43
Partie C – Tests de peptides marqueurs spécifiques par la méthode ELISA	43
4. Discussion générale, Conclusion et Perspectives	45
4.1. Complexité des échantillons.....	46
4.2. Analyses ciblées avec <i>a priori</i>.....	47
4.3. Méthode PCA : Principal Component Analysis (Analyse en composantes principales).....	49
4.3.1. Problématique des peptides biomarqueurs	49
4.3.2. Principal Component Analysis : le concept.....	50
4.3.3. Analyse PCA appliquée aux farines animales	50
4.3.4. Avantages de la PCA.....	51
4.4. Conclusion	53
5. Références	54
5.1. Bibliographie	54
5.2. Directives de la Commission Européenne	59
5.3. Webographie	59
6. Annexes.....	61

La fin des années 80 et le début des années 90 ont été marqués par une crise sanitaire sans précédent dans l'histoire européenne. En effet, c'est à cette époque que la maladie de la vache folle ou encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) fut décrite comme nouvelle épidémie. Cette maladie, transmise par l'utilisation de farines animales contaminées par un agent infectieux identifié comme le prion, a causé la mort de plusieurs milliers de troupeaux à travers l'Europe. A cette crise sanitaire s'est associée une crise socio-économique, puisqu'elle a provoqué la panique chez les consommateurs de viande, ceux-ci craignant d'être à leur tour atteints par la maladie. Cette panique était cependant tout à fait légitime, puisque cette maladie a la capacité d'être transmise à l'homme (via l'alimentation d'une viande contaminée par le prion), la forme humaine de cette maladie étant connue sous le nom de maladie de Creutzfeld-Jakob. On estime que cette épidémie provoqua à l'époque un peu plus de 200 victimes humaines (WHO, 2012).

Afin d'enrayer la maladie, de nombreuses mesures ont été mises en place en Europe. Les farines sont soumises à des traitements thermiques dits sécurisés (133°C, 20 min, 3 bars) et les farines responsables de la propagation de cette maladie ont été bannies. D'autres mesures de sécurité ont également été instaurées, tels que des dépistages réguliers de la maladie au sein des troupeaux et des critères de sélection des animaux plus stricts avant que ceux-ci ne soient envoyés à l'abattoir. Grâce à ces mesures, cette maladie est à l'heure actuelle presque totalement éradiquée en Europe.

Pour des raisons économiques et écologiques, la réintroduction des farines animales à l'alimentation du bétail s'est intensifiée ces dernières années. Certaines méthodes d'analyses de ces farines ont d'ailleurs été développées. Cependant, malgré ces méthodes, le problème de la traçabilité des farines animales, mais également de la viande en général, reste fortement présent. C'est d'ailleurs pour des problèmes similaires dans le processus de traçabilité de la viande que le scandale de la viande de cheval a éclaté début 2013.

Ces difficultés de traçabilité et d'analyse précise des farines animales nécessitent donc le développement de nouvelles méthodes d'analyse. C'est dans ce but que le projet « PeptidoGénomique » a vu le jour. Ce projet, financé par le SPF Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement, comporte deux volets. Le premier volet reprend les analyses génomiques réalisées sur les farines animales. Son but était à l'origine d'identifier des profils épigénétiques différents en fonction de l'origine tissulaire des séquences d'ADN contenues dans ces farines animales. Le second volet comprend les analyses peptidomiques réalisées sur les farines animales. Son but est de cibler la composante protéique des sous-produits animaux en établissant leur profil peptidique au moyen de la spectrométrie de masse (thèse d'Hélène Marbaix). C'est dans le cadre de ce volet peptidomique que s'inscrit ce mémoire. Par ailleurs, en cours de projet, une collaboration avec le NIFES (The National Institute of Nutrition and Seafood Research, Norvège) a été établie. Ce sont des échantillons fournis par le NIFES qui seront principalement analysés dans le cadre de ce mémoire.

Ce mémoire débutera par une présentation détaillée de la problématique engendrée par l'épidémie de la vache folle et les méthodes officielles développées afin d'assurer une meilleure traçabilité de ces farines. Les défis liés à ces méthodes seront alors expliqués. La méthode peptidomique/protéomique, utilisant la spectrométrie de masse (MS), sera ensuite détaillée. Les appareillages disponibles en MS ainsi que les différentes stratégies développées afin de déterminer la composition des farines seront enfin plus amplement décrits.

Ce manuscrit vise à vous présenter, chers lecteurs, le travail réalisé dans ce contexte au sein de l'unité de recherche URBC-Narilis de l'Université de Namur. Je vous souhaite, d'ores et déjà, une très bonne lecture.

INTRODUCTION

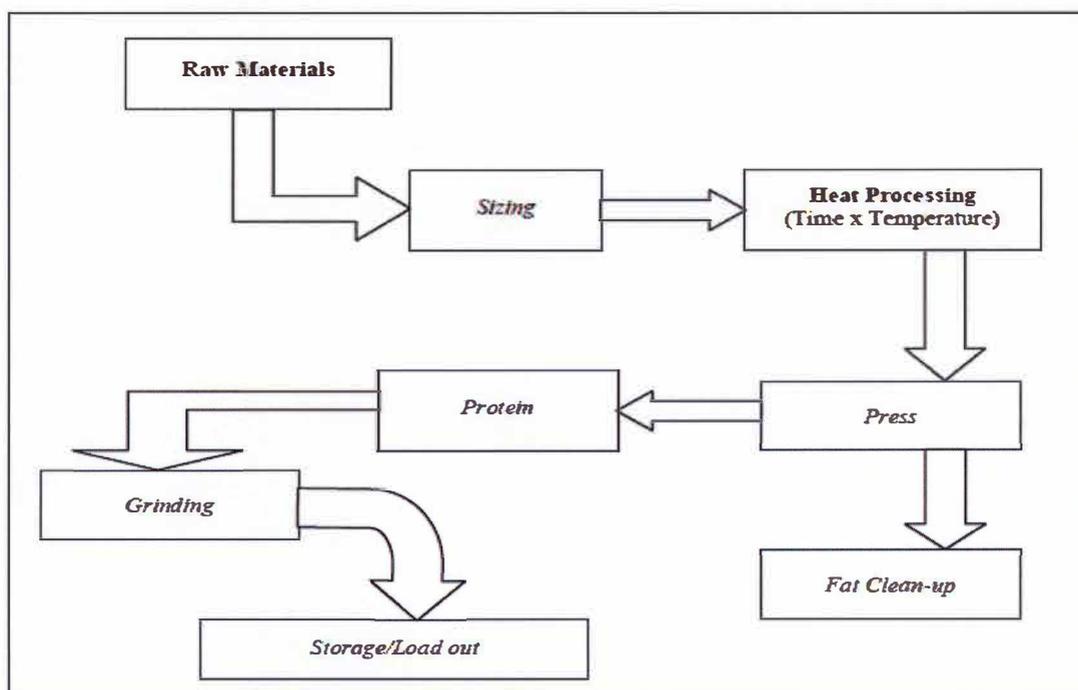


Figure 1.1 – Schéma simplifié du processus d'équarrissage. La matière première animale (« raw materials ») est premièrement découpée en morceaux d'une taille déterminée. Ces morceaux sont ensuite cuits à la vapeur suivant une température et un temps de cuisson déterminés en fonction de la nature du matériel. Le tout est ensuite pressé (« press »), de façon à extraire la graisse, l'eau et les fractions protéiques. Ces dernières sont broyées (« grinding ») puis stockées jusqu'à utilisation (Meeker & Hamilton, 2006).

1. Introduction

1.1. Historique

On estime à environ la moitié du poids total d'un animal produit pour sa viande, son lait ou ses œufs, consommée par l'être humain. L'autre moitié, n'étant pas consommée, représente une quantité impressionnante de matière première, également appelée « sous-produits ». La composition de ces « sous-produits » est très diversifiée, puisqu'y sont retrouvés la plupart des déchets produits en abattoirs, tels que les poils, les plumes, la peau, la tête, les os, le sang, les organes et autres déchets organiques. Bien que cette matière première ne soit pas destinée à la consommation humaine, elle représente un certain intérêt économique et écologique, puisqu'elle peut contenir jusqu'à 60 % d'eau, 20 % de graisses et 20 % de protéines et minéraux, pouvant être utilisés à d'autres fins (Meeker & Hamilton, 2006). C'est dans cette optique économique et écologique que le développement d'un système de collecte et de traitement de ces « sous-produits » a vu le jour, ce principe étant plus couramment connu sous le nom d'équarrissage. Le processus d'équarrissage, également appelé « rendering process », consiste en une transformation des déchets organiques animaux au moyen de différentes méthodes physiques et chimiques.

Les premières formes d'industrie de l'équarrissage existaient déjà il y a plusieurs centaines d'années, où l'objectif était de récolter la graisse animale ou « suif », dans le but de fabriquer du savon et des bougies (Phillips *et al.*, 2000 (webographie) ; cité dans Entis, 2007). Cependant, suite à la révolution industrielle, de nouvelles techniques de transformation ont vu le jour afin d'extraire les différents « sous-produits » de ces déchets animaux. Grâce à l'utilisation de chaleur et de diverses techniques de séparation, les fractions protéiques (également appelées « cracklings ») de ces déchets ont dès lors pu être extraites au même titre que la graisse et l'eau présentes dans les carcasses. Bien que les « cracklings » étaient à l'origine vendues comme fertilisant, il s'est rapidement avéré que ces fractions protéiques, en étant introduites dans l'alimentation du bétail, fournissaient une croissance supérieure à ces animaux en comparaison aux animaux nourris exclusivement avec des protéines végétales (Denton *et al.*, 2005). C'est toutefois au Royaume-Uni, lors de la Seconde Guerre Mondiale, que l'alimentation du bétail au moyen de fractions protéiques animales a connu sa plus grande expansion. En effet, suite aux nombreuses restrictions causées par la guerre dans le secteur agricole, le mot d'ordre était de recycler au maximum ces « sous-produits » animaux dans le but de minimiser l'importation de nourriture destinée au bétail. Malgré la fin de la guerre et la levée des restrictions agricoles en 1953, le développement de cette industrie alimentaire se consolida et continua son expansion (Phillips *et al.*, 2000 (webographie) ; cité dans Entis, 2007).

Dans les années 1960 et 1970, des améliorations apportées dans le processus de transformation des « sous-produits » animaux ont permis d'augmenter davantage la production de ces fractions protéiques animales, plus communément appelées Protéines Animales Transformées (PATs). En effet, ce processus a évolué depuis un système de fonctionnement par lots (« batch configuration ») vers un système en continu (« continuous-flow configuration ») (Auvermann *et al.*, 2004, webographie). Depuis 1994, cinq méthodes de traitement des déchets animaux sont approuvées par la Commission Européenne (EC N° 1774/2002, cité dans Woodgate & Van der Veen, 2004). La température de cuisson ainsi que le temps accordé à ce processus représentent les facteurs principaux déterminant la qualité des produits finaux (graisse, eau et PATs), ces facteurs étant également influencés par la composition et la nature des déchets animaux utilisés (**Figure 1.1**). De manière générale, ces

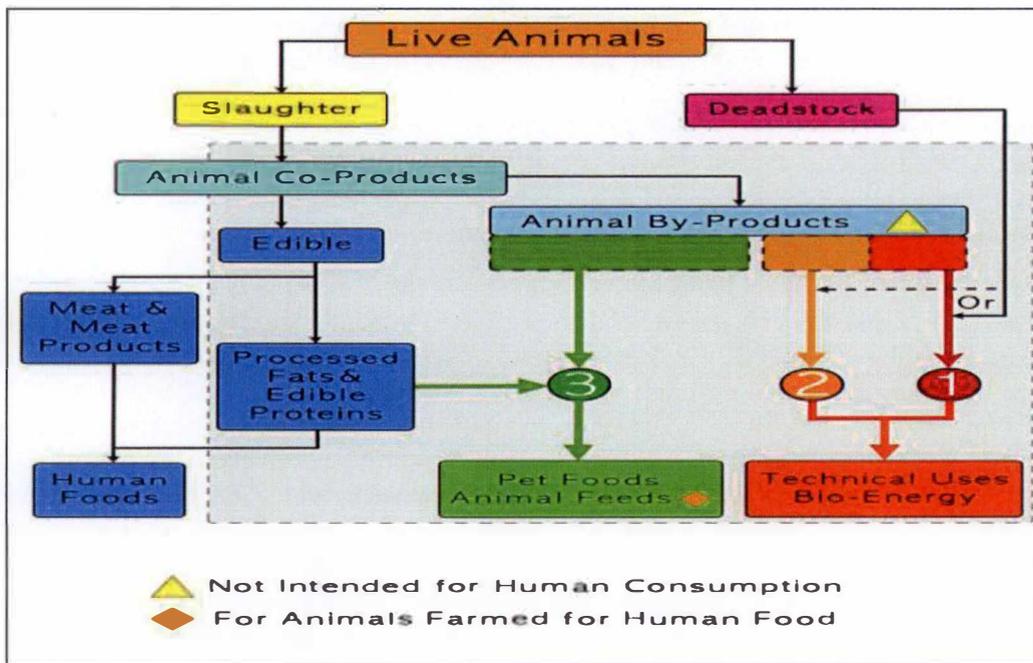


Figure 1.2 – Schéma de production des différentes catégories de « sous-produits » animaux. Les catégories 1 (rouge) et 2 (orange) sont utilisées comme source d'énergie (bioénergie), tandis que les « sous-produits » animaux correspondant à la catégorie 3 (vert) sont destinés à la consommation animale (EFPPA).

déchets sont cuits à la vapeur, à une température comprise entre 115°C et 145°C pendant 20 à 90 minutes et sous une pression d'environ 3 bars (Meeker & Hamilton, 2006, Margry & de Jong, 2012). Ces conditions de traitement visent principalement à inactiver les microorganismes abondamment présents au sein des carcasses et pouvant nuire à l'homme, au bétail ou à l'environnement.

Selon l'EFPPA (European Fat Processors and Renderers Association), les « sous-produits » animaux sont différenciés selon trois catégories (**Figure 1.2**). De manière générale, les deux premières catégories correspondent à des animaux malades ou morts, qui ne respectent pas les exigences vétérinaires, et sont donc impropres à la consommation humaine et animale. Les « sous-produits » provenant de ces deux catégories sont soit détruits, soit utilisés pour produire de l'énergie (bioénergie). La troisième catégorie correspond aux « sous-produits » animaux propres à la consommation humaine mais n'étant pas destinés à la consommation humaine pour diverses raisons commerciales, comme décrit dans Woodgate & Van der Veen (Woodgate & Van der Veen, 2004). C'est à partir de cette troisième catégorie que sont issues les PATs (celles-ci étant également appelées farines animales) destinées à la consommation animale, comme stipulé par la directive de la Commission Européenne, entrée en vigueur en mai 2003 (EC N° 1774/2002). Selon l'origine et la composition de ces « sous-produits » animaux, différentes farines animales sont décrites : farine de viande, farine de viande et d'os, farine de volaille, farine de plume, farine de sang, farine de poisson,... (2006 AAFCO Ingredient Manual ; cité dans Meeker & Hamilton, 2006). Ces farines animales contiennent non seulement une grande quantité de protéines, mais contiennent également une certaine quantité de minéraux et de vitamines essentielles nécessaires à l'alimentation animale (Van Raamsdonk et al., 2007).

Cependant, malgré l'importance des PATs comme source de protéines pour l'alimentation animale, certaines de ces farines ont rapidement été bannies du marché alimentaire. En cause, l'émergence de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), une maladie neurodégénérative transmissible via l'utilisation de farines animales contaminées par une protéine appelée « prion ». L'émergence de cette maladie ainsi que son lien avec les farines animales, ayant donné lieu à leur interdiction au sein du secteur alimentaire, vont à présent être plus amplement détaillés.

1.2. Emergence de l'ESB

L'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), également appelée « maladie de la vache folle », est une maladie neurodégénérative du système nerveux central (SNC) des bovins, faisant partie d'un groupe de maladies appelées encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST). Les EST affectent non seulement les bovins, mais peuvent également affecter d'autres espèces animales telles que les moutons, les chèvres, les chevaux, les porcs et même l'homme, chez qui la maladie est plus connue sous le nom de maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ) (Pattison, 1998). L'émergence de l'ESB au Royaume-Uni en 1986 et sa propagation à d'autres pays européens mena la communauté scientifique à s'interroger sur l'agent responsable de cette maladie et sur son mode de transmission.

1.2.1. Bref historique

C'est en 1985 dans le sud du Royaume-Uni que les premiers épisodes de la maladie ont été décrits. En effet, neuf vaches d'un même troupeau ont développé d'étranges symptômes variant d'une démarche anormale à des tremblements plus ou moins intenses. Suite à la mort de ces animaux, ces derniers ont été envoyés dans un centre de recherche vétérinaire, où leur

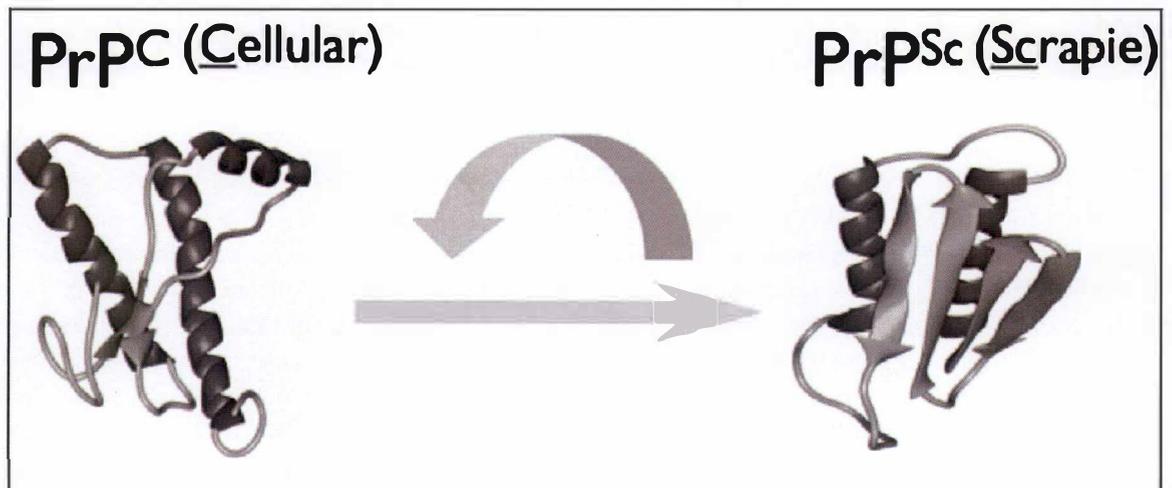


Figure 1.1 – Conversion de la protéine prion normale (forme cellulaire PrP^C) vers la forme anormale (PrP^{Sc}) (Consulté le 27 août 2014 sur <http://ffiproject.wordpress.com/ffi/>, modifié).

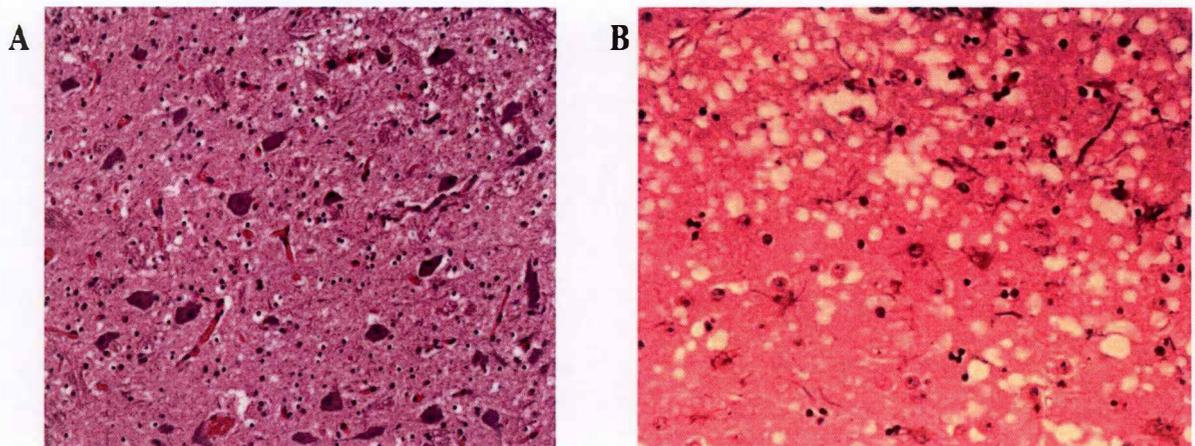


Figure 1.2 – Coupe histologique dans un cerveau de bovin atteint par l'encéphalopathie spongiforme bovine. A) Coupe histologique d'un cerveau sain, avec coloration spécifique du tissu neuronal. B) Coupe histologique d'un cerveau d'un animal malade, dans lequel un certain nombre de vacuoles peuvent être observées, les espaces créés par ces vacuoles faisant penser à une éponge, d'où le nom d'encéphalopathie spongiforme (consulté le 28 août 2014 sur U.S. Food and Drug Administration, <http://www.fda.gov/animalveterinary/resourcesforyou/animalhealthliteracy/ucm136222.htm>).

cerveau a été scrupuleusement analysé. L'analyse histologique des cerveaux y révéla la présence de lésions spongiformes, faisant porter à croire qu'il s'agissait de cas d'encéphalopathies spongiformes. En novembre 1986, après que d'autres troupeaux soient tombés malades et présentant des mêmes symptômes, l'encéphalopathie spongiforme bovine fut identifiée comme nouvelle pathologie en Grande-Bretagne (Phillips *et al.*, 2000 (webographie); cité dans Entis, 2007). Entre 1989 et 2007, l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) estime à plus de 190 000 les cas d'ESB recensés à travers le monde. Néanmoins, certaines estimations suggèrent que plusieurs millions d'animaux infectés par l'ESB sont rentrés dans la chaîne alimentaire depuis l'émergence de la maladie en 1986 (Donnelly *et al.*, 2002). Suite aux travaux de Stanley Prusiner, l'agent responsable des EST a été décrit comme étant une protéine infectieuse portant le nom de « prion », forme contractée de *proteinaceous infectious only particle* (Prusiner, 1998).

1.2.2. Le prion

L'encéphalopathie spongiforme bovine, la tremblante du mouton ou la maladie de Creutzfeld-Jakob chez l'homme font partie des pathologies regroupées sous le nom d'encéphalopathies spongiformes transmissibles, dont la protéine prion (PrP) est l'agent responsable. Cette protéine prion, ayant un poids moléculaire d'environ 27 – 30 kDa, a été définie comme étant une « protéine infectieuse » responsable des troubles neurologiques caractéristiques des EST. En réalité, deux isoformes de la protéine prion ont été décrites : la forme dite normale (PrP^C) et la forme dite infectieuse (PrP^{Sc}). La forme normale (PrP^C) est retrouvée de manière physiologique au sein des cellules mammaliennes et aurait un rôle dans le métabolisme du cuivre ainsi que des effets neuroprotecteurs. La forme anormale (PrP^{Sc}) est quant à elle résistante à la protéinase K (PK) et forme des agrégats au sein du cerveau des espèces infectées (Hedlin *et al.*, 2012). Chez une espèce atteinte par une des formes d'EST, cette protéine PrP^C se retrouve convertie sous la forme PrP^{Sc} après qu'une portion de son hélice α soit modifiée et repliée sous la forme d'un feuillet β . C'est en réalité la forme PrP^{Sc} qui est responsable du changement de conformation de la forme PrP^C de la protéine. En effet, des études ont montré que cette protéine PrP^{Sc}, une fois dans le système nerveux central, induit un changement de conformation de la protéine PrP^C (en lui servant de modèle) vers la forme PrP^{Sc} (**Figure 1.3**). Ces changements de conformations sont dès lors accompagnés par des modifications des propriétés physicochimiques de la protéine prion, donnant lieu aux lésions et symptômes caractéristiques des EST (Prusiner, 1998).

1.2.3. Symptômes et lésions

Parmi les différents symptômes causés par la protéine prion, l'incoordination des membres et la difficulté de l'animal à se mouvoir et à se tenir debout font partie des symptômes les plus évidents de la maladie. Une rapide perte de poids ainsi que des troubles du comportement et des tremblements sont également associés à l'ESB. La période d'incubation de la maladie peut varier de 4 à 6 ans et la mort de l'animal intervient généralement dans les 2 à 6 mois après l'apparition des premiers symptômes. Aucun traitement n'est à ce jour disponible pour soigner cette maladie. La variante humaine de l'ESB, la maladie de Creutzfeld-Jakob (CJD), est caractérisée par des symptômes similaires à ceux décrits pour l'ESB, tels que l'ataxie, la démence et des spasmes musculaires. Cependant, la période d'incubation de la CJD peut durer plusieurs décennies, ce qui en fait une maladie d'autant plus difficile à diagnostiquer (Prusiner, 1998). L'examen clinique post-mortem du cerveau d'un animal malade reste d'ailleurs le meilleur moyen de confirmer ou non son atteinte par la maladie. En effet, les signes histologiques caractéristiques consistent en la formation de vacuoles au sein de la matière grise du SNC, ces vacuoles se formant principalement au niveau du corps cellulaire des neurones (**Figure 1.4**). D'autres changements phénotypiques peuvent également être

observés, tels que la perte ou la mort de neurones, une forte prolifération d'astrocytes ou encore la formation de plaques amyloïdes (Gavier-Widen et al., 2005).

1.2.4. Corrélation entre l'ESB et les farines animales

Suite à l'émergence de l'ESB dans les années 1980, de nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer l'agent responsable de cette maladie ainsi que son mode de transmission. Les connaissances de l'époque ainsi que les études histopathologiques permettaient déjà d'affirmer que l'agent responsable de l'ESB était une version mutée de la protéine prion affectant les bovins (Reaney & Jorgensen, 2012). Très rapidement, il s'est avéré que le mode de transmission le plus probable de cette maladie consistait en l'utilisation de farines animales contaminées par la protéine prion. Comme décrit au point 1.1., le développement de l'industrie de l'équarrissage et l'utilisation de « sous-produits » animaux dans le but de produire des farines animales riches en protéines a connu une forte expansion dans les années 70 et 80. Dans un souci d'efficacité, de nombreux changements concernant le traitement de ces produits animaux ont été instaurés: passage à un système en continu ainsi que l'arrêt de l'utilisation d'un solvant d'extraction (Phillips *et al.*, 2000 (webographie) ; cité dans Entis, 2007). Tout porte désormais à croire que ces changements ont failli à leur tâche, c'est-à-dire inactiver toute forme d'agent pathologique transmissible pouvant être responsable de maladies, telle que la protéine prion. En effet, il apparaît que lors de la production des farines animales, les conditions de température et de pression n'étaient pas efficaces à 100 % pour inactiver totalement l'agent infectieux (Taylor et al., 1995). Ces changements auraient donc permis à la maladie de dépasser un seuil d'infectiosité, seuil au-dessus duquel une certaine quantité de protéine prion "viable" peut initier et provoquer une épidémie comme l'épidémie de la « vache folle » qu'a connue l'Europe dans les années 90 (Reaney & Jorgensen, 2012 ; Phillips *et al.*, 2000 (webographie); cité dans Entis, 2007). Puisque la période d'incubation de la maladie chez le bovin est de 4 à 6 ans en moyenne, il est fort probable qu'une certaine quantité d'animaux infectés (ayant été nourris avec des farines animales contaminées) soient entrés à leur tour dans la chaîne alimentaire, faisant perdurer ainsi le cycle de la maladie. De nombreuses mesures ont donc été mises en place dans les années 1990 afin de limiter l'expansion de l'ESB. Un certain nombre d'interdictions concernant l'utilisation des farines animales dans l'alimentation du bétail ont ainsi vu le jour.

1.3. Interdictions des farines animales

1.3.1. Législation et régulations

Dans les années qui suivirent l'apparition de l'ESB en Grande-Bretagne en 1986, de nombreuses régulations ont été mises en œuvre afin de limiter au maximum l'expansion de la maladie. Une première interdiction a été instaurée au Royaume-Uni en 1988 par un comité d'experts connu sous le nom de « Southwood Working Party ». Puisque l'ESB touche principalement les bovins (avec une certaine part d'infectiosité chez d'autres ruminants tels que les chèvres et moutons), ce comité décida de bannir toute farine animale contenant des protéines de ruminants destinées à l'alimentation des ruminants (BSE Order, 1988). Après que le pic de la maladie soit atteint en 1992 avec plus de 36 000 cas recensés au Royaume-Uni, les premiers effets de l'interdiction de 1988 ont été observés, avec une diminution du nombre de cas. Cependant, un certain nombre de cas d'infection chez des bovins nés après l'interdiction de 1988 ont été découverts. Cela implique donc que, malgré l'interdiction des farines animales de ruminants dans l'alimentation des ruminants, l'ESB continue à être transmise soit parce que les interdictions mises en place ne sont pas respectées, soit via l'utilisation de farines animales contenant des protéines de non-ruminants. Comme les non-

Tableau 1.1 – Tableau comparatif des législations européennes de 2008 et 2013. A) Législation européenne datant de 2008 concernant l'alimentation du bétail au moyen de farines animales (adapté de Liu *et al.*, 2011). B) Législation européenne datant du 01 juin 2013 concernant l'alimentation du bétail au moyen de farines animales. Les cases vertes représentent les farines animales de non-ruminants qui seront probablement réintroduites dans l'alimentation des non-ruminants dans un futur proche (adapté de Liu *et al.*, 2011 et selon les directives de la Commission de Régulation EC n° 56/2013).

Farines	Bétail					
	Ruminant	Porc	Volaille	Poisson	Animaux de compagnie	
Ruminant	X	X	X	X		✓
Porc	X	X	X	X		✓
Volaille	X	X	X	X		✓
Poisson	X*	✓	✓	X/✓		✓

*Autorisé comme source protéique remplaçant le lait maternel chez les jeunes bovins

Farines	Bétail					
	Ruminant	Porc	Volaille	Poisson	Animaux de compagnie	
Ruminant	X	X	X	X		✓
Porc	X	X	X	✓		✓
Volaille	X	X	X	✓		✓
Poisson	X*	✓	✓	X/✓		✓

*Autorisé comme source protéique remplaçant le lait maternel chez les jeunes bovins

Tableau 1.2 – Tableau de critères d'observation et d'identification par microscopie optique des particules de différentes espèces animales présentes au sein des farines animales (adapté de Gizzi *et al.*, 2003 ; cité dans Plouvier *et al.*, 2012).

Espèces	Critères visuels				
	Os	Lacunes	Canules	Muscles	Autres
Mammifères	Couleur blanc crème (a)	Elliptiques	Visibles	Striés	Poils
Volailles	Plus sombre que (a) Forme courte et pointue	Sphériques	Visibles	Striés	Plumes
Poissons	Plus transparente que (a) Forme fusiforme à côtés parallèles	Globulaires	Non visibles	Striés	Ecailles, arrêtes

ruminants (porc, volaille, poisson) pouvaient encore recevoir des farines animales contenant des protéines de ruminants, et que les farines de non-ruminants étaient encore destinées à l'alimentation des ruminants, il a été proposé l'existence d'une contamination croisée entre ruminants et non-ruminants (Reaney & Jorgensen, 2012). Des mesures plus rigoureuses ont donc été mises en place vers la fin des années 1990 et le début des années 2000. En effet, en 1996, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) établit un certain nombre de recommandations concernant les mesures à prendre quant à l'encéphalopathie spongiforme bovine. L'interdiction de faire entrer des animaux atteints ou suspectés d'être atteints par l'ESB dans la chaîne alimentaire ainsi que l'interdiction formelle d'utiliser des farines animales de ruminants font notamment partie de ces recommandations (Liu et al., 2011, WHO, 1996).

La première interdiction alimentaire à l'échelle européenne eut lieu en 2001, avec l'interdiction d'utiliser des farines animales de mammifères pour l'alimentation des ruminants, comme décrit dans la Directive (EC) N° 999/2001 (Commission Européenne, 2001). En 2002, l'alimentation intra-spécifique fut à son tour prohibée, chaque espèce animale ne pouvant plus recevoir de farine animale appartenant à la même espèce, cette pratique étant considérée comme "à risque" mais également comme une forme de cannibalisme ((EC) N° 1774/2002). Cette même commission classifia également les sous-produits animaux selon trois catégories et leur utilisation respective, comme décrit au point 1.1. et à la **Figure 1.2** (Commission européenne, 2002). Enfin, un amendement de la commission de 2001 a étendu l'interdiction de toutes les farines animales mammaliennes et aviaires pour l'alimentation animale (à l'exception des animaux de compagnie), tel que décrit dans la Directive (EC) N° 1234/2003 (Commission Européenne, 2003). En ce qui concerne les farines animales à base de poisson, celles-ci sont autorisées dans l'alimentation des porcs et des volailles, et également autorisées comme source protéique remplaçant le lait maternel chez les jeunes bovins (Commission Européenne, 2008) (**Tableau 1.1 – A**).

1.3.2. Réintroduction de certaines farines animales

Pour diverses raisons économiques et écologiques, la volonté de réintroduire certaines farines animales à l'alimentation du bétail s'est intensifiée ces dernières années. Bien que les farines de ruminants ainsi que l'intra-spécifique seront toujours prohibés dans l'alimentation animale, aucune exclusion définitive n'est envisagée concernant les autres farines animales existantes. Ainsi, une des principales volontés est de réintroduire les farines de non-ruminants à l'alimentation animale. Un premier pas a été franchi en juin 2013, avec la réintroduction des farines de porc et de volailles à l'alimentation des poissons d'élevage, comme décrit par la Directive (EC) N° 56/2013 (Commission Européenne, 2013). L'étape suivante serait de réintroduire les farines de porc pour l'alimentation des volailles et les farines de volaille pour l'alimentation des porcs (**Tableau 1.1 – B**). Selon l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA), cette réintroduction est possible et nécessaire pour diverses raisons. Tout d'abord grâce aux nombreux progrès réalisés dans la production et la traçabilité de ces farines animales. Ensuite, parce que les tests développés afin de vérifier la composition de ces farines animales ont fortement évolué. Aussi, il apparaît que le risque de transmission de l'ESB (ou autre forme d'EST) via l'alimentation des non-ruminants par des farines de non-ruminants est tout à fait négligeable, tant que l'alimentation intra-spécifique reste prohibée (EFSA, 2011).

Cette optique de réintroduction de certaines farines animales et la volonté de faire respecter la législation actuelle concernant l'utilisation de ces farines impliquent le développement de techniques d'analyse visant à déterminer leur composition. Les différentes méthodes existantes vont à présent être plus amplement détaillées.

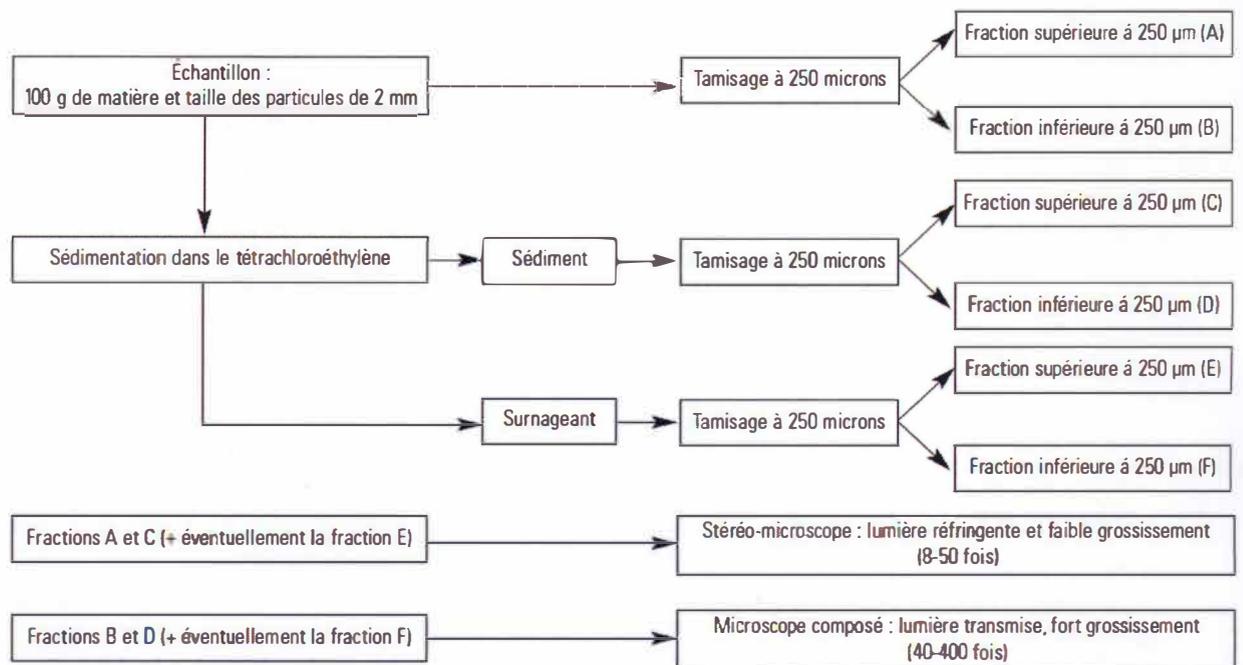


Figure 1.5 – Protocole général appliqué aux échantillons destinés à une analyse pour la microscopie optique (Plouvier *et al.*, 2012; adapté de Van Raamsdonk & Van der Voet, 2003).

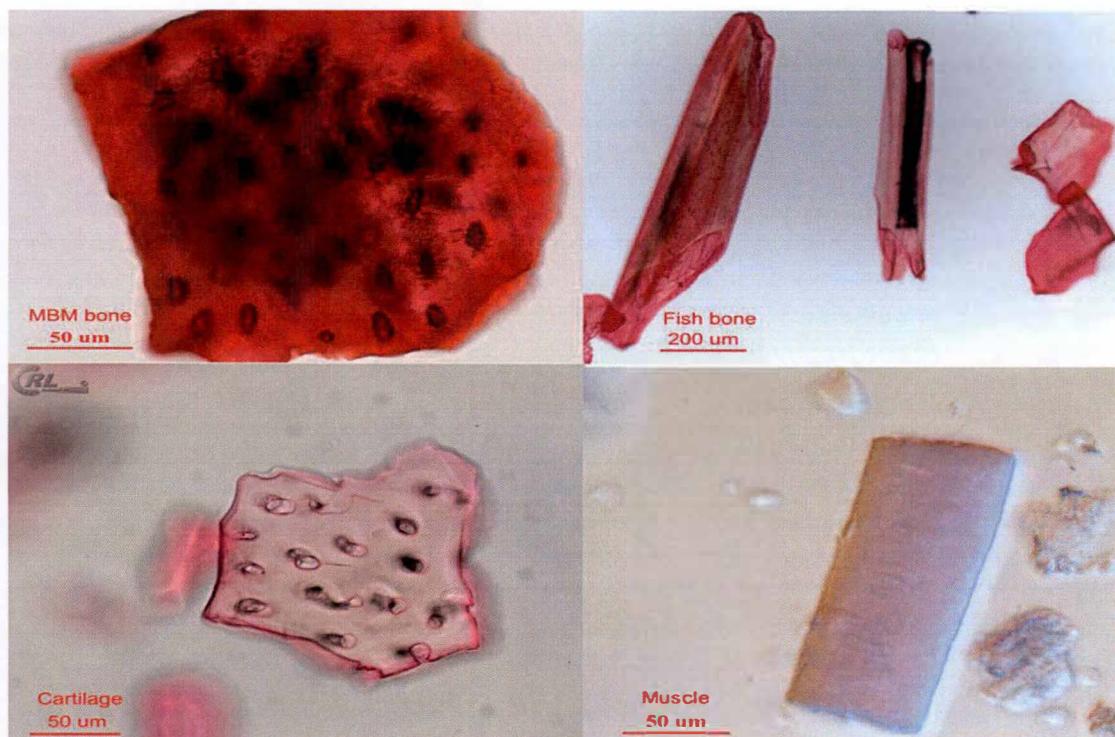


Figure 1.6 – Fractions colorées de muscle, cartilage et os de différentes particules pouvant être retrouvées au sein d'une farine animale (Liu *et al.*, 2011).

1.4. Méthodes de détection des protéines animales transformées

De nombreuses méthodes de détection des protéines animales transformées ont vu le jour vers la fin des années 1990 et le début des années 2000. Ces méthodes de détection visent principalement à mettre en place un système de reconnaissance et de détermination de l'origine des particules animales présentes dans les farines destinées à l'alimentation du bétail. D'un point de vue pratique, ces techniques tendent à observer, déterminer et évaluer au sein d'un échantillon de farine quelconque la présence de toute particule animale n'étant pas autorisée selon les différentes législations mises en place en Europe. Parmi les nombreuses méthodes d'analyse, quatre d'entre elles seront plus amplement détaillées dans la suite de ce mémoire, à savoir la microscopie optique, la microscopie proche infrarouge, la réaction en chaîne par polymérase et la méthode ELISA.

1.4.1. Microscopie optique

La microscopie optique consiste en une analyse des différents fragments présents dans une farine animale dans le but de détecter la présence de protéines animales transformées (PATs). Ces PATs, sous la forme de fragments de muscles, d'os, de cartilage ou encore de poils et de plumes, sont observées et leur origine déterminée selon certains critères morphologiques et histologiques. Comme décrit dans la Directive EC N° 126/2003 et la Commission de Régulation EC N° 152/2009, la microscopie optique est la seule méthode officielle européenne de contrôle et d'analyse des PATs dans les farines animales (Commission Européenne, 2003, 2009). L'un des avantages de cette méthode est qu'elle permet de détecter la présence de PATs à des concentrations très faibles, allant jusqu'à moins de 0.1 %, tout en ayant un très faible taux de faux négatifs (Liu et al., 2011). De même, cette technique permet également à l'expérimentateur le discernement visuel entre des particules d'os, puisque la forme des lacunes présentes au niveau de ces particules analysées est différente selon leurs diverses origines (mammifères, oiseaux, poissons) (**Tableau 1.2**) (Gizzi et al., 2003, Plouvier et al., 2012).

D'un point de vue pratique, la préparation des échantillons à analyser nécessite au préalable différentes étapes de broyage et de tamisage, afin d'obtenir différentes fractions – grossières à fines – de l'échantillon. A cet échantillon est ajouté du tetrachloroéthylène, ce dernier permettant la sédimentation des particules de densité plus importante telles que les os, les minéraux et autres particules "lourdes". Les fractions sédimentées ainsi que les particules de flottaison sont récupérées et séchées séparément puis analysées au microscope (**Figure 1.5**). Dans certains cas, des colorants sont ajoutés à la préparation des échantillons dans le but de mettre en évidence des particules spécifiques présentes dans les farines analysées, tels que le rouge d'alizarine (coloration des os en rouge) ou le réactif de Fehling (mise en évidence des muscles) (Liu et al., 2011). La distinction entre les différentes particules analysées repose principalement sur des critères morphologiques. Par exemple, les particules d'os des mammifères sont facilement reconnaissables étant donné la présence de nombreux canaux de Havers d'où partent un grand nombre de canalicules de Volkmann reliant entre eux ces différents canaux. Les os de volaille ont, quant à eux, un aspect plus effilé et anguleux, tandis que les os de poisson sont plutôt tubulaires et aux bords parallèles, tel que décrit dans Liu *et al.*, 2011 (**Figure 1.6**).

Cependant, bien que la microscopie optique permette de détecter la présence de particules animales dans un mélange complexe (tel qu'une farine animale), cette méthode officielle d'analyse ne permet pas, à elle seule, une identification taxonomique des particules analysées. En effet, l'expérimentateur ne peut déterminer avec certitude à quelle espèce appartient tel ou tel fragment observé. Dans ce but, d'autres méthodes d'identification des PATs ont été

élaborées, ces méthodes alternatives servant principalement de support additionnel à l'analyse microscopique.

1.4.2. Microscopie proche infrarouge

La microscopie proche infrarouge (NIRM) est une technique d'analyse des farines animales similaire à la microscopie optique, hormis qu'elle caractérise les différentes particules au moyen d'un spectre proche infrarouge (NIR). En effet, les différentes particules d'un mélange sont éclairées par un faisceau infrarouge, ces particules renvoyant ensuite un spectre proche infrarouge différent en fonction de la particule illuminée. Cette technique a un sérieux avantage par rapport à la microscopie optique : l'analyse de chaque particule est évaluée selon ses propriétés chimiques et non par son apparence (Boix et al., 2012, Fernandez Pierna et al., 2004). En pratique, différentes particules d'un mélange sont étalées sur une plaque et amenées au microscope proche infrarouge. Un faisceau infrarouge est ensuite dirigé vers chaque particule et les spectres proches infrarouges de chacune de celles-ci sont récoltés. Les spectres obtenus sont ensuite analysés suivant différents critères, tels que décrits par Zengling (Zengling et al., 2011). Pour qu'une particule soit identifiée comme étant d'origine animale, elle doit impérativement répondre à tous les critères d'analyse décrits. Cette technique permet une analyse minutieuse des particules présentes dans une farine, grâce à sa limite de détection de 0.05 % (Baeten et al., 2005). Bien que cette technique présente une forte sensibilité, elle n'en reste pas moins coûteuse en temps et n'est donc pas utilisée comme méthode de routine.

1.4.3. Réaction en chaîne par polymérase

La réaction en chaîne par polymérase, également notée PCR pour *polymerase chain reaction*, est une technique mise en point dans les années 1980 dont le but est d'amplifier de manière exponentielle un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. La technique PCR a donc été proposée comme méthode d'analyse pour confirmer la présence de particules de certaines espèces dans un échantillon de farine animale (Plouvier et al., 2012). Au moyen d'amorces oligonucléotidiques spécifiques, un fragment d'ADN complémentaire de ces amorces sera alors amplifié lors d'une série de cycles thermo-enzymatiques. La méthode PCR combine à la fois sensibilité et spécificité, dans le but d'assurer une détermination taxonomique des particules présentes dans un mélange complexe tel qu'une farine animale (Chiappini et al., 2005). Il est d'ailleurs reconnu que cette méthode d'analyse peut détecter la présence de 0.1 % de particules animales dans une farine, ce qui en fait une méthode d'analyse très robuste (Fumière et al., 2006). Des variantes de cette méthode PCR ont également été mises au point et appliquées à l'identification et à la quantification des particules animales présentes dans un mélange. Ainsi, la Q-PCR ou PCR quantitative est une technique PCR permettant de mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle du processus, au moyen d'une sonde fluorescente spécifique. La fluorescence enregistrée permet ainsi de quantifier la présence d'ADN spécifique d'une espèce (Fumière et al., 2009). Cependant, bien que la PCR permette de confirmer la présence d'ADN d'une espèce (bovin, porc,...), elle ne peut confirmer la nature exacte de la particule identifiée (muscle, os, graisse, sang,...). Par ailleurs, une limitation majeure de cette technique est qu'elle repose sur l'intégrité des molécules d'ADN présentes dans le mélange à analyser. Or, les différentes conditions de température et de pression nécessaires à la fabrication des farines animales affectent fortement l'intégrité des molécules d'ADN, rendant ainsi l'analyse des farines animales par méthode PCR plus laborieuse (Chiappini et al., 2005). C'est pour ces raisons que la PCR est principalement utilisée comme outil d'analyse combiné à d'autres méthodes existantes (Gizzi et al., 2003). Enfin, il est important de noter que la méthode PCR est une approche dite « *a priori* », puisque cette dernière fonctionne grâce à des sondes spécifiques reconnaissant l'ADN d'espèces particulières.

1.4.4. Méthode immuno-enzymatique ELISA

La méthode immuno-enzymatique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est une technique immunologique basée sur la reconnaissance d'un antigène par un anticorps spécifique. Dans le cas d'une farine animale, l'antigène représente une protéine animale (ou un fragment dérivé), laquelle est reconnue par un anticorps spécifique de cette protéine. En pratique, un anticorps dit de « capture » capable de fixer une protéine d'intérêt spécifique est immobilisé dans les puits d'une plaque 96 puits. Une solution contenant un extrait protéique est alors ajoutée dans chaque puits. La protéine spécifique de l'anticorps se lie alors à l'anticorps immobilisé, les autres protéines étant éliminées grâce à différents lavages. Par l'utilisation d'un anticorps secondaire reconnaissant la protéine d'intérêt et couplé à une enzyme (souvent la peroxydase de raifort ou HRP pour Horseradish Peroxidase) (ou à un fluorochrome), la protéine recherchée dans le mélange est facilement identifiable grâce à une réaction colorimétrique (ou en fluorimétrie). Appliquée à l'analyse des farines animales, la méthode ELISA permet donc de détecter la présence de protéines spécifiques (de muscle, d'os, de sang, de graisse,...) dans un mélange complexe. L'avantage de cette technique est son faible coût, sa rapidité ainsi que son aisance de mise en œuvre, ce qui ne nécessite donc pas de connaissances techniques avancées (Reaney & Bremer, 2012). Cependant, cette technique à l'inconvénient de ne pas être encore assez caractérisée. En effet, les anticorps actuellement utilisés pour reconnaître une protéine animale dans une farine ne sont pas assez spécifiques, ce qui réduit la sensibilité et la spécificité de détection de cette méthode (Liu et al., 2011). De plus, il est difficile de tenir compte de l'altération des protéines et donc de produire des anticorps reconnaissant non pas la protéine native mais la protéine altérée par les conditions thermiques et de pression nécessaires à la fabrication des farines animales.

Au vu des différentes méthodes décrites ci-dessus, il apparaît clairement que chaque méthode d'analyse apporte sa part d'information sans pour autant répondre aux différentes exigences d'analyse et de détection concernant les PATs en Europe. En effet, la microscopie optique permet la détection de PATs dans des farines animales, sans pouvoir déterminer l'espèce d'où provient cette particule. Les méthodes immunologiques et la méthode PCR permettent quant à elles l'identification de l'espèce d'où provient une particule, mais ne peuvent en confirmer (ou partiellement confirmer) l'origine tissulaire (os, muscle, poils,...). De plus, leur sensibilité et spécificité de détection sont assez limitées. Elles sont d'ailleurs d'autant plus limitées étant donné l'altération du matériel analysé, suite aux procédés thermiques drastiques nécessaires à la fabrication des farines animales. Dans un effort de faire respecter au mieux la législation européenne, la combinaison de certaines de ces méthodes a été décrite. Ainsi, l'analyse d'une farine animale peut se faire via l'utilisation d'un microscope optique, suivie par une méthode immunologique permettant de compléter les résultats microscopiques. Une autre combinaison d'analyse, qui regroupe la microscopie proche infrarouge et la méthode PCR a également été décrite (Bremer et al., 2012). Bien que les résultats suggèrent le potentiel de combiner plusieurs de ces méthodes, certaines limitations restent cependant difficiles à contourner. Le temps d'analyse et la limite de détection de chaque méthode ne permet pas, à l'heure actuelle, d'utiliser ces méthodes combinées comme outil d'analyse de routine. Pour ces raisons, de nouvelles pistes ont été envisagées afin de développer une méthode qui puisse répondre aux différents critères de détection et d'identification des PATs (détermination de l'origine taxonomique et tissulaire) tout en restant applicables et accessibles au développement d'un protocole de routine. C'est dans cette optique que des méthodes alternatives ont été développées ces dernières années: une nouvelle méthode génomique et une méthode peptidomique/protéomique. La méthode génomique est basée sur l'identification des

composés animaux grâce au profil de gènes dont l'expression varie d'un tissu à l'autre, avec des profils de méthylation tissus-spécifiques.

La méthode peptidomique/protéomique est quant à elle basée spécifiquement sur les protéines animales contenues dans les farines. C'est cette méthode peptidomique/protéomique qui est la base de l'entièreté de ce mémoire et qui va à présent être plus amplement détaillée.

1.5. Méthode peptidomique/protéomique

La protéomique se réfère à l'étude des protéines, que ce soit à l'échelle de leur identification, de leur structure, de leur fonction ou de leurs interactions avec d'autres protéines constitutives dans un système biologique donné (Graves & Haystead, 2002). Dans ce travail, cette approche visera à identifier le plus grand nombre de protéines présentes dans des échantillons de farine. La peptidomique a l'avantage d'être une méthode d'analyse robuste et permet notamment de fournir une vue d'ensemble des différentes protéines présentes dans un échantillon biologique sans pour autant nécessiter une connaissance préalable de ce dernier (Reece et al., 2012). Il s'agit généralement d'une approche sans *a priori*, au contraire des méthodes PCR ou ELISA, qui sont elles des approches avec *a priori*. Parmi les différents aspects techniques associés à la peptidomique, un de ses atouts est de permettre l'identification d'une espèce animale ainsi que son origine tissulaire en caractérisant une séquence en acides aminés au sein d'une protéine particulière. C'est dans cette optique que la peptidomique appliquée à l'identification des PATs présentes dans une farine a été récemment développée. Cependant, l'étude des protéines présentes dans une farine animale relève d'un certain « challenge » technique. En effet, les modifications liées à la formation de ces farines animales (température et pression élevées) ainsi que les modifications post-traductionnelles des protéines (phosphorylation, hydroxylation, méthylation, acétylation,...) rendent l'analyse peptidique et protéique d'autant plus difficile. De par la grande complexité biologique des échantillons de PATs, l'étude de ces protéines nécessite le développement de techniques d'analyse possédant une très grande sensibilité opérationnelle (Lin et al., 2003).

Ces dernières années, de nombreux développements apportés dans le domaine de la spectrométrie de masse font de cette méthode un choix évident quant à l'analyse des protéines présentes dans une farine animale. Cette technique a d'ailleurs fait ses preuves dans diverses études protéomiques destinées à l'identification de protéines animales, telles que décrites dans (Sentandreu & Sentandreu, 2011). La spectrométrie de masse a la capacité de répondre aux exigences requises par la Commission Européenne sur l'utilisation des farines animales. En effet, cette méthode d'analyse a le pouvoir de déterminer de manière précise l'origine taxonomique et tissulaire d'un peptide issu d'une protéine animale particulière, et cela même dans un échantillon complexe. Cette technique permet donc de fournir des renseignements précis sur la composition d'une farine animale (d'un point de vue taxonomique et tissulaire), ce que les autres techniques d'analyses décrites au point 1.4 ne pouvaient que partiellement réaliser.

En protéomique, deux stratégies expérimentales sont essentiellement décrites: l'analyse directe des protéines en spectrométrie de masse (approche « Top-down ») et l'analyse de peptides issus de la fragmentation de protéines par protéolyse (approche « Bottom-up »). L'analyse de ces protéines et peptides en spectrométrie de masse repose principalement sur l'ionisation de ces biomolécules au moyen de techniques dites « d'ionisation douce » (soft ionization techniques) au niveau de la source du spectromètre de masse. Le principe « d'ionisation douce » repose sur le fait que les biomolécules analysées sont ionisées sans induire leur fragmentation (Reece et al., 2012). La création de molécules ionisées intactes

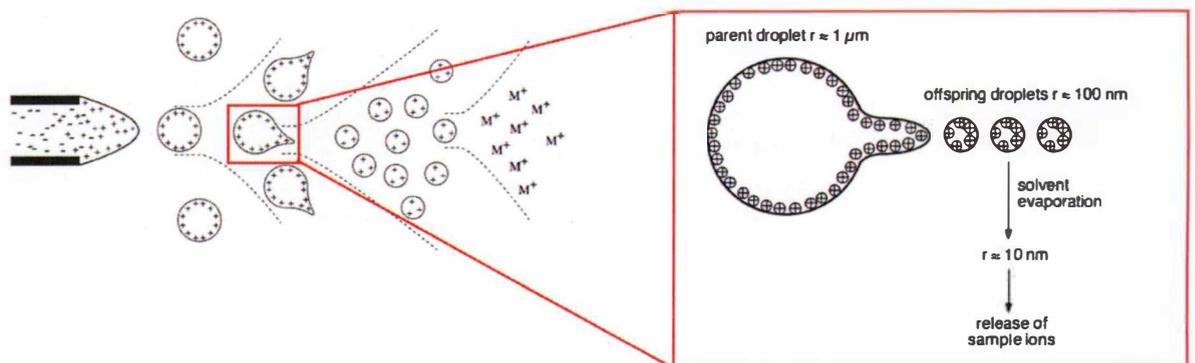


Figure 1.7 – Principe de l'ionisation par électrospray. Les biomolécules (protéines/peptides) sont soumises à un intense champ électrique les chargeant positivement. Sous l'action d'un gaz nébulisateur, ces molécules ionisées en solution vont quitter le capillaire chargé et former de fines gouttelettes. Ces gouttelettes, par la répulsion des charges et l'évaporation du solvant, vont se scinder en plusieurs gouttelettes de plus fin diamètre, jusqu'au moment où chaque gouttelette ne contient plus qu'un ion chargé. Ce dernier étant enfin désorbé et envoyé vers l'analyseur du spectromètre de masse (adapté de Bruins, 1998 & Ho *et al.*, 2003).

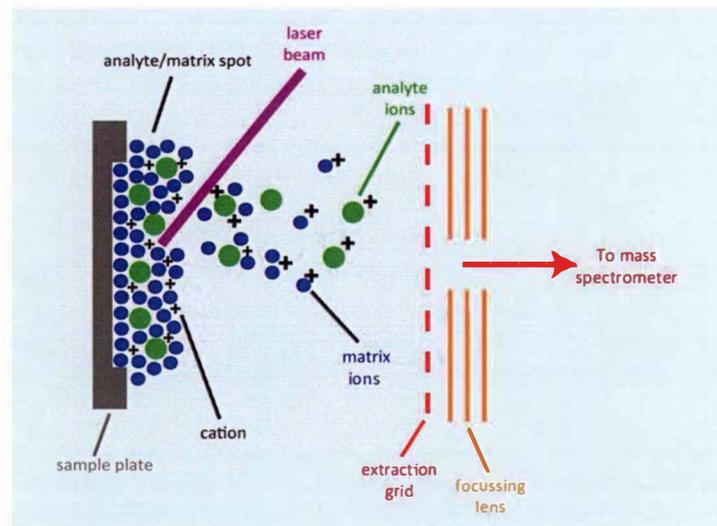


Figure 1.8 – Principe de fonctionnement du MALDI. Les biomolécules analysées (protéines/peptides) sont co-précipitées avec une matrice (bleu) sur une plaque, et sont illuminées au moyen d'un rayon laser (laser beam). En absorbant la lumière émise par les rayons, les molécules de la matrice vont libérer de l'énergie en étant relâchées dans la phase gazeuse. Les biomolécules libérées (vert) et mises en phase gazeuse sont alors envoyées vers le spectromètre de masse (modifié de <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/maldi-ionisation.xhtml>, University of Bristol, consulté le 25 octobre 2014).

permet alors au spectromètre de masse de pouvoir déterminer avec précision la masse moléculaire d'une protéine ou d'un peptide particulier. Les biomolécules, une fois ionisées, sont analysées de manière précise dans un analyseur au sein du spectromètre de masse. Ces biomolécules sont ensuite envoyées vers un détecteur, où leur spectre de masse est alors déterminé au moyen de différents programmes bioinformatiques. Ces différentes techniques d'ionisation et d'analyse des protéines et peptides vont à présent être plus particulièrement détaillées.

1.5.1. Techniques d'ionisation

1.5.1.1. Ionisation par électrospray

L'ionisation par électrospray (ESI, *Electrospray ionization*) est une technique consistant en la conversion de biomolécules (protéines/peptides) d'une phase liquide vers une phase gazeuse en générant des ions multichargés. De manière générale, les biomolécules sont envoyées dans un fin tube capillaire (généralement connecté depuis une HPLC) se terminant en une fine aiguille faisant face à l'entrée du spectromètre de masse. Au niveau de cette aiguille, les biomolécules se trouvant dans une phase liquide sont soumises à un fort potentiel électrique généralement situé dans une gamme de 2 à 5 kV (Lin et al., 2003). Ce potentiel électrique a dès lors la capacité de charger les biomolécules en solution. Le plus souvent, les peptides et protéines analysés sont chargés positivement puisque le capillaire est utilisé comme anode et l'ouverture du spectromètre de masse comme cathode. A ce moment là, une succession d'étapes va se produire et transférer ces biomolécules chargées d'une phase liquide à une phase gazeuse.

A la sortie de l'aiguille, les biomolécules (sous pression atmosphérique) se retrouvent sous la forme de fines gouttelettes chargées. Ces gouttelettes sont soumises à deux phénomènes : la répulsion des biomolécules chargées entre elles et l'élimination du solvant au moyen d'un gaz nébulisateur (généralement de l'azote). Au fur et à mesure, ces gouttelettes voient leur taille diminuer, par l'évaporation du solvant, et par conséquent voient leur densité de charge augmenter (Bruins, 1998). Consécutivement, ces gouttelettes se désintègrent en gouttelettes d'autant plus petites, jusqu'au moment où chaque biomolécule ionisée est désorbée et se retrouve en phase gazeuse (**Figure 1.7.**). Ces ions gazeux (multichargés) sont alors envoyés vers l'analyseur du spectromètre de masse. Généralement, les analyseurs utilisés avec un électrospray peuvent être de type quadrupôle (Q), temps de vol (TOF), trappe ionique ou FT-ICR (pour plus de détails, se référer au point 1.5.2).

1.5.1.2. Ionisation laser assistée par matrice

L'ionisation laser assistée par matrice (MALDI, *Matrix-assisted laser desorption/ionization*) est une seconde forme d'ionisation des biomolécules. Cette méthode n'utilise pas de potentiel électrique, mais utilise plutôt l'énergie des lasers pour ioniser les molécules biologiques. De manière générale, les peptides/protéines à analyser sont déposés sur une plaque où ils sont cristallisés avec de petites molécules ayant la capacité d'absorber l'énergie correspondant à la longueur d'onde du laser. Ce sont ces molécules (formant la matrice) qui vont absorber l'énergie issue des lasers, ceux-ci ayant généralement une longueur d'onde d'émission de 337 nm (Lin et al., 2003). Les molécules les plus souvent utilisées comme matrice sont de l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique pour les peptides et de l'acide sinapique ou de l'acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique pour les protéines. L'énergie absorbée par les cristaux va se propager à travers la matrice et les biomolécules. Des fractions de matrice et de biomolécules vont alors se retrouver libérées dans une phase gazeuse. Les peptides et/ou protéines ionisés sont désorbés de cette matrice et envoyés vers l'analyseur du spectromètre de masse (**Figure**

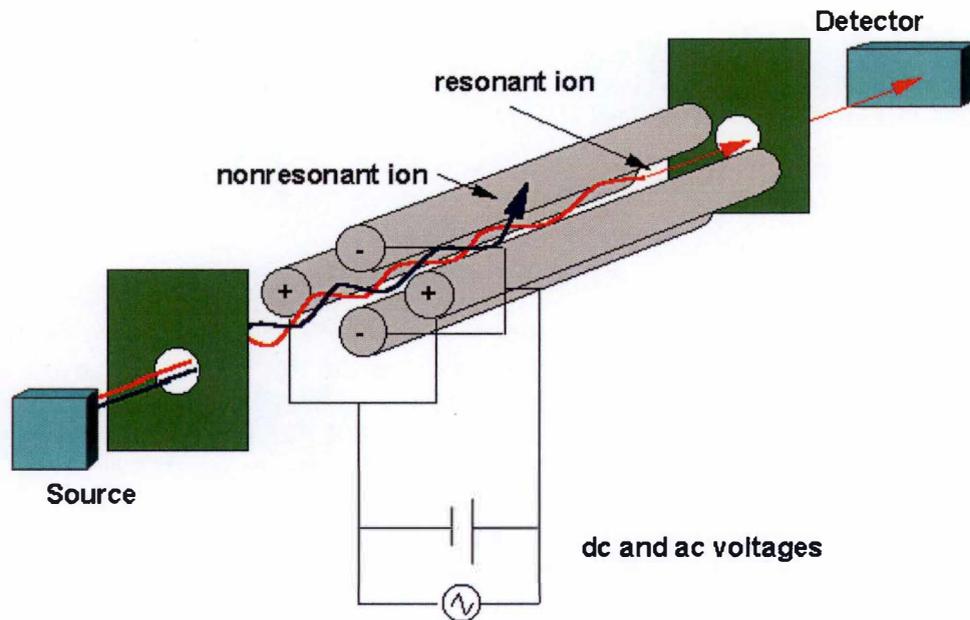


Figure 1.9 – Principe de l'analyseur de masse quadrupôle. Les ions provenant de la source sont envoyés vers le quadrupôle, où ils sont sélectionnés selon leur rapport m/z grâce à un voltage appliqué aux quatre barres métalliques constitutives du quadrupôle. Les ions dont le rapport m/z est sélectionné oscilleront jusqu'au détecteur, les autres ions s'écraseront sur les barres métalliques ou s'échapperont du système ([http://www.chemicool.com/definition/quadrupole mass spectrometry.html](http://www.chemicool.com/definition/quadrupole_mass_spectrometry.html), consulté le 25 octobre 2014).

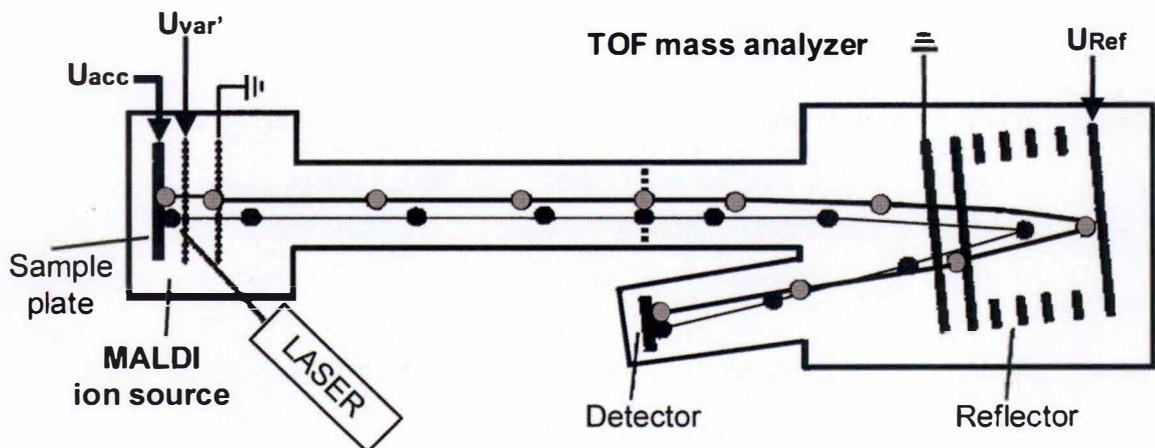


Figure 1.10 – Principe du fonctionnement d'un analyseur de masse de type temps de vol (TOF). Dans le cas présent, la source d'ionisation des biomolécules est de type MALDI. Les ions sont envoyés vers l'analyseur TOF, où leur temps de parcours pour arriver jusqu'au détecteur dépendra de leur énergie cinétique mais également de leur rapport m/z . L'énergie cinétique de chaque ion sera corrigée au moyen d'un reflectron, de façon à ce que les ions ayant le même rapport m/z mais dont l'énergie cinétique diffère arrivent au même moment au niveau du détecteur (Hirsch *et al.*, 2004).

1.8.) (Lin et al., 2003). L'ionisation MALDI est généralement utilisée pour analyser des mélanges de peptides ou protéines moins complexes par rapport à l'ionisation ESI (Aebersold & Mann, 2003). A l'inverse de l'ESI, les biomolécules ionisées par le MALDI sont généralement monochargées. L'analyseur habituellement couplé au MALDI est de type temps de vol (TOF) (se référer au point 1.5.2).

1.5.2. Analyseurs de masse

Après avoir été ionisées, les biomolécules sont ensuite envoyées au niveau d'un analyseur de masse au sein même du spectromètre de masse. Au niveau de cet analyseur, les molécules ionisées vont être séparées selon leur rapport masse sur charge (m/z). Alors que certains analyseurs fonctionnent au moyen d'un champ électrique, d'autres fonctionnent selon un champ magnétique (Lin et al., 2003). Différents analyseurs existent, chacun ayant ses propriétés particulières. De manière générale, un analyseur est évalué selon deux critères principaux, à savoir sa résolution et sa précision de masse (m/z). La résolution d'un analyseur est définie par sa capacité à séparer deux masses différentes. La précision de masse est la différence entre la masse théorique d'une protéine ou d'un peptide et la masse mesurée de cette protéine ou de ce peptide. La précision de masse s'exprime en ppm (parts-per-million) et est également liée à la résolution de l'analyseur. Ainsi, un instrument possédant une faible résolution aura par conséquent une précision de masse plus faible. Les principaux analyseurs utilisés en spectrométrie de masse vont à présent être brièvement exposés.

1.5.2.1. Quadrupôle

L'analyseur de masse de type quadrupôle (Q) est constitué de quatre barres métalliques cylindriques disposées parallèlement deux à deux. Un voltage est appliqué à ces barres métalliques, où chaque barre adjacente est soumise à une polarité différente. De cette façon et à tout moment, deux barres opposées seront chargées positivement tandis que les deux autres barres opposées seront chargées négativement. Les ions traversant le quadrupôle auront alors une trajectoire particulière en fonction de leur rapport m/z mais également du voltage soumis à ces barres métalliques. Ainsi, il est possible de sélectionner des ions dont le rapport m/z est intéressant. En effet, si l'expérimentateur décide de ne sélectionner qu'une gamme particulière d'ions chargés, ceux-ci auront une trajectoire stable, et oscilleront tout au long du quadrupôle et pourront être envoyés vers un détecteur en fin de parcours. En revanche, les ions dont le rapport m/z n'est pas sélectionné auront alors une trajectoire instable, iront s'écraser sur les barres métalliques et seront ainsi éliminés (**Figure 1.9**) (Lin et al., 2003). Le quadrupôle peut également être utilisé selon un mode scan, où le voltage augmente selon une gamme d'intensité permettant à chaque instant de ne laisser passer que des ions ayant un rapport m/z bien défini (Chalkley, 2010).

1.5.2.2. Temps de vol

L'analyseur de masse de type temps de vol (TOF, *Time-Of-Flight*) a la capacité d'accélérer des groupes d'ions grâce à un champ électrique et de les différencier selon le temps que ceux-ci prennent pour traverser un tube de vol jusqu'au détecteur (**Figure 1.10**). Les ions partent tous avec la même énergie cinétique mais comme ceux-ci ne possèdent pas le même rapport m/z , au plus un ion est lourd, au moins vite il traversera le tube de vol. L'analyseur TOF a la capacité d'associer à chaque ion une valeur précise de son rapport m/z rien qu'en mesurant le temps que cet ion met pour traverser le tube de vol (Cotter, 1989, Lin et al., 2003, Chalkley, 2010). De façon à augmenter la résolution d'analyse, le TOF peut également être couplé à un réflectron, ce dernier permettant de focaliser les ions n'ayant pas la même énergie cinétique mais dont le rapport m/z est le même. En effet, si deux ions possédant une énergie cinétique faiblement différente et possédant le même rapport m/z sont envoyés dans le TOF, l'ion

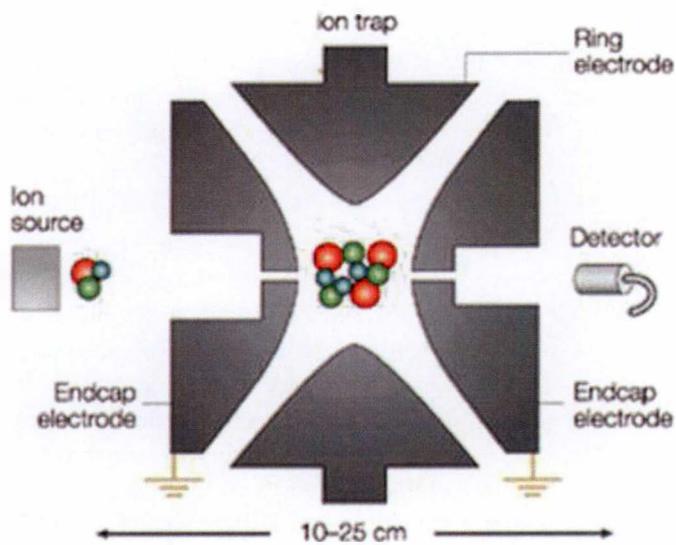


Figure 1.11 – Principe du fonctionnement d'un analyseur de type trappe ionique. Les ions provenant de la source sont envoyés vers l'analyseur, où ils seront soumis à un voltage permettant de piéger ces ions au centre de l'analyseur. Ces ions peuvent soit être envoyés vers le détecteur, où leur rapport m/z sera mesuré (analyse MS), soit être fragmentés (CID) pour être ensuite envoyés vers le détecteur (analyse MS/MS) (Glish & Vachet, 2003).

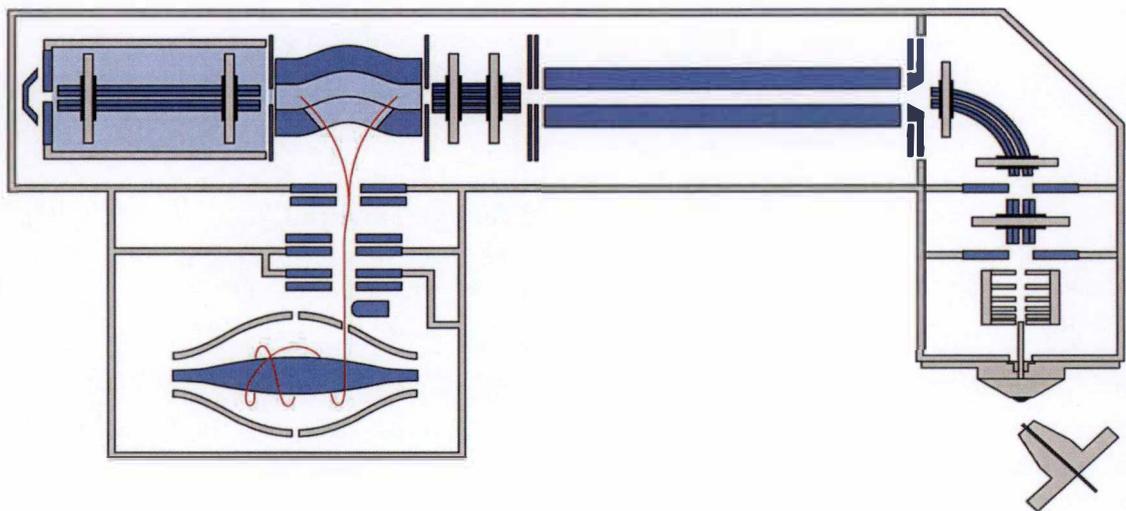


Figure 1.12 – Principe du fonctionnement de l'analyseur de type « orbitrap ». Les ions envoyés vers l'« orbitrap » (parcours rouge) vont osciller selon leur rapport m/z et pourront être fragmentés dans une cellule de collision afin de réaliser un spectre MS/MS. Dans le cas présent, cet « orbitrap » est couplé à une source de type ESI et à un premier analyseur de type quadrupole (Thermo Scientific).

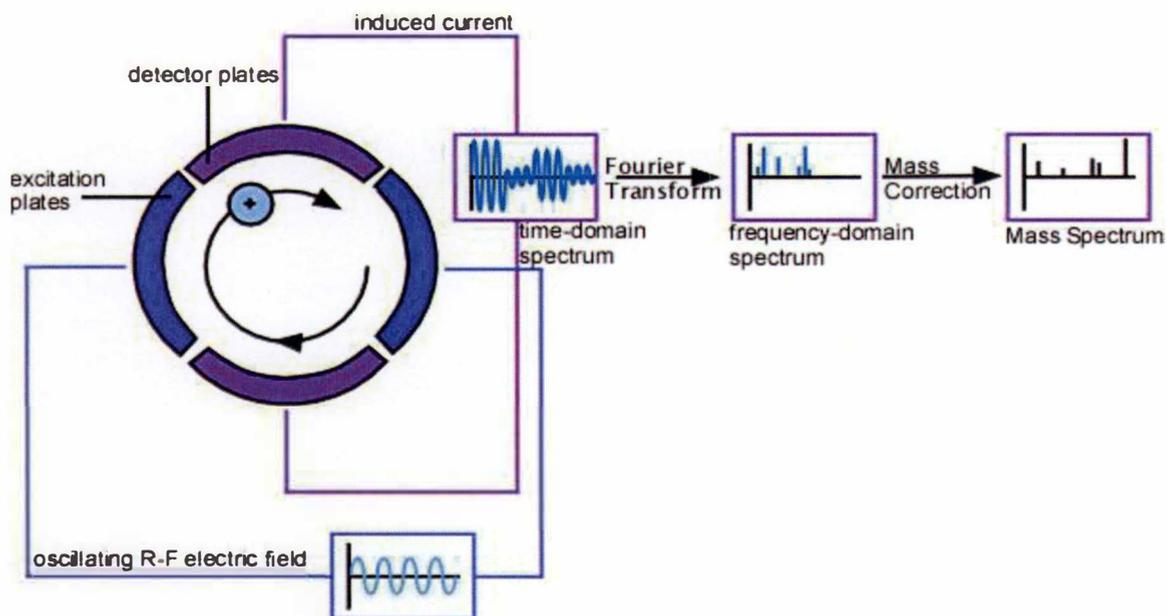


Figure 1.13 – Principe du fonctionnement de l'analyseur de type cyclotron à resonance des ions (FT-ICR). Les ions introduits dans cet analyseur sont soumis à un champ magnétique permettant à ces ions d'osciller au centre de cet analyseur. L'oscillation est fonction du rapport m/z de chaque ion. Ces ions peuvent ensuite être détectés, cette détection apparaissant sous la forme d'un signal électrique. Ce dernier est ensuite converti en un spectre de masse grâce au principe de la transformation de Fourier (Consulté le 31 octobre 2014, http://people.whitman.edu/~dunnivfm/CMS_Ebook/CH5/5.5.6.html).

possédant la plus grande énergie cinétique pénétrera plus profondément dans le réflectron avant d'être réfléchi et envoyé vers le détecteur. De cette façon, les ions ayant le même rapport m/z arriveront au même moment sur le détecteur. L'utilisation d'un réflectron permet notamment d'augmenter la performance de l'analyseur, que ce soit au niveau de sa résolution ou de la précision de masse qui en résulte (Chalkley, 2010, Hirsch et al., 2004).

1.5.2.3. Trappe ionique

Un analyseur de type trappe ionique est un appareillage permettant de réaliser la sélection, l'isolement et la fragmentation des peptides dans un même endroit (Chalkley, 2010). En effet, la chambre ou trappe ionique est soumise à un voltage permettant de piéger les ions au centre d'une électrode circulaire. Ce voltage peut alors être utilisé pour envoyer de manière sélective les ions vers un détecteur pour analyser leur rapport m/z (analyse MS). L'expérimentateur peut également décider de retenir les ions afin que ceux-ci soient fragmentés en entrant en collision avec un gaz (hélium) pour être ensuite envoyés vers le détecteur, afin de déterminer leur séquence en acides aminés (MS/MS) (**Figure 1.11**). L'avantage de cet analyseur est sa rapidité d'analyse et son prix peu élevé par rapport aux autres analyseurs disponibles. En revanche, il ne permet pas de fournir une grande précision de masse et ne possède donc pas une grande résolution (Aebersold & Mann, 2003)

1.5.2.4. « Orbitrap »

Un analyseur de type « orbitrap » consiste en une électrode externe en forme de tonneau renfermant en son centre une seconde électrode de forme fusiforme (**Figure 1.12**). De par la forme particulière de cet analyseur, les ions injectés dans l'« orbitrap » sont soumis à plusieurs forces les faisant osciller autour de l'électrode centrale. La fréquence de cette oscillation dépend du rapport m/z des ions, cette fréquence étant alors détectée et convertie en rapport m/z grâce à la transformation de Fourier (Chalkley, 2010, Scigelova et al., 2011). L'« orbitrap » a la capacité de réaliser des spectres MS de grande précision. Il peut également réaliser des spectres MS/MS en envoyant des ions sélectionnés vers un analyseur de type trappe ionique normale, où ces ions seront fragmentés puis envoyés vers le détecteur. L'intérêt de cet appareil est qu'il peut fournir une très haute résolution d'analyse (jusqu'à 150 000 FWH) ainsi qu'une très bonne précision de masse (2 à 5 ppm) pour les ions précurseurs. Cependant, comparé aux autres analyseurs, le temps d'analyse est nettement plus élevé si l'on veut travailler à haute résolution (Hu et al., 2005).

1.5.2.5. Spectromètre de masse à transformation de Fourier (FT-ICR)

Le spectromètre de masse à transformation de Fourier (FT-ICR) est un type d'analyseur faisant partie de la famille des trappes ioniques, mais utilisant un champ magnétique de forte intensité pour piéger des ions en son centre (**Figure 1.13**). En effet, lorsque les ions sont introduits dans cet analyseur, ces derniers vont être soumis au champ magnétique et osciller autour de ce dernier en fonction de leur rapport m/z . Ainsi, les ions ayant un même rapport m/z oscilleront de la même manière et pourront alors être détectés. Cette détection se produit sous la forme d'un signal électrique enregistré au niveau de deux plaques détectrices : un courant ionique est mesuré lors du passage de ces ions d'une plaque à une autre (Lin et al., 2003). En effet, ce signal est ensuite converti en une valeur de m/z grâce au principe de la transformation de Fourier (Scigelova et al., 2011). L'avantage de cet analyseur de masse est sa très grande sensibilité, sa très haute résolution et sa grande précision de masse. Cependant, cet appareillage n'est que peu utilisé en analyse de routine, de par son coût élevé et sa faible capacité à fragmenter les peptides (Marshall et al., 1998, Aebersold & Mann, 2003).

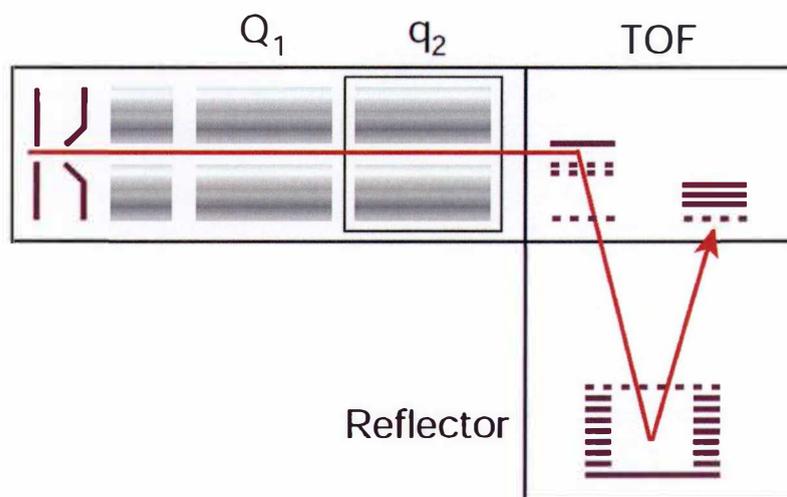


Figure 1.14 – Principe du fonctionnement du spectromètre de masse hybride de type Q-TOF (Aebersold & Mann, 2003).

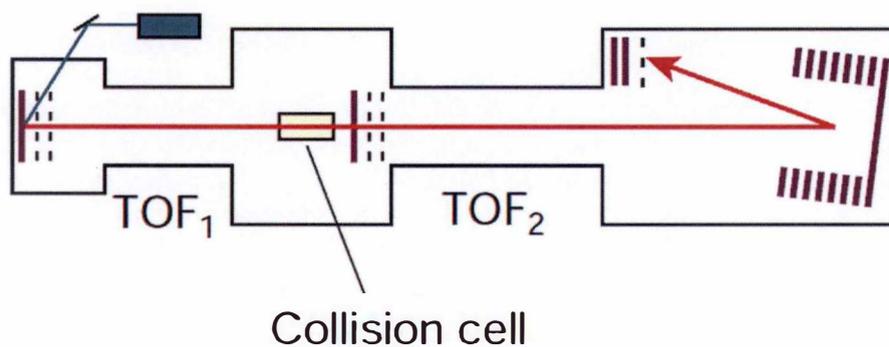


Figure 1.15 – Principe du fonctionnement du spectromètre de masse hybride de type TOF-TOF (Aebersold & Mann, 2003).

1.5.3. Spectromètres de masse hybrides

Les différents analyseurs de masse décrits ci-dessus possèdent des caractéristiques leur permettant de fournir des informations particulières sur les protéines ou peptides détectés. Dans certains cas, la force de plusieurs de ces analyseurs peut être utilisée et combinée afin de profiter des avantages qui leur sont propres. Ces spectromètres de masse hybrides ou spectromètres de masse *en tandem* possèdent des capacités uniques en matière d'analyse des biomolécules, permettant notamment de fournir la séquence en acides aminés d'une protéine ou d'un peptide et de déterminer son origine taxonomique et tissulaire.

1.5.3.1. Q-TOF

Un spectromètre de masse de type Q-TOF est, comme son nom l'indique, un spectromètre de masse hybride combinant un analyseur de type quadropôle et un analyseur de type temps de vol. En arrivant au niveau du quadropôle (Q_1), les ions sont sélectionnés selon leur rapport m/z . Les ions sélectionnés continuent leur parcours, tandis que les autres ions sont déviés de leur trajectoire. Les ions (les peptides ionisés) passent ensuite dans une cellule de collision (q_2). Dans cette cellule de collision se trouve un gaz noble, principalement de l'argon ou de l'hélium. Les ions « mères » vont entrer en collision avec les atomes de gaz, cette collision produisant la dissociation des ions « mères » au niveau de leur lien peptidique. Ainsi, un ion précurseur donne « naissance » à deux ions « filles », ce principe étant connu sous le nom de dissociation induite par collision ou CID (*collision-induced dissociation*). Les ions « filles » sont alors envoyés vers le second analyseur de masse qu'est le TOF. Au niveau de ce dernier, ces ions seront séparés selon leur rapport m/z . Leur détection au niveau d'un détecteur en fin de parcours permettra alors de créer un spectre de masse caractéristique de ces ions. Cet appareillage est couramment utilisé puisqu'il possède une grande sensibilité, une grande résolution ainsi qu'une grande précision de masse (Aebersold & Mann, 2003, Lin et al., 2003, Chalkley, 2010) (**Figure 1.14**).

1.5.3.2. TOF-TOF

Une autre forme de spectrométrie de masse en tandem utilise deux analyseurs de masse de type temps de vol, séparés l'un de l'autre par une cellule de collision. Dans le premier analyseur TOF (TOF_1), les ions sont sélectionnés selon leur rapport m/z en fonction du temps qu'ils passent dans le tube de vol. Les ions non sélectionnés sont quant à eux déviés de leur parcours. Les ions entrent alors dans la cellule de collision, où ils entreront en collision avec les atomes d'un gaz inerte tel que l'argon ou l'hélium. Leur dissociation (CID) donnera naissance à des ions « filles », ces ions étant ensuite séparés selon leur rapport m/z dans le second analyseur TOF (TOF_2) (**Figure 1.15**). Un spectromètre de masse de type TOF-TOF est généralement connecté à une source de type MALDI et permet un séquençage très sensible des peptides qui le traversent. Cependant, comme le MALDI ne permet de produire que des ions monochargés, l'information obtenue après la cellule de collision n'est pas aussi précise qu'avec une ionisation en électrospray (Medzihradzky et al., 2000), cité dans Aebersold & Mann, 2003).

1.5.3.3. Triple Q

Un spectromètre de masse de type triple quadropôle (triple Q) est un appareillage hybride utilisant 3 quadropôles placés en série. Cet appareillage peut avoir différentes fonctions selon le mode opératoire utilisé. En effet, le triple Q peut être utilisé afin de mesurer le rapport m/z de composés intacts. Dans cette configuration, les deux premiers quadropôles permettent simplement de transmettre les ions vers le dernier quadropôle, celui-ci fonctionnant selon un mode scan et mesurant le rapport m/z de chaque molécule ionisée. Une seconde configuration

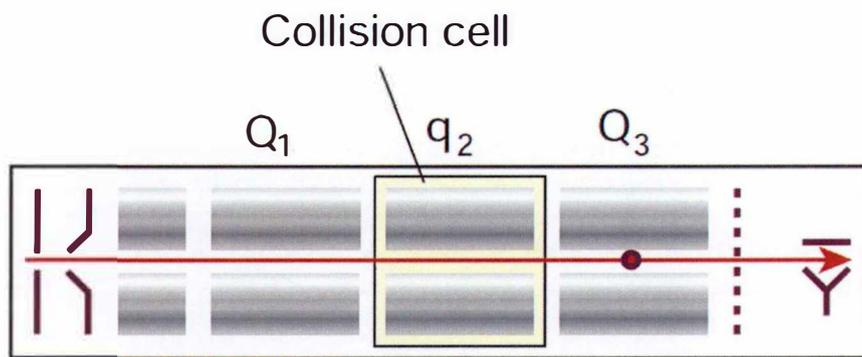


Figure 1.16 – Principe du fonctionnement du spectromètre de masse hybride de type triple Q (Aebersold & Mann, 2003).

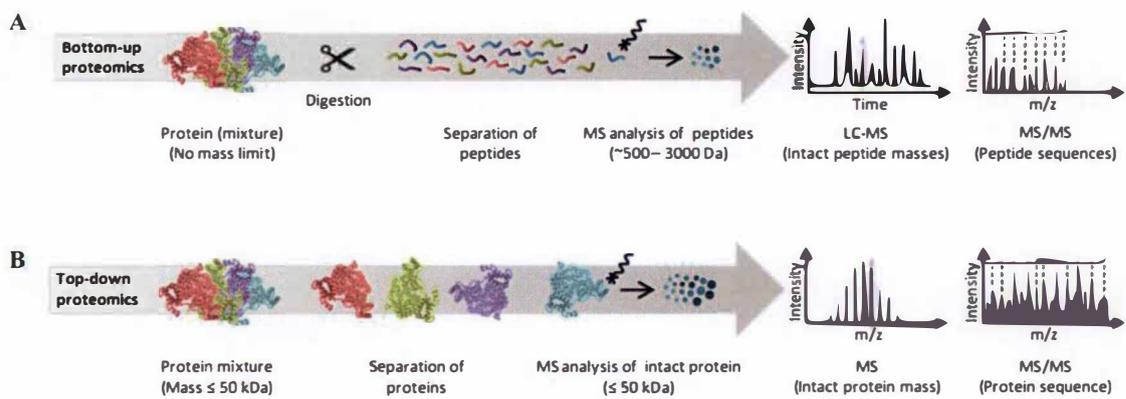


Figure 1.17 – Principe de l'approche protéomique « Bottom-up » (A) et « Top-down » (B) (Switzar *et al.*, 2013).

permet à cet appareillage de fragmenter les biomolécules analysées. Dans ce cas, le premier quadropôle sélectionne (Q_1) les ions ayant un rapport m/z spécifique et ces ions sont envoyés vers le second quadropôle (q_2). Celui-ci fonctionne comme une cellule de collision où les ions précurseurs sont fragmentés en ions « filles ». Le dernier quadropôle (Q_3) est enfin utilisé selon un mode scan, où le rapport m/z de chaque ion « fille » est déterminé (Chalkley, 2010) (**Figure 1.16**).

1.5.4. Identification et analyses des protéines

Lors d'études protéomiques, différentes approches peuvent être utilisées afin d'identifier et de caractériser les protéines et peptides analysés. Alors que la plupart des études protéomiques basées sur une analyse en spectrométrie de masse se basent sur l'analyse de peptides issus de la digestion enzymatique de protéines, certaines analyses se basent directement sur les protéines. L'analyse directe des protéines en spectrométrie de masse dépend principalement de la résolution et de la précision de masse de l'appareillage et donc de sa capacité à réaliser une telle analyse. Ces deux approches protéomiques différentes sont plus communément appelées approches « Bottom-up » et « Top-down ».

1.5.4.1. Approche « Bottom-up »

L'approche protéomique « Bottom up » consiste en l'analyse de peptides en spectrométrie de masse en tandem à partir d'un mélange de protéines ayant été digérées enzymatiquement (**Figure 1.17 – A**). Pour cette approche, les protéines doivent subir plusieurs traitements préalables afin de pouvoir être ensuite analysées au spectromètre de masse. Généralement, l'enzyme utilisée pour digérer les protéines est la trypsine, même si d'autres protéases peuvent également être utilisées. La trypsine a la capacité de produire des fragments protéiques d'environ 14 acides aminés, en clivant les protéines au niveau C-terminal de leurs résidus lysine (K) et arginine (R) (Switzar et al., 2013). L'avantage de cette méthode de digestion est qu'elle n'est pas restreinte à une taille limite des protéines et possède une très grande efficacité et un haut degré de spécificité, ce qui rend les peptides issus de la digestion enzymatique aisément analysables en spectrométrie de masse (Burkhart et al., 2012). Ces peptides sont ensuite envoyés vers une chromatographie liquide afin d'être séparés (selon divers critères d'hydrophobicité et d'interactions avec la colonne chromatographique). Les peptides séparés sont alors analysés grâce à un spectromètre de masse. Soit la configuration du spectromètre de masse permet de réaliser une analyse MS (ESI-Q-MS, MALDI-TOF-MS) permettant de fournir une information sur la masse de chaque peptide, soit les peptides sont analysés grâce à un spectromètre de masse en tandem (ESI-Q-TOF, MALDI-TOF/TOF). Dans cette configuration permettant de réaliser des analyses MS/MS, les peptides seront fractionnés dans une cellule de collision et les spectres de masses obtenus permettront alors de fournir la séquence en acide aminés de chaque peptide analysé (Aebersold & Mann, 2003, Lin et al., 2003, Switzar et al., 2013).

1.5.4.2. Approche « Top-down »

L'approche protéomique « Top-down » consiste en l'analyse directe de protéines en spectrométrie de masse (**Figure 1.17 – B**). Dans le cas présent, les protéines ne sont donc pas digérées de manière enzymatique en solution mais sont plutôt clivées en phase gazeuse. En effet, les protéines intactes sont introduites dans le spectromètre de masse où elles vont être ionisées puis fragmentées dans une cellule de collision. La fragmentation des protéines peut se faire selon différentes méthodes, à savoir la dissociation activée par collision (CAD), la dissociation par capture d'électrons (ECD) et la dissociation par transfert d'électrons (ETD) (Wu et al., 2007). Le produit de cette fragmentation permet de fournir *in fine* des informations sur la masse et la séquence en acides aminés de ces protéines. De part la taille importante des

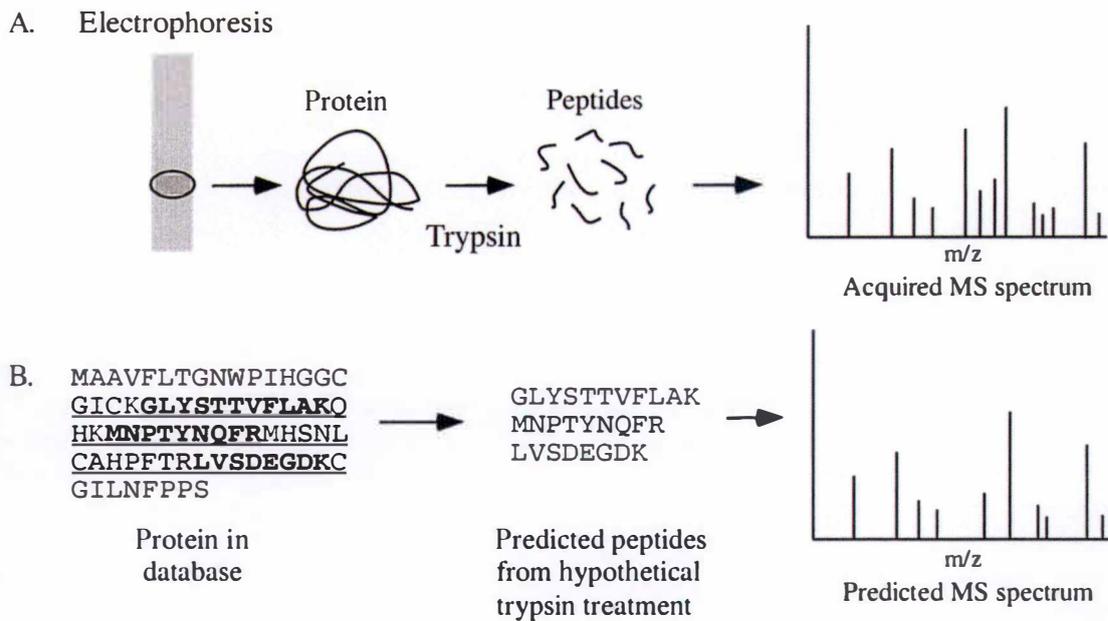


Figure 1.18 – Principe du peptide mass fingerprinting. A) Une protéine inconnue est convertie en peptides par l'action d'une enzyme protéolytique, la trypsine par exemple. Ces peptides sont ensuite analysés en spectrométrie de masse, et un spectre MS est obtenu. B) Le spectre de masse de la protéine inconnue (A) est comparé à des spectres de masses théoriques provenant de protéines digérées in silico en base de données. La comparaison entre ces différents spectres de masse (expérimentaux et théoriques) permet l'identification de la protéine inconnue (Graves & Haystead, 2002).

biomolécules introduites dans le spectromètre de masse, l'appareillage utilisé doit être fonction de ce paramètre et doit ainsi pouvoir fournir une précision de masse et une résolution supérieure. C'est pour ces raisons que la méthode « Top-down » n'est généralement possible qu'avec des spectromètres de masse de type Orbitrap ou Cyclotron à résonance des ions (FT-ICR) (Lin et al., 2003, Switzar et al., 2013). Cependant, cette approche ne permet pas à l'heure actuelle d'analyser des protéines dont le poids moléculaire est supérieur à 50 kDa et des progrès doivent dès lors être réalisés au niveau de l'appareillage de façon à dépasser ces limitations (Lin et al., 2003, Han et al., 2006, McLafferty et al., 2007).

1.5.6. Analyses bioinformatiques – recherche en bases de données

Comme décrit précédemment, la spectrométrie de masse peut être exploitée de façon à déterminer le profil protéique/peptidique d'un échantillon et à permettre l'identification des protéines présentes dans ce même échantillon. Selon l'analyse réalisée, deux méthodes peuvent être utilisées afin de caractériser les biomolécules présentes dans l'échantillon : la méthode PMF (Peptide Mass Fingerprinting) et la méthode PFF (Peptide Fragment Fingerprinting) (Barbarini & Magni, 2010). La méthode PMF est réservée à une analyse MS (où les peptides sont analysés selon leur rapport m/z sans être fragmentés) tandis que la méthode PFF est réservée à une analyse MS/MS (fragmentation des peptides puis analyse de leur rapport m/z). Préalablement à ces méthodes d'analyse, les données brutes acquises par le spectromètre de masse sont soumises à différents traitements. De manière générale, le bruit de fond de ces données est éliminé et les signaux intéressants sont amplifiés. Chaque charge est assignée à un ion et un spectre de masse en bâton est ensuite créé. Enfin, une liste de pics (peak list) est générée et le format du fichier est transformé en format d'entrée utilisable par le moteur de recherche (par exemple .mgf, .txt, .xml,...). Les données brutes peuvent alors être comparées aux banques de données afin d'identifier les protéines présentes dans l'échantillon analysé.

1.5.6.1. Peptide Mass Fingerprinting

Dans la méthode du *Peptide Mass Fingerprinting*, les masses peptidiques obtenues lors d'un scan MS sont enregistrées et comparées à une liste de masses peptidiques provenant de protéines digérées enzymatiquement *in silico* (Reece et al., 2012). En comparant la masse des peptides analysés avec la masse des peptides théoriques, il est possible de déterminer à quelle protéine appartient tel ou tel peptide présent dans l'échantillon. Cette comparaison est réalisée grâce à un moteur de recherche, qui fait le lien entre les données brutes obtenues par le spectromètre de masse et les banques de données. Différents moteurs de recherche peuvent être utilisés, notamment MASCOT (www.matrixscience.com), SEQUEST (www.sequest.com) ou PHENYX (www.phenyx-ms.com). Cependant, le principe du PMF nécessite une mixture relativement pure en protéines car la complexité de "matching" entre peptides observés et peptides théoriques augmente avec la complexité du mélange analysé, comme décrit dans Reece et al., 2012 (Figure 1.18).

1.5.6.2. Peptide Fragment Fingerprinting

Dans la méthode du *Peptide Fragment Fingerprinting*, les masses des fragments peptidiques obtenues lors d'un scan MS/MS sont utilisées pour déterminer la séquence en acides aminés de ces peptides. Une fois la séquence en acides aminés d'un peptide déterminée, il est possible de retrouver la protéine d'où provient ce peptide. Plusieurs méthodes permettent de déterminer la séquence en acides aminés d'un peptide à partir d'une liste de pics obtenus lors d'une analyse en spectrométrie de masse. L'une de ces méthodes consiste en la comparaison des masses peptidiques obtenues expérimentalement avec une librairie contenant des listes de masses théoriques (générées *in silico*). Ces masses théoriques sont issues de la digestion

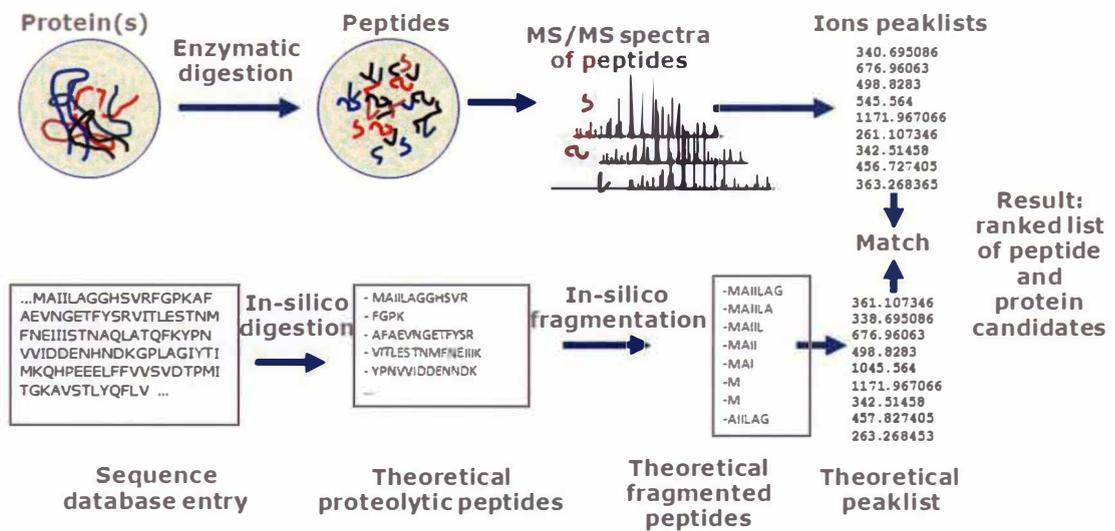


Figure 1.19 – Principe du peptide fragment fingerprinting. Une protéine inconnue est digérée enzymatiquement et les peptides obtenus sont ensuite analysés par une analyse MS/MS. La liste du rapport m/z de chaque ion obtenu est alors comparée à une liste théorique. Cette liste théorique est obtenue grâce à la digestion *in silico* de protéines contenues dans une banque de données. Les peptides théoriques sont ensuite fragmentés *in silico* et les masses de ces fragments peptidiques sont comparées aux masses expérimentales. Cette comparaison, réalisée grâce à un moteur de recherche, permet de déterminer l'origine de la protéine inconnue (source: "Applications biologiques de la spectrométrie de masse" par Matias Moller web: http://images.slideplayer.es/2/1034774/slides/slide_28.jpg).

in silico de protéines présentes dans une banque de données. Les peptides théoriques obtenus sont ensuite fragmentés *in silico* et les masses de ces fragments théoriques sont comparées aux masses des ions expérimentaux (**Figure 1.19**). La comparaison entre les masses expérimentales et les masses *in silico* est réalisée grâce à des moteurs de recherche tels que Mascot (Reece *et al.*, 2012). De façon à faciliter le processus d'identification, la recherche en base de données peut être restreinte à certains critères d'analyse. Par exemple, si les peptides analysés sont issus d'une digestion enzymatique utilisant la trypsine, la recherche en base de données peut être spécifiquement dirigée vers des protéines ayant été digérées *in silico* par la trypsine. De la même manière, si les échantillons analysés contiennent des protéines d'espèces particulières (ex : porc, bovin, rongeurs,...), des bases de données restreintes ne contenant que ces espèces peuvent également être utilisées de façon à diminuer le temps d'analyse, tel que décrit dans Reece *et al.*, (2012).

1.5.6.3. Interprétation des résultats

Une fois la recherche en banque de données terminée, il est nécessaire d'interpréter les résultats obtenus. Différents algorithmes vont ainsi déterminer un score d'identification entre les peptides expérimentaux et les peptides provenant des bases de données. Ce système de score est principalement utilisé pour définir le degré de similarité entre les peptides identifiés. Ce score est basé sur un calcul de probabilité, ce calcul représentant la probabilité que la concordance observée entre un peptide expérimental et un peptide théorique retrouvé en base de données soit due au hasard ($\text{Score} = -10 \times \text{Log}(P)$, où P représente la probabilité). La meilleure concordance entre deux peptides (et donc qui ne sera pas due au hasard), aura donc une faible probabilité et un score élevé.

Lorsque les données brutes sont analysées, l'expérimentateur peut choisir de stocker ses données dans une plateforme bioinformatique. Parmi les plateformes disponibles, ProteinScape (Bruker) peut être utilisée. Celle-ci permet de centraliser les données protéomiques acquises par le spectromètre de masse et de faire le lien avec les moteurs de recherche comme MASCOT. Cependant, les données peuvent également être envoyées vers un logiciel protéomique comme Scaffold (Proteome Software). De manière similaire à ProteinScape, Scaffold stocke les données protéomiques et permet à l'expérimentateur d'interpréter les résultats MS. Cependant, l'interface de Scaffold offre la possibilité d'afficher de manière plus conviviale les listes de protéines identifiées et permet également à l'expérimentateur d'inclure ses propres conditions de score et d'identité entre séquences peptidiques. Par ailleurs, Scaffold a la capacité d'effectuer des recherches concernant des peptides spécifiques à une espèce (via l'option « similarity »), cette recherche de peptides spécifiques d'une espèce étant le but principal de ce mémoire.

1.5.7. Exemples d'application d'analyses protéomiques particulières

L'identification de peptides marqueurs spécifiques d'espèces présentes dans des farines animales représente une des nombreuses applications d'approches protéomiques basées sur la spectrométrie de masse. Ce type d'analyse protéomique peut notamment être utilisé à des fins d'identification et de traçabilité des produits alimentaires comme la viande (Sentandreu & Sentandreu, 2011). C'est d'ailleurs grâce à cette technique que le scandale de la viande de cheval a pu être découvert début 2013. Outre l'aspect réglementaire, l'analyse spécifique de certains de ces produits peut également avoir une connotation ethnique et religieuse, surtout dans le contexte des viandes Halal et Casher. En effet, suivant certaines croyances religieuses, la consommation de nourriture contenant toute forme de porc doit être exclue. Des analyses protéomiques basées sur l'identification de particules de porc dans des viandes de bœuf Halal ont par exemple été réalisées, permettant ainsi à ces communautés de respecter leurs

croyances (von Bargen et al., 2013). De manière plus surprenante, de nombreuses études protéomiques sont couramment réalisées dans le domaine de l'archéologie. En effet, des études basées sur d'anciens parchemins ont permis d'identifier les espèces animales avec lesquelles ont été réalisés ces manuscrits, permettant ainsi de retracer l'histoire de nombreux procédés ancestraux (Toniolo et al., 2012). Enfin, la protéomique peut également être utilisée afin d'étudier les habitudes alimentaires de peuples anciens, notamment en analysant les particules de lait retrouvées sur d'anciennes céramiques (Hong et al., 2012). De par ces exemples, il est clair que la protéomique est une approche intéressante et innovatrice permettant de répondre à des questions à la fois fondamentales et diversifiées.

Objectifs du mémoire

Comme nous venons de le voir dans cette partie introductive, l'émergence de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) dans les années 90 a mis un terme à l'utilisation des farines dérivées de produits animaux et destinées à l'alimentation du bétail. En effet, la cause de cette épidémie de la « vache folle » fut l'utilisation de farines animales infectées par une « protéine infectieuse » appelée protéine prion. Grâce aux différentes mesures mises en place afin d'éradiquer cette maladie, le nombre de nouveaux cas d'ESB a presque totalement disparu. Cependant, pour des raisons économiques et écologiques, la volonté de réintroduire certaines de ces farines animales dans l'alimentation du bétail s'est intensifiée ces dernières années. De façon à rendre possible cette réintroduction, certaines méthodes analytiques permettant d'analyser la composition de ces farines animales ont été développées. Malgré l'utilisation de différentes méthodes telles que la microscopie, la PCR ou des méthodes immunologiques, la composition exacte de ces farines (origine taxonomique et tissulaire) ne peut être déterminée avec précision. C'est dans ce but qu'une méthode peptidomique/protéomique utilisant la spectrométrie de masse a été développée afin de dépasser ces limitations. En effet, de par sa grande résolution, la spectrométrie de masse a le pouvoir de fournir une identification à la fois taxonomique et tissulaire des protéines présentes dans les farines animales. Ce mémoire est donc divisé selon trois grands axes principaux :

1. La première partie de ce mémoire vise à analyser de manière sans *a priori* les différentes farines animales (farines de bœuf, de porc, de mouton et de volaille) mises à notre disposition. Au moyen de différentes méthodes d'extractions protéiques, suivies d'une étape de trypsinisation, les mélanges obtenus sont analysés en spectrométrie de masse, le but étant de trouver dans ces différentes farines des peptides marqueurs d'espèces spécifiques. De cette façon, ces peptides pourront ensuite être utilisés afin de développer des anticorps destinés à réaliser des tests immunologiques (ELISA). De cette manière, l'origine des farines animales pourra être déterminée. La sensibilité de cette méthode peptidomique/protéomique, c'est-à-dire sa capacité à détecter la présence de particules contaminantes d'une espèce dans une farine « pure » d'une autre espèce, sera également évaluée.
2. La deuxième partie de ce mémoire vise à simplifier et raccourcir tout le protocole de traitement des échantillons en vue d'un transfert vers des laboratoires et agences de sécurité alimentaire, tout en préservant au maximum la puissance et la résolution de l'analyse MS/MS. Le temps demandé à de telles analyses protéomiques est crucial et sera donc évalué afin de le réduire tout en fournissant un maximum de données utilisables.
3. La troisième partie de ce mémoire vise à réaliser des tests ELISA sur certains peptides marqueurs d'espèces sélectionnés. Ces tests ELISA sont réalisés en collaboration avec le Centre d'Economie Rurale (CER) de Marloie.

MATÉRIEL & MÉTHODES

Tableau 2.1 – Liste des échantillons NIFES et CRA-W utilisés comme support analytique.

Numéro de l'échantillon	Description de l'échantillon
N 01	Farine de sang de volaille
N 02	Farine de sang de volaille
N 03	Farine de sang de volaille
N 04	Farine de sang de volaille
N 05	Farine de volaille
N 06	Farine de volaille
N 07	Farine de volaille
N 08	Farine de volaille
N 09	Farine de plume
N 10	Farine de plume
N 11	Farine de plume
N 15	Farine de porc
N 16	Farine de porc
N 17	Farine de porc
N 20	FVO bovine (carcasse) (133°C)
N 21	Farine de viande (muscle) bovine (133°C)
N 22	FVO de mouton (carcasse) (133°C)
N 23	Farine de viande (muscle) de mouton (133°C)
C'	Farine de porc
G'	Farine de boeuf
J	Farine de porc
K	Farine de boeuf
Végétal	Farine végétale – alimentation pour chevaux

Tableau 2.2 – Matériel et réactifs utilisés pour l'extraction protéique au TCA-Acétone.

Echantillons de farine animale
TCA : Acide trichloroacétique (Merck, USA)
DTT: Dithiothréitol (Sigma-Aldrich, USA)
Acétone (Merck, USA)
Eau distillée
DLA :
- Urée 7 M (Merck, USA)
- Thiourée 2 M (GE Healthcare, UK)
- Tris 30 mM (Sigma, USA)
- Chaps 4 % (Aldrich, USA)
Vortex
Centrifugeuse (1-15PK Refrigerated Microcentrifuge, Sigma, USA)
Thermomixer (Eppendorf Thermomixer® comfort, Eppendorf, Germany)

2. Matériel et méthodes

2.1. Echantillons

L'ensemble des échantillons de farines animales sur lesquels sont basées les analyses peptidiques décrites dans ce mémoire provient en partie du département Valorisation des productions du Centre wallon de Recherches Agronomiques de Gembloux (CRA-W) et en partie du *National Institut of Nutrition and Seafood Research* de Norvège (NIFES). Avant d'être utilisés pour la partie peptidomique, des analyses PCR ont été réalisées sur ces échantillons au CRA-W. Ces échantillons de farines animales sont de différentes natures : farines de viande et d'os (FVO) de volaille, de porc, de mouton, de bovin, farines de plume et de sang de volaille, farines de viande de bovin et de mouton (**Tableau 2.1**). Ces échantillons de farines ont préalablement été traités selon des conditions de durée, de température et de pression définies par la Commission Européenne (EC N° 1774/2002), à savoir 20 min – 133°C – 3 bars pour les farines de mammifères et 20 min – 121°C – 3 bars pour les farines de volaille. Afin d'obtenir une granulométrie des particules similaire et de faciliter l'extraction protéique, les échantillons ont également été broyés à 0,5 mm au moyen d'un moulin ZM 200 (Retsch, Allemagne).

2.2. Extraction protéique

L'extraction protéique des farines animales constitue la première étape de la méthode peptidomique décrite dans ce manuscrit. En s'inspirant de la littérature et du projet PeptidoGénomique (RF N°11/6243, thèse d'Hélène Marbaix), 3 protocoles d'extraction protéique (HCl, TCA-Acétone et SDS-Tris) ont été testés sur les différents échantillons de farine à notre disposition (Seddon et al., 2004, Jiang et al., 2007, Mechin et al., 2007, Buckley et al., 2008). L'étape d'extraction protéique est cruciale puisqu'elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon de farine, un extrait protéique plus ou moins concentré en fonction de l'efficacité de la méthode utilisée. Ces extraits protéiques seront ensuite purifiés, concentrés, digérés et analysés au spectromètre de masse, comme décrit dans la suite de la section Matériel et Méthodes.

2.2.1. Extraction TCA-Acétone

2.2.1.1. Principe :

La méthode d'extraction utilisant le TCA-Acétone est une méthode dite « *sans a priori* », puisqu'elle permet d'extraire les protéines de la manière la plus large possible. Cette méthode d'extraction protéique est très utilisée et permet d'extraire efficacement les protéines présentes dans une farine animale. L'utilisation combinée du TCA (acide trichloroacétique) à un solvant organique tel que l'acétone (volatile et donc facilement éliminé par simple évaporation) a l'avantage de faire précipiter les protéines sans pour autant les dénaturer. L'extraction protéique au TCA-Acétone permet également de dessaler les échantillons, rendant ainsi ces extraits compatibles lors d'analyses en spectrométrie de masse (Jiang et al., 2004).

2.2.1.2. Matériel : Se référer au **tableau 2.2**.

2.2.1.3. Méthode :

Trois solutions sont nécessaires à la réalisation de cette étape de précipitation protéique. Ces trois solutions doivent être conservées à -20°C au moins une heure avant leur utilisation et la solution 1 doit être préparée fraîchement.

Solution 1 : 10 g de TCA et 0,3 g de dithiothréitol (DTT) dans 100 ml d'acétone froid (= solution 10 % TCA).

Solution 2 : 0,3 g de DTT (dithiothréitol) dans 100 ml d'acétone froid (= solution 100 % acétone).

Solution 3 : 0,3 g de DTT et 10 ml d'eau milliQ dans 90 ml d'acétone froid (= solution 90 % acétone).

Une solution de DLA doit également être préparée au préalable et stockée à -20°C en vue de son utilisation. Pour réaliser cette solution, 10,5 g d'urée et 3,8 g de thiourée sont pesés et dissous dans de l'eau milliQ pour atteindre un volume légèrement inférieur à 25 ml. Une fois ces réactifs complètement dissous, 91 mg de Tris et 1 g de CHAPS sont ajoutés à la solution. Une fois cette solution entièrement solubilisée, de l'eau milliQ est ajoutée jusqu'à obtenir 25 ml de solution finale. Cette solution de DLA terminée est alors aliquotée dans différents tubes Eppendorf.

Pour réaliser cette extraction protéique au TCA-Acétone, 200 mg de farine animale sont homogénéisés avec 1,8 ml de **solution 1** dans un tube Eppendorf de 2 ml, et stockés à -20°C pendant 3 heures. Pour que l'extraction protéique soit la plus efficace possible, l'échantillon est vortexé toutes les 10 minutes pendant la première demi-heure. L'échantillon est ensuite centrifugé à 16 000 g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé, tandis que le culot est resuspendu dans 1,8 ml de **solution 2** puis stocké la nuit à -20°C . Le lendemain, l'échantillon est à nouveau centrifugé à 16 000 g à 4°C pendant 10 minutes, le surnageant décanté et le culot resuspendu dans 1,8 ml de **solution 2** puis conservé à -20°C pendant 1 heure (cette étape est répétée 2 fois). L'échantillon est alors centrifugé à 16 000 g à 4°C pendant 10 minutes, puis le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 1,8 ml de **solution 3**. Après avoir été stocké à -20°C pendant 1 heure, l'échantillon est à nouveau centrifugé à 16 000 g à 4°C pendant 10 minutes, décanté et laissé quelques minutes à l'air libre de façon à ce que l'acétone s'évapore un maximum. Le culot est alors resuspendu dans 300 μl de DLA. Cette solution de DLA (urée 7 M, thiourée 2 M, Tris 30 mM & CHAPS 4 %), de par sa composition, aura pour but principal de solubiliser les protéines contenues dans le culot. Pour que ce processus soit optimal, l'échantillon est agité au moyen d'un thermomixer à 1 400 rpm à 12°C pendant 1 heure. L'échantillon est stocké la nuit à -20°C . Le lendemain, l'échantillon est centrifugé à 16 000 g à 4°C pendant 10 minutes puis le surnageant récolté dans un nouvel Eppendorf en vue de doser la concentration en protéines (voir 2.3). Dans le cas où l'échantillon n'est pas directement utilisé pour d'autres analyses, celui-ci doit être conservé à -20°C .

2.2.2. Extraction SDS-Tris

2.2.2.1. Principe :

La méthode d'extraction protéique utilisant le SDS-Tris est, au même titre que l'extraction TCA-Acétone, une méthode dite « *sans a priori* » puisqu'elle permet également d'extraire les protéines de la manière la plus vaste possible. Le SDS est un détergent ionique ayant pour but de solubiliser les protéines présentes dans les échantillons de farine. Le Tris, quant à lui, joue le rôle de tampon, de façon à ce que le pH de l'échantillon ne varie que peu (pH = 8,8).

Tableau 2.3 – Matériel et réactifs utilisés pour l'extraction protéique au SDS-Tris.

Echantillons de farine animale
SDS (MP Biomedicals, LLC, USA)
Tris (Sigma, USA)
Eau distillée
Tube Eppendorf 2 ml
Bain-marie
Vortex
Centrifugeuse (1-15PK Refrigerated Microcentrifuge, Sigma, USA)
Thermomixer (Eppendorf Thermomixer® comfort, Eppendorf, Germany)

Tableau 2.4 – Matériel et réactifs utilisés pour l'extraction protéique à l'HCl.

Echantillons de farine animale
HCl 12 M (HCl fumant)
Eau distillée
DLA : <ul style="list-style-type: none">- Urée 7 M (Merck, USA)- Thiourée 2 M (GE Healthcare, UK)- Tris 30 mM (Sigma, USA)- Chaps 4 % (Aldrich, USA)
Glace
Vortex
Centrifugeuse (1-15PK Refrigerated Microcentrifuge, Sigma, USA)
Thermomixer (Eppendorf Thermomixer® comfort, Eppendorf, Germany)

2.2.2.2. Matériel : Se référer au **tableau 2.3**.

2.2.2.3. Méthode :

Une solution de SDS 2 % – Tris 1 M est préalablement préparée en vue de l'extraction protéique. Pour 20 ml de solution, 2,42 g de Tris et 0,4 g de SDS sont solubilisés dans un volume adéquat d'eau milliQ. La solution de SDS est ensuite chauffée au bain-marie à une température d'environ 80 – 90°C et 1,8 ml de cette solution chaude sont ajoutés à 200 mg de farine préalablement pesés dans un tube Eppendorf de 2 ml. L'échantillon est homogénéisé au moyen d'un vortex et incubé à 80 – 90°C au bain-marie pendant 10 minutes. L'échantillon est ensuite agité au thermomixer à 1 400 rpm à 20°C pendant 1 heure. L'homogénat protéique est enfin centrifugé à 16 000 g à 12°C pendant 10 minutes puis le surnageant récolté dans un nouvel Eppendorf en vue de doser la concentration en protéines (voir 2.3). Dans le cas où l'échantillon n'est pas directement utilisé, celui-ci doit être conservé à 4°C.

2.2.3. Extraction HCl

2.2.3.1. Principe :

La méthode d'extraction protéique utilisant l'HCl est une méthode dite avec « *a priori* » puisque l'HCl est principalement utilisé pour extraire de manière préférentielle les collagènes présents dans les farines animales. Pour rappel, une farine animale est un mélange complexe constitué de nombreuses particules animales dérivées de différents tissus et organes dont les muscles, la graisse et les os. Les os sont composés de différents types cellulaires retenus dans une matrice osseuse. Cette matrice osseuse elle-même est composée de deux parties, à savoir une partie minérale constituée d'hydroxyapatite et une partie organique constituée principalement de collagènes et de protéoglycanes (Jiang et al., 2007). Comme l'HCl est un acide fort, il a le pouvoir de déminéraliser les os en s'attaquant à la partie minérale de l'os. Ce faisant, les protéines contenues dans cette matrice, et notamment les collagènes, peuvent alors être plus facilement récupérées. C'est dans cette optique que cette méthode d'extraction protéique est appelée avec « *a priori* », même si l'HCl a également le pouvoir d'extraire d'autres protéines contenues dans les farines animales, au même titre que les collagènes.

2.2.3.2. Matériel : Se référer au **tableau 2.4**.

2.2.3.3. Méthode :

Pour réaliser l'extraction protéique à l'HCl, 40 mg de farine animale sont homogénéisés avec 950 µl d'eau milliQ et 50 µl d'HCl 12 M. L'échantillon est vortexé environ toutes les 3 heures et est conservé à température ambiante pendant 48 heures. L'échantillon est ensuite centrifugé à 16 000 g à 4°C pendant 10 minutes, puis le surnageant est éliminé. Le culot restant est alors rincé dans 1 ml d'eau milliQ glacée. L'échantillon est incubé sur glace (4°C) pendant 15 minutes, puis est centrifugé à 16 000 g à 4°C pendant 10 minutes puis le surnageant est éliminé. Ce lavage du culot est répété 3 fois de façon à éliminer toute trace d'HCl. Le lavage du culot dans de l'eau glacée a également l'intérêt de permettre une meilleure précipitation des protéines contenues dans l'échantillon analysé. Une fois ces 3 lavages réalisés, l'échantillon est centrifugé à 16 000 g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant est alors éliminé et le culot resuspendu dans environ 100 µl de DLA (urée 7 M, thiourée 2 M, Tris 30 mM & CHAPS 4 %) de façon à solubiliser les protéines. L'échantillon est ensuite agité au moyen d'un thermomixer à 1 400 rpm à 12°C pendant 20 minutes. L'échantillon est à nouveau centrifugé à 16 000 g à 12°C pendant 10 minutes et son surnageant récolté dans un nouveau tube Eppendorf en vue de doser la concentration en protéines (voir 2.3). Dans le cas

Tableau 2.5 – Matériel et réactifs utilisés pour réaliser le dosage protéique des échantillons.

Echantillons protéiques
Etalon protéique BSA, 2 µg/µl (Bovin Serum Albumine, Pierce, Thermo Scientific, USA):
- Droite d'étalonnage :
A : 10 µl H ₂ O + 0 µl d'étalon (0 µg/µl)
B : 10 µl H ₂ O + 0 µl d'étalon (0 µg/µl)
C : 9 µl H ₂ O + 1 µl d'étalon 0,5 µg/µl (0,5 µg/µl)
D : 8 µl H ₂ O + 2 µl d'étalon 0,5 µg/µl (1 µg/µl)
E : 9 µl H ₂ O + 1 µl d'étalon 2 µg/µl (2 µg/µl)
F : 7,5 µl H ₂ O + 2,5 µl d'étalon 2 µg/µl (5 µg/µl)
G : 5 µl H ₂ O + 5 µl d'étalon 2 µg/µl (10 µg/µl)
- Blanc (en double):
9 µl H ₂ O + 1 µl de tampon d'extraction
- Echantillons (en double):
9 µl H ₂ O + 1 µl d'échantillon (dilué ou non)
Eau distillée
Agent bloquant IDCR (Ionic Detergent Compatibility Reagent)
Réactif de Pierce (Pierce TM BCA Protein Assay kit, USA)
Plaque 96 puits
Spectrophotomètre (Microplate Spectrophotometer xMark, Bio-rad, USA)

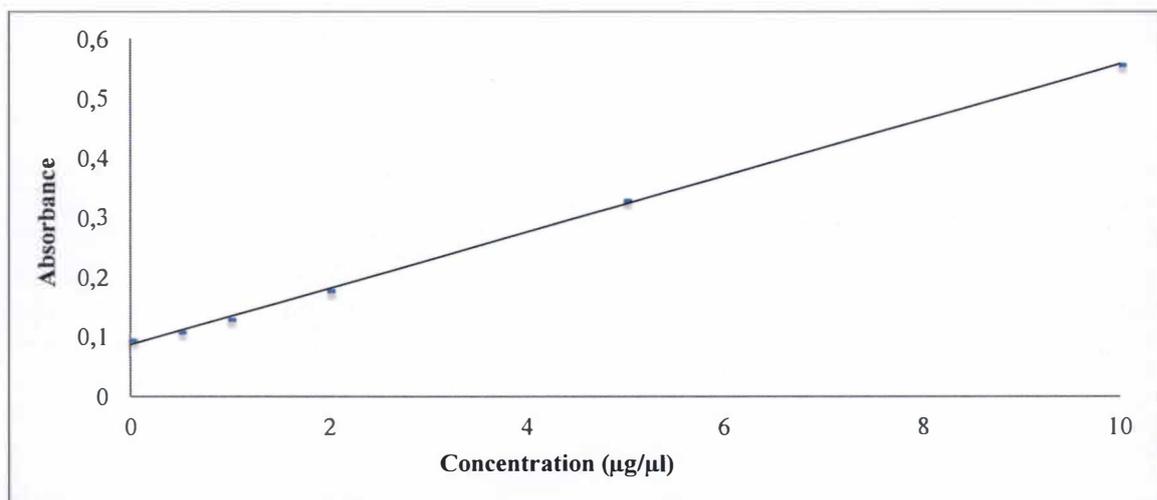


Figure 2.1 – Exemple type d'une courbe d'étalonnage.

où l'échantillon n'est pas directement utilisé pour d'autres analyses, celui-ci doit être conservé à -20°C.

2.3. Dosage de la concentration en protéines

Le dosage de la concentration totale en protéines d'un échantillon de farine animale est réalisé par la méthode de Pierce. La méthode de Pierce est un dosage colorimétrique basé sur le changement d'absorbance d'un composé coloré suite à sa liaison aux protéines contenues dans l'échantillon, l'absorbance étant mesurée à 660 nm au moyen d'un spectrophotomètre. A partir d'un réactif de couleur brune, la coloration du composé devient verdâtre en fonction de la concentration en protéine. C'est en fait la déprotonation du composé coloré à un pH faible et sa liaison aux acides aminés chargés positivement (lysine, arginine et histidine) qui cause ce changement de couleur. L'intérêt de cette méthode de quantification des protéines est sa compatibilité avec la plupart des détergents et agents réducteurs pouvant se trouver dans l'échantillon. De plus, un additif (IDCR – Ionic Detergent Compatibility Reagent) rajouté dans le colorant Pierce rend ce dernier d'autant plus compatible avec de plus fortes concentrations en détergents, tels que le SDS utilisé lors de l'extraction protéique au SDS-Tris.

Le dosage de la concentration des protéines s'effectue en plaque 96 puits, avec une colonne réservée à la droite d'étalonnage, une colonne réservée aux blancs et les colonnes suivantes réservées aux échantillons à doser. Pour déterminer la concentration des protéines, une droite d'étalonnage est réalisée. Cette droite est obtenue en mesurant l'absorbance d'une protéine standard (Albumine Sérique Bovine, BSA) à différentes concentrations (**Tableau 2.5 & Figure 2.1**). En reportant la valeur d'absorbance de chaque échantillon sur cette droite d'étalonnage et au moyen de l'équation de la droite ($y = ax + b$, où y représente l'absorbance et x la concentration en protéines), il est alors possible de déterminer la concentration protéique des échantillons. De manière générale, la concentration des échantillons se réalise en double (1 μ l d'échantillon + 9 μ l d'eau), dont une moyenne est calculée. Un blanc, qui correspond au tampon d'extraction utilisé (DLA par exemple), est également réalisé en double (1 μ l de tampon d'extraction + 9 μ l d'eau). Sa valeur d'absorbance est déduite de la valeur moyenne d'absorbance obtenue pour chaque échantillon de façon à obtenir une concentration protéique la plus précise possible. La solution Pierce est ajoutée à raison de 150 μ l par puits, la plaque étant ensuite mise à l'obscurité environ 5 minutes avant sa lecture à 660 nm au spectrophotomètre

2.4. Purification des protéines par la méthode de "Clean-Up"

Après chaque extraction protéique, une étape dite de "Clean-Up" est réalisée, ce "Clean-Up" étant une étape supplémentaire à la préparation de l'échantillon analysé. En effet, l'étape de "Clean-Up" est principalement utilisée pour éliminer les différentes molécules de tampon, les phospholipides, les polysaccharides et les lipides présents dans l'échantillon après l'extraction protéique. Le fait d'éliminer ces constituants permettra notamment une meilleure migration des protéines lorsque celles-ci seront utilisées pour analyser leur profil protéique sur un gel d'électrophorèse. Outre le fait d'éliminer ces contaminants, l'étape de "Clean-Up" permet également de concentrer et de faire précipiter les protéines contenues dans l'échantillon analysé. Enfin, le "Clean-Up" permet aussi également d'éliminer les détergents pouvant se trouver dans l'échantillon protéique, de façon à rendre compatible ceux-ci avec l'analyse en aval en spectrométrie de masse.

Tableau 2.6 – Matériel et réactifs utilisés pour la réalisation de l'étape de "Clean-Up".

Echantillons protéiques
Kit Clean-Up (2D Clean-Up Kit, GE Healthcare, USA)
Eau distillée
DLA : <ul style="list-style-type: none"> - Urée 7 M (Merck, USA) - Thiourée 2 M (GE Healthcare, UK) - Tris 30 mM (Sigma, USA) - Chaps 4 % (Aldrich, USA)
RapiGest 0.2 % (RapiGest TM SF Surfatant, Waters, USA): Préparation : <ul style="list-style-type: none"> - Fiole de Rapigest + 100 µl de TD50 = Rapigest 1 % - Faire des aliquots de 10 µl 1 % - Rajouter 40 µl de TD 50 à l'aliquot de 10 µl 1% pour avoir du Rapigest 0,2 %
Vortex
Centrifugeuse (1-15PK Refrigerated Microcentrifuge, Sigma, USA)
Thermomixer (Eppendorf Thermomixer® confort, Eppendorf, Germany)
Bloc chauffant

Tableau 2.7 – Matériel et réactifs utilisés pour réaliser les étapes d'électrophorèse, de coloration et de scan du gel.

Electrophorèse
Tampon Tris 0,1 M pH 8,5 – 8,9 Préparation : <ul style="list-style-type: none"> - 800 ml d'eau - 30 g de Tris-aminométhane (121,14 g/mol) - 144 g de Glycine - 10 g de SDS
DTT (Sigma-Aldrich, USA)
Extraits protéiques
Tampon NuPAGE bleu – LDS Sample Buffer (Novex by LifeScience, USA)
Gel acrylamide 18 % (Novex® 18 % Tris-Glycine Gel, Novex by LifeScience, USA)
Cuve d'électrophorèse (Novex minicell, Invitrogen, USA)
Etalon protéique (SeeBlue® Plus 2 Prestained Standard protein kit)
Minispin (Eppendorf, Germany)
Bloc chauffant
Vortex
Coloration au Krypton et Scan
Solution de fixation : <ul style="list-style-type: none"> - Ethanol (Merck, USA) - Acide acétique (Merck, USA) - Eau distillée
Krypton (Krypton TM Protein stain 10 %, Thermo Scientific, USA)
Solution de décoloration : <ul style="list-style-type: none"> - Acide acétique (Merck, USA) - Eau distillée
Typhoon (Typhoon 9420, Amersham Biosciences, GE)

De manière pratique, le kit "Clean-Up" offre la possibilité de réaliser deux types de procédures pour purifier et concentrer les protéines. Dans le cadre de ce mémoire, c'est la procédure A qui est exclusivement utilisée (voir kit Clean-Up). Il est important de noter qu'en fin de "Clean-Up", le culot de protéines est soit resuspendu dans une solution de DLA pour l'analyse sur gel, soit resuspendu dans une solution de RapiGest 0,2 % pour les échantillons destinés à une digestion en milieu liquide suivie par une analyse en spectrométrie de masse (**Tableau 2.6.**). L'intérêt d'utiliser le RapiGest est qu'il a la capacité de solubiliser les protéines et de les rendre plus accessibles à l'action enzymatique, ce qui favorise l'efficacité et le temps de digestion enzymatique. Le RapiGest est également compatible avec les analyses en spectrométrie de masse et avec la trypsine utilisée comme enzyme de digestion protéique. Une étape de dosage des protéines est également réalisée en fin de "Clean-Up", de façon à évaluer la concentration des échantillons ainsi que le rendement du "Clean-Up". Cette étape de dosage est également réalisée à l'aide du réactif de Pierce, comme décrit au point 2.3.

2.5. Analyse du profil protéique sur gel

Après chaque étape d'extraction protéique et de purification des extraits à l'aide du kit "Clean-Up", les protéiques extraites sont déposées sur un gel d'électrophorèse. Le but de cette manipulation est principalement d'évaluer le profil protéinique général des échantillons analysés. Grâce à un étalon protéique déterminé, l'expérimentateur peut ainsi obtenir une évaluation approximative de la gamme des protéines de l'échantillon en se basant sur leur poids moléculaire.

2.5.1. Electrophorèse

2.5.1.1. Principe :

Lors de l'électrophorèse des échantillons protéiques, les protéines chargées sur le gel sont séparées selon leur poids moléculaire. Ainsi, les protéines ayant un haut poids moléculaire migreront moins vite dans le gel par rapport aux protéines possédant un faible poids moléculaire. L'électrophorèse est donc utilisée pour fournir un aspect visuel des différentes protéines contenues dans l'échantillon analysé. Il est d'ailleurs possible de prélever chaque bande protéique de manière individuelle par un robot, le Spot-Picker, pour réaliser une digestion "in-gel" des protéines en vue de leur analyse MS. Cependant, pour des raisons pratiques, cette technique n'a pas été utilisée dans la suite de ce mémoire.

2.5.1.2. Matériel: Se référer au **tableau 2.7.**

2.5.1.3. Méthode :

Un gel acrylamide 18 % précoulé est utilisé pour réaliser cette électrophorèse. Deux étapes de préparation – des solutions et des échantillons – sont réalisées au préalable de l'étape d'électrophorèse proprement dite. Deux solutions sont préparées, à savoir le tampon d'électrophorèse (Tris 0,1 M) et une solution de DTT 0,5 M. Pour 1 litre de tampon d'électrophorèse, 30 g de tris-aminométhane (121,14 g/mol), 144 g de glycine et 10 g de SDS sont solubilisés dans 800 ml d'eau. Une fois solubilisée, le pH de la solution est mesuré et réajusté si nécessaire de façon à être compris entre 8,5 et 8,9. Ensuite, de l'eau est ajoutée jusqu'à obtenir 1 litre de tampon. Pour réaliser la solution de DTT, 0,154 g de DTT est solubilisé dans 2 ml d'eau.

L'étape suivante consiste en la préparation des échantillons. Dans un nouvel Eppendorf, 15 µg de protéines de chaque échantillon sont prélevés et un certain volume de tampon Tris 0,1 M ajouté de façon à obtenir un volume de 12 µl. A ces 12 µl sont ajoutés 4 µl de tampon

Tableau 2.8 – Matériel et réactifs utilisés pour réaliser l'étape de digestion liquide.

Echantillons protéiques
DTT (Sigma-Aldrich, USA)
Iodoacétamide 40 mM
CaCl ₂
Trypsine (Trypsin Gold 1 µg/µl, Mass Spectrometry Grade, Promega, USA)
Acide trifluoroacétique (Biosolve BV, Netherlands)
Vortex
Thermomixer (Eppendorf Thermomixer® confort, Eppendorf, Germany)
Minispin (Eppendorf, Germany)
Fiole de spectrométrie de masse
Sonicateur (Hielscher Ultrasound Technology, USA)

NuPAGE bleu et 1,6 µl de DTT 0,5 M. Le DTT a la fonction de prévenir la formation de ponts disulfures et permet donc de conserver les protéines dans un état déplié. Les échantillons sont vortexés puis passés quelques secondes à la minispin avant d'être chauffés à 85°C pendant 2 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 1 300 rpm. Les gels précoulés sont placés dans la cuve d'électrophorèse avec du tampon d'électrophorèse dilué 10 fois (80 ml de tampon dilué dans 720 ml d'eau), 10 µl d'étalon protéique est ajouté dans le premier puits du gel et la totalité de l'échantillon préparé (à savoir 15 µg de protéines) est chargée dans les autres puits du gel. La migration des protéines s'effectue à 125 V pendant environ 2 h.

2.5.2. Coloration du gel et révélation

Pour colorer les gels réalisés, trois solutions sont nécessaires :

- solution de fixation : 40 % éthanol – 10 % d'acide acétique – 50 % d'eau
- solution de coloration : 10 % de Krypton – 90 % d'eau
- solution de décoloration : 5 % d'acide acétique – 95 % d'eau

Une fois l'électrophorèse terminée, le gel est enlevé du système et démoulé de la plaque. Le gel est ensuite trempé deux fois 30 minutes dans la solution de fixation, puis est rincé 5 minutes dans de l'eau. Le gel est ensuite passé dans la solution de coloration jusqu'au lendemain, de façon à ce que les protéines soient bien marquées au Krypton. Le lendemain, le gel est placé 5 minutes dans la solution de décoloration puis rincé deux fois 15 minutes dans de l'eau. Le gel peut alors être scanné au Typhoon.

2.6. Digestion en milieu liquide

Les échantillons dont le culot a été resuspendu dans du RapiGest 0,2 % en fin de "Clean-Up" sont destinés à une digestion enzymatique, en vue d'analyser au spectromètre de masse les peptides contenus dans ces échantillons. La digestion enzymatique des protéines est une étape nécessaire, puisque le spectromètre de masse ne peut identifier avec précision la masse d'une protéine, surtout si cette dernière est d'une taille conséquente. Le but est donc de fragmenter, à l'aide d'une enzyme, les protéines contenues dans les échantillons en un certain nombre de peptides. De façon à obtenir une digestion enzymatique optimale, différentes étapes de préparation de l'échantillon sont nécessaires. Il est important de faire remarquer que la majorité des étapes décrites ci-dessous se déroulent dans une « salle blanche » afin de minimiser de possibles contaminations des échantillons (kératine, poussières,...) tout en conservant un environnement "stable" d'expérience.

La première étape consiste en une **réduction** des protéines grâce à du DTT 10 mM (à partir d'un stock 1 M), ce dernier empêchant les protéines de former des ponts disulfures. Les échantillons sont incubés pendant 45 minutes à 37°C sous une agitation de 500 rpm en présence du DTT. La deuxième étape consiste en une **alkylation** des protéines au moyen d'une solution d'iodoacétamide 40 mM (à partir d'un stock 550 mM). L'iodoacétamide est un agent alkylant ayant la capacité de se lier de façon covalente aux groupes thiols des protéines, les empêchant également de créer des ponts disulfures. Les échantillons sont incubés dans l'obscurité pendant 45 minutes à 37°C sous une agitation de 500 rpm. La troisième et dernière étape de ce processus consiste en la digestion enzymatique des échantillons par la trypsine (**trypsinisation**). Pour ce faire, du CaCl₂ à une concentration de 1 mM (à partir d'un stock de 100 mM) est ajouté aux échantillons. Le CaCl₂ aurait la fonction d'augmenter l'activité de la trypsine. Cette trypsine (qui clive les protéines au niveau de la partie C-terminale des acides-aminés lysine et arginine) est ensuite ajoutée aux échantillons selon un rapport de concentration trypsine/échantillon de 1/20 (Marbaix *et al.*, en préparation) (**Tableau 2.8**). Les

échantillons sont alors incubés pendant un certain temps (différents temps d'incubation ont été testés) à 37°C sous une agitation de 300 rpm. Une fois le temps d'incubation avec la trypsine terminé, la réaction enzymatique est stoppée par l'ajout de 0,5 µl d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA). Le pH des échantillons est à ce moment évalué et doit être inférieur à 2. Les échantillons sont incubés pendant 45 minutes à 37°C sous une agitation de 300 rpm. Les échantillons sont enfin centrifugés à 1 300 rpm pendant 10 minutes puis le surnageant est récupéré et transféré dans une fiole avant injection dans le spectromètre de masse. Les échantillons sont soit conservés à 4°C ou à -20°C dans le cas où ces derniers ne sont pas directement injectés dans le spectromètre de masse.

L'un des objectifs de ce mémoire est de développer une méthode d'analyse de routine permettant d'être utilisée dans des laboratoires et agences de sécurité alimentaire. Dans ce but, la réduction du temps de digestion enzymatique a été évaluée. Les premières étapes de réduction et d'alkylation sont ou non conservées puis la trypsine est ajoutée. Cependant, au lieu d'incuber les échantillons pendant 5 heures, ces échantillons sont soniqués pendant 1 à 2 minutes (amplitude : 60, Cycle : 1), puis la réaction est stoppée par du TFA. Le reste du protocole est également conservé.

2.7. Analyse des échantillons par spectrométrie de masse en tandem

Les farines animales analysées dans le cadre de ce mémoire représentent des échantillons complexes, comportant un grand nombre de protéines animales. Afin de permettre une identification basée sur l'origine taxonomique et tissulaire de ces particules, l'analyse des peptides en spectrométrie de masse est une étape fondamentale. En effet, la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) permet le séquençage des peptides contenus dans les échantillons. En confrontant ensuite la séquence de ces peptides avec des banques de données, il est possible de déterminer la protéine à laquelle se rapporte un peptide particulier. Les analyses en spectrométrie de masse sont réalisées au moyen d'un spectromètre de masse de type ESI-Q-TOF couplé à une chromatographie en phase inverse de type nano.

2.7.1. ESI-Q-TOF couplé à une nano HPLC

2.7.1.1. Principe :

La première partie de l'analyse des échantillons digérés consiste en une décomplexification du mélange peptidique au moyen d'une chromatographie de type nano HPLC (Nanoflow High-Performance Liquid Chromatography). Les échantillons sont préalablement dessalés au niveau d'une pré-colonne, puis sont envoyés sur la colonne chromatographique en phase inverse. Le principe de la phase inverse repose sur le fait que la colonne chromatographique se comporte d'une phase stationnaire composée de particules de silice sur lesquelles ont été greffés des chaînes alkyles de plusieurs atomes de carbone (C18). Au niveau de cette colonne, les peptides sont séparés selon leur hydrophobicité au moyen d'un gradient de solvant organique composé d'acétonitrile. Plus précisément, la nature apolaire de la phase stationnaire permet aux peptides hydrophobes de s'y adsorber. Une phase mobile, composée d'acétonitrile et d'eau, est alors envoyée vers la colonne chromatographique. La phase mobile polaire entre alors en compétition avec les peptides accrochés à la colonne. Ainsi, les peptides les plus hydrophiles sont élués lorsque l'acétonitrile est à plus faible concentration, tandis que les peptides les plus hydrophobes sont élués par une concentration plus importante en acétonitrile. Les peptides désorbés sont ensuite envoyés vers le spectromètre de masse, ce dernier étant directement connecté à la colonne chromatographique via un fin capillaire.

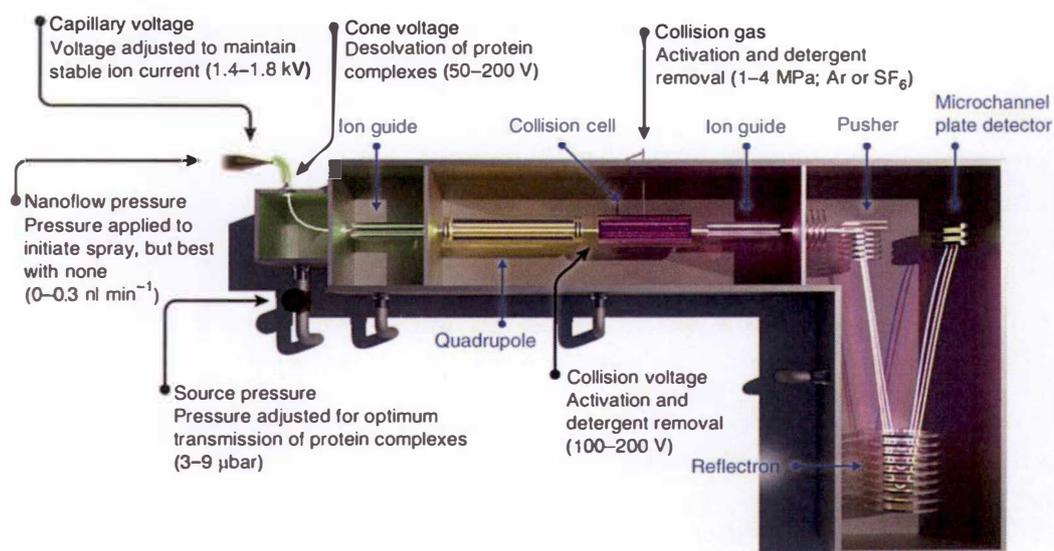


Figure 2.2 – Représentation schématique de la structure d'un spectromètre de masse de type Q-TOF.
(Laganowsky *et al.*, 2013).

Tableau 2.9 – Matériel et réactifs utilisés pour l'analyse en spectrométrie de masse.

Spectromètre de masse ESI-MS/MS maXis Impact UHR-TOF (Bruker, Germany)
Nano-UPLC UltiMate 3000 (Thermo, USA)
Colonne chromatographique en phase inverse (Acclaim PepMap 100 C18, 75 µm X 250 mm, Thermo, USA)
Solvant A (eau 95 %, acétonitrile 5 %, acide formique 0,1 %)
Solvant B (eau 20 %, acétonitrile 80 %, acide formique 0,1 %)

Le spectromètre de masse est un outil d'analyse composé de trois parties distinctes : une source, un analyseur et un détecteur. L'analyseur et le détecteur sont soumis à des conditions de vide poussé, ce vide permettant d'éviter toute contamination de l'appareil et permet également aux ions de circuler librement. Dans le cadre de ce mémoire, l'appareil utilisé est de type ESI-Q-TOF, où l'ESI (electrospray ionisation) représente la source et le Q-TOF représente un système hybride d'analyseur (**Figure 2.2**) (Laganowsky et al., 2013) (se référer au point 1.5.3.1 de l'introduction pour plus d'informations concernant le fonctionnement de cet appareillage).

2.7.1.2. Matériel : Se référer au **tableau 2.9**.

2.7.1.3. Méthode :

Les échantillons ayant été digérés sont, dans un premier temps, séparés par la chromatographie liquide en phase inverse sur une colonne de 75 μm x 250 mm. Deux phases mobiles sont utilisées afin de décomplexifier le mélange peptidique :

- Phase mobile A : 95 % H₂O – 5 % acétonitrile – 0,1 % acide formique
- Phase mobile B : 20 % H₂O – 80 % acétonitrile – 0,1 % acide formique

Environ 2 μl d'échantillon (le volume prélevé dépend de l'expérience et de la concentration de l'échantillon) sont injectés dans l'HPLC. Le contenu organique de la phase mobile est augmenté de manière linéaire de 4 % à 30 % de phase B en 160 minutes puis de 30 % de phase B à 90 % en 25 minutes. Ce gradient de solvant organique est nécessaire à la bonne séparation des peptides sur la colonne chromatographique. Pendant 10 minutes, la colonne est lavée avec 90 % de phase B et est ensuite reconditionnée pendant 20 minutes au moyen de 4 % de phase B.

La colonne est directement reliée à la source Captive Spray (Bruker) du spectromètre de masse. Lors du scan, les spectres MS sont acquis toutes les 0,5 secondes et dans un rapport masse sur charge (m/z) compris entre les gammes 50 et 2200. Les peptides les plus intenses (ions 2+ à 4+) sont séquencés pendant un temps de cycle de 3 secondes. L'énergie de la dissociation induite par collision (CID) est automatiquement réglée en fonction du rapport m/z et de l'état de charge de l'ion précurseur. Les systèmes Maxis et Thermo sont pilotés par Compass HyStar 3.2 (Bruker).

2.7.2. Analyse des résultats

L'analyse bioinformatique des résultats provenant du spectromètre de masse est ensuite effectuée. Les listes des pics caractéristiques de la spectrométrie de masse sont créées par le programme DataAnalysis 4.2 (Bruker) et enregistrées en tant que fichiers MGF pour être ensuite utilisées dans ProteinScape 3.1 (Bruker), avec Mascot 2.4 comme moteur de recherche (Matrix Science). La spécificité enzymatique est définie sur « trypsine », et le nombre maximum de « missed-cleavages » par peptide est fixé à deux (un « missed-cleavage » représente l'endroit d'un peptide où la trypsine n'a pas clivé un lien peptidique où se trouve une lysine ou une arginine). Des modifications post-traductionnelles des protéines telles que la carbamidométhylation de la cystéine, l'oxydation de la méthionine, la conversion de la glutamine en pyro-glutamate (Gln \rightarrow pyro – Glu) et l'hydroxylation de la proline et de la lysine (pour les collagènes) sont autorisées comme modifications variables. La fenêtre de tolérance de masse pour les peptides monoisotopiques est fixée à 10 ppm et la fenêtre de tolérance MS/MS est réglée à 0,05 Da. Les listes de pics sont analysées au moyen de deux bases de données spécialement conçues pour l'analyse des peptides provenant des farines animales (AllUniprot, 616 520 entrées; CollagenUniprot, 2 865 entrées) et qui contiennent 4 taxons différents (ruminantia, suina, rodentia & aves). Une recherche dans une base de

données « decoy » peut également être réalisée, avec un False Discovery Rate (FDR) fixé à 1 %. Cette base de donnée « decoy » permet d'estimer la fréquence d'identifications incorrectes de peptides parmi les identifications correctes. En effet, lors d'analyses complexes en MS/MS comme celles réalisées dans ce mémoire, des identifications incorrectes de peptides peuvent être fréquentes. La recherche dans une base de données « decoy » permet donc de détecter les fausses identifications peptidiques parmi les bonnes identifications (stratégie du « decoy » décrite dans Elias & Gygi (Elias & Gygi, 2010)).

Le programme Scaffold 4.3 (Proteome Software) est utilisé pour valider les peptides et protéines identifiés en MS/MS. L'identification d'un peptide n'est acceptée que si elle peut être établie à plus de 95 % de probabilité par l'algorithme peptide prophète (Keller et al., 2002) avec la correction delta-masse réalisée dans Scaffold. L'identification d'une protéine n'est acceptée que si elle peut être établie à plus de 95 % de probabilité d'atteindre un FDR inférieur à 1 % et si au moins 2 peptides ont été identifiés. Enfin, pour valider les résultats de Scaffold, les peptides candidats sont blastés dans NCBI pour confirmer qu'ils sont en effet issus des espèces pour lesquelles ils ont été identifiés dans Scaffold.

2.8. Tests immuno-enzymatiques ELISA

Les peptides marqueurs spécifiques d'espèces ayant été déterminés dans les échantillons de farines animales ont été synthétisés (Eurogentec, Liège, Belgique) et ensuite utilisés pour produire des anticorps dans le but d'augmenter la spécificité des tests immunologiques réalisés sur les farines animales. Ces peptides, une fois sélectionnés, sont administrés à des lapins, ces derniers produisant des anticorps spécifiquement dirigés contre ces peptides spécifiques. Après environ deux mois, le sang des lapins est prélevé et les anticorps présents dans le sérum sont récoltés. Les anticorps obtenus sont ensuite analysés par ELISA indirect afin de vérifier leur spécificité. Le principe de l'ELISA indirect repose sur la reconnaissance d'un antigène par un anticorps primaire spécifique et la mise en évidence de cette reconnaissance par une réaction colorimétrique. En effet, l'antigène fixé au fond d'un puits d'une plaque 96 puits est reconnu par un anticorps spécifique. Le complexe antigène-anticorps est ensuite reconnu par un anticorps secondaire, ce dernier étant spécifique à l'anticorps primaire et couplé à une enzyme permettant sa révélation. La réaction colorimétrique engendrée peut alors être mesurée dans un spectrophotomètre, cet appareil permettant de fournir une quantification des complexes antigène-anticorps.

De manière générale, le peptide d'intérêt est premièrement solubilisé dans un mélange de DMF (Diméthylformamide), de PBS et d'urée. Les puits d'une plaque 96 puits sont ensuite coatés par le peptide d'intérêt, à raison de 100 ng ou de 1000 ng de peptides par puits. Ce coating est réalisé dans un tampon (PBS) à 4°C durant une nuit. La plaque est ensuite rincée plusieurs fois, puis saturée avec un tampon de saturation composé de PBS et de gélatine de poisson 1 % à 37°C pendant une heure. La plaque est alors rincée plusieurs fois puis incubée en présence de l'anticorps primaire à 37°C pendant une heure. Différentes dilutions de cet anticorps sont réalisées au moyen d'un tampon contenant du PBS et du tween 0,05 %. Après cette étape, la plaque est à nouveau rincée plusieurs fois puis incubée avec une solution contenant l'anticorps secondaire (goat anti-rabbit IgG), cet anticorps reconnaissant l'anticorps primaire et étant couplé à une peroxydase de type HRP. Après une heure d'incubation à 37°C, la plaque est rincée puis mise en présence du substrat (TMB, Thermo Scientific, USA) de l'HRP pendant une dizaine de minutes, le complexe HRP – TMB permettant ainsi de produire une réaction colorimétrique de couleur bleue. Cette réaction est finalement stoppée par ajout de H₂SO₄ puis la plaque est lue à 450 nm dans un spectrophotomètre à multipuits.

RÉSULTATS & DISCUSSION

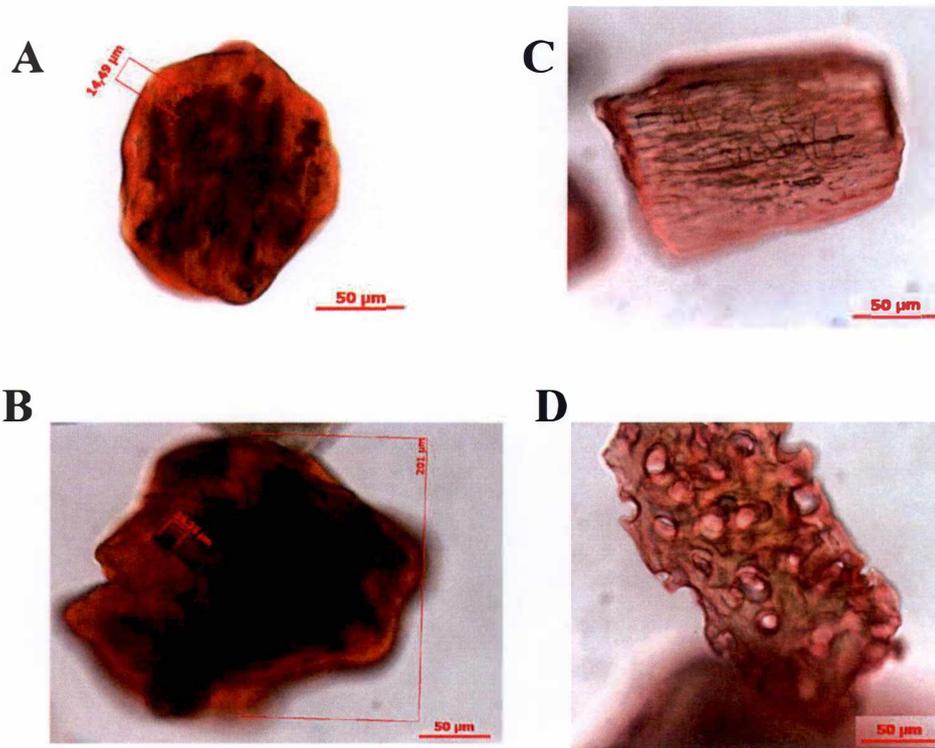


Figure 3.1 – Images en microscopie optique de particules animales d’origine terrestre (A & B) et marine (C & D) présentes dans une farine animale. Ces particules peuvent être différenciées selon différents critères, notamment la présence de canalicules osseux, de structures fibrillaires,... Ces images de microscopie optique ont été réalisées au Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W) de Gembloux.

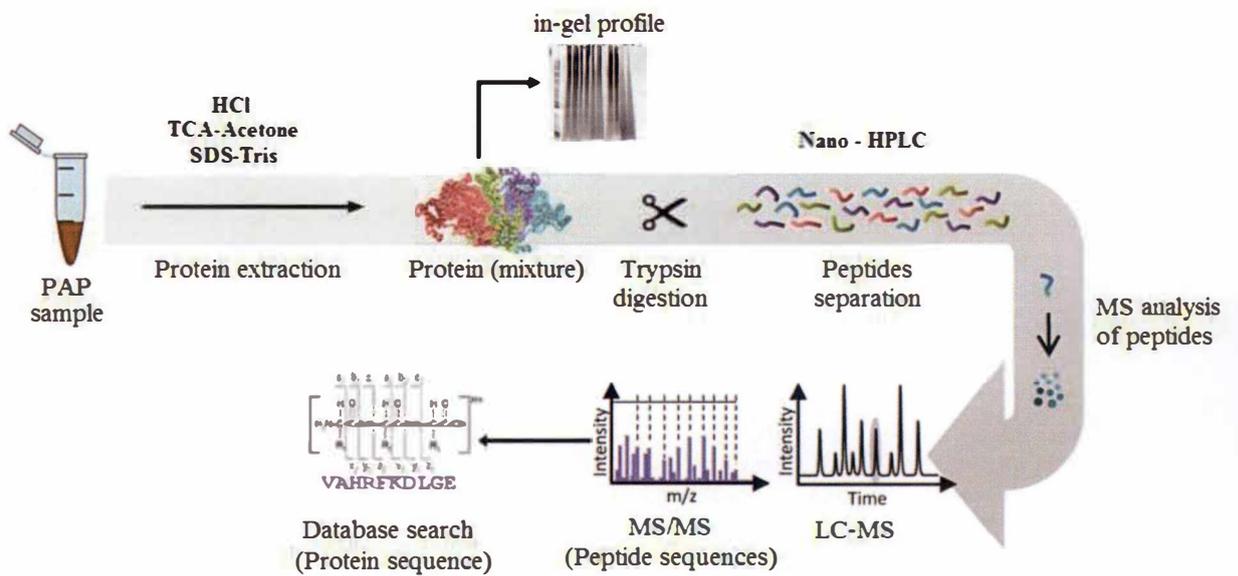


Figure 3.2 – Schéma général de la méthode peptidomique/protéomique développée dans ce mémoire. (modifié d’après Liu *et al.*, 2013)

3. Résultats et Discussion

Partie A – Analyse sans *a priori* de farines animales dans le but d'identifier des peptides marqueurs spécifiques selon différentes méthodes d'extraction protéique.

3A. 1. Analyse préliminaire : microscopie optique

Selon la législation actuellement en vigueur en Europe, l'analyse officielle des farines animales est réalisée au moyen d'un microscope optique. En effet, après différentes étapes de préparation, les particules animales résiduelles sont étalées sur une lame et observées au microscope. Cette méthode de microscopie, comme décrite dans la partie introductive, permet non seulement une détection très précise des particules animales mais permet également de discerner ces particules d'un point de vue morphologique. C'est dans ce but qu'une analyse préliminaire de farines animales par la microscopie optique a été réalisée. Cette analyse fut exécutée avec la collaboration du Centre Wallon de Recherches Agronomiques de Gembloux (CRA-W).

Une farine animale décrite comme étant destinée à l'alimentation des poissons d'élevage fut utilisée comme base de cette analyse microscopique. Une fois réalisées les différentes étapes de tamisage, de blanchiment et de coloration des particules animales, ces dernières ont pu être observées au microscope optique (**Figure 3.1**). Ces particules peuvent être différenciées selon certains critères morphologiques, notamment la présence ou non de canalicules, la forme de leurs lacunes et la présence de stries. L'œil d'un observateur expérimenté peut dès lors faire la distinction entre les particules d'origine terrestre (**Figure 3.1 – A & B**) et les particules d'origine marine (**Figure 3.1 – C & D**) présentes dans cet échantillon de farine (à l'exception des mammifères marins, ceux-ci présentant les mêmes caractéristiques que les mammifères terrestres). En effet, les particules d'origine terrestre ont la particularité de posséder des canaux de Havers d'où partent un grand nombre de canalicules de Volkmann reliant entre eux ces différents canaux. Ces particules peuvent donc être décrites comme étant des particules d'os provenant d'animaux terrestres. Les particules d'origine marine (poissons) ont quant à elles la particularité de présenter des stries caractéristiques des arrêtes de poisson (C) et la forme typique des particules de cartilage (D).

Bien qu'il soit possible de faire une distinction entre l'origine des espèces (mammifères, poissons, oiseaux), la microscopie optique ne permet pas de réaliser une identification taxonomique plus précise de ces particules. Or, la demande de réintroduction de certaines farines animales exige une identification à la fois taxonomique et histologique de ces particules afin de respecter la législation mise en place en Europe. Cette analyse préliminaire confirme donc la nécessité de développer une méthode permettant de répondre aux exigences européennes en matière de sécurité alimentaire. La méthode peptidomique/protéomique décrite dans ce mémoire a donc pour but de répondre à cette demande de réintroduction et de fournir une identification à la fois taxonomique et histologique des farines animales analysées.

3A. 2. Principe de la méthode peptidomique/protéomique

La méthode peptidomique développée dans ce mémoire est schématiquement représentée à la **figure 3.2**. Comme décrit dans la partie « Matériel et Méthodes », les échantillons de farines (PATs) sont soumis à trois types d'extractions protéiques différentes : l'extraction HCl,

TCA-Acétone et SDS-Tris. Les extractions TCA-Acétone et SDS-Tris ont été sélectionnées puisque ces dernières permettent d'extraire de manière générale toutes les protéines d'une farine animale (extraction sans *a priori*). L'extraction HCl a quant à elle été sélectionnée en raison de la composition des farines animales. En effet, il apparaît que ces farines contiennent une certaine quantité de particules d'os, ces os renfermant beaucoup de protéines telles que des collagènes. Puisque l'HCl a la capacité de déminéraliser l'os et dès lors d'extraire plus facilement les collagènes, cette méthode avec *a priori* a également été sélectionnée. Le profil protéique de ces extraits peut ensuite être évalué au moyen d'une électrophorèse à une dimension (1D). Les protéines sont ensuite digérées enzymatiquement par la trypsine de façon à obtenir un mélange de peptides. Ces peptides sont d'abord séparés selon leur hydrophobicité au moyen d'une colonne chromatographique de type nano-HPLC. Ils sont ensuite envoyés vers le spectromètre de masse, où ils sont ionisés par une source de type ESI. En fonction des paramétrages de l'appareil, les peptides sont analysés selon un mode MS ou MS/MS. Dans cette dernière configuration, les peptides sont fragmentés au niveau d'une cellule de collision puis détectés en fin de parcours. En confrontant les masses expérimentales des fragments obtenus avec des masses de peptides digérés *in silico* en base de données, il est possible de déterminer la séquence en acides aminés de ceux-ci. Ce principe est connu sous le terme de « peptide fragment fingerprinting ».

La première partie de ce mémoire vise principalement à identifier des peptides marqueurs spécifiques d'espèces présents dans les farines animales. Afin d'identifier un grand nombre de ces peptides, la fiabilité de chaque étape de cette approche peptidomique doit être évaluée. Dans ce but, une étude comparative des différentes méthodes d'extraction a été réalisée.

3A. 3. Etude comparative des méthodes d'extraction protéique

3A. 3.1. Rendement d'extraction

L'extraction protéique représente la première étape vers l'identification de peptides spécifiques d'espèces présents dans un échantillon de PATs. Comme différentes méthodes d'extraction protéique existent et sont bien documentées dans la littérature (Buckley et al., 2008, Jiang et al., 2007, Mechin et al., 2007, Seddon et al., 2004), certaines d'entre elles ont déjà été testées au laboratoire afin d'évaluer leur efficacité (Rapport PeptidoGenomique RF N°11/6243, thèse d'Hélène Marbaix). Dans cette étude, cinq protocoles d'extraction ont été examinés : TCA-Acétone, SDS 2 % - Tris 1 M pH 8.8, TBS - SDS - EDTA, DLA et phénol. En comparant la quantité de protéines extraites obtenues pour chacune de ces méthodes, l'extraction SDS-Tris et TCA-Acétone se sont révélées être les méthodes fournissant la plus grande quantité de protéines. Cependant, l'utilisation de détergents et tampons, tels que le SDS et le Tris, est décrite pour induire des interférences et incompatibilités avec les analyses en spectrométrie de masse (Chen et al., 2007, Shieh et al., 2005). C'est pourquoi la méthode utilisant le TCA-Acétone a été utilisée préférentiellement pour l'extraction protéique des farines animales. Par ailleurs, les farines étudiées sont composées de mélanges complexes de particules animales, où les particules d'os représentent une part importante. Puisque le collagène est la protéine majoritairement retrouvée dans les os, une seconde méthode d'extraction protéique utilisant l'HCl a également été utilisée. En effet, l'HCl a la capacité de déminéraliser les particules d'os, ce qui permet d'extraire plus efficacement le collagène présent (Jiang et al., 2007). Ainsi, les extractions protéiques utilisant le TCA-Acétone et l'HCl ont été conservées pour les analyses réalisées dans le cadre de ce mémoire. Cependant, une étape de "Clean-Up" (GE Healthcare) intervenant après l'extraction protéique a été testée lors d'expérimentations antérieures (Marbaix et al., en préparation). Cette étape de "Clean-Up" a la fonction principale de concentrer et de purifier

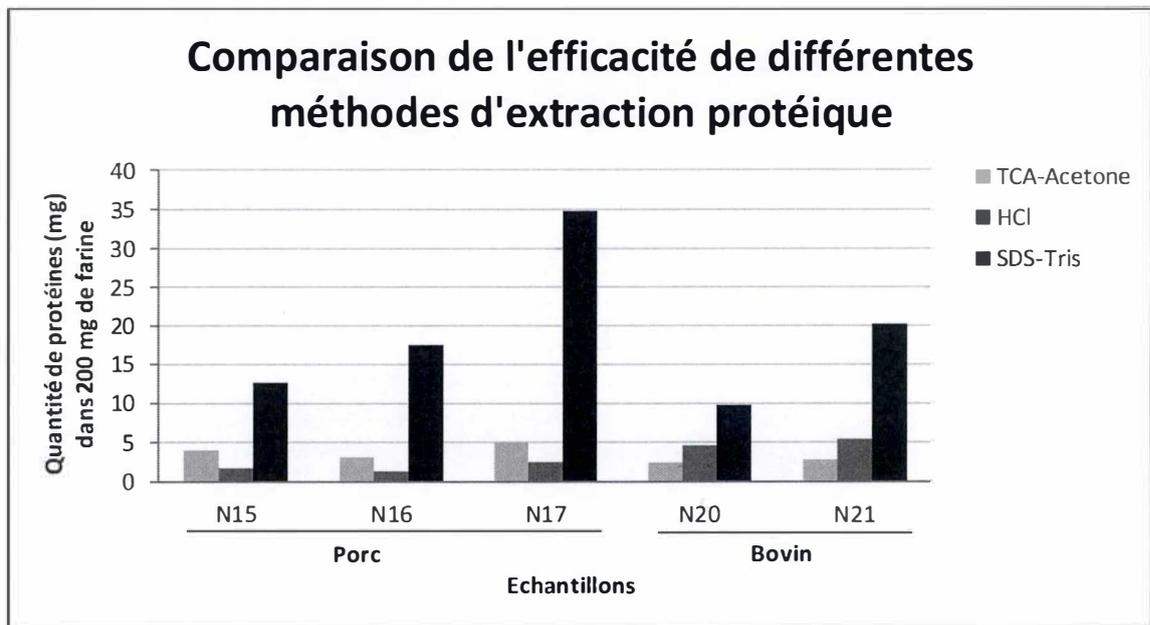


Figure 3.3 – Comparaison de l'efficacité de différentes méthodes d'extraction protéique. Deux cents milligrammes de farine animale provenant de 5 échantillons (Porc : N15, N16 & N17 ; Bovin : N20 & N21) ont été traités au TCA-Acétone, au HCl ou au SDS-Tris de façon à extraire leurs protéines. La quantité de protéines après extraction (exprimée en mg) est donnée pour chaque échantillon selon les différentes méthodes d'extraction protéique.

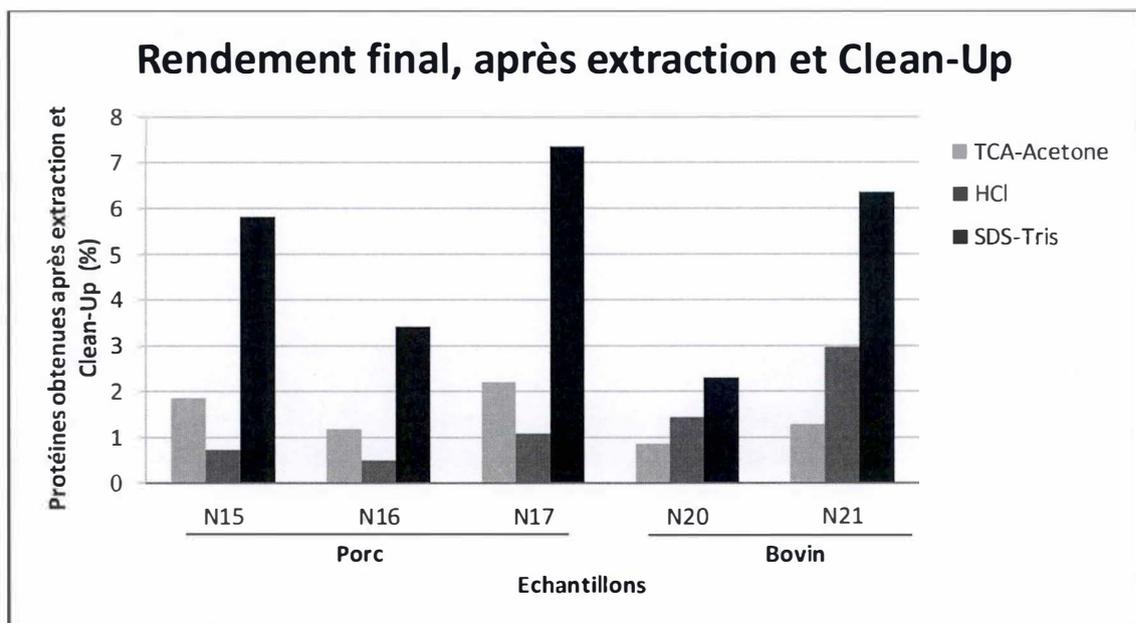


Figure 3.4 – Rendement final après extraction protéique et étape de "Clean-up". Deux cents milligrammes de farine animale provenant de 5 échantillons (Porc : N15, N16 & N17 ; Bovin : N20 & N21) ont été traités au TCA-Acétone, au HCl ou au SDS-Tris de façon à extraire leurs protéines. Après l'extraction, 70 µg de protéines sont prélevés pour chaque échantillon et une étape de "Clean-Up" est réalisée sur ces derniers. Le rendement final, c'est-à-dire le rendement du Clean-Up combiné à la quantité de protéines obtenues après chaque extraction, est représenté en % pour chaque extraction protéique réalisée sur les différents échantillons de farine animale.

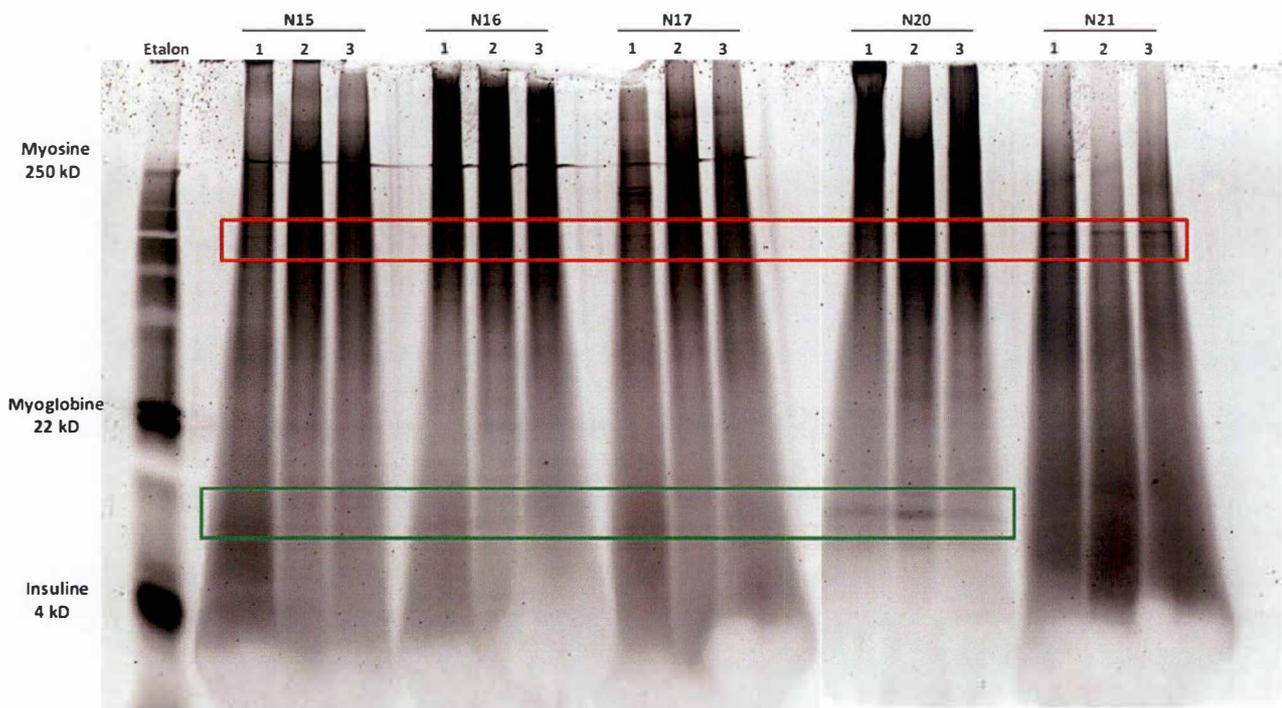


Figure 3.5 – Gel 1D Tris-Glycine 18 % illustrant le profil protéique de 5 échantillons ayant été extraits selon les 3 méthodes d'extraction protéique. Trois échantillons de farine de porc (N15, N16 & N17) et deux échantillons de farine de bovin (N20 & N21) ont été traités à l'HCl (1), au TCA-Acétone (2) ou au SDS-Tris (3) de façon à extraire leurs protéines. Les échantillons ont ensuite subi une étape de "Clean-Up", avec resuspension de l'extrait protéique dans du DLA, avant d'être analysés par électrophorèse. L'étalon protéique utilisé est le SeeBlue® Plus2 Prestained Standart kit. Le gel est coloré au krypton et scanné à 470 V par un scanner de type Typhoon 9420 (Amersham Biosciences, GE). Rectangle rouge : bandes protéiques similaires entre les différents échantillons et selon les différents modes d'extractions (poids moléculaire d'environ 100 kD). Rectangle vert : bandes protéiques similaires entre les échantillons de porc et l'échantillon bovin N20 (poids moléculaire d'environ 10 kD).

les extraits protéiques avant que ceux-ci ne soient digérés enzymatiquement. De plus, il apparaît également que le "Clean-Up" a la capacité d'éliminer les détergents (le SDS par exemple) présents dans un échantillon. De ce fait, l'extraction protéique utilisant le SDS-Tris a donc également été utilisée lors des analyses peptidomiques réalisées dans ce mémoire.

Ainsi, en prenant en compte ces observations, une première analyse sur des échantillons de porc et de bovin provenant du NIFES (Norvège) a été réalisée. Ces échantillons ont été extraits selon les trois modes d'extraction protéique sélectionnés: TCA-Acétone, HCl et SDS-Tris. La quantité de protéines obtenue selon ces différents protocoles d'extraction pour trois échantillons de porc (N15, N16 & N17) et deux échantillons de bovin (N20 & N21) est représentée à la **figure 3.3**. Il apparaît que pour la même quantité de farine (200 mg) utilisée au début de l'extraction protéique, l'extraction utilisant le SDS-Tris fournit de meilleurs résultats comparée aux deux autres méthodes (TCA-Acétone & HCl). En effet, environ deux à sept fois plus de protéines ont été extraites par cette méthode SDS-Tris, à la fois pour les trois échantillons de porc et les deux échantillons de bovin. Néanmoins, l'extraction protéique n'est que la première étape de traitement de ces farines animales. En effet, une étape de "Clean-Up" a été réalisée sur ces cinq échantillons. Après cette étape de purification et de concentration, le rendement général d'extraction (prenant donc en compte l'extraction et le "Clean-Up") a été évalué (**Figure 3.4**). Il apparaît que la méthode d'extraction protéique utilisant le SDS-Tris a un rendement d'extraction nettement supérieur par rapport aux autres méthodes d'extraction (TCA-Acétone & HCl) et cela pour les différentes farines animales testées. En terme de quantité de protéines obtenues, la méthode d'extraction SDS-Tris semble donc la plus efficace et pourrait être considérée comme la meilleure méthode. Cependant, il est important de noter que le but principal de ce mémoire est d'identifier des peptides marqueurs spécifiques des farines animales analysées. De ce fait, une extraction protéique permettant d'extraire une grande variété de protéines devrait être privilégiée. À ce stade, même si l'extraction utilisant le SDS-Tris permet d'extraire une quantité importante de protéines (en terme de concentration), une étude qualitative approfondie sur la nature des protéines extraites doit être réalisée.

3A. 3.2. Profil protéique sur gel

En parallèle à cette étude comparant la quantité de protéines obtenue pour chacune des méthodes d'extraction testées, leur profil sur gel a également été évalué. Le but de cet exercice n'est pas d'obtenir des informations quantitatives mais plutôt de comparer les échantillons et de voir comment ceux-ci répondent à chaque extraction protéique. Dans ce but, un gel 1D Tris-Glycine 18 % a été utilisé pour évaluer le profil protéique des trois échantillons de porc et des deux échantillons de bovin ayant été extraits selon les trois méthodes d'extraction précédemment décrites (**Figure 3.5**). Bien que la résolution de ce gel soit assez faible, plusieurs observations peuvent être faites. Premièrement, en comparant les différentes méthodes d'extraction (1 : HCl, 2 : TCA-Acétone, 3 : SDS-Tris), il est difficile de déterminer la méthode permettant d'offrir la meilleure extraction protéique. En effet, peu de bandes protéiques sont visibles sur ce gel, à l'exception de certaines bandes mieux représentées au niveau des échantillons de porc N16 et N17, et cela pour l'extraction HCl (pistes N°1). Cette différence pourrait donc être interprétée comme l'indication d'une efficacité supérieure de l'HCl à extraire les protéines. Cette information ne peut cependant pas être confirmée à ce stade de l'expérience. Deuxièmement, il apparaît que certaines bandes protéiques sont représentées dans les cinq échantillons étudiés et cela pour les différents protocoles d'extraction (rectangle rouge). Le poids moléculaire correspondant à ces bandes protéiques est estimé à 100 kD et il s'agit probablement de protéines très robustes ou quantitativement plus représentées. Signalons que les chaînes α des collagènes font

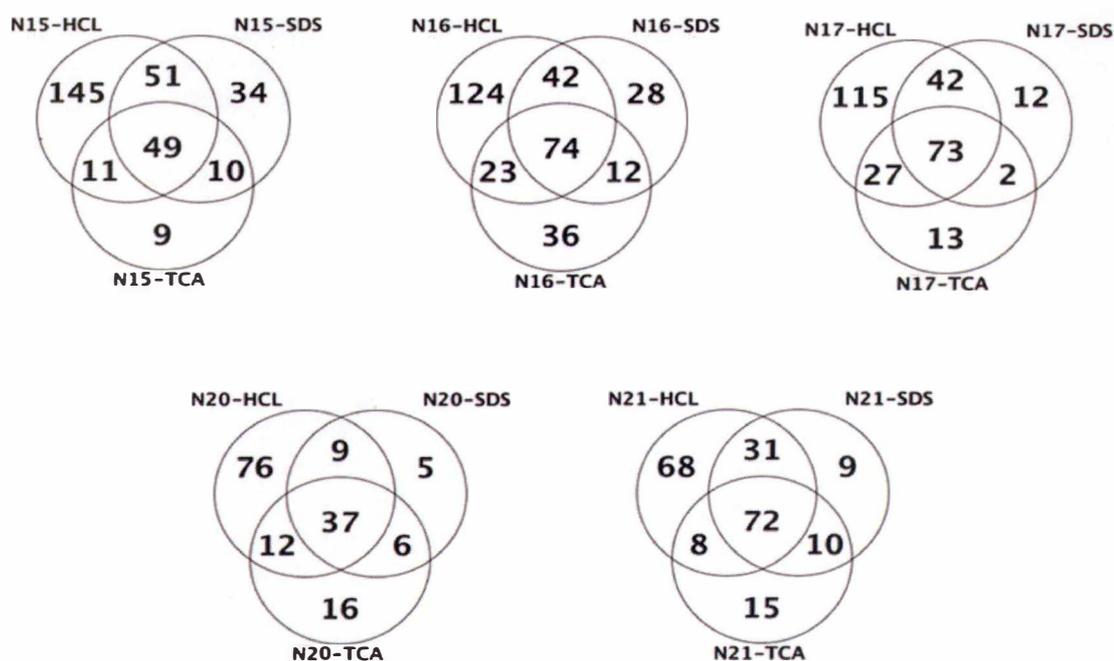


Figure 3.6 – Diagrammes de Venn illustrant les effets comparatifs de différentes méthodes d'extraction protéique (HCl, TCA-Acétone & SDS-Tris) sur 5 échantillons de farine provenant du NIFES (Porc : N15, N16 & N17 ; Bovin : N20 & N21) de façon à évaluer le nombre de peptides identifiés pour chacune de ces méthodes d'extraction. Les protéines ont été extraites selon 3 protocoles d'extraction (HCl, TCA et SDS) puis ont subi une étape de "Clean-Up" avec resuspension des extraits protéiques dans du RapiGest 0,2 %. Ces extraits ont ensuite été digérés enzymatiquement par la trypsine (rapport trypsine/protéines, 1/20) pendant 5 heures avant leur analyse MS/MS.

Tableau 3.1 – Effet de différentes méthodes d'extraction protéique sur le nombre de peptides identifiés pour différents échantillons de porc et bovin provenant du NIFES.

Extraction protéique	Echantillons de porc			Echantillons de bovin	
	N15	N16	N17	N20	N21
HCl	256	263	257	134	179
SDS-Tris	144	156	129	57	122
TCA-Acétone	79	145	115	71	105

exactement ce poids moléculaire. Troisièmement, certaines bandes protéiques ne sont apparemment observées qu'au niveau des échantillons de porc (N15, N16 et N17) et d'un échantillon de bovin (N20) et ne sont pas observées au niveau de l'échantillon de bovin N21 (rectangle vert, poids moléculaire : 10 kD). L'explication la plus probable de cette différence proviendrait de la nature des échantillons de farine testés. En effet, comme décrit précédemment, les échantillons de farines animales peuvent avoir une composition différente en fonction de la nature des particules les composant. Par exemple, certaines farines sont composées principalement de particules d'os, tandis que d'autres sont composées de particules de viande (des muscles par exemple) ou une combinaison des deux (« FVO » ou « farine de viande et d'os »). En l'occurrence, les échantillons testés dans cette expérience sont des échantillons de viande et d'os, à l'exception de l'échantillon de bovin N21 qui est une farine exclusivement composée de viande. D'ailleurs, l'aspect de ces farines est différent selon la nature de leurs particules, une farine de viande étant plus grasse est sujette à s'agréger dans son récipient. Puisque la graisse peut interférer avec l'extraction protéique, le profil sur gel d'un échantillon peut donc être affecté. Ces raisons font donc penser que l'absence plus prononcée de bandes protéiques dans l'échantillon N21, par rapport aux autres échantillons testés, serait principalement due à sa composition, les graisses étant plus abondantes dans celui-ci.

Bien que les gels 1D puissent apporter certaines informations quant à la nature des protéines présentes dans chaque échantillon et sur de possibles effets des protocoles d'extraction testés, leur faible résolution ne permet cependant pas de tirer des conclusions définitives. Pour avoir une meilleure idée de l'efficacité de chaque méthode d'extraction, une analyse en spectrométrie de masse doit être réalisée.

3A. 4. Analyses en spectrométrie de masse

Une analyse des farines animales en spectrométrie de masse est une étape cruciale permettant à la fois de déterminer l'efficacité des méthodes d'extraction testées tout en fournissant des informations sur la nature des protéines extraites. Dans ce but, trois échantillons de porc (N15, N16 & N17) et deux échantillons de bovin (N20 & N21) ont été extraits selon les trois protocoles d'extraction utilisés dans ce mémoire (HCl, TCA-Acétone & SDS-Tris). Après l'extraction protéique, les échantillons ont subi une étape de "Clean-Up" puis ont été digérés enzymatiquement par la trypsine pendant cinq heures (ratio trypsine/protéines : 1/20). Il est important de faire remarquer que dans un protocole classique de digestion enzymatique, un temps de digestion de plus de 20 heures est généralement conseillé de même qu'un ratio trypsine/protéines de 1/50 (Jiang et al., 2007, Sentandreu et al., 2010). Cependant, Hélène Marbaix a testé différents temps de digestion et de ratio trypsine/protéines. Elle a pu montrer que, dans le cas des farines animales, c'est avec une digestion de cinq heures et un ratio trypsine/protéines de 1/20 qu'elle identifiait le plus grand nombre de peptides (Rapport Peptidogénomique RF N°11/6243, thèse d'Hélène Marbaix).

Les peptides issus de la digestion enzymatique ont ensuite été analysés au moyen d'un spectromètre de masse de type ESI – MS/MS MaXis Impact UHR-qTOF (Bruker, Germany) auquel est couplé une HPLC de type nano. Le but principal de cette expérience est donc de déterminer quelle méthode d'extraction protéique est la plus efficace en termes de quantité et de diversité des peptides identifiés. Le nombre total de peptides identifiés pour chaque extraction protéique dans chaque échantillon de farine testé est représenté au moyen de diagrammes de Venn (**Figure 3.6**). Les diagrammes de Venn obtenus montrent que le nombre de peptides identifiés dans chaque échantillon est supérieur lorsque l'HCl est utilisé, comparé

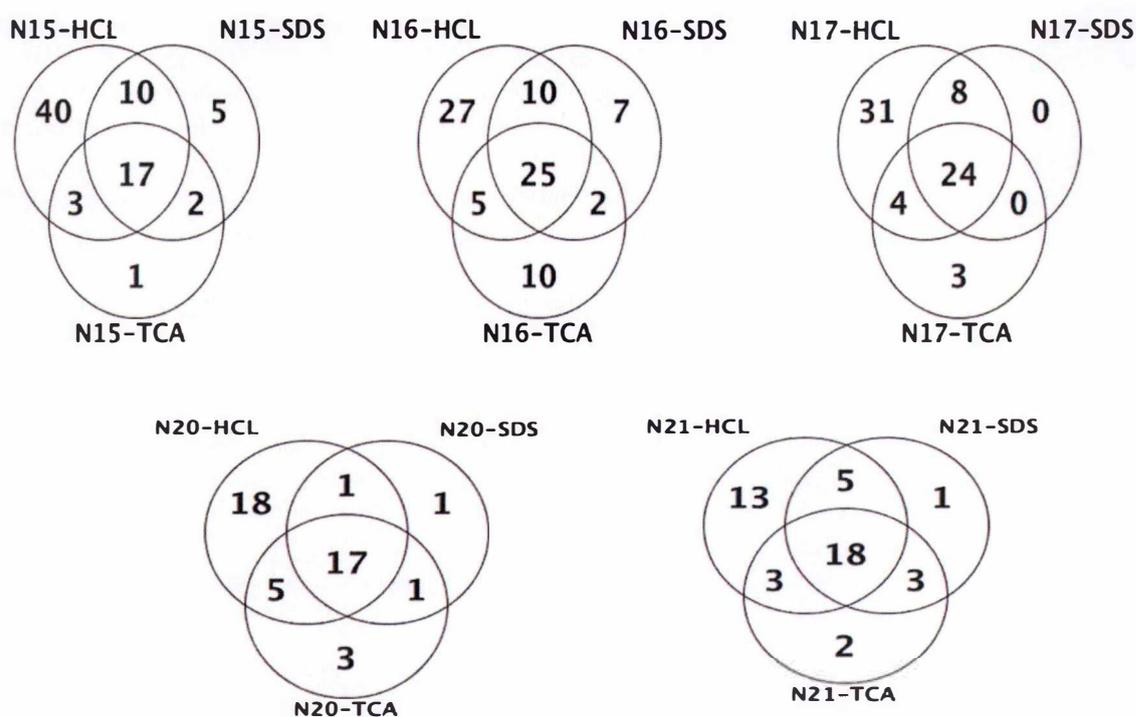


Figure 3.7 – Diagrammes de Venn illustrant les effets comparatifs de différentes méthodes d'extraction protéique (HCl, TCA-Acétone & SDS-Tris) sur 5 échantillons de farine provenant du NIFES (Porc : N15, N16 & N17 ; Bovin : N20 & N21) de façon à évaluer le nombre de protéines identifiées pour chacune de ces méthodes d'extraction. Les protéines ont été extraites selon 3 protocoles d'extraction (HCl, TCA-Acétone & SDS-Tris) puis ont subi une étape de "Clean-Up" avec resuspension des extraits protéiques dans du RapiGest 0,2 %. Ces extraits ont ensuite été digérés enzymatiquement par la trypsine (rapport trypsine/protéines, 1/20) pendant 5 heures avant leur analyse MS/MS.

Tableau 3.2 – Effet de différentes méthodes d'extraction protéique sur le nombre de protéines identifiées pour différents échantillons de porc et bovin provenant du NIFES.

Extraction protéique	Echantillons de porc			Echantillons de bovin	
	N15	N16	N17	N20	N21
HCl	70	67	67	41	39
SDS-Tris	34	44	32	20	27
TCA-Acétone	23	42	31	26	26

Tableau 3.3. A – Liste des protéines de bovin et de porc les plus représentées, identifiées grâce à l'analyse MS/MS d'échantillons de farine de bovin et de porc provenant du NIFES (cette liste a été créée au moyen de la banque de données faite "maison" AllUniprot).

Protéines de bovin	Protéines de porc
Myosin-2 (<i>Bos taurus</i>)	Myosin (<i>Sus scrofa</i>)
Hemoglobin alpha subunit (<i>Bos taurus</i>)	Hemoglobin alpha subunit (<i>Sus scrofa</i>)
Hemoglobin beta subunit (<i>Bos taurus</i>)	Hemoglobin beta subunit (<i>Sus scrofa</i>)
Alpha-2-HS-glycoprotein (<i>Bos taurus</i>)	Alpha-2-HS-glycoprotein (<i>Sus scrofa</i>)
Prothrombin (<i>Bos taurus</i>)	Desmin (<i>Sus scrofa</i>)
Myoglobin (<i>Bos grunniens mutus</i>)	Vimentin (<i>Sus scrofa</i>)
Heat shock protein beta-1 (<i>Bos taurus</i>)	Heat shock protein beta-1 (<i>Sus scrofa</i>)
Myosin light chain 6B (<i>Bos grunniens mutus</i>)	Myosin light chain 1F (<i>Sus scrofa</i>)
Histone H4 (<i>Bos taurus</i>)	Beta-tropomyosin (<i>Sus scrofa</i>)
Fibromodulin (<i>Bos taurus</i>)	Beta-enolase 3 (<i>Sus scrofa</i>)
Chondroadherin (fragment) (<i>Bos taurus</i>)	Prophenin-2 (<i>Sus scrofa</i>)
Serum albumin (<i>Bos taurus</i>)	Serum albumin (<i>Sus scrofa</i>)

Tableau 3.3. B – Liste des protéines de bovin et de porc les plus représentées, identifiées grâce à l'analyse MS/MS d'échantillons de farine de bovin et de porc provenant du NIFES (cette liste a été créée au moyen de la banque de données faite "maison" CollagenUniprot).

Protéines de bovin	Protéines de porc
Collagen alpha-1 (II) chain (<i>Bos grunniens mutus</i>)	Collagen alpha-1 (III) chain (<i>Sus scrofa</i>)
Collagen alpha-2 (I) chain (<i>Bos grunniens mutus</i>)	Collagen alpha-3 (VI) chain (<i>Sus scrofa</i>)

Comparaison du nombre de peptides uniques identifiés selon 3 méthodes d'extraction protéiques différentes, dans un échantillon de bovin

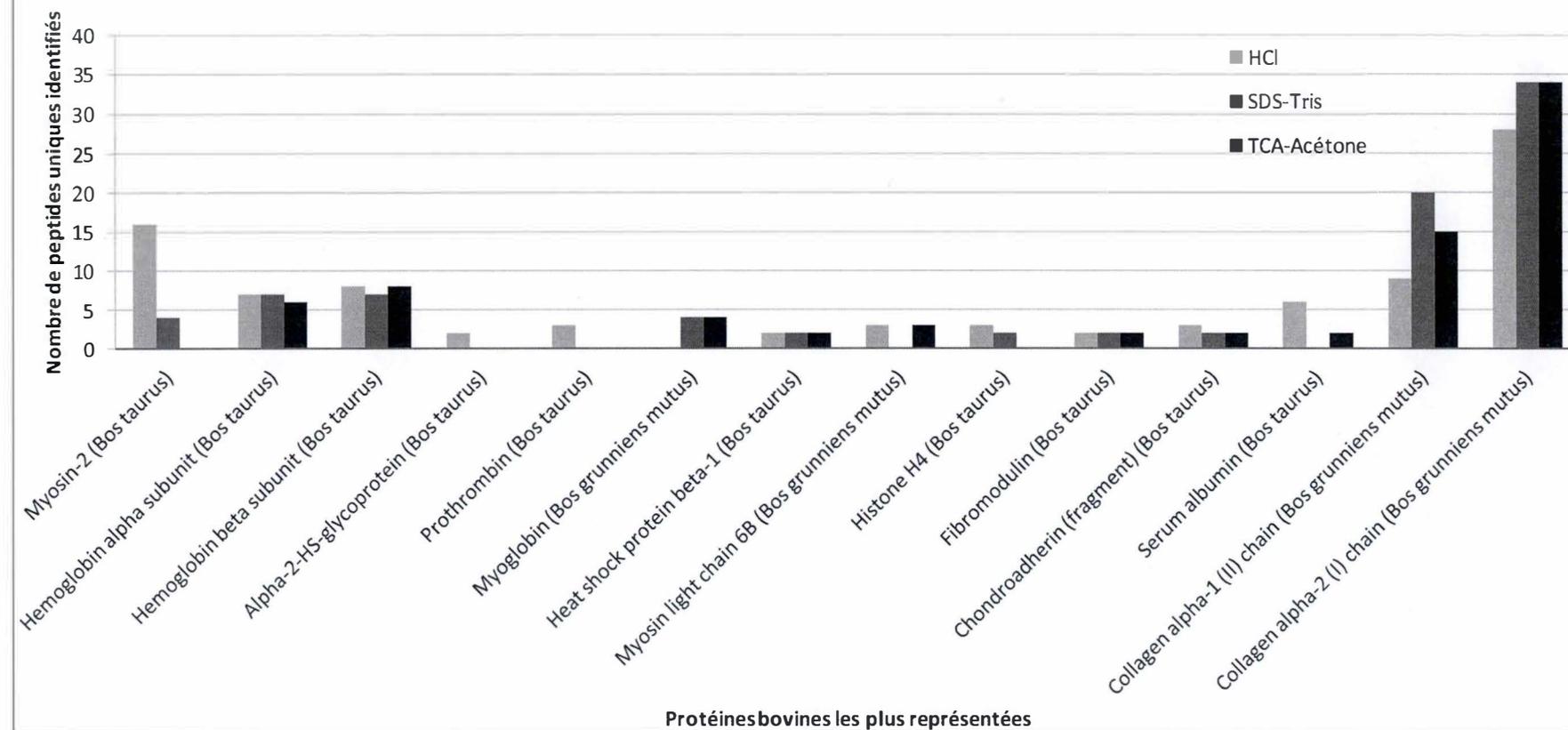


Figure 3.8 – Comparaison du nombre de peptides uniques identifiés dans un échantillon de farine de bovin, selon différentes méthodes d'extraction. Les protéines d'un échantillon bovin (N20) ont été extraites selon différents protocoles d'extraction (HCl, SDS-Tris & TCA-Acétone). Les échantillons ont ensuite subi une étape de "Clean-Up" avant d'être digérés enzymatiquement par la trypsine (ratio trypsine/protéine, 1/20) pendant 5 heures, avant leur analyse MS/MS. Le nombre de peptides uniques identifiés pour les protéines bovines les plus abondantes est représenté pour chaque extraction protéique. La liste de ces protéines les plus abondantes a été créée à l'aide de deux bases de données "maison" : AllUniprot et CollagenUniprot.

aux autres méthodes. En effet, le nombre de peptides identifiés pour les échantillons de porc (N15, N16 & N17) est respectivement de 256, 263 et 257 pour l'extraction utilisant l'HCl (**Tableau 3.1**). Lorsque le SDS-Tris est utilisé, seulement 144, 156 et 129 peptides sont identifiés pour ces échantillons et seulement 79, 145 et 115 peptides sont identifiés lorsque l'extraction TCA-Acétone est réalisée. Des résultats similaires ont également été obtenus au niveau des deux échantillons de bovin (N20 & N21). Le nombre de protéines identifiées pour chacune des méthodes d'extraction testées et dans chaque échantillon suit la même tendance. En effet, l'HCl permet également d'identifier une quantité de protéines plus importante par rapport aux autres méthodes d'extraction (**Figure 3.7 & Tableau 3.2**). Ces résultats confirment bien la nécessité d'une analyse qualitative. Si l'extraction avec l'HCl s'avère moins efficace en terme de rendement d'extraction comparé à l'extraction SDS-Tris (**Figures 3.3 & 3.4**), elle permet cependant d'extraire plus de protéines différentes (**Figure 3.7 & Tableau 3.2**).

L'étape suivante consiste à identifier les protéines les plus représentées dans ces échantillons selon les différentes méthodes d'extraction. Dans ce but, une liste des protéines les plus abondamment retrouvées dans ces trois échantillons de porc (*Sus scrofa*) et ces deux échantillons de bovin (*Bos taurus* & *Bos grunniens mutus*) a été créée avec l'aide de Scaffold 4.3. En réalité, deux listes ont été créées : une liste comprenant toutes les protéines (**Tableau 3.3. A**) et une liste ne contenant que les collagènes (**Tableau 3.3. B**). La liste comprenant toutes les protéines a été créée grâce à une banque de données faite « maison » appelée « AllUniprot » construite à partir de la banque de données « Uniref100 ». Cette banque de données inclut dans ses paramétrages des modifications post-traductionnelles fréquemment observées : carbamidométhylation des cystéines, conversion de la glutamine en pyro-glutamate et oxydation des méthionines (**Figure supplémentaire S1**). La liste ne comprenant que les collagènes a été créée grâce à la banque de données faite « maison » appelée « CollagenUniprot » et qui inclut dans ses paramétrages une modification supplémentaire : l'hydroxylation des lysines et des prolines (**Figure supplémentaire S2**). De cette façon, l'identification d'une protéine (sous-unité de collagène) est rendue plus aisée par une couverture de séquences peptidiques beaucoup plus importante (Ex : 50 % au lieu de 14 %, cette comparaison étant représentée en **Figure supplémentaire S3**).

Parmi les protéines les plus abondamment identifiées dans ces échantillons de porc et de bovin, certaines ont une origine musculaire (myosine, myoglobine, desmine, tropomyosine,...), d'autres sont des protéines du sang (hémoglobine, albumine sérique) tandis que d'autres sont plutôt ubiquistes ("heat shock protein", histone H4, prothénine-2, ...). Les collagènes, quant à eux, sont principalement retrouvés dans les os mais peuvent également être localisés au niveau des tissus conjonctifs (collagènes I, III), du cartilage (collagène II) et de la lame basale des cellules (collagène IV) (Reece et al., 2012).

Ces deux listes ont ensuite été utilisées afin de comparer le nombre de peptides uniques identifiés pour chacune de ces protéines et selon les différentes méthodes d'extraction. De façon à faciliter cette comparaison, seulement un échantillon de porc (N15) et un échantillon de bovin (N20) ont été choisis. La comparaison du nombre de peptides uniques identifiés selon les trois protocoles d'extraction dans l'échantillon de bovin (N20) suggère que la méthode utilisant l'HCl est la plus efficace (**Figure 3.8**). En effet, pour chaque protéine représentée, le nombre de peptides uniques identifiés est généralement plus élevé lorsque l'HCl est utilisé, comparé aux autres méthodes. C'est le cas pour les protéines telles que la myosine-2, l'alpha-2-HS-glycoprotéine, la prothrombine, la chondradhérine et l'albumine sérique. Pour les autres protéines non citées, les autres méthodes (SDS-Tris & TCA-Acétone) ne semblent pas fournir un nombre de peptides uniques plus élevé par rapport à l'HCl. Une exception peut cependant être remarquée au niveau des collagènes et surtout pour la

Comparaison du nombre de peptides uniques identifiés selon 3 méthodes d'extractions protéiques différentes, dans un échantillon de porc

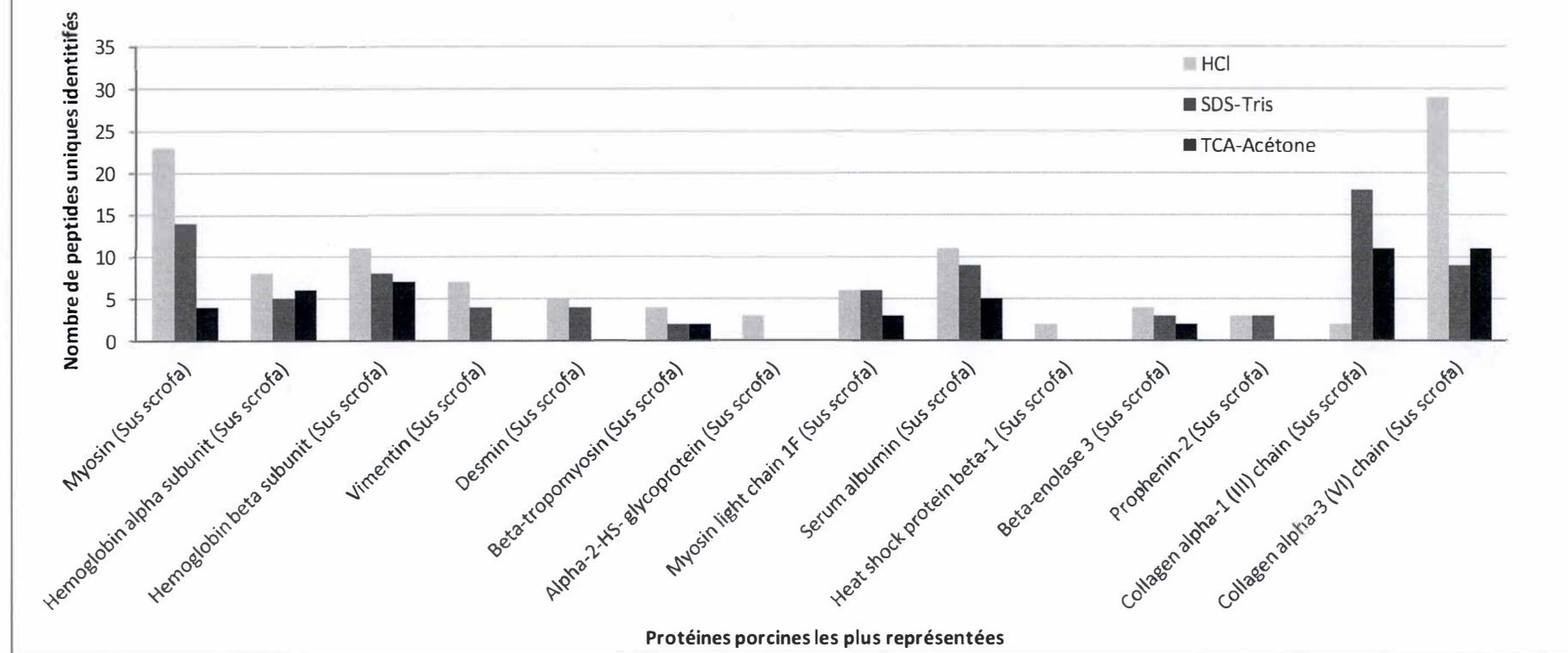


Figure 3.9 – Comparaison du nombre de peptides uniques identifiés dans un échantillon de farine de porc, selon différentes méthodes d'extraction. Les protéines d'un échantillon bovin (N15) ont été extraites selon différents protocoles d'extraction (HCl, SDS-Tris & TCA-Acétone). Les échantillons ont subi une étape de "Clean-Up" avant d'être digérés enzymatiquement par la trypsine (ratio trypsine/protéine, 1/20) pendant 5 heures, avant leur analyse MS/MS. Le nombre de peptides uniques identifiés pour les protéines porcines les plus abondantes est représenté pour chaque extraction protéique. La liste de ces protéines les plus abondantes a été créée à l'aide de deux banques de données "maison" : AllUniprot et CollagenUniprot.

chaîne α -1 (II), où le nombre de peptides uniques identifiés est plus élevé lorsque le TCA-Acétone et le SDS-Tris sont utilisés.

Des résultats similaires ont également pu être observés au niveau de l'échantillon de porc (N15). En effet, le nombre de peptides uniques identifiés pour chaque protéine est plus élevé lorsque l'HCl est utilisé par rapport aux autres protocoles d'extraction (**Figure 3.9**). Le même type d'expérience a été réalisé pour les échantillons N16 et N17, avec la même tendance générale et un plus grand nombre de peptides extraits avec l'HCl par rapport aux autres méthodes testées. Cependant, des différences entre échantillons semblent exister en ce qui concerne le peptide de la sous-unité alpha-1 (III) de collagène (**Figure supplémentaire S4 & S5**).

Ces résultats soulignent le fait que l'HCl doit certainement être utilisé de manière préférentielle lors d'expérimentations futures pour la recherche de peptides marqueurs de farines animales. Cependant, bien que la tendance générale montre une efficacité supérieure de l'HCl, cela n'implique pas forcément un abandon des méthodes utilisant le TCA-Acétone et le SDS-Tris. Ces méthodes ont d'ailleurs prouvé leur efficacité en permettant d'identifier un certain nombre de peptides. L'étape suivante consiste donc en l'identification de peptides marqueurs spécifiques d'espèces animales. En fonction de la diversité des peptides et de la présence ou non de peptides marqueurs, il sera alors possible de ne sélectionner qu'une seule de ces méthodes d'extraction, au même titre que celle utilisant l'HCl.

3A. 5. Identification de peptides marqueurs spécifiques de porc et de bovin

Le but final de l'approche peptidomique/protéomique est d'identifier des peptides marqueurs spécifiques d'espèces retrouvés de préférence dans la plupart des échantillons de farine analysés. Dans une étude préliminaire (Projet PeptidoGénomique RF N°11/6243, thèse d'Hélène Marbaix), certains peptides marqueurs de porc et de bovin ont déjà été identifiés. Parmi les peptides déjà identifiés, trois peptides de bovin et quatre peptides de porc ont été sélectionnés comme antigènes pour la production d'anticorps polyclonaux de lapin au Centre d'Economie Rurale de Marloie (CER). Le but de cette production d'anticorps est d'élargir la gamme d'anticorps déjà disponible pour réaliser des tests ELISA plus spécifiques directement sur les farines animales. De cette façon, la composition d'une farine animale pourra être mieux caractérisée par des tests de routine, offrant la possibilité d'une éventuelle réintroduction de ces farines dans le secteur alimentaire animal.

Comme ces peptides marqueurs de porc et de bovin ont été identifiés dans des farines provenant du CRA-W, une recherche de ces peptides dans les échantillons provenant du NIFES a également été réalisée. Cette analyse a été effectuée dans les trois échantillons de porc (N15, N16 & N17) et les deux échantillons de bovin (N20 & N21), obtenus avec les différentes méthodes d'extraction décrites plus haut. Comme représenté au **tableau 3.4. A**, un peptide correspondant à la sous-unité alpha de l'hémoglobine de *Bos taurus* (AVEHLDDLPGALSESDLHAHK) a été identifié dans les échantillons N15 et N20 et cela pour les différentes méthodes d'extraction. La présence de ce peptide dans l'échantillon N20 est attendue, puisqu'il s'agit d'un échantillon de FVO de bœuf. Ce peptide aurait également pu être identifié dans l'échantillon N21, puisque ce dernier est également un échantillon de bovin. L'absence de ce peptide dans cet échantillon peut être la conséquence de la forte composition en graisse de celui-ci. Cependant, le fait de retrouver ce peptide dans l'échantillon N15 (porc) pourrait être l'indice d'une éventuelle contamination de cet échantillon de porc par des particules bovines. Deux peptides correspondant à la protéine HSP- β 1 de *Bos taurus* (ALPAAAIEGPAYNR & SATQSAEITIPVTFQAR) ont également

Tableau 3.4. A – Liste des peptides spécifiques de bovin identifiés dans différents échantillons du NIFES et selon différentes méthodes d'extraction protéique. Poids moléculaires: Hemoglobin subunit alpha (15 kD), Heat shock protein beta-1 (23 kD).

Protéine	Peptides	Echantillons NIFES
Hemoglobin subunit alpha (<i>Bos taurus</i>)	AVEHLDDLPGALSESDLHAHK	N15 HCl, SDS & TCA N20 HCl, SDS & TCA
Heat shock protein beta-1 (<i>Bos taurus</i>)	ALPAAAIEGPAYNR	N20 HCl & SDS N21 HCl, SDS & TCA
	SATQSAEITIPVTFQAR	N20 HCl & SDS N21 HCl, SDS & TCA

Tableau 3.4. B – Liste des peptides spécifiques de porc identifiés dans différents échantillons du NIFES et selon différentes méthodes d'extraction protéique. Poids moléculaires: Desmin (54 kD), Heat shock protein beta-1 (23 kD), Carbonic anhydrase 3 (29 kD).

Protéine	Peptides	Echantillons NIFES
Desmin (<i>Sus scrofa</i>)	TSGGAGGLGPLR	N15 SDS N16 HCl & TCA
Heat shock protein beta-1 (<i>Sus scrofa</i>)	PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR	N15 HCl N16 HCl, SDS & TCA N17 HCl & TCA
Carbonic anhydrase 3 (<i>Sus scrofa</i>)	HDPSLLPWTASYDPGSAK GGPLTAAAYR	N17 TCA /

été identifiés dans les échantillons N20 et N21. L'extraction TCA-Acétone n'a, semble-t-il, pas permis d'identifier ces peptides marqueurs dans l'échantillon N20. Toutefois, il est important de faire remarquer que la recherche de ces peptides marqueurs est réalisée grâce au logiciel Scaffold 4.3, où ces peptides ne sont sélectionnés qu'à la condition de posséder un score de probabilité d'identification supérieur ou égal à 95 %. Cela veut donc dire que ces peptides peuvent être présents dans l'extrait TCA-Acétone, mais si leur score de probabilité est inférieur à 95 %, ils n'entrent pas dans les critères de sélection. Une analyse des peptides marqueurs de porc a également été réalisée, comme représenté au **tableau 3.4. B**. Ces peptides ont été exclusivement identifiés dans des échantillons de porc (N15, N16 ou N17) et cela pour les différentes méthodes d'extraction. L'absence d'identification d'un peptide pour l'un ou l'autre protocole d'extraction peut également s'expliquer par des scores trop bas, comme mentionné ci-dessus. A ce jour, 25 peptides de bovin et 22 peptides de porc ont été identifiés (**Tableaux supplémentaires S1 & S2**).

De manière générale, l'extraction protéique utilisant l'HCl permet d'identifier la plupart des peptides marqueurs sélectionnés pour la production d'anticorps de lapin. Cette méthode est donc conservée pour les expériences ultérieures. En revanche, il est plus difficile de départager les méthodes d'extraction protéique utilisant le TCA-Acétone et le SDS-Tris. Dans un souci de facilité et afin de pouvoir développer une méthode d'analyse sans *a priori*, le protocole d'extraction SDS-Tris a été abandonné au profit du protocole d'extraction TCA-Acétone pour les expérimentations suivantes.

3A. 6. Identification de peptides marqueurs spécifiques de volaille et de mouton

La législation européenne en matière de farines animales bannit de manière catégorique la distribution de farines de bovin à l'alimentation du bétail ((EC) N° 1234/2003 (Commission Européenne, 2003). Dès lors, la recherche de peptides marqueurs spécifiques de bovin fut une des préoccupations premières de la méthode peptidomique développée dans ce mémoire. Ensuite, de façon à répondre à la volonté de réintroduire certaines farines animales (farine de porc pour l'alimentation des volailles), une recherche de peptides marqueurs spécifiques de porc a également été réalisée. Un grand nombre de ces peptides de bovin et de porc ont dès lors été identifiés, ces peptides servant ainsi à l'élaboration d'anticorps destinés au développement de tests ELISA. Afin de répondre à la demande de réintroduction des farines de volaille à l'alimentation des porcs, une étude sur la découverte de peptides marqueurs spécifiques de volaille a donc été réalisée. Enfin, puisque des farines de mouton étaient également disponibles, une recherche sur les peptides marqueurs spécifiques de mouton fut également effectuée.

3A. 6.1. Peptides marqueurs de volaille (*Gallus gallus*)

Des farines de volaille et des farines de plume provenant du NIFES et du CRA-W ont été utilisées afin de rechercher la présence de ces peptides marqueurs. Ces farines ont subi deux types d'extractions protéiques, à savoir l'extraction HCl et l'extraction TCA-Acétone. Les extraits protéiques ont ensuite subi une étape de "Clean-Up" pour être ensuite digérés enzymatiquement par la trypsine pendant cinq heures. Une liste composée d'une vingtaine de peptides marqueurs abondamment retrouvés dans ces échantillons de volaille et de plumes est reprise au **tableau 3.5**. Une liste plus exhaustive de ces peptides marqueurs est reprise au **tableau supplémentaire S3**. Parmi les peptides marqueurs identifiés, certains proviennent de particules de muscles (myosine, desmine) tandis que d'autres sont retrouvés principalement dans le sang (hémoglobine, albumine sérique). Une grande majorité de ces peptides sont

Tableau 3.5 – Liste de peptides marqueurs identifiés dans des échantillons de farine de volaille (*Gallus gallus*) et de plume provenant du NIFES et du CRA-W.

Protéines	Peptides
Myosin-11 (<i>Gallus gallus</i>)	DNADLANEIR IAQLEELDEEHSNIETMSDR LQIEVENVTSLLEAESK
Desmin (<i>Gallus gallus</i>)	TSAVPTLSTFR
Vimentin (<i>Gallus gallus</i>)	YVSASPGGVYATK
Heat shock protein beta-1 (<i>Gallus gallus</i>)	LLPSESALLPAPGSPYGR VPFTFLTSPSWEFPR
Serum albumin (<i>Gallus gallus</i>)	PLPSIILDEICQVEK QSDINTCFGEEGANLIVQSR TNCDLLHDHGEADFLK FVHDSIGVHK
Hemoglobin subunit alpha-D (<i>Gallus gallus</i>)	AASHQEEFGAEALTR NVDNLSQAMAELSNLHAYNLR
Keratin, type II cytoskeletal 8 (<i>Gallus gallus</i>)	GLFEGYVGTLR ATLETAIAEAER WSLLQSQQPQR
Keratin, type II cytoskeletal 5 (<i>Gallus gallus</i>)	GFSSGSAIVGGSGGGTR
Keratin 75 (<i>Gallus gallus</i>)	ENIGGELSK LDALLEEIDFLR
Keratin 4 (<i>Gallus gallus</i>)	LLQEQSPTTSTR
Desmoplakin isoform (<i>Gallus gallus</i>)	SVEEVAADIEPFLK QALEEAAATIQDK

Tableau 3.6 – Liste de peptides marqueurs identifiés dans des échantillons de farines de mouton (*Ovis aries*) provenant du NIFES et du CRA-W.

Protéines	Peptides
Hemoglobin subunit beta (<i>Ovis aries</i>)	FFEHFGLSNADAVMNNPK HHGNEFTPVLQADFQK
Beta-A globin chain (<i>Ovis aries</i>)	HHGSEFTPVLQAEFQK
Alpha globin I (<i>Ovis aries ophion</i>)	VGGNAGAYGAEALER LLSHTLLVTLACHLPNDFTPAVHASLDK

également issus de particules riches en kératine, puisque cette protéine est l'un des constituants majeur des plumes. Ces peptides marqueurs de volaille (*Gallus gallus*) n'ont pas encore été testés pour la production d'anticorps polyclonaux de lapin.

3A. 6.2. Peptides marqueurs de mouton (*Ovis aries*)

Des farines de mouton provenant du NIFES et du CRA-W ont également été utilisées afin de rechercher des peptides marqueurs spécifiques de cette espèce. Les protéines de ces farines ont été extraites par l'HCl ou le TCA-Acétone, ont subi une étape de "Clean-Up" puis ont été digérées par la trypsine pendant cinq heures. La liste de peptides marqueurs spécifiques de mouton est reprise au **tableau 3.6**. La totalité des peptides spécifiques provient de protéines du sang, telles que l'hémoglobine. Une des raisons expliquant le faible nombre de peptides identifiés pour le mouton est que ce dernier n'est pas encore totalement caractérisé au niveau de son génome. Il se peut que dans quelques années, une fois que le génome complet du mouton sera caractérisé, un plus grand nombre de peptides marqueurs spécifiques d'*Ovis aries* pourra être identifié. Ces quelques peptides n'ont pas encore été testés pour la production d'anticorps polyclonaux de lapin.

3A. 7. Etude de la sensibilité et limite de détection

Un des objectifs de ce travail est de pouvoir déterminer la sensibilité de l'approche peptidomique/protéomique et sa limite de détection pour des particules animales présentes dans une farine. La méthode officielle européenne d'analyse des farines animales, la microscopie optique, peut par exemple détecter la présence d'une particule animale sous la forme de protéines animales transformées (PATs) jusqu'à des concentrations relatives de 0.1 % (Liu et al., 2011). L'idéal serait donc d'atteindre des niveaux similaires de détection pour pouvoir détecter, par exemple, la présence d'un peptide de bovin en faible concentration dans une farine de porc ou *vice versa*. Afin d'évaluer la sensibilité et la limite de détection de cette approche peptidomique, une analyse sur différents mélanges de farines a été réalisée.

3A. 7.1. Profil protéique sur gel des "mix" de farines

Le profil protéique sur gel de différents mélanges de farine extraits selon deux méthodes d'extraction protéique (TCA-Acétone & HCl) a été réalisé. Un premier mélange de type porc – bovin (PB) a été effectué. Plus précisément, de la farine de bovin (échantillon G', CRA-W) a été mélangée à une farine de porc (échantillon C', CRA-W) à raison de 0 %, 1 %, 5 % ou 10 %. Le but général de cette expérience est de préciser à quelles concentrations relatives en farines de bovin les peptides de bovin sont effectivement détectés dans la farine de porc.. Cependant, bien que la farine de porc soit considérée comme une farine « pure », sa composition exacte n'est pas totalement connue. En effet, les farines animales sont des mélanges hétérogènes, et on ne peut exclure la présence de particules de bovin contaminantes. Afin de ne pas obtenir de résultats biaisés, un second mélange de farine a été réalisé : une farine 100 % végétale où a été ajoutée de la farine de bovin à 0, 1, 5 ou 10 %. Cette farine végétale, provenant du CRA-W, est une farine purement végétale destinée à l'alimentation des chevaux. Dans ce cas, cette farine ne contient pas de particules animales pouvant biaiser les résultats.

Ces mélanges ont donc été extraits selon deux méthodes d'extraction protéique différentes (TCA-Acétone & HCl) et les extraits protéiques déposés sur un gel Tris-Glycine 18 % (**Figure 3.10**). Puisque différentes quantités relatives de farine de bovin ont été ajoutées à ces échantillons de porc et de produits végétaux, on pourrait s'attendre à une différence au niveau

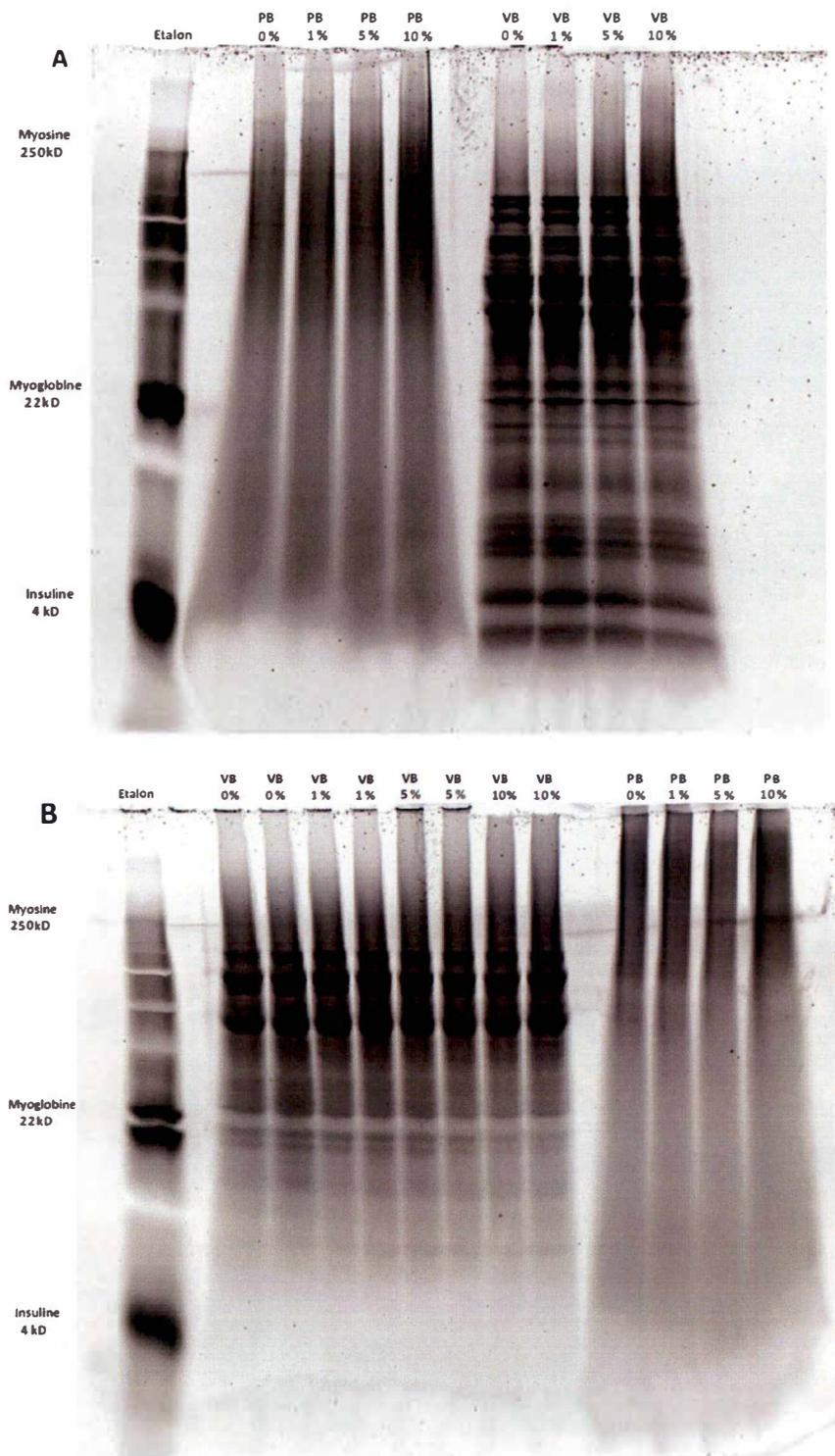


Figure 3.10 – Gel Tris-Glycine 18 % illustrant le profil protéique de mélanges de farines Végétal – Bovin (VB) et Porc – Bovin (PB) selon deux méthodes d'extraction protéique (A : TCA-Acétone, B : HCl). Des mélanges végétal – bovin (0, 1, 5 et 10 % de farine de bovin dans une farine végétale) et des mélanges porc – bovin (0, 1, 5 et 10 % de farine de bovin dans une farine de porc) ont été extraits soit au TCA-Acétone (A), soit à l'HCl (B). Les échantillons ont ensuite subi une étape de "Clean-Up", avec resuspension de l'extrait protéique dans du DLA, avant d'être analysés par électrophorèse. L'étalon protéique utilisé est le SeeBlue® Plus2 Prestained Standart kit. Le gel est coloré au krypton à 480 V (gel A) et à 450 V (gel B) par un scanner de type Typhoon 9420 (Amersham Biosciences, GE).

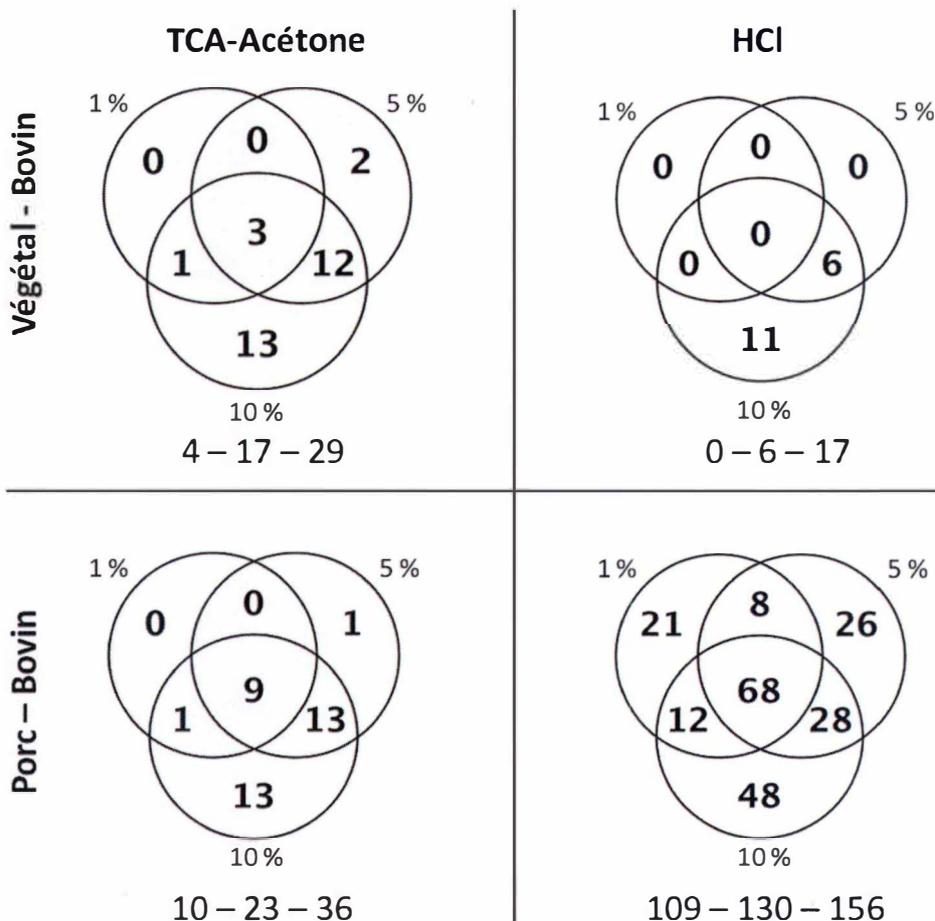


Figure 3.11 – Diagrammes de Venn illustrant le nombre de peptides de bovin identifiés dans différents mélanges de farines (Végétal – Bovin & Porc – Bovin), selon deux méthodes d'extraction protéique différentes (TCA-Acétone & HCl). Les protéines ont été extraites suivant les deux méthodes d'extraction avant de subir une étape de "Clean-Up", avec resuspension des extraits protéiques dans du RapiGest 0,2 %. Les extraits ont ensuite été digérés enzymatiquement par la trypsine (ratio trypsine/protéine, 1/20) pendant 5 heures avant leur analyse MS/MS.

Tableau 3.7 – Liste des peptides spécifiques de bovin retrouvés dans les échantillons de mélange Végétal – Bovin (VB) et Porc – Bovin (PB), pour deux méthodes d'extractions protéiques différentes (TCA-Acétone & HCl).

Protéine	Peptides	Echantillons
Hemoglobin subunit alpha (<i>Bostaurus</i>)	AVEHLDDLPGALSESDLHAHK	VB 10 %, HCl VB 5 % & 10 %, TCA PB 5 % & 10 %, TCA
Heat shock protein beta-1 (<i>Bostaurus</i>)	ALPAAAIIEGPAYNR SATQSAEITIPVTFQAR	PB 10 %, HCl /

du profil protéique. Cependant, en observant ces deux gels, aucune différence ne peut être décrite suivant les concentrations relatives croissantes en matériel bovin (de 0 % à 10 %). Par contre, une différence entre échantillons (végétal versus animal) et méthodes d'extractions peut être observée. En effet, il apparaît clairement que les méthodes utilisant le TCA-Acétone (**Figure 3.10 – A**) ou l'HCl (**Figure 3.10 – B**) extraient de manière différente les protéines végétales, puisque le profil protéique est sensiblement différent entre ces mélanges « VB ». L'extraction TCA-Acétone semble d'ailleurs plus efficace pour extraire les protéines végétales, puisque un plus grand nombre de bandes protéiques peuvent être observées lorsque le TCA-Acétone est utilisé (A) comparé à l'HCl (B). Il faut savoir que les farines végétales sont soumises à des traitements moins drastiques que les farines d'origine animale. De plus, leur composition est assez différente d'une farine animale, cette farine végétale contenant diverses espèces végétales, des cendres brutes, des polysaccharides, du gluten, ... (**Figure supplémentaire S6**). Ces farines végétales pourraient donc exercer un effet de matrice important, ce qui aurait des répercussions sur le profil protéique sur gel.

3A. 7.2. Analyse MS des échantillons « mix »

Une analyse en spectrométrie de masse de ces mélanges PB et VB fut ensuite effectuée. Les échantillons ont été digérés enzymatiquement par la trypsine pendant cinq heures puis envoyés vers le spectromètre de masse pour leur analyse MS/MS. Les diagrammes de Venn illustrant le nombre de peptides de bovin identifiés dans ces différents mélanges et selon les deux modes d'extractions protéiques sont représentés à la **figure 3.11**. Ces diagrammes suggèrent l'identification d'un certain nombre de peptides de bovin et cela même pour des mélanges à 1 %, tel que représenté dans les mélanges VB – TCA-Acétone, PB – TCA-Acétone & PB – HCl (4, 10 et 109 peptides de bovins identifiés, respectivement). Aussi, une différence apparaît entre les échantillons VB et PB, notamment pour l'extraction HCl. En effet, le nombre de peptides bovins identifiés dans le mélange PB – HCl est nettement plus important que dans le mélange VB – HCl. Une explication avancée de façon à expliquer cette différence serait un possible effet de matrice créé par la farine végétale. En effet, puisque la majorité de l'échantillon VB est constitué en majorité de protéines végétales et autres molécules d'origines végétales, ce mélange complexe a, semble-t-il, influencé le processus d'extraction protéique. Pour les mélanges PB, le nombre de peptides de bovin identifiés est clairement supérieur avec l'extraction HCl, comparée à l'extraction TCA-Acétone. Par exemple, pour le mélange à 1 %, 109 peptides ont été identifiés avec l'extraction HCl et 10 seulement avec l'extraction TCA-Acétone.

Pour chaque échantillon, une évaluation spécifique des peptides de bovin sélectionnés pour la production d'anticorps polyclonaux de lapin a été réalisée. Le but est de déterminer la présence ou non de ces peptides dans ces mélanges de farines et à quelles concentrations relatives. Ainsi, il apparaît que le peptide de la sous-unité alpha de l'hémoglobine de *Bos taurus* est identifié dans les échantillons VB – TCA et PB – TCA à des concentrations relatives de 5 et 10 % (**Tableau 3.7**). En ce qui concerne l'extraction HCl, ce peptide n'est identifié que dans l'échantillon VB à la concentration relative de 10 %. Parmi les deux peptides appartenant à la protéine HSP- β 1 de *Bos taurus*, seul le peptide ALPAAAIEGPAYNR est identifié et uniquement dans l'échantillon PB – HCl à la concentration relative de 10 %. Cependant, comme décrit précédemment, cela ne veut pas dire que ces peptides ne sont pas présents. Tout dépend du score de probabilité d'identification choisi par l'expérimentateur mais également du type d'analyse réalisé sur ces mélanges de farine. En effet, une analyse MS/MS a été réalisée sur ces mélanges afin d'obtenir ces résultats. Un scan en mode MS/MS ne laisse passer que certains peptides lors de l'analyse et il arrive que des peptides, en quantité moindre, ne soient pas analysés. Dès lors, l'utilisation

d'un appareillage différent, un triple quadrupôle par exemple, pourrait être utilisé de façon à détecter les peptides présents en plus petites quantités. Une analyse prospective de différents mélanges de farines au moyen d'un triple quadrupôle a été réalisée en collaboration avec le CER (Marloie) et sera plus amplement décrite dans la partie « Discussion générale, Conclusion et Perspectives » de ce mémoire.

3A. 8. Résumé

La première partie de ce travail avait pour but de réaliser une étude peptidomique/protéomique sans *a priori* sur des farines animales de natures différentes afin d'identifier/confirmer un certain nombre de peptides marqueurs spécifiques d'espèces particulières. De façon à identifier ces peptides marqueurs, plusieurs méthodes d'extraction protéique ont été testées afin d'extraire les protéines présentes dans ces farines. Des analyses ont été réalisées de façon à sélectionner la ou les méthodes d'extraction les plus efficaces. Cette efficacité a été évaluée selon plusieurs critères, notamment la facilité d'extraction de la méthode, la quantité de protéines obtenue et le nombre de peptides uniques identifiés pour chaque méthode testée. Ce sont finalement les méthodes utilisant le TCA-Acétone et l'HCl qui ont été retenues pour la plupart des analyses réalisées au cours de ce mémoire.

Un certain nombre de peptides marqueurs de bovin, de porc, de volaille et de mouton ont à ce jour pu être identifiés. Alors que certains peptides n'ont pas encore été testés pour la production d'anticorps, d'autres ont déjà montré des résultats satisfaisants (Voir Partie C des Résultats).

Le degré de sensibilité et de spécificité de l'approche peptidomique/protéomique a également été étudié dans des expériences préliminaires au moyen de différents mélanges de farine. La méthode développée permet d'identifier certains peptides spécifiques de bovin présents dans des mélanges même à des concentrations relatives de 1 à 5 %. Une perspective future serait donc de tenter de diminuer cette limite de détection de façon à se positionner au même niveau de sensibilité que la microscopie optique.

Partie B – Adaptations de l'approche peptidomique/protéomique en vue d'un protocole de routine court, efficace et flexible

La première partie de ce mémoire consistait en une analyse sans *a priori* de farines animales afin d'identifier des peptides marqueurs spécifiques de ces farines. Dans ce but, des protocoles d'extraction, de purification et de digestion ont été testés afin de rechercher le plus grand nombre de ces peptides marqueurs. A partir du moment où l'extraction protéique débute et jusqu'au moment où les peptides sont analysés en spectrométrie de masse, environ une semaine d'expériences est nécessaire. Puisque ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet financé par le SPF Santé publique, nous avons aussi essayé de répondre à la recommandation de développer un protocole court et applicable en analyses de routine par des agences publiques de sécurité alimentaire. Dans ce but, les différentes étapes de l'approche peptidomique/protéomique décrite dans la partie A (se référer à la **Figure 3.2**) ont été optimisées de façon à réduire ce temps d'expérimentation.

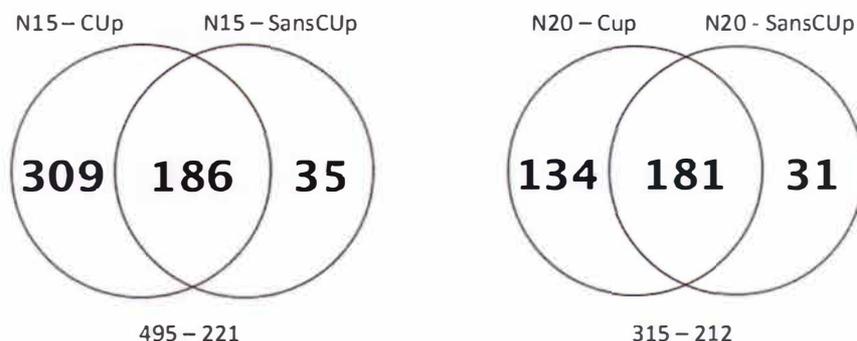


Figure 3.12 – Diagrammes de Venn illustrant l'efficacité du "Clean-Up" au niveau du nombre de peptides identifiés dans un échantillon de porc (N15) et de bovin (N20). Des échantillons de farine de porc et de bovin ont été traités à l'HCl de façon à extraire leurs protéines. L'extrait protéique a ensuite subi une étape de "Clean-Up" ou non (CUp ou SansCUp) et le culot est resuspendu dans du RapiGest 0,2 %. Les extraits ont alors été digérés enzymatiquement par la trypsine (ratio trypsine/protéine, 1/20) pendant 5 heures avant leur analyse MS/MS.

Tableau 3.8. A – Liste des peptides marqueurs de bovin retrouvés dans les échantillons ayant subi ou non une étape de "Clean-Up".

<u>Protéine</u>	<u>Peptides</u>	<u>Echantillons</u>
Hémoglobine subunit alpha (<i>Bos taurus</i>)	AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK	N15 CUp N20 CUp
Heat shock protein beta-1 (<i>Bos taurus</i>)	ALPAAAIEGPAYNR SATQSAEITIPVTFQAR	N20 CUp & SansCUp /

Tableau 3.8. B – Liste des peptides marqueurs de porc retrouvés dans les échantillons ayant subi ou non une étape de "Clean-Up".

<u>Protéine</u>	<u>Peptides</u>	<u>Echantillons</u>
Desmin (<i>Sus scrofa</i>)	TSGGAGGLGPLR	N15 CUp
Carbonic anhydrase-3 (<i>Sus scrofa</i>)	GGPLTAAYR HDPSLLPWTASYDPGSAK	/ /
Heat shock protein beta-1 (<i>Sus scrofa</i>)	PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR	/

3B. 1. Etude de l'efficacité de l'étape de "Clean-Up"

Après chaque extraction, les extraits protéiques subissent une étape de "Clean-Up" (GE Healthcare, USA). Cette étape a plusieurs fonctions : éliminer les détergents non compatibles avec une analyse MS, concentrer et purifier les échantillons protéiques. Cependant, le coût du kit de "Clean-Up" et le temps requis pour cette étape (environ une journée) nous ont conduits à mener une étude permettant d'évaluer son efficacité. Une étude préliminaire réalisée sur des échantillons du CRA-W avait déjà été effectuée auparavant, cette étude suggérant l'efficacité du "Clean-Up" (Projet Peptidogénomique RF N°11/6243, thèse d'Hélène Marbaix). Cependant, puisque la majorité des farines animales utilisées dans ce mémoire proviennent du NIFES, une analyse similaire a été effectuée sur ces farines. Dans ce but, deux échantillons de farines animales (N15 : porc, N20 : bovin) ont été sélectionnés pour réaliser cette analyse. Ces échantillons ont été extraits par la méthode protéique utilisant l'HCl et les extraits protéiques ont subi ou non une étape de "Clean-Up" avant d'être digérés enzymatiquement par la trypsine. Ces peptides ont ensuite été analysés en spectrométrie de masse et le nombre de peptides identifiés pour chaque échantillon est représenté par des diagrammes de Venn, tels que présentés à la **figure 3.12**. Ces diagrammes suggèrent que le nombre de peptides identifiés dans chaque échantillon est plus élevé après une étape de "Clean-Up" (CUp), comparé à une extraction sans "Clean-Up" (SansCUp). En effet, le nombre de peptides identifiés après "Clean-Up" dans l'échantillon de porc (N15) est de 495, comparé aux 221 peptides identifiés lorsque le "Clean-Up" n'est pas réalisé. La même tendance est observée dans l'échantillon de bovin (N20), où le nombre de peptides identifiés lorsque le "Clean-Up" est effectué est de 315, comparé aux 212 peptides identifiés lorsqu'aucune étape de "Clean-Up" n'est accomplie. Ensuite, une évaluation de la présence des trois peptides de bovin et des quatre peptides de porc sélectionnés pour la production d'anticorps a été réalisée. Le but est de déterminer la présence de ces peptides dans ces échantillons de porc et de bovin, et dans quelles conditions ("Clean-Up" ou sans "Clean-Up"). Il apparaît que la plupart de ces peptides sont identifiés dans les échantillons ayant subi ce "Clean-Up", tel que représenté aux **tableaux 3.8 A & B**. Bien que les peptides bovins aient été identifiés dans les échantillons « CUp », seul le peptide dérivé de la desmine de *Sus scrofa* a été identifié. Même si on ne peut exclure un effet matrice variable d'un peptide à l'autre, il faudrait répéter cette expérience afin de vérifier la présence de ces peptides de porc dans les échantillons analysés lorsque le "Clean-Up" est réalisé ou non.

Ces résultats suggèrent, dans l'ensemble, que l'étape de "Clean-Up" est importante et devrait être conservée lors d'analyses ultérieures.

3B. 2. Réduction et alkylation des protéines

Avant la digestion enzymatique des protéines, plusieurs étapes de préparation de ces dernières sont nécessaires afin d'optimiser l'action de l'enzyme utilisée. Les protéines sont en effet caractérisées par une structure tertiaire, cette conformation étant notamment conservée par la présence de ponts disulfures entre certains résidus cystéine de la protéine. Afin de faciliter la digestion enzymatique, ces ponts disulfures doivent être rompus. Une façon de réaliser cela est de réduire ces ponts disulfures au moyen de DTT (dithiothréitol). Afin que ces liaisons ne se reforment pas, de l'iodoacétamide (IAA) est également ajoutée à l'extrait protéique. L'IAA est un agent alkylant réagissant avec les résidus cystéine libres en bloquant leur réoxydation (Gundry et al., 2009). De cette façon, la protéine en solution se retrouve sous une conformation dépliée, offrant un accès aisé à l'enzyme au niveau de ses nombreux sites de clivage. Cependant, une hypothèse a été émise selon laquelle les protéines extraites à partir

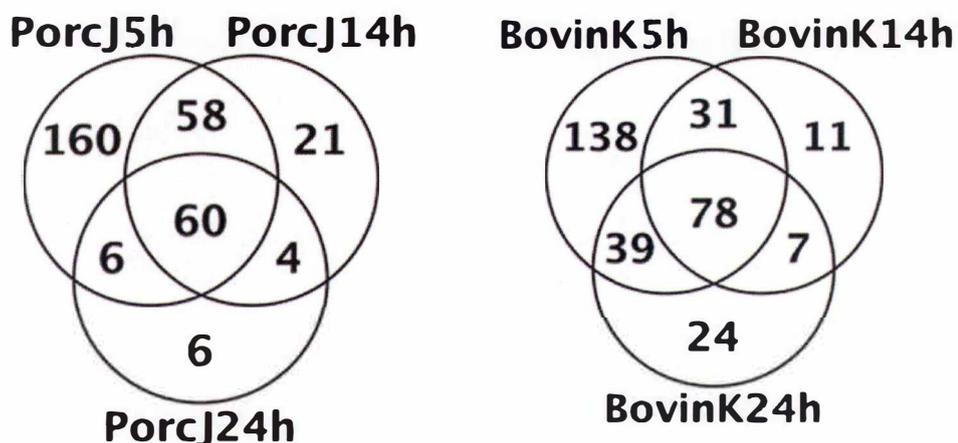


Figure 3.13 – Diagrammes de Venn illustrant l'effet comparatif de différents temps de digestion enzymatique à la trypsine (5h, 14h & 24h) sur deux échantillons du CRA-W (J : Porc ; K : Bovin) sur le nombre de peptides identifiés pour chacun de ces temps de digestion. Les échantillons ont été traités au TCA-Acétone pour ensuite subir une étape de "Clean-Up", avec resuspension du culot dans du RapiGest 0,2 %. Les extraits protéiques ont ensuite été digérés enzymatiquement par la trypsine (ratio trypsine/protéine, 1/20) pendant 5h, 14h ou 24h avant leur analyse MS/MS.

Tableau 3.9 – Effets du temps de trypsinisation sur le nombre de peptides identifiés

Nombre de peptides identifiés		
Temps	Echantillon de porc	Echantillon de bovin
5 h	284	286
14 h	143	127
24 h	76	148

d'une farine animale sont déjà présentes en grande partie avec une conformation dépliée. En effet, le traitement de ces farines (exposition à des température et pression élevées) favorise la dénaturation de ces protéines. Une expérience a donc été réalisée sur des échantillons de farine, où les étapes de réduction et d'alkylation (par DTT et IAA) réalisées en amont de la trypsinisation n'ont pas été effectuées. Après l'analyse MS, une recherche théorique sur les peptides a été réalisée dans ProteinScape. Très peu de modifications carbamidométhyles peuvent être observées chez ces peptides. De plus, en analysant la séquence des différents peptides identifiés, on remarque que ces derniers ne contiennent qu'un nombre minime de cystéines dans leur séquence en acides aminés (résultats non montrés). Cette observation tend donc à confirmer l'hypothèse suggérant que l'utilisation de DTT et d'IAA n'est, en fin de compte, pas nécessaire.

3B. 3. Diminution du temps de digestion enzymatique

La digestion enzymatique à proprement dite des protéines issues de l'extraction protéique des farines animales est également une étape demandant un certain temps d'expérience. En effet, dans la majorité des expériences réalisées en peptidomique, une digestion enzymatique réalisée pendant toute une nuit est généralement requise. Cependant, ce temps important n'est pas compatible avec un protocole de « routine » et doit donc être réduit. Une étude préliminaire a également été réalisée dans ce but, où des échantillons ont été digérés pendant vingt-quatre heures ou cinq heures par la trypsine. Ces résultats ont suggéré une plus grande quantité de peptides identifiés à cinq heures de digestion par rapport aux vingt-quatre heures (Projet Peptidogénomique RF N°11/6243, thèse d'Hélène Marbaix).

Néanmoins, une nouvelle étude comparative du temps de digestion enzymatique a été réalisée, incorporant dans celle-ci un temps intermédiaire de quatorze heures (ce temps correspondant en réalité à un temps « overnight » comme habituellement décrit dans la littérature). Le but est de déterminer si le temps de digestion enzymatique de cinq heures reste efficace en terme de nombre de peptides identifiés. Les protéines de deux échantillons du CRA-W (J : porc, K : bovin) ont été extraites par le TCA-Acétone, ont subi une étape de "Clean-Up" puis ont été digérées enzymatiquement par la trypsine pendant cinq, quatorze ou vingt-quatre heures avant leur analyse MS. Les diagrammes de Venn suggèrent que le nombre de peptides identifiés pour chaque échantillon est plus élevé lorsqu'une digestion de cinq heures est effectuée, par rapport aux autres temps de digestion testés (**Figure 3.13 & Tableau 3.9**). Il semble même que le nombre de peptides identifiés diminue en fonction du temps de trypsinisation. En effet, le nombre respectif de peptides de porc et de bovin identifiés à cinq heures est de 284 et de 286, alors qu'il n'est que de 76 et 148 peptides à vingt-quatre heures. Cette tendance générale est tout à fait particulière aux farines animales. En effet, de nombreuses études ont été réalisées sur le temps nécessaire requis pour une digestion enzymatique optimale. Il apparaît que dans le cas d'un échantillon protéique complexe (ex : une combinaison de 45 protéines plasmatiques), le temps de digestion enzymatique requis est généralement supérieur à cinq heures (Proc et al., 2010). Cette observation a d'ailleurs été confirmée par Hustoft et al, qui ont montré qu'un temps de digestion plus long était nécessaire pour un échantillon comportant un mélange de protéines (BSA, lysozyme, cytochrome-c & α -lactalbumine) par rapport à un échantillon n'en contenant qu'une (Hustoft et al., 2011). Les protéines se comportent donc de manière différente en fonction de l'environnement et de la complexité du mélange dans lequel elles se trouvent. Puisqu'une farine animale constitue un mélange complexe de protéines, une digestion enzymatique plus longue aurait donc du être observée.

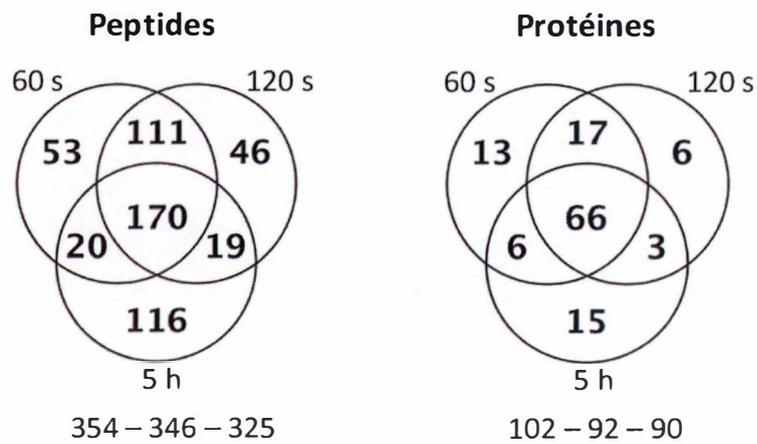


Figure 3.14 – Diagrammes de Venn illustrant le nombre de peptides et de protéines identifiés à différents temps de digestion enzymatique par la trypsine, pendant 60 s ou 120 s avec sonication et 5 h sans sonication.

Tableau 3.10 – Peptides marqueurs spécifiques de porc identifiés dans les échantillons 60 s, 120 s et 5 h.

Protéine	Peptides	Echantillons
Desmin (<i>Sus scrofa</i>)	TSGGAGGLGPLR	60 s, 120 s
Carbonic anhydrase 3 (<i>Sus scrofa</i>)	GGPLTAAYR HDPSLLPWTASYDPGSAK	60 s, 120 s /
Heat shock protein beta-1 (<i>Sus scrofa</i>)	PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR	/

Dans tous les cas, puisqu'un temps de digestion enzymatique de cinq heures s'est avéré plus efficace pour les échantillons utilisés dans ce travail, les temps de digestion enzymatique plus longs (14 heures ou 24 heures) ont donc définitivement été abandonnés.

Le temps de digestion enzymatique reste, même pour une durée de cinq heures, une étape limitante au développement d'un protocole de routine. Cependant, plusieurs façons permettant de réduire ce temps de digestion ont été décrites (Capelo et al., 2009, Switzar et al., 2013). Des méthodes utilisant des rayons infrarouges, des micro-ondes, des ultrasons ou une température de digestion plus élevée auraient ainsi la capacité de diminuer considérablement ce temps de digestion enzymatique. Parmi ces méthodes, celle utilisant les ultrasons a été évaluée dans ce mémoire, en se basant sur des protocoles expérimentaux décrits dans la littérature (Lopez-Ferrer et al., 2005, Rial-Otero et al., 2007). Pour ce faire, un échantillon de porc (C') a subi une extraction protéique à l'HCl, suivie par une étape de "Clean-Up". Cet échantillon a ensuite été digéré enzymatiquement par la trypsine avec sonication pendant soixante secondes (60 s) ou cent-vingt secondes (120 s). Une digestion normale de cinq heures (5 h) (sans sonication) a également été réalisée sur cet échantillon. Les échantillons « 60 s » et « 120 s » ont été soniqués en présence de trypsine, à une amplitude de 70 % et un cycle de 1 (mode continu). Les diagrammes de Venn représentant le nombre de protéines et peptides identifiés pour chaque temps de digestion/sonication sont illustrés à la **figure 3.14**. Ces diagrammes suggèrent que la digestion enzymatique avec sonication fonctionne relativement bien, puisqu'un certain nombre de peptides (53) et protéines (13) ont été spécifiquement identifiés au temps « 60 s ». De plus, il apparaît que le nombre total de peptides et protéines identifiés est supérieur au temps « 60 s » par rapport aux autres temps de digestion : 354 peptides ont été identifiés à « 60 s » tandis que 325 peptides ont été identifiés à « 5 h » sans sonication. Bien que cette différence en terme de nombre de peptides soit légère, ces résultats restent pour le moins encourageants dans le but de développer un protocole d'analyse court et efficace.

La recherche de peptides marqueurs spécifiques de porc dans ces échantillons a également été réalisée (**Tableau 3.10**). Il apparaît que le peptide appartenant à la desmine de *Sus scrofa* est retrouvé uniquement dans les échantillons « 60 s » et « 120s ». Le peptide GGPLTAAYR correspondant à l'anhydrase carbonique-3 de *Sus scrofa* est également retrouvé dans les échantillons « 60 s » et « 120 s » et cela avec un score de probabilité d'identification supérieur ou égal à 95 %. Il semble cependant que ce peptide ait été également identifié dans l'échantillon « 5 h », mais pour un score de probabilité de 84 %. Les deux autres peptides de porc, notamment le peptide de la HSP- β 1 de *Sus scrofa*, n'ont pas été retrouvés dans ces échantillons. La recherche d'autres peptides de porc (n'ayant pas encore été testés pour la production d'anticorps) à partir d'une liste plus exhaustive pourrait certainement confirmer l'intérêt d'utiliser cette méthode de digestion enzymatique « ultra-rapide ».

Quoi qu'il en soit, ces résultats sont encourageants pour la suite et une digestion de soixante secondes avec sonication sera privilégiée par rapport à une digestion de cinq heures.

3B. 4. Diminution du temps d'extraction protéique

L'étape qui nécessite le plus de temps reste la première étape : l'extraction protéique des farines animales. Dans un protocole « normal » d'extraction, le temps requis pour obtenir un extrait protéique est d'environ de deux à trois jours pour les extractions utilisant l'HCl et le TCA-Acétone. Afin de diminuer ce temps d'extraction tout en garantissant son rendement, différents protocoles « accélérés » ont été testés.

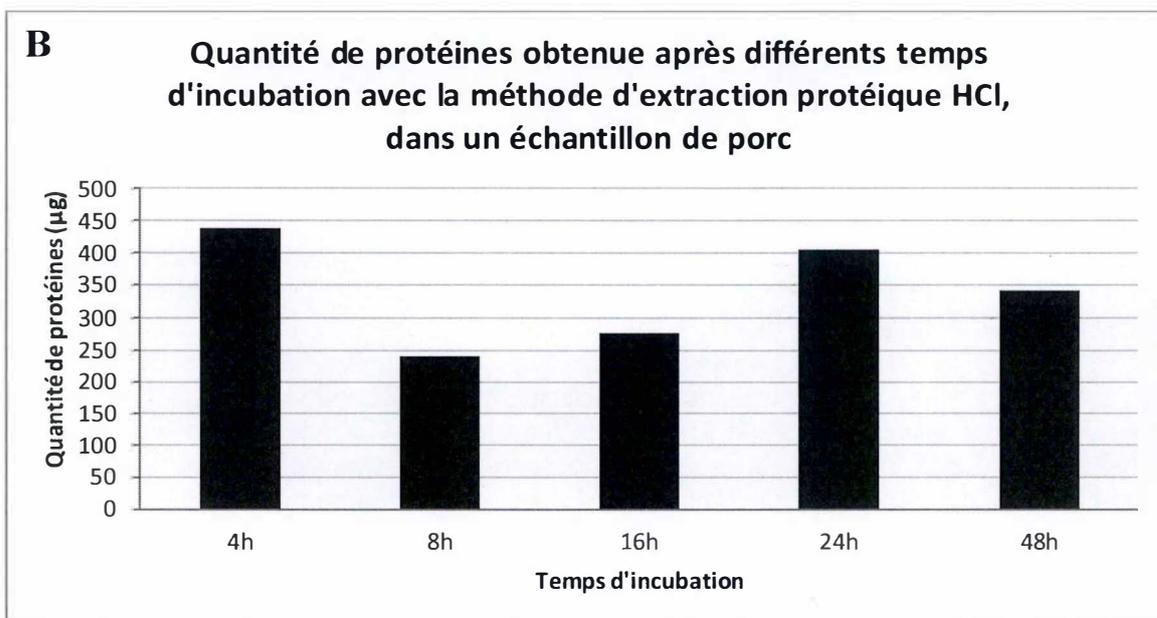
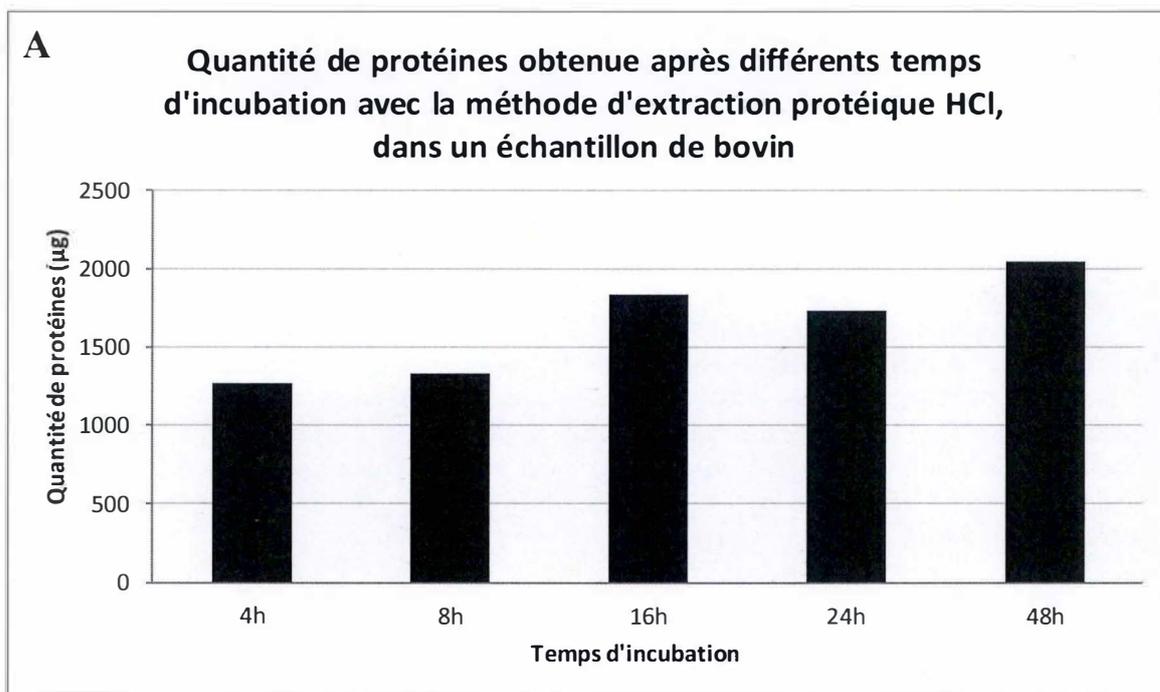


Figure 3.15 – Comparaison de l'efficacité de la méthode d'extraction protéique utilisant l'HCl selon différents temps d'incubation, sur un échantillon de bovin (A) et un échantillon de porc (B). Quarante mg de farines de bovin et de porc ont été extraits par la méthode HCl, selon différents temps d'incubation : 4 h, 8 h, 16 h, 24 h et 24 h. La quantité de protéines (µg) récoltées pour chaque échantillon est évaluée selon les différents temps d'incubation.

3B. 4.1. Réduction du temps d'extraction TCA-Acétone

Un protocole d'extraction TCA-Acétone « normal » nécessite un peu plus de quarante-huit heures d'expérience. Cependant, puisque certaines étapes de ce protocole sont nécessaires au bon fonctionnement de cette extraction, un protocole fortement raccourci est difficile à mettre en œuvre. Néanmoins, un nouveau protocole « court » a été testé, ce dernier ne durant qu'une journée et demie. En fin d'extraction, les extraits sont resuspendus soit dans du DLA, soit dans un tampon de lyse rendant ces extraits compatibles avec une analyse ELISA. Les résultats obtenus suggèrent que ces protocoles raccourcis fonctionnent relativement bien, même si le nombre de peptides identifiés pour chacun d'eux est inférieur par rapport au protocole normal. De plus, les peptides marqueurs spécifiques de porc et de bovin testés pour la production d'anticorps ont bien été identifiés dans chacune de ces extractions (Thèse d'Hélène Marbaix).

3B. 4.2. Réduction du temps d'extraction HCl

Dans un protocole « normal » d'extraction protéique à l'HCl, quarante-huit heures sont nécessaires afin d'extraire les protéines animales (Jiang et al., 2007, Buckley et al., 2008). Puisque le but de ce mémoire est également de développer un protocole court adaptable en analyses de routine, une étude réduisant ce temps d'extraction a été réalisée. Pour ce faire, deux échantillons du CRA-W (C' : porc, G' : bovin) ont été extraits par la méthode HCl selon différents temps d'incubation : 4 h, 8 h, 16 h, 24 h et 48 h (temps « normal »). Les quantités de protéines obtenues après chacune de ces extractions et pour chaque échantillon sont représentées à la **figure 3.15**. Ces résultats suggèrent qu'après seulement quatre heures d'extraction à l'HCl, les quantités de protéines (μg) sont relativement élevées, à la fois pour l'échantillon de bovin (A) et de porc (B). En effet, environ 440 μg de protéines ont été extraits après quatre heures d'extraction, alors que seulement 340 μg de protéines l'étaient après quarante-huit heures d'extraction, dans l'échantillon de porc (à partir de 40 mg de farine de départ). En ce qui concerne l'échantillon de bovin, environ 1300 μg de protéines ont été obtenus après quatre heures d'extraction, par rapport aux 2000 μg de protéines obtenus après un temps d'extraction de quarante-huit heures. Bien que les résultats après quatre heures suggèrent une quantité de protéines plus faible (pour l'échantillon de bovin), cette quantité n'en reste pas moins relativement importante.

Ces résultats d'extractions « courtes » suggèrent donc que l'extraction HCl de quatre heures pourrait être utilisée de façon routinière. Cependant, une analyse en spectrométrie de masse des peptides obtenus après ces quatre heures doit encore être réalisée, de façon à évaluer la présence de peptides marqueurs dans ces échantillons. Si un certain nombre de ces peptides marqueurs sont identifiés, alors ce temps d'extraction pourra être conservé pour des analyses ultérieures.

Il serait également intéressant d'évaluer le déroulement d'un protocole complet « accéléré ». Par exemple, un protocole d'extraction par l'HCl de quatre heures, suivi par une étape de "Clean-Up" et terminé par une digestion enzymatique par la trypsine avec sonication pendant soixante seconde. Ce protocole « accéléré » ne prenant que deux jours (au lieu des cinq jours habituels) pourrait alors, si les résultats MS s'avèrent satisfaisants, être appliqué comme protocole standard pour les analyses de routine.

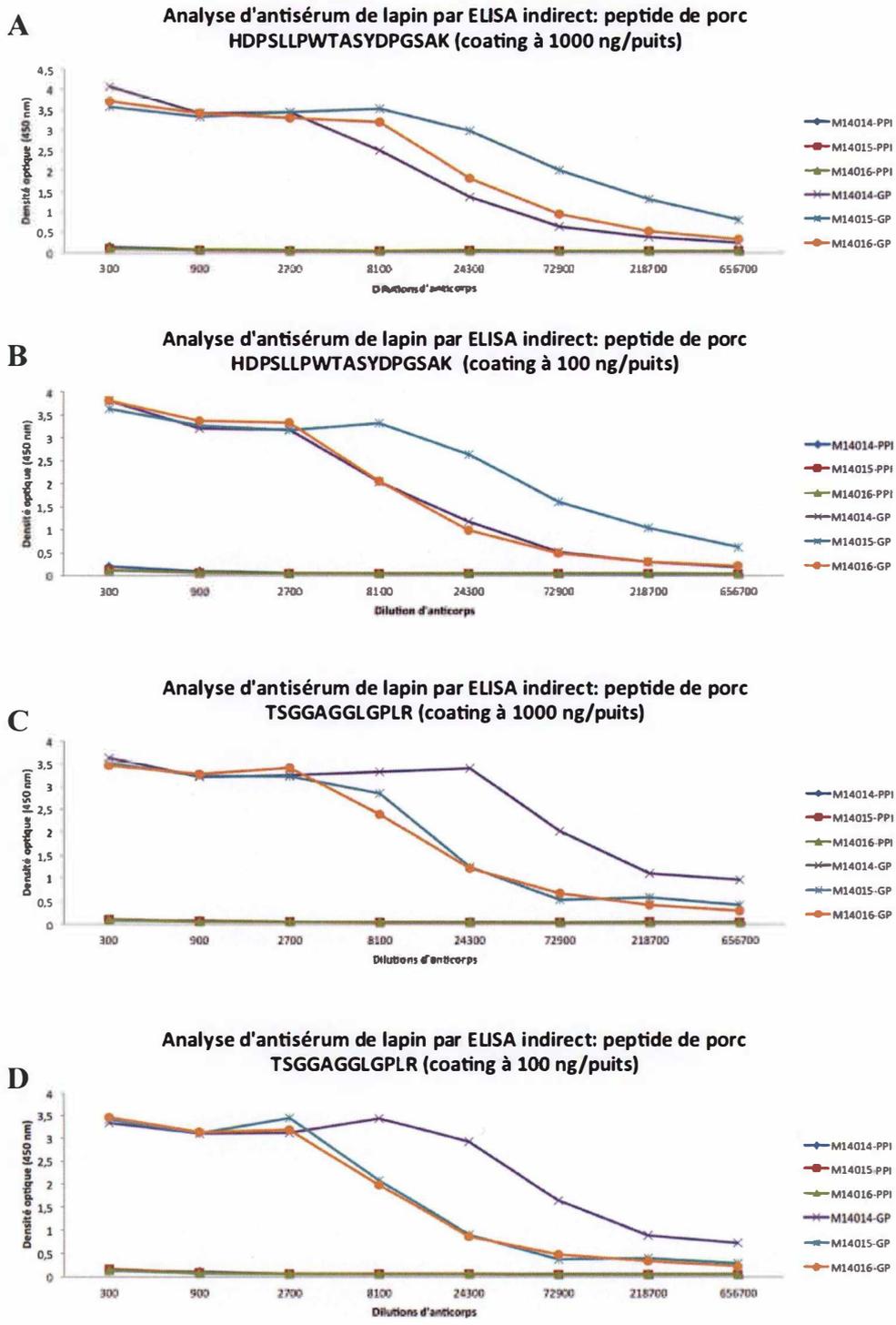


Figure 3.16 – Tests ELISA indirects réalisés sur deux peptides de porc sélectionnés pour la production d'anticorps polyclonaux de lapin. La densité optique à 450 nm a été mesurée au moyen d'un spectrophotomètre pour des dilutions sériées de l'anticorps d'intérêt. Un anticorps secondaire couplé à une HRP (peroxydase) à été utilisé pour révéler les complexes anticorps primaire-peptide de porc. Peptide de porc HDPSLLPWTASYDPGSAK "coaté" à raison de 1000 ng/puits (A) et de 100 ng/puits (B). Peptide de porc TSGGAGGLGPLR "coaté" à raison de 1000 ng/puits (C) et de 100 ng/puits (D). Les résultats ont été obtenus avec la collaboration du Centre d'Economie Rurale (CER) de Marloie.

3B. 5. Résumé

La seconde partie de ce travail avait pour but d'adapter l'approche peptidomique en vue d'un protocole de routine plus court, efficace et flexible pour les agences publiques de sécurité alimentaire. Des optimisations ont dès lors été réalisées afin de réduire le temps et le coût nécessaire au déroulement de cette approche peptidomique. Parmi ces optimisations, une digestion enzymatique « accélérée » a été proposée, cette dernière suggérant un potentiel élevé par rapport à une digestion enzymatique "habituelle". De même, les protocoles d'extraction protéique, étant des étapes limitantes dans le temps, ont été également réduits. C'est ainsi qu'un protocole d'extraction TCA-Acétone d'une journée et demi et un protocole d'extraction HCl de quatre heures ont prouvé leur efficacité lors de l'extraction protéique des farines animales. L'étude du potentiel de ces protocoles sera poursuivie dans de prochaines expériences (Thèse d'H. Marbaix).

Partie C – Tests de peptides marqueurs spécifiques par la méthode ELISA

L'objectif principal de ce mémoire est d'identifier des peptides marqueurs spécifiques d'espèces présents dans des farines animales. Plusieurs de ces peptides marqueurs ont été identifiés, certains d'entre eux ayant déjà été sélectionnés pour la production d'anticorps polyclonaux de lapin. Le but principal de cette production d'anticorps est d'élargir la gamme d'anticorps disponibles pour la réalisation de tests ELISA sur les farines animales. En effet, les tests ELISA actuellement réalisés sur les farines animales ne sont, pour l'instant, pas encore assez caractérisés et peu reproductibles, même si les méthodes immunologiques pour l'identification d'espèces présentes dans une farine sont utilisées comme méthodes d'analyse alternatives à la méthode microscopique.

Parmi les nombreux peptides de porc et de bovin identifiés dans les farines analysées, trois peptides de bovin et quatre peptides de porc ont initialement été testés pour la production d'anticorps. Ces peptides, synthétisés par Eurogentec (Liège, Belgique), ont ensuite été injectés à des lapins (en général, trois lapins sont utilisés) et des prélèvements de sang réguliers sont réalisés (CER, Marloie). Après environ deux mois d'immunisation, un grand prélèvement de sang (GP) est réalisé en vue de récolter un maximum de sérum contenant les anticorps d'intérêt. Les résultats présentés ci-après ont été réalisés avec la collaboration du CER de Marloie, et présentent les résultats ELISA de deux peptides marqueurs de porc ayant été sélectionnés pour la production d'anticorps. Un premier anticorps de l'anhydrase carbonique 3 de *Sus scrofa* a été analysé par la méthode ELISA. Dans ce but, le peptide HDPSLLPWTASYDPGSAK a été "coaté" au fond de puits d'une plaque 96 puits à raison de 1000 ng de peptide par puits. Des dilutions sériées de l'anticorps spécifique de ce peptide ont été ajoutées à ces puits, où l'anticorps doit normalement reconnaître le peptide et s'y lier. Ensuite, après plusieurs rinçages, un anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire est rajouté dans chaque puits, cet anticorps étant lié à une enzyme (peroxydase) permettant sa révélation et son dosage colorimétrique. Les résultats du test ELISA réalisé sur ce peptide sont décrits à la **figure 3.16 – A**. Les résultats présentés suggèrent qu'avant d'être immunisés par ce peptide de porc (PPI : Prélèvement Pré-Immunsation), les lapins testés (M14014, M14015 & M14016) ne possédaient pas d'anticorps capables de reconnaître ce peptide puisque la densité optique est égale à zéro pour les courbes bleu foncé, rouge et verte. En revanche, après le grand prélèvement (GP), il s'avère que l'immunisation a bien fonctionné puisque des densités optiques proches de quatre sont observées pour chacune des courbes (bleu clair, orange et mauve) lorsque les concentrations d'anticorps sont élevées. Suivant la

dilution de l'anticorps, la densité optique observée diminue. Puisque qu'un "coating" de ce peptide à 1000 ng/puits fonctionne relativement bien, un test réalisé sur des puits "coatés" à 100 ng/puits de ce peptide a également été réalisé. Les résultats de ce test ELISA suggèrent que même à 100 ng/puits, les anticorps dirigés vers le peptide de l'anhydrase carbonique 3 présentent une spécificité relativement élevée (**Figure 3.16 – B**). Ces tests suggèrent donc qu'un "coating" à 100 ng/puits de ce peptide et des dilutions d'anticorps entre 8 100 fois et 24 300 fois peuvent être utilisées.

Un second test ELISA sur le peptide de la desmine de *Sus scrofa* (TSGGAGGLGPLR) a également été réalisé, avec un "coating" de ce peptide à 1000 ng/puits et à 100 ng/puits (**Figure 3.16 – C & D**). De la même manière que le premier test exposé ci-dessus, le prélèvement pré-immunisation suggère que ces lapins ne possédaient pas d'anticorps capables de reconnaître ce peptide testé. Les tests après grand prélèvement suggèrent par contre que des anticorps spécifiques ont été produits contre ce peptide de porc. De plus, il s'avère qu'à une concentration de 100 ng/puits de ce peptide, le test ELISA se révèle aussi satisfaisant qu'à une concentration de 1000 ng/puits. Une diminution de la densité optique peut être observée à des dilutions d'anticorps comprises entre 8 100 et 24 300 fois. Ces tests suggèrent donc qu'un "coating" à 100 ng/puits du peptide et une dilution d'environ 20 000 fois de cet anticorps sont des conditions favorables à la réalisation d'autres tests ELISA.

**DISCUSSION GÉNÉRALE,
CONCLUSION &
PERSPECTIVES**

4. Discussion générale, Conclusion et Perspectives

Une méthode peptidomique/protéomique visant à analyser les farines animales dans le but d'identifier des peptides marqueurs spécifiques de ces farines a été développée au cours de ce mémoire. La majeure partie des analyses effectuées sur ces farines ont été réalisées sans *a priori*. En effet, une analyse ciblée sur ces farines n'aurait, par exemple, pas permis d'identifier un nombre suffisant de peptides marqueurs spécifiques et de déterminer les méthodes d'extraction protéique les plus reproductibles et fournissant une quantité importante de ces peptides. C'est d'ailleurs grâce à cette méthode sans *a priori* que les protocoles d'extraction utilisant l'HCl et le TCA-Acétone ont été sélectionnés pour de futures analyses. Grâce à cette méthode, 22 peptides de porc, 25 peptides de bovin et plus d'une cinquantaine de peptides de volaille ont pu être identifiés. Certains de ces peptides de porc et bovin sont d'ailleurs actuellement testés pour la production d'anticorps polyclonaux afin de développer des tests ELISA plus spécifiques sur les farines animales, au CER de Marloie.

La transmission de cette méthode peptidomique à des agences publiques pour la sécurité alimentaire a nécessité le développement d'un protocole dit « de routine ». De façon à mettre au point cette procédure de routine, c'est-à-dire un protocole court tout en permettant d'identifier le plus grand nombre de peptides marqueurs, des optimisations ont été réalisées. A partir d'un protocole nécessitant environ une semaine d'analyses, il a été possible de réduire ce temps d'expérimentation à deux jours. Parmi les optimisations proposées, un temps d'extraction HCl de quatre heures et une digestion enzymatique accélérée (ne prenant qu'une minute) à l'aide d'un sonicateur ont prouvé leur efficacité.

Les résultats présentés dans ce mémoire ont ainsi permis de répondre en partie aux exigences européennes concernant l'identification des particules animales présentes dans une farine. En effet, depuis les interdictions concernant les farines animales, seule la méthode utilisant la microscopie optique était utilisée de manière officielle pour analyser la composition de ces farines. Comme la microscopie ne permet pas une identification des particules animales d'un point de vue taxonomique (Liu et al., 2011), la réintroduction de certaines farines animales reste donc proscrite. Cependant, grâce à la méthode peptidomique utilisant la spectrométrie de masse, il est maintenant possible de déterminer l'origine taxonomique et tissulaire des particules animales. C'est dans ce but que la protéomique appliquée à l'analyse des farines animales pourrait intervenir dans la possible réintroduction de certaines de ces farines à l'alimentation du bétail.

La peptidomique/protéomique appliquée aux farines animales a donc prouvé son efficacité à plusieurs niveaux. En effet, cette technique offre une capacité d'analyse de haute résolution et permet également une identification précise des protéines et des peptides biomarqueurs. La peptidomique est donc une méthode de choix pour une identification sans *a priori* des constituants protéiques des farines animales. Cependant, des difficultés subsistent : les fortes homologues de séquences protéiques et peptidiques des espèces identifiées, la sensibilité de détection encore insuffisante et la complexité du matériel analysé. Le défi majeur est de pouvoir les contourner, pour pouvoir pleinement évaluer le potentiel de ce type d'approche.

A

Bos MVLSAADKGNVKAAWGKVGGAEEYGAELERMFLSFP¹TKTYFPHFDLSHGSAQVKGHG
 Sus MVLSAADKANVKAAWGKVGGAAGAHGAEALERMFLGFP¹TKTYFPHFNL SHGSDQVKAHG
 *****.*****:*. :*****.*****:***** **.*

Bos AKVAAALTKAVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHSLLVTLASHLP²SDFTP
 Sus QKVADALTKAVGHLLDDLPGALSALSDDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHHPDDFNP
 *** ***** ***** *****.*****:*** **.*

Bos AVHASLDKFLANVSTVLTSKYR
 Sus SVHASLDKFLANVSTVLTSKYR
 :*****

Homologies: 86,62 %

B

Bos MAERRVPFSLLRGSPWDPFRDWPYPAHSRLF³DQAFGLPRLPEEWSQWLSHSGWPGYVRALP
 Sus MTERRVPFSLLRSPWDPFRDWPYPAHSRLF³DQAFGLPRLPEEWSQWLSHSGWPGYVRPLP
 *.*****.***** ***** *****

Bos AAAIEGP-----AYNRALSRQLSSGVSEIQQTADRWRVSLDVNHFAPEELTVKTKDGVV
 Sus PPAIEGPAAVAAPAYSRLLSRQLSSGVSEIQQTADRWRVSLDVNHFAPEELTVKTKDGVV
 ***** **.* ***** *****

Bos EITGKHEERQDEHGYISRCFTRKYTLPPGVDP⁴TLVSSLSPEGLTVEAPLPK SATQSAE
 Sus EITGKHEERQDEHGFISRCFTRKYTLPPGVDP⁴TVSSLSPEGLTVEAPLPK PATQSAE
 *****:***** *****:***** *****

Bos ITIPVTFQARAQLGGPEAGKSEQPE SKDP
 Sus ITIPVTFEARAQLGGTEAGKSEKPGTK--
 *****:***** *****:*

Homologies: 92 %

Figure 4.1 – Homologies de séquences protéiques entre espèces différentes. A) Homologie de séquence de 86,62 % entre la sous-unité alpha de l'Hémoglobine de *Bos taurus* et la même protéine de *Sus scrofa*. B) Homologie de séquence de 92 % entre l'Heat Shock Protein β 1 de *Bos taurus* et la même protéine de *Sus scrofa*. Les barres noires représentent les parties de séquences correspondant aux peptides de bovin (AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK, ALPAAAIEGPAYNR & SATQSAEITIPVTFQAR) actuellement testés pour la production d'anticorps (analyse de l'homologie de séquence réalisée par Clustalw).

4.1. Complexité des échantillons

La complexité des échantillons de farine analysés a sensiblement influencé les résultats obtenus dans le cadre de ce mémoire. En effet, il apparaît que les farines animales sont des mélanges complexes, constitués de particules d'os, de muscles, de cartilage, de graisse, ... Outre la composition de ces farines, les traitements lors de leur production (133°C – 20 minutes – 3 bars) augmentent encore davantage leur complexité. Les protéines sont en effet pour la plupart fortement dégradées par ces traitements thermiques. Cela peut d'ailleurs être observé sur les gels 1D, ceux-ci révélant des "smears" de protéines, où peu de bandes protéiques peuvent être observées. C'est d'autant plus évident lorsque ces protéines animales sont comparées à des protéines de farines végétales. En effet, les gels 1D montrant des extractions de farines végétales illustrent bien ce fait, où la résolution du gel est bien plus haute, avec un grand nombre de bandes protéiques bien définies. Ces aliments végétaux n'ont pas subi les mêmes conditions de traitement et sont majoritairement constitués de protéines végétales ainsi que de particules de cendre (un mélange de minéraux bruts contenus dans les particules végétales). Cette complexité des farines animales doit donc être un paramètre important à prendre en compte lorsque des analyses sont effectuées sur ces dernières.

L'un des défis également lié à l'analyse peptidomique d'une farine animale est la forte homologie de séquence observée entre protéines d'espèces différentes. En effet, il s'avère que la plupart des protéines identifiées ont une homologie de séquence proche de 90 %. Deux exemples peuvent d'ailleurs être observés en **figure 4.1**, où l'homologie entre la sous-unité de l'hémoglobine alpha (**Figure 4.1 – A**) de *Bos taurus* et de *Sus scrofa* et celle de l'HSP- β 1 (**Figure 4.1 – B**) de ces mêmes espèces sont respectivement de 86,62 % et de 92 %. Cette forte homologie de séquence explique la difficulté de déterminer des peptides marqueurs spécifiques d'espèces. En effet, de nombreux peptides issus de ces protéines ont été obtenus et analysés grâce à la plateforme bioinformatique Scaffold 4.0. Avec ce logiciel, les peptides marqueurs candidats sont sélectionnés d'une part selon leur abondance relative et d'autre part pour leur spécificité. Pour qu'un peptide marqueur soit sélectionné et conservé, il est impératif que ce dernier soit spécifique d'une espèce, et uniquement de cette espèce. Or, la forte homologie de séquence entre protéines ne facilite pas cette recherche de peptides biomarqueurs. Par exemple, un peptide identifié par Scaffold comme étant spécifique au bœuf pourra également être identifié comme étant spécifique au porc, après qu'un BLAST de ce peptide soit réalisé. Il est donc important de garder en mémoire qu'il existe une forte homologie de séquences protéiques entre espèces, et que des précautions (réalisation d'un BLAST par exemple) sont des étapes nécessaires avant de valider un quelconque biomarqueur.

Un autre défi lié à cette homologie de séquence est la production d'anticorps de lapin destinés au développement de tests immunologiques sur les farines animales. En effet, puisque les protéines sont fortement homologues entre espèces, il est très probable que les peptides biomarqueurs issus de ces protéines présentent eux-mêmes de fortes homologies. Un anticorps dirigé contre un peptide de bœuf pourrait donc, par exemple, reconnaître un peptide similaire de porc, invalidant ainsi le test immunologique. C'est d'ailleurs pour ces raisons que deux kits développés pour la détection de particules de bovin dans des farines animales ont été invalidés. En effet, les kits ELISA-test MELISA-TEK (Sigma-Aldrich) et BioKit (Tepnel BioSystems), sont des tests ELISA conçus pour l'analyse de farines animales et dont la spécificité est normalement dirigée vers la détection de protéines de ruminants (troponine-I et autres protéines musculaires thermorésistantes). Or, une étude réalisée par Myers et al (2007) a permis de démontrer que ces tests ELISA manquaient à la fois de sensibilité et de spécificité d'espèce, invalidant ainsi ces tests pour leur utilisation en analyses routinières sur les farines

animales (Myers et al., 2007). Il est important de noter que dans la plupart des cas, l'approche utilisée pour développer ces tests immunologiques diffère de l'approche réalisée dans le cadre de ce mémoire. En effet, il apparaît que la plupart des antigènes utilisés pour la production d'anticorps sont issus de matériels « frais », c'est à dire purifiés à partir d'organes ou de tissus animaux. Par exemple, la protéine « h-caldesmone », une protéine musculaire thermorésistante purifiée à partir de cellules musculaires lisses d'intestin de bovins, a été utilisée pour la production d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre cette protéine musculaire (Kim et al., 2004). Les tests ELISA sont ensuite réalisés sur des échantillons de farines animales. Il s'avère que ces tests restent peu spécifiques. En revanche, dans le cadre de ce mémoire, l'approche est différente, puisque nous partons des farines animales pour identifier des antigènes potentiels encore présents (peptides). En effet, en analysant les farines animales, des peptides biomarqueurs ont été identifiés. Puisque ceux-ci sont largement identifiés dans la plupart des échantillons de farine analysés, on peut penser que ces derniers sont relativement thermorésistants. Ensuite, c'est à partir de ces peptides que des anticorps seront produits pour des tests immunologiques à réaliser sur des échantillons de farines. Ces tests immunologiques pourraient ainsi permettre de résoudre ces problèmes de sensibilité et de spécificité observés dans les tests classiques réalisés sur les farines animales.

Chaque technique d'analyse des farines animales comporte ses avantages et ses inconvénients. Par exemple, les méthodes enzymatiques « ELISA-like » ont l'avantage d'être faciles à mettre en oeuvre, d'être peu onéreuses et de fournir une quantification rapide d'un antigène dans une solution donnée. Cependant, comme mentionné précédemment, un des inconvénients est son manque de spécificité, les anticorps n'étant pas assez caractérisés du fait de la forte homologie de séquence entre peptides. La spectrométrie de masse est, quant à elle, une technique onéreuse et nécessite des connaissances techniques avancées. Elle permet cependant de fournir des informations d'une grande précision sur la séquence d'une/un protéine/peptide. Les analyses en spectrométrie de masse (MS) constituent, d'après nos résultats, une approche complémentaire aux tests immunologiques qui mérite donc d'être poursuivie.

4.2. Analyses ciblées avec *a priori*

Une fois les différentes mises au point réalisées dans la première partie de ce mémoire, nous avons essayé de simplifier et raccourcir le protocole expérimental afin que ce dernier puisse être utilisé comme méthode de routine par les agences publiques de sécurité alimentaire. Bien que le spectromètre de masse hybride de type Q-TOF utilisé dans la première partie de ce travail est un appareil de haute résolution et permet une identification précise des peptides/protéines (Morris et al., 1996, Lin et al., 2003), le temps d'analyse ainsi que la reproductibilité restent des points à améliorer. D'autre part, la transposition de l'approche peptidomique/protéomique développée vers des laboratoires de « routine » va nécessiter l'utilisation d'un appareillage moins coûteux et permettant des analyses plus rapides. Parmi les différents spectromètres de masse existants, le triple quadropôle semble l'appareil le plus approprié. Bien que ce dernier possède une plus faible résolution, il peut s'avérer utile lorsqu'un peptide marqueur est déjà connu et que l'on veut l'identifier dans un mélange complexe ou le quantifier (Chalkley, 2010). Il est d'ailleurs important de faire remarquer que dans le cadre de ce mémoire, l'aspect qualitatif a primé sur l'aspect quantitatif lors de la recherche des peptides marqueurs. En effet, nous nous sommes contentés d'une quantification relative des peptides identifiés, puisque le but était d'obtenir une information sur la variété des protéines présentes et parmi celles-ci, de sélectionner celles qui étaient représentées de manière reproductible dans un maximum d'échantillons. En comparaison, l'URBC a entrepris

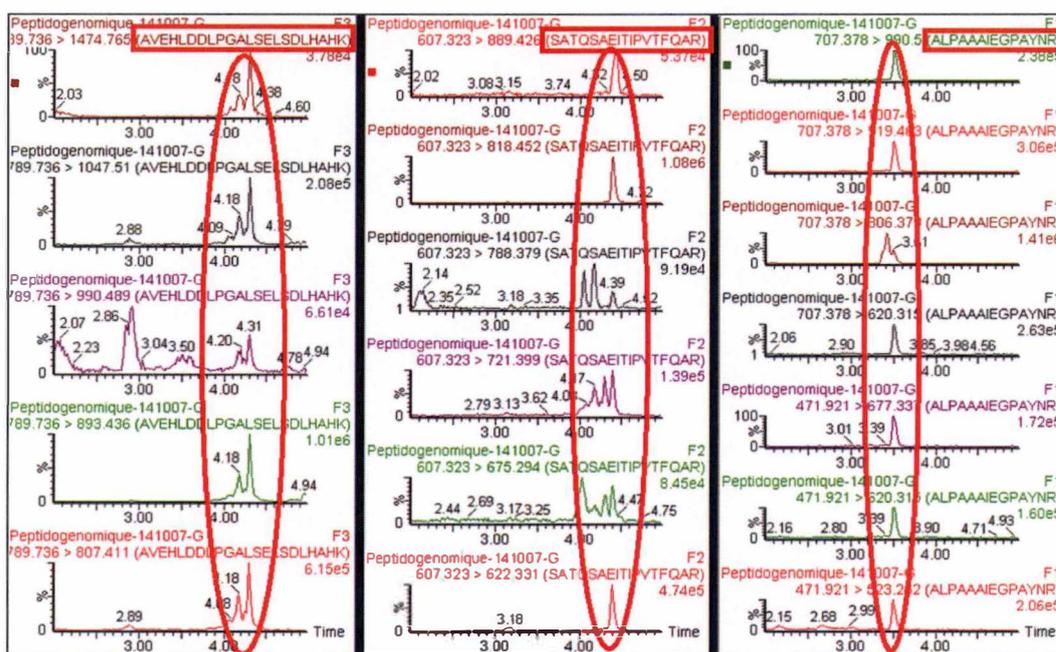
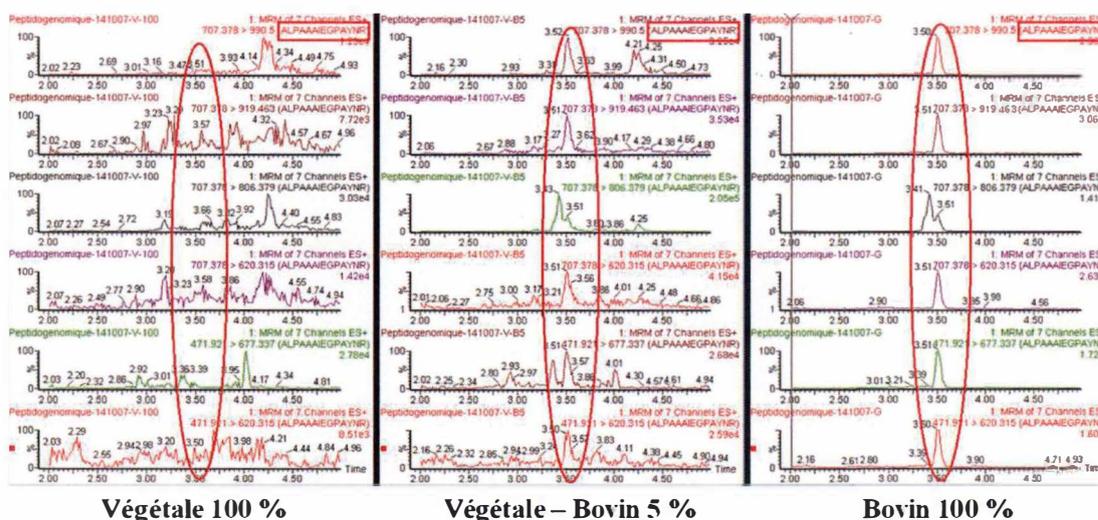


Figure 4.2 – Analyse en triple quadrupôle de trois peptides de bovin (AVEHLDDLPGALSESDLHAHK, SATQSAEITIPVTFQAR & ALPAAAEIGPAYNR) dans une farine bovine (G') provenant du CRA-W. Une farine de bovin (G') a été extraite selon la méthode TCA-Acétone et a subi une étape de "Clean-Up" avant d'être digérée enzymatiquement par la trypsine pendant cinq heures. Cet échantillon a ensuite été analysé au moyen d'un triple quadrupôle, où une chromatographie liquide (LC) de vingt minutes a été réalisée. Différentes transitions de chaque peptide peuvent être observées. Ces résultats ont été obtenus avec la collaboration du CER de Marloie.



Végétale 100 %

Végétale – Bovin 5 %

Bovin 100 %

Figure 4.3 – Analyse en triple quadrupôle de trois farines différentes (Végétale 100 %, Végétale 95 % - Bovin 5 % & Bovin 100 %) provenant du CRA-W, avec identification d'un peptide de bovin (ALPAAAEIGPAYNR) dans chacune d'elles. Une farine végétale, un mélange de farine végétale-bovin (G') et une farine de bovin (G') ont été extraits selon la méthode TCA-Acétone, ont subi une étape de "Clean-Up" puis ont été digérés enzymatiquement par la trypsine pendant cinq heures. Ces échantillons ont ensuite été analysés au moyen d'un triple quadrupôle selon une analyse LC-MS/MS de vingt minutes. Différentes transitions peuvent être observées, le peptide d'intérêt étant présent dans chacune de ces transitions, avec un temps de rétention de 3.5 minutes. Ces résultats ont été obtenus avec la collaboration du CER de Marloie.

une autre étude visant à étudier les allergènes dans certains produits alimentaires (tels que des « cookies »), qui elle nécessite obligatoirement de passer par un appareillage permettant une quantification précise de ces derniers (projet ALLERMASS, financé par la Région Wallonne). La quantification des allergènes dans les aliments est par ailleurs obligatoire afin d'identifier précisément la composition de divers produits alimentaires et de minimiser les risques potentiellement encourus par les personnes allergiques (Johnson et al., 2011, Picariello et al., 2011).

Lors des étapes d'optimisation réalisées dans ce mémoire, le développement d'un protocole MS plus court fut aussi une priorité, afin de développer un protocole de routine. Le temps nécessaire à l'analyse LC-MS/MS est une des étapes limitantes, un temps d'analyse de 215 minutes ayant été utilisé dans le cadre de ce mémoire. Puisqu'un triple quadrupôle a la capacité de réduire ce temps d'analyse tout en gardant une certaine spécificité, une étude préliminaire a été réalisée en collaboration avec le CER de Marloie. Le but de cette analyse est de déterminer la présence ou non des trois peptides marqueurs de bovin (sélectionnés pour la production d'anticorps) dans une farine bovine, avec un temps LC-MS/MS de vingt minutes. Pour rappel, un spectromètre de masse de type triple quadrupôle est composé de trois quadrupôles placés en série, le premier ne sélectionnant qu'un peptide de rapport m/z défini, le second fonctionnant comme une cellule de collision et le dernier séparant les fragments peptidiques obtenus selon leur rapport m/z. Bien que le triple quadrupôle possède une résolution plus faible par rapport à un autre appareil de type Q-TOF, cette faible résolution peut être compensée par une spécificité plus grande de cet appareillage. En effet, le triple Q a la capacité de travailler au moyen de différentes transitions. Une transition représente le rapport m/z d'un ion que l'expérimentateur renseigne au spectromètre de masse, afin qu'il se focalise spécifiquement sur celui-ci. En se focalisant sur quelques masses lors de son "scan", le triple Q gagne alors en spécificité. De cette façon, des peptides d'intérêt peuvent être détectés avec une grande sensibilité et spécificité même dans un échantillon complexe tel qu'une farine animale (Chalkley, 2010, Aebersold & Mann, 2003). Des résultats préliminaires ont ainsi pu être générés, ces résultats suggérant le potentiel de l'utilisation d'un triple quadrupôle comme méthode d'analyse de routine (**Figure 4.2**). En effet, il peut être observé que les trois peptides marqueurs de bovin (AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK, SATQSAEITIPVTFQAR & ALPAAAIEGPAYNR) ont tous été identifiés dans cette farine bovine (G') pour les différentes transitions indiquées, même après un temps LC de vingt minutes. De plus, une étude prospective sur la sensibilité de détection de cet appareil a également été réalisée. Le but est, dans ce cas-ci, d'analyser une farine végétale, une farine de bœuf (G') et une farine végétale dans laquelle la farine de bovin (G') a été ajoutée à 5 % et de déterminer la présence ou non d'un peptide marqueur de bovin (ALPAAAIEGPAYNR) dans ces échantillons (**Figure 4.3**). Ce peptide n'apparaît pas dans la farine végétale, mais apparaît bien dans la farine 100 % bovin et dans la farine végétale avec 5 % de farine de bovin. Il suffit simplement de regarder les temps de rétention au niveau des pics chromatographiques (cercle rouge) pour se rendre compte qu'il s'agit bien du même peptide pour chaque analyse et pour chaque transition.

Ces résultats prospectifs sont très encourageants, puisqu'ils soulignent le fait qu'en passant d'une méthode sans *a priori* « longue » à une méthode avec *a priori* « courte », il est possible de retrouver des peptides marqueurs spécifiques et cela même quand ceux-ci sont en quantité réduite. Il est important de noter que les échantillons analysés par ce triple quadrupôle ont préalablement été extraits par la méthode TCA-Acétone. Une étude prospective prochaine devrait également étudier la présence de ces peptides de bovin dans des échantillons ayant été extraits par la méthode HCl. De plus, l'un des objectifs étant d'évaluer la sensibilité de détection de cet appareillage, des mélanges de farines différents (99 % végétale + 1 % de

bovin, par exemple) seront prochainement évalués. D'ores et déjà, on peut conclure qu'une méthode de routine appliquée aux farines animales est donc envisageable et pourrait ainsi permettre de répondre aux exigences européennes en matière de sécurité alimentaire.

4.3. Méthode PCA : Principal Component Analysis (Analyse en composantes principales).

4.3.1. Problématique des peptides biomarqueurs

Dans le cadre de ce mémoire, deux types d'analyses ont été réalisés : des analyses permettant la mise au point de l'approche peptidomique et des analyses permettant de transférer cette méthode peptidomique/protéomique vers des agences de sécurité alimentaire pour développer un protocole de « routine ». Les mises au point, réalisées en URBC, ont nécessité l'utilisation d'un appareillage de type nanoLC-MS/MS (le Q-TOF dans le cas présent). Bien que cet appareil offre une haute résolution et une identification précise des protéines, les analyses n'en restent pas moins longues à effectuer et leur reproductibilité reste limitée. D'autre part, les premiers essais d'analyses de « routine », réalisés au moyen d'un appareillage de type triple quadropôle (LC-MS/MS), ont permis d'augmenter la rapidité de l'analyse tout en gardant une grande spécificité, mais il reste à effectuer un travail de mise au point concernant la sensibilité. Grâce à ces deux types d'analyses, nous avons sélectionné des peptides biomarqueurs et nous envisageons de les détecter en « routine ».

Néanmoins, la méthode de routine choisie est une méthode ciblée et seulement une petite partie des peptides seront sélectionnés comme peptides biomarqueurs pour caractériser les échantillons complexes que sont les farines animales. Il est donc légitime de se poser la question de l'importance des milliers de peptides non-exploités et de la façon dont ceux-ci peuvent être utilisés pour fournir de l'information pertinente sur les échantillons.

Un exemple permettant d'illustrer cette non-exploitation d'information concerne, par exemple, les collagènes présents dans les farines animales. Les collagènes sont les protéines les plus abondamment retrouvées chez les vertébrés, les collagènes étant le constituant principal des os, du cartilage et des tissus conjonctifs (Gelse et al., 2003). De ce fait, il est clair que les farines animales en contiennent une quantité importante, puisque certaines de ces farines sont majoritairement constituées de particules d'os. Un observateur extérieur pourrait alors se demander pourquoi une telle protéine, abondamment identifiée dans les farines animales, n'est pas sélectionnée plus fréquemment pour constituer les listes de peptides biomarqueurs établies dans ce mémoire. L'explication principale se base sur la structure même des collagènes et sur les nombreuses modifications post-traductionnelles de ces protéines. Parmi ces modifications, l'hydroxylation des prolines constitue la modification la plus importante au sein d'un polypeptide de collagène (Vitagliano et al., 2001). En effet, il apparaît que les collagènes ont plus de la moitié de leurs prolines qui sont hydroxylées (Reece et al., 2012). D'autres modifications, liées à la mort de l'animal (modifications post-mortem) et au processus de fabrication des farines animales (température et pression élevées) telles que la désamination des glutamines, augmentent davantage la complexité de l'analyse de cette protéine. L'analyse en spectrométrie de masse est donc plus délicate lorsqu'il s'agit des collagènes, puisque le risque d'erreurs d'identifications augmente avec l'augmentation du nombre de modifications et une partie de ces modifications est très variable au sein même d'une farine. C'est d'autant plus difficile lorsque ces peptides sont utilisés à des fins de tests ELISA sur des farines animales. Pour ces différentes raisons, nous avons décidé de ne pas utiliser les peptides de collagènes comme biomarqueurs de référence.

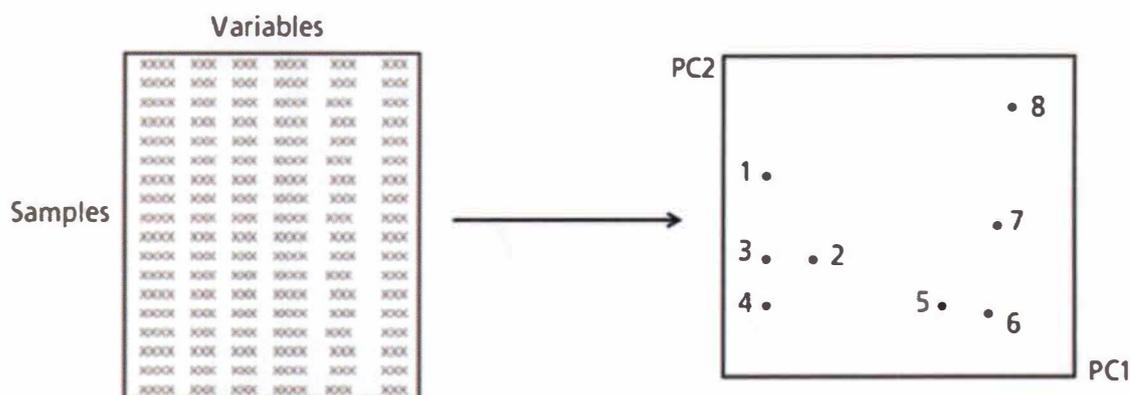


Figure 4.4 – Principe de l'Analyse en Composantes Principales ou Principal Component Analysis (PCA). La PCA est une analyse statistique non supervisée permettant de décomplexifier des quantités importantes de données dans un grand nombre d'analyses, tout en conservant un maximum d'information. Ces données sont transformées en un « graphe » dont l'abscisse et l'ordonnée représentent les PC1 et PC2, c'est-à-dire la direction des deux plus grandes variances dans un échantillon (Massart and Vander Heyden, 2004).

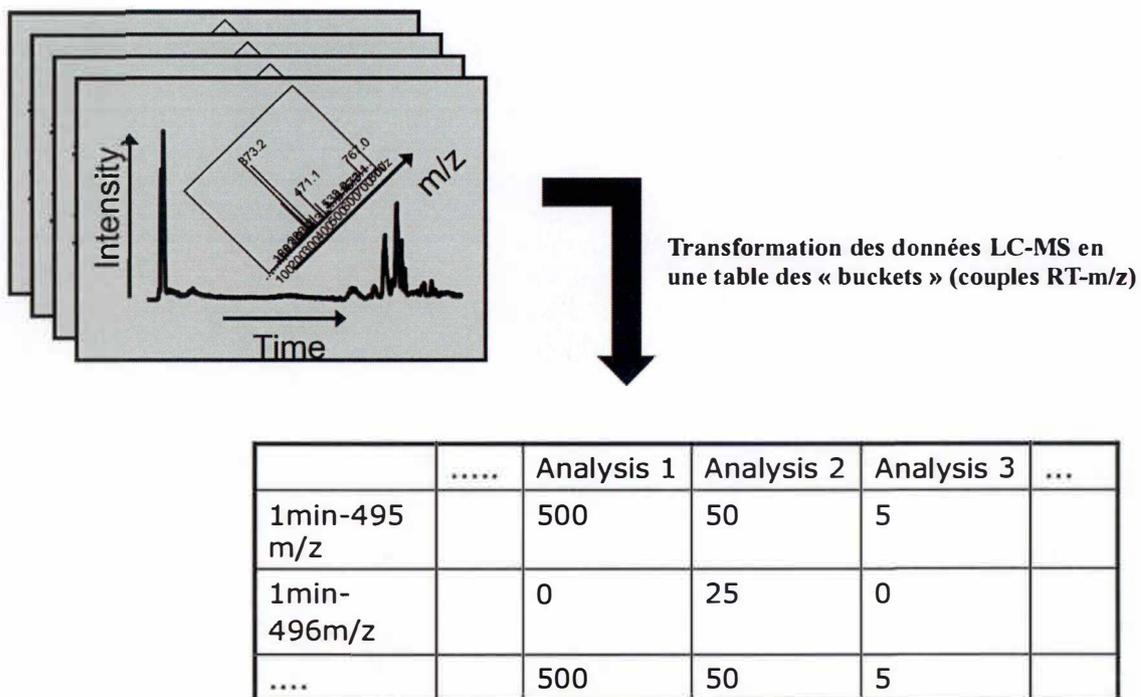


Figure 4.5 – Principe de formation de la table des « buckets ». Les données MS issues du spectromètre de masse sont converties en un tableau, où chaque peptide est représenté par un couple temps de rétention (RT) et un rapport m/z (RT-m/z), ces couples étant également associés à une intensité (manuel de ProfileAnalysis, Bruker).

Néanmoins, bien que ces peptides de collagènes ne soient pas considérés comme de bons biomarqueurs au même titre que d'autres protéines de natures différentes, leur abondance pourrait tout de même suggérer un potentiel éventuel en terme d'informations pertinentes. Ainsi, il nous semble intéressant d'avoir une vue d'ensemble des peptides obtenus et de pouvoir comparer d'une manière globale les profils peptidiques des farines analysées. Une des perspectives de ce mémoire est donc d'étudier plus précisément toutes ces données non-exploitées au moyen d'une analyse statistique de type PCA (Principal Component Analysis).

4.3.2. *Principal Component Analysis : le concept*

Lors d'une analyse en spectrométrie de masse de mélanges complexes et hétérogènes tels que les farines animales, des milliers de données sont obtenues. Ces données dépendent de variables telles que le rapport m/z et le temps de rétention, liées à l'intensité des pics chromatographiques ou des spectres de masses. Une telle complexité de données empêche un expérimentateur de visualiser de manière générale l'ensemble d'un échantillon analysé afin de le comparer aux autres échantillons. C'est dans ce but qu'une analyse PCA peut être réalisée. La PCA est une analyse statistique non supervisée permettant de décomplexifier des quantités importantes de données dans un grand nombre d'analyses, tout en conservant un maximum d'informations (Ringner, 2008, Massart & Vander Heyden, 2004) (**Figure 4.4**). La PCA permet d'identifier et de visualiser les variables les plus influentes dans un groupe de données. Dans le cas d'analyses en LC-MS, les données sont représentées en trois dimensions : le temps de rétention (RT), le rapport m/z et l'intensité. La première étape de l'analyse PCA consiste à réduire ces trois dimensions en une table de données à deux dimensions. Le logiciel « ProfileAnalysis » (Bruker) réalise cette transformation en associant les rapports m/z des peptides à leur temps de rétention en LC (**Figure 4.5**). Cette table appelée « buckets table » représente, pour chaque analyse, l'association de la variable « RT-m/z » à son intensité. Les données étant transformées, nous pouvons passer à la seconde étape qui est la PCA proprement dite (ProfileAnalysis, Bruker). Le résultat de cette analyse statistique se présentera en deux graphes : le « Scoring plot » et le « Loading plot » qui permettront une visualisation complète des analyses. Chaque point du « Scoring plot » représente l'ensemble des variables d'une analyse LC-MS. Il peut s'agir de répliquats biologiques ou techniques. Chaque point d'un « Loading plot » représente un couple RT-m/z (de manière simplifiée, il s'agit d'un peptide). Il est important de noter que ces deux graphes portent en abscisse la PC1 et en ordonnée la PC2. La PC1 représente la direction de la plus grande variance dans les échantillons, la PC2 représente la direction de la seconde plus grande variance observée dans les échantillons. L'expérimentateur peut cependant décider de changer la « valeur » de ces axes, comparant ainsi d'autres PC entre elles (PC 1 avec PC 3, PC 2 avec PC 4 et ainsi de suite).

4.3.3. *Analyse PCA appliquée aux farines animales*

Afin d'illustrer ces concepts de « Scoring plot » et « Loading plot », une analyse PCA a été réalisée par Marc Dieu (Plateforme MaSUn) sur des échantillons de farines animales. L'objectif, en réalisant cette analyse, est de comparer des farines d'espèces différentes mais aussi de comparer des farines de mêmes espèces mais de provenances différentes. Ainsi, trois échantillons de bovin (CRA-W : K & G', NIFES : N20), un échantillon de volaille, un échantillon de mouton et un échantillon de porc ont été analysés en spectrométrie de masse. Quatre analyses LC-MS de soixante-cinq minutes ont ainsi été réalisées pour chaque échantillon. Les résultats de l'analyse PCA sont représentés à la **figure 4.6**, où le « Scoring plot » (A) et le « Loading plot » (B) sont représentés.

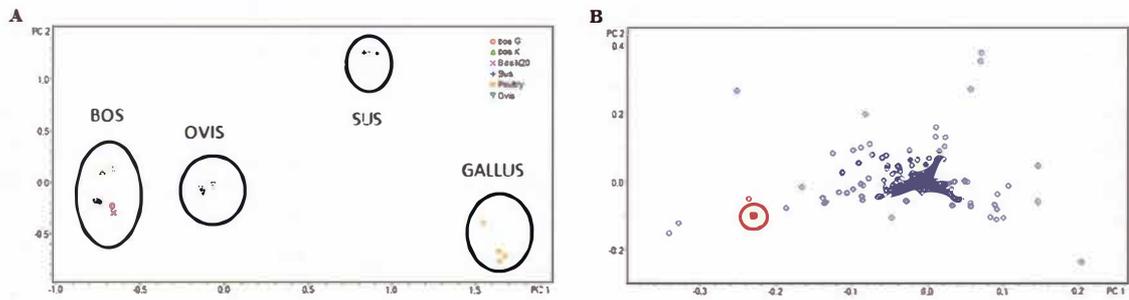


Figure 4.6 – Représentation d'un « Scoring plot » (A) et d'un « Loading plot » (B). Trois échantillons de bovin (CRA-W : K & G', NIFES : N20), un échantillon de volaille, un échantillon de porc et un échantillon de mouton ont été analysés en spectrométrie de masse. Quatre analyses LC-MS de 65 minutes ont été réalisées pour chaque échantillon de façon à réaliser une analyse PCA sur ceux-ci. Le « Scoring plot » (A) représente l'ensemble des variables d'une analyse LC-MS. Le « Loading plot » représente l'ensemble des « buckets », chaque point étant représenté par un couple RT-m/z identifié dans la table des « buckets ». Par exemple, le cercle rouge représente un peptide dont le RT est de 17,48 minutes et un rapport m/z de 2056,129. Ce peptide est identifié comme étant un peptide de collagène alpha-2 (I) de *Bos taurus* (R.GAQGPPGATGFPGAAGR.V). Abscisse : PC 1 (la plus grande variance), ordonnée : PC 2 (la seconde plus grande variance).

En ce qui concerne le « Scoring plot » (A), celui-ci permet de fournir des informations intéressantes à la fois sur les échantillons analysés mais également sur la méthode MS utilisée. En effet, en étudiant ce graphe, on peut se rendre compte, suivant l'axe de la PC1, qu'il existe une séparation entre les points des différents groupes d'analyses effectuées. Ainsi, les échantillons de bovin (K, G' & N20) peuvent être différenciés des échantillons de mouton (Ovis), de porc (Sus) et de volaille (Gallus). Au premier coup d'œil, cette analyse PCA permet donc de différencier des échantillons d'espèces différentes. La reproductibilité technique de l'analyse peut également être évaluée. On remarque, suivant l'axe de la PC2, que chaque échantillon analysé (quatre injections de chaque échantillon dans le spectromètre de masse) présente une faible variabilité par rapport aux autres échantillons de la même espèce (cercles noirs). Enfin, la reproductibilité biologique de l'analyse MS peut également être évaluée : on observe par exemple que les échantillons de même espèce (bovin dans le cas présent), provenant de deux centres de recherche différents (CRA-W de Gembloux et NIFES de Norvège), se retrouvent au même endroit sur ce « Scoring plot ».

Les « Scoring plot » et « Loading plot » sont étroitement liés, ainsi au niveau du « Loading plot », les points à gauche du graphique sont en lien direct avec les analyses présentes à gauche du « Scoring plot ». Dans notre cas, ces points gauches représentent une variabilité due aux analyses de farines de bovins et de moutons.

Chaque point du « Loading plot » représente un peptide, c'est-à-dire un couple RT-m/z. En analysant ce « Loading plot », plusieurs observations peuvent être faites. Tout d'abord, puisque les points de ce graphe sont analysés selon la PC 1 et la PC 2 (la PC 1 représentant la plus grande variabilité des échantillons), les points situés aux alentours des coordonnées 0 – 0 sont des peptides variant peu d'un échantillon à l'autre et sont donc moins intéressants lors de la recherche de peptides marqueurs. En effet, un bon peptide marqueur devrait également pouvoir être différencié parmi d'autres peptides, notamment grâce à une plus grande variabilité. Il est donc logique que les points situés aux extrémités de ce graphe sont des points ayant une plus grande variabilité et donc responsables de la séparation des échantillons analysés. Dans le cas présent, puisque plusieurs farines de natures différentes sont représentées (bovin, porc, volaille, mouton), il apparaît que les points situés à la gauche de ce « Loading plot » correspondent à des peptides appartenant plus particulièrement à *Bos taurus* tandis que les points situés à la droite de ce « Loading plot » appartiennent davantage à *Gallus gallus*. Par exemple, en cliquant sur un des points de ce « plot » (cercle rouge), le programme identifie ce couple RT-m/z comme étant un peptide de rapport m/z de 2056.129. Dans notre première approche de la PCA, nous devons retourner dans les listes d'analyses MSMS pour identifier ce peptide. Il s'agit d'un peptide de collagène alpha-2 (I) de *Bos taurus* (R.GAQGPPGATGFPGAAGR.V). Il apparaît que ce peptide est identifié (valeurs d'intensité importante) dans les échantillons de bovin (K, G' & N20) et pas dans les échantillons de porc, de mouton et de volaille (Figure 4.6). Grâce à cette analyse PCA, ce peptide de collagène pourrait ainsi être sélectionné comme nouveau peptide marqueur. Il s'agit d'un premier test et suite à nos remarques sur le collagène (point 4.3.1), ce peptide ne sera pas utilisé pour les tests ELISA mais il pourra contribuer dans cet ensemble de peptides à différencier les espèces en utilisant un test statistique de type PCA.

4.3.4. Avantages de la PCA

De nombreux avantages potentiels apparaissent dès cette première analyse statistique PCA. En effet, la PCA permet tout d'abord à l'expérimentateur d'obtenir au premier coup d'œil une comparaison des échantillons analysés. De ce fait, cette analyse est tout à fait innovatrice et

complémentaire, par rapport aux méthodes prospectives et ciblées utilisées jusqu'à présent dans ce mémoire. En effet, en temps normal, les résultats provenant du spectromètre de masse sont analysés grâce à une plateforme bioinformatique. Par exemple, dans le cas de ce mémoire, la recherche de peptides marqueurs est réalisée à l'aide de Scaffold 4.0. Dans certains cas, les listes de protéines identifiées dans Scaffold peuvent atteindre plusieurs centaines d'identifications, rendant ainsi la recherche de peptides marqueurs très fastidieuse. En analyse PCA, nous pourrions, à partir du « Loading plot », sélectionner directement les peptides de grandes variabilités afin de les identifier.

Actuellement, il apparaît qu'après une analyse de 65 minutes, il a été possible d'identifier des peptides marqueurs spécifiques d'espèces, comme c'est le cas du peptide de collagène décrit précédemment. C'est d'ailleurs au niveau des collagènes que cette analyse PCA pourrait s'avérer être la plus intéressante. Les collagènes ne sont, en effet, pas considérés comme de bons peptides biomarqueurs, comme décrit précédemment. Cependant, l'analyse PCA permet d'identifier ces peptides et permet de les différencier parmi des centaines d'autres peptides. Des recherches plus approfondies de l'analyse PCA sur les peptides de collagènes pourront donc éventuellement permettre de reconsidérer le choix des peptides des collagènes comme biomarqueurs.

L'analyse PCA est également intéressante pour mettre au point une méthode en « routine » plus rapide et plus robuste. En effet, dans le cadre de ce mémoire, une seule LC-MS/MS de 215 minutes était généralement effectuée lors de l'analyse des échantillons. Dans le cas d'une analyse PCA, plusieurs réplicats techniques (actuellement de 65 minutes) ont été réalisés, qui permettent aussi de vérifier la reproductibilité de nos analyses. A l'avenir, nous essayerons de diminuer encore les temps d'analyses afin d'atteindre l'objectif de pouvoir proposer cette approche peptidomique aux agences publiques de sécurité alimentaire.

Bien que nous ne soyons, pour l'instant, qu'au stade de tests préliminaires de faisabilité, les résultats des analyses PCA se sont révélés très satisfaisants et prometteurs. On pourrait donc envisager que cette analyse statistique soit étendue à l'ensemble des analyses futures réalisées sur les farines animales. Outre la recherche de peptides marqueurs, l'analyse PCA pourrait également permettre d'évaluer le degré de sensibilité de l'appareillage MS utilisé. En effet, puisque la limite de détection des particules animales par la microscopie optique est de 0,1 % (Fumière et al., 2009), il serait intéressant d'arriver à une telle limite au moyen du spectromètre de masse. Au moyen de différents mélanges de farines, il serait éventuellement possible, grâce à la PCA, d'identifier des farines ayant un très faible pourcentage de particules contaminantes. Des tests sont d'ailleurs actuellement en cours, afin d'évaluer de possibles différences entre des mélanges de farines (porc – bovin), ces farines de porc ne contenant que 0,1 %, 0,5 % ou 1 % de farine de bovin. Si ces tests se révèlent concluants, il sera alors possible d'étendre davantage cette analyse PCA comme méthode alternative ou complémentaire à la méthode peptidomique/protéomique développée mais aussi aux autres méthodes d'analyse reconnues.

4.4. Conclusion

Ce manuscrit décrit le développement d'une stratégie peptidomique/protéomique permettant d'analyser de manière approfondie la composition des farines animales. En effet, cette méthode a le pouvoir de déterminer l'origine taxonomique et tissulaire des diverses particules présentes dans une farine. Elle permet ainsi de surpasser les limitations associées aux méthodes officielles d'analyse de ces farines animales. Le pouvoir de détection de cette méthode a donc permis d'identifier un certain nombre de peptides marqueurs spécifiques d'espèces animales. Ces peptides marqueurs seront ensuite transmis à des laboratoires d'analyses de sécurité alimentaire afin de développer des tests immunologiques plus spécifiques sur ces farines animales. Les optimisations réalisées dans le cadre de ce mémoire ont également eu comme objectif prioritaire de pouvoir transférer cette méthode peptidomique/protéomique à ces laboratoires d'analyses afin de développer des tests de routine en spectrométrie de masse sur les farines animales. Ces optimisations ont pu mettre en évidence la robustesse de la méthode peptidomique/protéomique, puisqu'un protocole réduit a permis d'identifier des peptides marqueurs spécifiques d'espèces dans les farines analysées.

La stratégie peptidomique/protéomique, même si des améliorations restent à faire, semble donc prometteuse comme méthode à inclure dans l'arsenal des méthodes officielles d'analyse des farines animales. Par ailleurs, cette approche pourra également s'appliquer à l'analyse d'autres types d'échantillons, que ce soit dans le contexte du contrôle alimentaire ou même de l'archéologie. Un projet inter-disciplinaire d'analyse de parchemins au moyen d'une approche peptidomique/protéomique est actuellement en cours à l'UNamur.

RÉFÉRENCES

5. Références

5.1. Bibliographie

- AEBERSOLD, R. & MANN, M. 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422, 198-207.
- BAETEN, V., VON HOLST, C., GARRIDO, A., VANCUTSEM, J., MICHOTTE RENIER, A. & DARDENNE, P. 2005. Detection of banned meat and bone meal in feedstuffs by near-infrared microscopic analysis of the dense sediment fraction. *Anal Bioanal Chem*, 382, 149-57.
- BARBARINI, N. & MAGNI, P. 2010. Accurate peak list extraction from proteomic mass spectra for identification and profiling studies. *BMC Bioinformatics*, 11, 518.
- BOIX, A., FERNANDEZ PIERNA, J. A., VON HOLST, C. & BAETEN, V. 2012. Validation of a near infrared microscopy method for the detection of animal products in feedingstuffs: results of a collaborative study. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 29, 1872-80.
- BREMER, M., FUMIÈRE, O., HEKMAN, W., MARIEN, A., KEMMERS-VONKEN, A., FERNÁNDEZ PIERNA, J. A., VLIEGE, J., BAETEN, V., VAN RAAMSDONK, L. W. D. & BERBEN, G. 2012. Combination methods for PAP detection and species determination of animal particles. In: Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. Chapter 13, JØRGENSEN, J. S. & BAETEN, V. (eds.). Les presses Universitaires de Namur, 139-149.
- BRUINS, A. P. 1998. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *J Chromatogr A*, 794, 345-357.
- BUCKLEY, M., COLLINS, M. & THOMAS-OATES, J. 2008. A method of isolating the collagen (I) alpha2 chain carboxyteleopeptide for species identification in bone fragments. *Anal Biochem*, 374, 325-34.
- BURKHART, J. M., SCHUMBRUTZKI, C., WORTELKAMP, S., SICKMANN, A. & ZAHEDI, R. P. 2012. Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. *J Proteomics*, 75, 1454-62.
- CAPELO, J. L., CARREIRA, R., DINIZ, M., FERNANDES, L., GALESIO, M., LODEIRO, C., SANTOS, H. M. & VALE, G. 2009. Overview on modern approaches to speed up protein identification workflows relying on enzymatic cleavage and mass spectrometry-based techniques. *Anal Chim Acta*, 650, 151-9.
- CHALKLEY, R. 2010. Instrumentation for LC-MS/MS in proteomics. *Methods Mol Biol*, 658, 47-60.
- CHEN, E. I., COCIORVA, D., NORRIS, J. L. & YATES, J. R., 3RD 2007. Optimization of mass spectrometry-compatible surfactants for shotgun proteomics. *J Proteome Res*, 6, 2529-38.
- CHIAPPINI, B., BRAMBILLA, G., AGRIMI, U., VACCARI, G., AARTS, H. J., BERBEN, G., FREZZA, D. & GIAMBRA, V. 2005. Real-time polymerase chain reaction approach for quantitation of ruminant-specific DNA to indicate a correlation between DNA amount and meat and bone meal heat treatments. *JAOAC Int*, 88, 1399-403.
- COTTER, R. J. 1989. Time-of-flight mass spectrometry: an increasing role in the life sciences. *Biomed Environ Mass Spectrom*, 18, 513-32.

RÉFÉRENCES

- DENTON, J. H., COON, C. N., PETTIGREW, J. E. & PARSONS, C. M. 2005. Historical and scientific perspectives of same species feeding of animal by-products. *J Appl Poult Res*, 14, 353-361.
- DONNELLY, C. A., FERGUSON, N. M., GHANI, A. C. & ANDERSON, R. M. 2002. Implications of BSE infection screening data for the scale of the British BSE epidemic and current European infection levels. *Proc Biol Sci*, 269, 2179-90.
- EFSA 2011. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific opinion on the revision of the quantitative risk assessment (QRA) of the BSE risk posed by processed animal proteins (PAPs). *EFSA Journal*, 9, 1-80.
- ELIAS, J. E. & GYGI, S. P. 2010. Target-decoy search strategy for mass spectrometry-based proteomics. *Methods Mol Biol*, 604, 55-71.
- ENTIS, P. 2007. *Food safety. Old habits, new perspectives*, ASM Press, Washington DC.
- FERNANDEZ PIERNA, J. A., BAETEN, V., MICHOTTE RENIER, A., COGDILL, R. P. & DARDENNE, P. 2004. Combination of support vector machines (SVM) and near-infrared (NIR) imaging spectroscopy for the detection of meat and bone meal (MBM) in compound feeds. *J Chemometrics*, 18, 341-349.
- FUMIÈRE, O., DUBOIS, M., BAETEN, V., VON HOLST, C. & BERBEN, G. 2006. Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal Bioanal Chem*, 385, 1045-54.
- FUMIÈRE, O., VEYS, P., BOIX, A., VON HOLST, C., BAETEN, V. & BERBEN, G. 2009. Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 13, 59-70.
- GAVIER-WIDEN, D., STACK, M. J., BARON, T., BALACHANDRAN, A. & SIMMONS, M. 2005. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J Vet Diagn Invest*, 17, 509-27.
- GELSE, K., POSCHL, E. & AIGNER, T. 2003. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, 1531-46.
- GIZZI, G., VAN RAAMSDONK, L. W., BAETEN, V., MURRAY, I., BERBEN, G., BRAMBILLA, G. & VON HOLST, C. 2003. An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform encephalopathy. *Rev Sci Tech*, 22, 311-31.
- GLISH, G. L. & VACHET, R. W. 2003. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 140-50.
- GRAVES, P. R. & HAYSTEAD, T. A. 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66, 39-63; table of contents.
- GUNDRY, R. L., WHITE, M. Y., MURRAY, C. I., KANE, L. A., FU, Q., STANLEY, B. A. & VAN EYK, J. E. 2009. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 10, Unit 10.25.
- HAN, X., JIN, M., BREUKER, K. & MCLAFFERTY, F. W. 2006. Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons. *Science*, 314, 109-12.
- HEDLIN, P., TASCHUK, R., POTTER, A., GRIEBEL, P. & NAPPER, S. 2012. Detection and control of prion diseases in food animals. *ISRN Vet Sci*, 2012, 254739.
- HIRSCH, J., HANSEN, K. C., BURLINGAME, A. L. & MATTHAY, M. A. 2004. Proteomics: current techniques and potential applications to lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287, L1-23.

RÉFÉRENCES

- HO, C. S., LAM, C. W., CHAN, M. H., CHEUNG, R. C., LAW, L. K., LIT, L. C., NG, K. F., SUEN, M. W. & TAI, H. L. 2003. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev*, 24, 3-12.
- HONG, C., JIANG, H., LU, E., WU, Y., GUO, L., XIE, Y., WANG, C. & YANG, Y. 2012. Identification of milk component in ancient food residue by proteomics. *PLoS One*, 7, e37053.
- HU, Q., NOLL, R. J., LI, H., MAKAROV, A., HARDMAN, M. & GRAHAM COOKS, R. 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom*, 40, 430-43.
- HUSTOFT, H. K., REUBSAET, L., GREIBROKK, T., LUNDANES, E. & MALEROD, H. 2011. Critical assessment of accelerating trypsination methods. *J Pharm Biomed Anal*, 56, 1069-78.
- JIANG, L., HE, L. & FOUNTOULAKIS, M. 2004. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J Chromatogr A*, 1023, 317-20.
- JIANG, X., YE, M., JIANG, X., LIU, G., FENG, S., CUI, L. & ZOU, H. 2007. Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis. *J Proteome Res*, 6, 2287-94.
- JOHNSON, P. E., BAUMGARTNER, S., ALDICK, T., BESSANT, C., GIOSAFATTO, V., HEICK, J., MAMONE, G., O'CONNOR, G., POMS, R., POPPING, B., REUTER, A., ULBERTH, F., WATSON, A., MONACI, L. & MILLS, E. N. 2011. Current perspectives and recommendations for the development of mass spectrometry methods for the determination of allergens in foods. *JAOAC Int*, 94, 1026-33.
- KELLER, A., NESVIZHSHKII, A. I., KOLKER, E. & AEBERSOLD, R. 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem*, 74, 5383-92.
- KIM, S. H., HUANG, T. S., SEYMOUR, T. A., WEI, C. I., KEMPF, S. C., BRIDGMAN, C. R., CLEMENS, R. A. & AN, H. 2004. Production of monoclonal antibody for the detection of meat and bone meal in animal feed. *J Agric Food Chem*, 52, 7580-5.
- LAGANOWSKY, A., READING, E., HOPPER, J. T. & ROBINSON, C. V. 2013. Mass spectrometry of intact membrane protein complexes. *Nat Protoc*, 8, 639-51.
- LIN, D., TABB, D. L. & YATES, J. R., 3RD 2003. Large-scale protein identification using mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*, 1646, 1-10.
- LIU, X., HAN, L., VEYS, P., BAETEN, V., JIANG, X. & DARDENNE, P. 2011. An overview of the legislation and light microscopy for detection of processed animal proteins in feeds. *Microsc Res Tech*, 74, 735-43.
- LOPEZ-FERRER, D., CAPELO, J. L. & VAZQUEZ, J. 2005. Ultra fast trypsin digestion of proteins by high intensity focused ultrasound. *J Proteome Res*, 4, 1569-74.
- MARGRY, R. & DE JONG, J. 2012. Feed chain: Processed animal proteins and their use in animal feed. In: Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. Chapter 1, JØRGENSEN, J. S. & BAETEN, V. (eds.). Les presses Universitaires de Namur, 9-16.
- MARSHALL, A. G., HENDRICKSON, C. L. & JACKSON, G. S. 1998. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom Rev*, 17, 1-35.
- MASSART, D. L. & VANDER HEYDEN, Y. 2004. From tables to visuals: Principal Component Analysis, Part 1. *LC-GC Europe*, 17, 2-5.

RÉFÉRENCES

- MCLAFFERTY, F. W., BREUKER, K., JIN, M., HAN, X., INFUSINI, G., JIANG, H., KONG, X. & BEGLEY, T. P. 2007. Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomics. *FEBS J*, 274, 6256-68.
- MECHIN, V., DAMERVAL, C. & ZIVY, M. 2007. Total protein extraction with TCA-acetone. *Methods Mol Biol*, 355, 1-8.
- MEDZIHRADESKY, K. F., CAMPBELL, J. M., BALDWIN, M. A., FALICK, A. M., JUHASZ, P., VESTAL, M. L. & BURLINGAME, A. L. 2000. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem*, 72, 552-8.
- MEEKER, D. L. & HAMILTON, C. R. 2006. An overview of the rendering industry. In: Essential rendering. National Renderers Association (eds). 1-16.
- MORRIS, H. R., PAXTON, T., DELL, A., LANGHORNE, J., BERG, M., BORDOLI, R. S., HOYES, J. & BATEMAN, R. H. 1996. High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 10, 889-96.
- MYERS, M. J., YANCY, H. F., FARRELL, D. E., WASHINGTON, J. D., DEEVER, C. M. & FROBISH, R. A. 2007. Assessment of two enzyme-linked immunosorbent assay tests marketed for detection of ruminant proteins in finished feed. *J Food Prot*, 70, 692-9.
- PATTISON, J. 1998. The emergence of bovine spongiform encephalopathy and related diseases. *Emerg Infect Dis*, 4, 390-4.
- PICARIELLO, G., MAMONE, G., ADDEO, F. & FERRANTI, P. 2011. The frontiers of mass spectrometry-based techniques in food allergenomics. *J Chromatogr A*, 1218, 7386-98.
- PLOUVIER, B. M., BAETEN, V., MAUDOUX, J. P., VANOPDENBOSCH, E., BERKVEN, D., DEGAND, G. & SAEGERMAN, C. 2012. Détection des protéines animales transformées: expérience et perspectives européennes. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 31, 1011-1031.
- PROC, J. L., KUZYK, M. A., HARDIE, D. B., YANG, J., SMITH, D. S., JACKSON, A. M., PARKER, C. E. & BORCHERS, C. H. 2010. A quantitative study of the effects of chaotropic agents, surfactants, and solvents on the digestion efficiency of human plasma proteins by trypsin. *J Proteome Res*, 9, 5422-37.
- PRUSINER, S. B. 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 13363-83.
- REANEY, S. & BREMER, M. 2012. Immunological approaches for processed animal protein detection in animal feeds. In: Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. Chapter 10, JØRGENSEN, J. S. & BAETEN, V. (eds.). Les presses Universitaires de Namur, 103-112.
- REANEY, S. & JØRGENSEN, J. S. 2012. BSE-PAP: the story of a feed safety issue. In: Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. Chapter 2, JØRGENSEN, J. S. & BAETEN, V. (eds.). Les presses Universitaires de Namur, 17-21.
- REECE, P., CHASSAIGNE, H., COLLINS, M., BUCKLEY, M., BREMER, M. & GRUNDY, H. 2012. Proteomic analysis of meat and bone meal and animal feed. In: Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. Chapter 11, JØRGENSEN, J. S. & BAETEN, V. (eds.). Les presses Universitaires de Namur, 113-124.

RÉFÉRENCES

- RIAL-OTERO, R., CARREIRA, R. J., CORDEIRO, F. M., MORO, A. J., SANTOS, H. M., VALE, G., MOURA, I. & CAPELO, J. L. 2007. Ultrasonic assisted protein enzymatic digestion for fast protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Sonoreactor versus ultrasonic probe. *J Chromatogr A*, 1166, 101-7.
- RINGNER, M. 2008. What is principal component analysis? *Nat Biotechnol*, 26, 303-4.
- SCIGELOVA, M., HORNSHAW, M., GIANNAKOPOULOS, A. & MAKAROV, A. 2011. Fourier transform mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 10, M111 009431.
- SEDDON, A. M., CURNOW, P. & BOOTH, P. J. 2004. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*, 1666, 105-17.
- SENTANDREU, M. A., FRASER, P. D., HALKET, J., PATEL, R. & BRAMLEY, P. M. 2010. A proteomic-based approach for detection of chicken in meat mixes. *J Proteome Res*, 9, 3374-83.
- SENTANDREU, M. A. & SENTANDREU, E. 2011. Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity. *Meat Sci*, 89, 280-5.
- SHIEH, I. F., LEE, C. Y. & SHIEA, J. 2005. Eliminating the interferences from TRIS buffer and SDS in protein analysis by fused-droplet electrospray ionization mass spectrometry. *J Proteome Res*, 4, 606-12.
- SWITZAR, L., GIERA, M. & NIESSEN, W. M. 2013. Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *J Proteome Res*, 12, 1067-77.
- TAYLOR, D. M., WOODGATE, S. L. & ATKINSON, M. J. 1995. Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures. *Vet Rec*, 137, 605-10.
- TONIOLO, L., D'AMATO, A., SACCENTI, R., GULOTTA, D. & RIGHETTI, P. G. 2012. The Silk Road, Marco Polo, a Bible and its proteome: a detective story. *J Proteomics*, 75, 3365-73.
- VAN RAAMSDONK, L. W. D. & VAN DER VOET, H. J. 2003. A ring trial for the detection of animal tissues in feeds in the presence of fish meal. Report 2003.012. RIKILT, Wageningen. 1-24.
- VAN RAAMSDONK, L. W. D., VON HOLST, C., BAETEN, V., BERBEN, G., BOIX, A. & DE JONG, J. 2007. New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feeds. *Ani Feed Sci Technol*, 133, 63-83.
- VITAGLIANO, L., BERISIO, R., MAZZARELLA, L. & ZAGARI, A. 2001. Structural bases of collagen stabilization induced by proline hydroxylation. *Biopolymers*, 58, 459-64.
- VON BARGEN, C., DOJAHN, J., WAIDELICH, D., HUMPF, H. U. & BROCKMEYER, J. 2013. New sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of horse and pork in halal beef. *J Agric Food Chem*, 61, 11986-94.
- WHO 1996. Report of a WHO consultation on public health issues related to human and animal transmissible spongiform encephalopathies. Geneva, Switzerland. *World Health Organisation*, 2-9.
- WOODGATE, S. & VAN DER VEEN, J. 2004. The role of fat processing and rendering in the European Union animal production industry. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 8, 283-294.
- WU, S. L., HUHMER, A. F., HAO, Z. & KARGER, B. L. 2007. On-line LC-MS approach combining collision-induced dissociation (CID), electron-transfer dissociation (ETD), and CID of an isolated charge-reduced species for the trace-level characterization of proteins with post-translational modifications. *J Proteome Res*, 6, 4230-44.

ZENGLING, Y., LUJIA, H., FERNANDEZ PIERNA, J. A., DARDENNE, P. & BAETEN, V. 2011. Review of the potential of near infrared microscopy to detect, identify and quantify processed animal by-products. *J NIRS*, 19, 211-231.

5.2. Directives de la Commission Européenne

Commission Européenne (EC). (2001). Règlement (CE) n° 999/2001 fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles. *Off. J. Eur. Union*, L 147, 31/05/2001, 1-40.

Commission Européenne (EC). (2002). Règlement (CE) n° 1774/2002 du Parlement européen et du Conseil du 3 octobre 2002 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux non destinés à la consommation humaine. *Off. J. Eur. Union*, L 273, 10/10/2002, 1-95.

Commission Européenne (EC). (2003). Règlement (CE) n° 1234/2003 de la Commission du 10 juillet 2003 modifiant les annexes I, IV et XI du règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n° 1326/2001 en ce qui concerne les encéphalopathies spongiformes transmissibles et l'alimentation des animaux. *Off. J. Eur. Union*, L 173, 11/07/2003, 6-13.

Commission Européenne (EC). (2003). Commission Directive (EC) n° 126/2003 on the analytical method for the determination of constituents of animal origin for the official control of feedstuffs. *Off. J. Eur. Union*, L 339, 78 – 84.

Commission Européenne (EC). (2008). Règlement (CE) n° 956/2008 de la Commission du 29 septembre 2008 modifiant l'annexe IV du règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles. *Off. J. Eur. Union*, L 260, 30/09/2008, 8 – 11.

Commission Européenne (EC). (2009). Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Off. J. Eur. Union*, L 54, 26/01/2009, 1-130.

Commission Européenne (EC). (2013). Commission Regulation (EC) No 56/2013 of 16 January 2013 amending Annexes I and IV to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Off. J. Eur. Union*, L 21, 24/01/2013, 3-16.

5.3. Webographie

Auvermann, B., Kalbasi, A., & Ahmed, A. 2004. Carcass disposal: a comprehensive review, Chapter 4. National Agricultural Biosecurity Center Consortium, August 2004 (Consulté le 2 septembre 2014; <http://amarillo.tamu.edu/files/2011/01/draftreport.pdf>).

BSE Order. 1988. The Bovine Spongiform Encephalopathy Order 1988, N°1039 (Consulté le 2 septembre 2014; <http://www.legislation.gov.uk/uksi/1988/1039/contents/made>).

RÉFÉRENCES

Phillips, L., Bridgeman, J., & Ferguson-Smith, M. 2000. The BSE Inquiry – 16 volumes. Inquiry into the emergence and identification of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) and variant Creutzfeld-Jakob Disease (vCJD) and the action taken in response to it up to 20 March 1996. Stationary Office, London, England, United Kingdom. [En ligne] <http://www.bseinquiry.gov.uk/report/index.htm>. Accédé le 24 août 2014.

ANNEXES

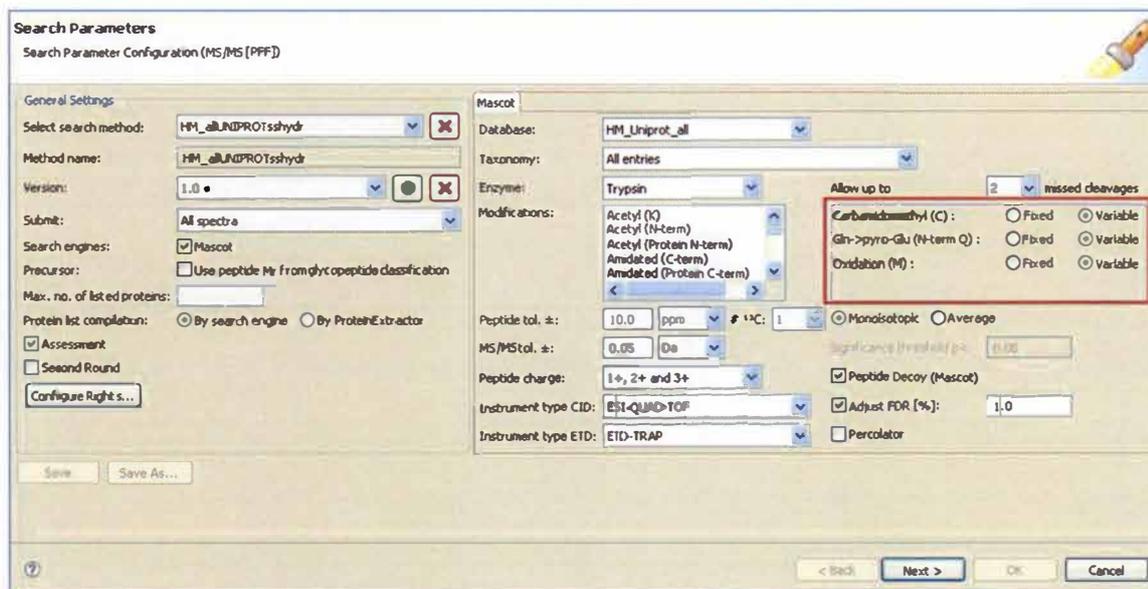


Figure S1 – Paramétrages inclus dans la recherche des peptides marqueurs en banques de données. Le rectangle rouge représente les modifications variables (Carbamidométhylation des cystéines, conversion de la glutamine en pyro-glutamate et oxydation des méthionines) incluses dans les paramètres de la banque de données « maison » appelée « AllUniprot » et basée sur la banque de données « Uniref100 ».

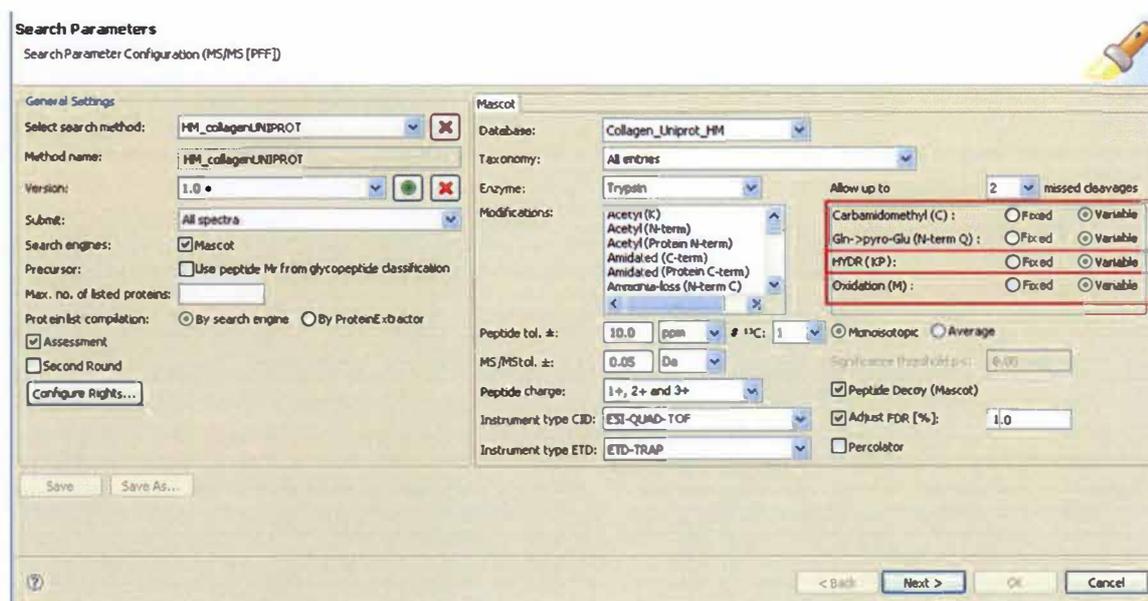
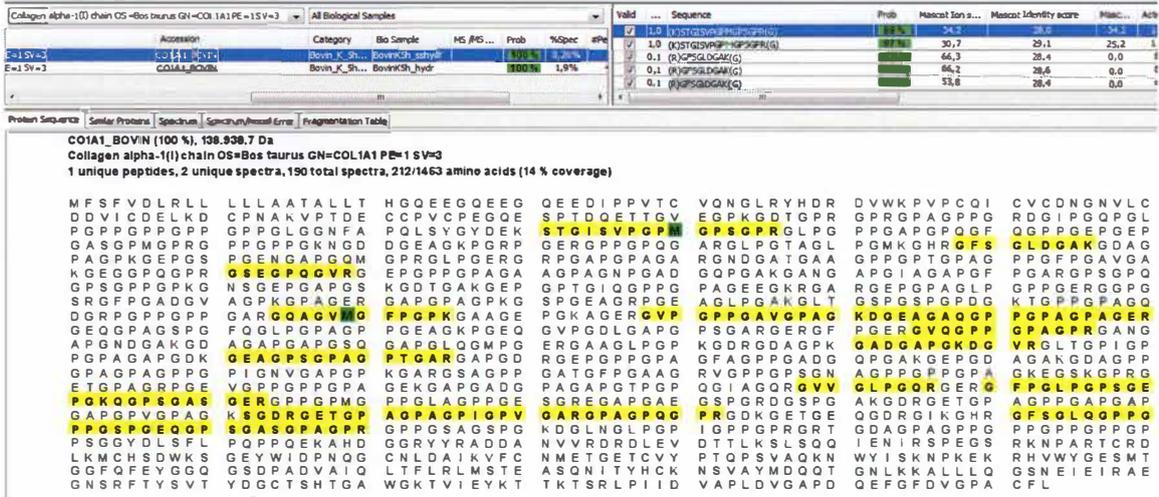


Figure S2 – Paramétrages inclus dans la recherche de peptides marqueurs en banques de données. Une modification supplémentaire est incluse (HYDR (KP) : hydroxylation des lysines et prolines), cette modification étant souvent retrouvée dans les collagènes. Ces paramètres sont utilisés pour la banque de données « CollagenUniprot ».

A



B

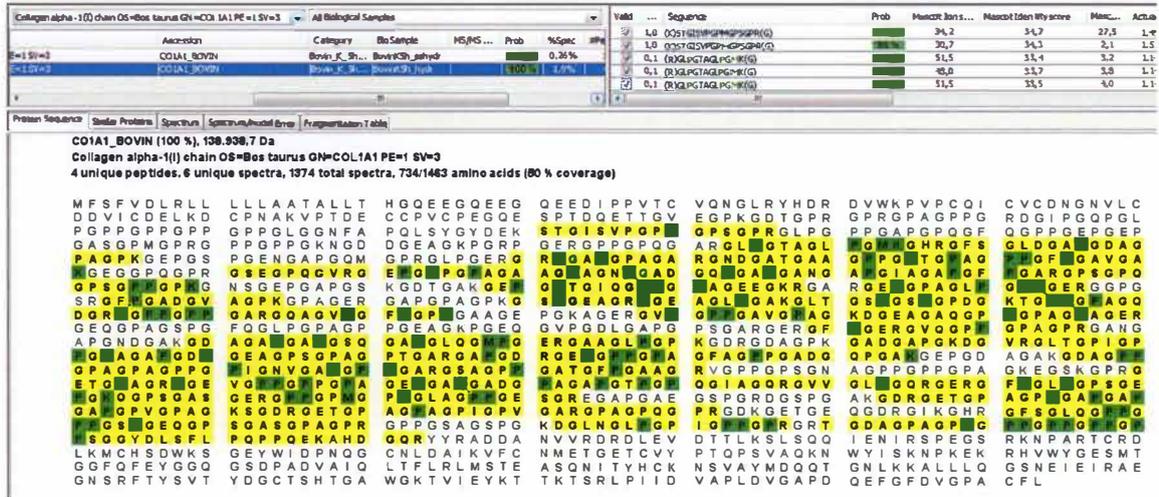


Figure S3 – Représentation de la couverture de séquence de la sous-unité de collagène alpha-1 (I) de *Bos taurus* sans (A) ou avec (B) l'inclusion de l'hydroxylation des lysines et des prolines dans les paramètres de la banque de données utilisée.

Comparaison du nombre de peptides uniques identifiés selon 3 méthodes d'extractions protéiques différentes, dans un échantillon de porc

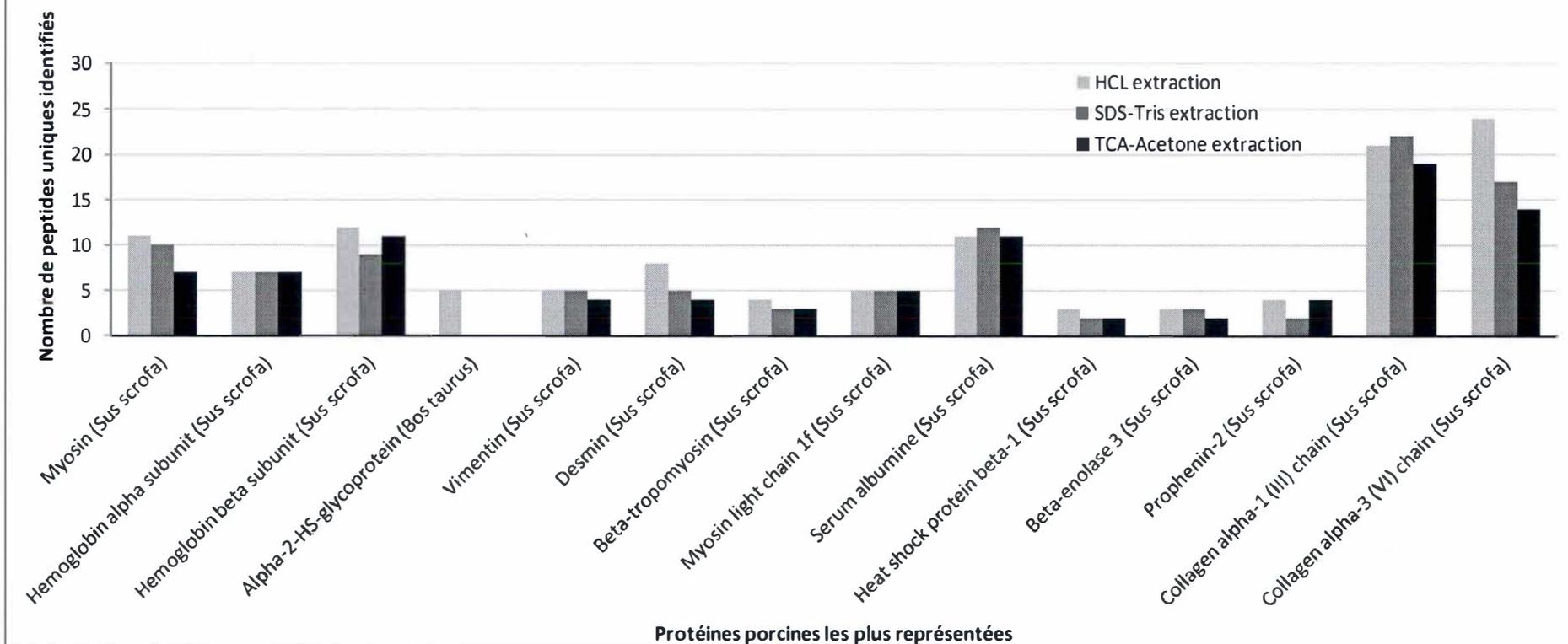


Figure S4 – Comparaison du nombre de peptides uniques identifiés dans un échantillon de farine de porc, selon différentes méthodes d'extraction. Les protéines d'un échantillon porc (N16) ont été extraites selon différents protocoles d'extraction (HCl, SDS-Tris & TCA-Acétone). Les échantillons ont ensuite subi une étape de "Clean-Up" avant d'être digérés enzymatiquement par la trypsine (ratio trypsine/protéine, 1/20) pendant 5 heures, avant leur analyse MS/MS. Le nombre de peptides uniques identifiés pour les protéines porcines les plus abondantes est représenté pour chaque extraction protéique. La liste de ces protéines les plus abondantes à été créée à l'aide de deux banques de données "maison" : AllUniprot et CollagenUniprot.

Comparaison du nombre de peptides uniques identifiés selon 3 méthodes d'extractions protéiques différentes, dans un échantillon de porc

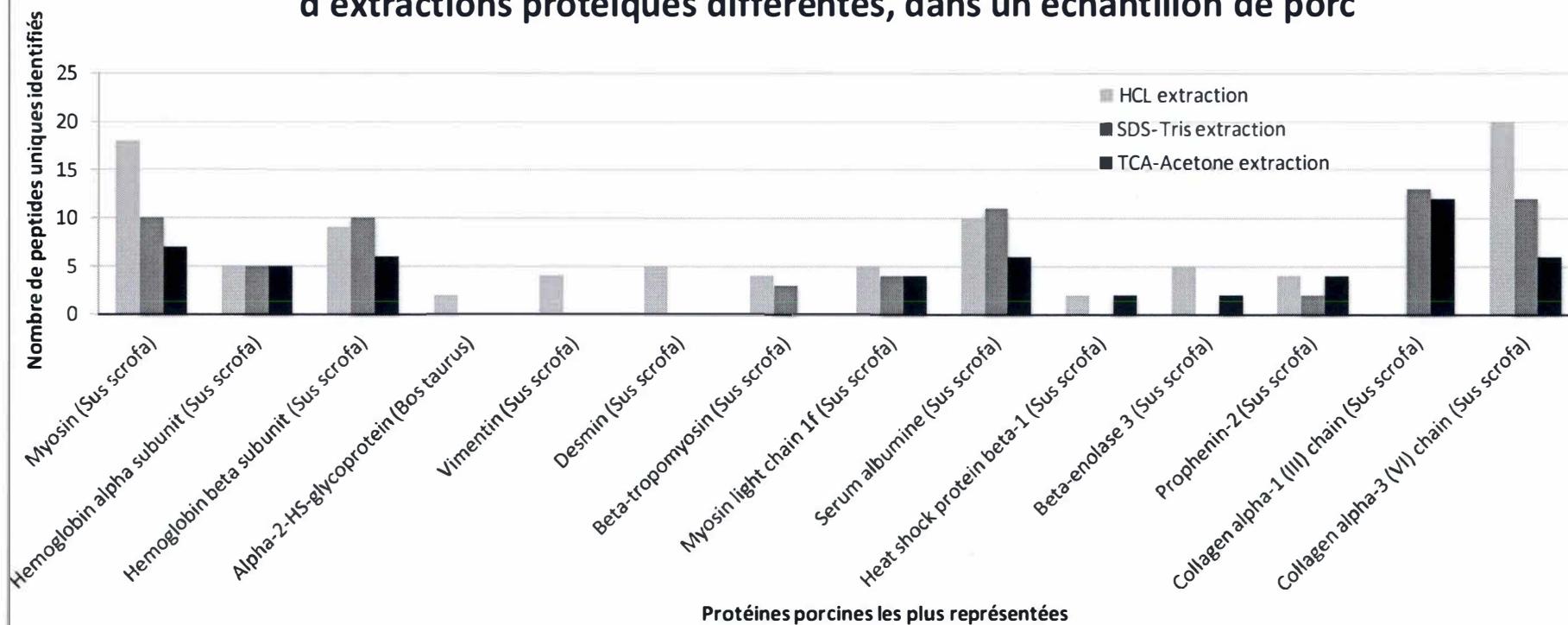


Figure S5 – Comparaison du nombre de peptides uniques identifiés dans un échantillon de farine de porc, selon différentes méthodes d'extraction. Les protéines d'un échantillon porc (N17) ont été extraites selon différents protocoles d'extraction (HCl, SDS-Tris & TCA-Acétone). Les échantillons ont ensuite subi une étape de "Clean-Up" avant d'être digérés enzymatiquement par la trypsine (ratio trypsine/protéine, 1/20) pendant 5 heures, avant leur analyse MS/MS. Le nombre de peptides uniques identifiés pour les protéines porcines les plus abondantes est représenté pour chaque extraction protéique. La liste de ces protéines les plus abondantes a été créée à l'aide de deux banques de données "maison" : AllUniprot et CollagenUniprot.

A

Volledig diervoeder voor paarden.
Aliment complet pour chevaux.

GEBRUIKSAANWIJZING/MODE D'EMPLOI

Koel en droog bewaren./A conserver dans un endroit frais et sec.
(2) Geproduceerd met genetisch gemodificeerde soja.

(2) Produit à partir de soja génétiquement modifié.

ANALYTISCHE BESTANDDELEN - CONSTITUANTS ANALYTIQUES

Ruwe as/Cendres brutes 8.80 %; Ruwe eiwit/Protéines brutes 13.00 %; Ruw vet/Matières grasses brutes 3.20 %; Ruwe celstof/Cellulose brute 12.20 %; Calcium 1.20 %; Totale fosfor/Phosphore totale 0.60 %; Natrium/Sodium 0.50 %

TOEVOEGINGSMIDDELEN/ADDITIFS

Nutritionele toevoegingsmiddelen: /Additifs nutritionnels: Vitamine A (E672) 12800 IE/kg/UJ/kg; Vitamine D3 (E671) 2600 IE/kg/UJ/kg; Vitamine E (all-rac- α -tocopheryl acetaat) (3a700)/Vitamine E (all-rac- α -acétate de tocophéryl) (3a700) 205 mg/kg; Biotine 0.3 mg/kg; Clofimechloride 205 mg/kg; Ijzer(II) sulfaat, monohydraat, Ijzer (E1)/Sulfate ferreux, monohydrate, Fer (E1) 102 mg/kg; Wateroplosbaar calciumjodaat, Jodium (E2)/Iodate de calcium, anhydre, Iode (E2) 1.0 mg/kg; Kobalt(II)sulfaat, heptahydraat, Kobalt (E3)/Sulfate de Cobalt, heptahydrate, Cobalt (E3) 0.15 mg/kg; Koper(II)sulfaat, pentahydraat, Koper (E4)/Sulfate cuivrique, pentahydrate, Cuivre (E4) 36 mg/kg; Mangaan(II)oxide, Mangaan (E5)/Oxyde manganéux, Manganèse (E5) 130 mg/kg; Zinkoxide, Zink (E6)/Oxyde de zinc, Zinc (E6) 126 mg/kg; Natriumseleniet, Selenium (E8)/Sélénite de Sodium, Sélénium (E8) 0.41 mg/kg

INHOUDSTELLING - COMPOSITION

Tarwezemelen, Sojaschillen (2), Tarweglutenvoer, Suikerbietmelasse, Mais, Calciumcarbonaat, Maïsglutenvoer, Natriumchloride, Magnesiumoxide, Son de blé, Pellets de soja (2), Aliment de gluten de blé, Mélasse de betterave, Mais, Carbonate de calcium, Aliment de gluten de maïs, Chlorure de sodium.

B

Protéines abondantes
Globuline (Triticum aestivum) (blé)
Alpha & Beta-conglycinin (Glycine max) (soja)
Triticin (Triticum aestivum) (blé)
Alpha-amylase (Aegilops sharonensis) (sorte de blé)
Glycinin (Glycine max) (soja)
G3PDH (Triticum aestivum) (blé)
Alpha-amylase inhibitor (Triticum aestivum) (blé)
Serpin (Triticum aestivum) (blé)
Beta-amylase (Hordeum vulgare) (orge)
Olesin (Triticum vulgare) (blé)
Globulin-1 S (Zea mays) (maïs)
High molecular weight Glutenin subunit (Triticum aestivum)

Figure S6 – Composition complète de la farine végétale pour chevaux utilisée dans le cadre de certaines expériences. A) Liste complète des "ingrédients" formant cette farine végétale. B) Liste des protéines végétales les plus abondamment représentées dans cette farine végétale. Cette liste a été créée grâce à Scaffold 4.0 et au moyen d'une banque de données végétale (Viridiplantae). Cet échantillon de farine végétale nous a été fourni par le Centre Wallon de Recherches Agronomique de Gembloux (CRA-W).

Tableau S1 – Liste exhaustive des 25 peptides marqueurs spécifiques de bovin identifiés dans les farines animales (cette liste a été créée dans le cadre de la thèse d'Hélène Marbaix).

Protéines	Peptides
Hemoglobin beta (<i>Bos taurus</i>)	AAVTAFWSK NFGNEFTPVLQADFQK
Hemoglobin subunit beta (<i>Bos javanicus</i>)	VLDSFSLXGMK
Hemoglobin subunit alpha (<i>Bos taurus</i>)	AVEHLDDLPGALSESLDLHAHK
Hemoglobin subunit alpha (<i>Bos taurus</i>)	LLSHSLLVTLASHLPSTFTPAVHASLDK VGGHAAEYGAALER
Serum albumin (<i>Bos taurus</i>)	DAFLGSFLYEYSR LVNELTEFAK
Heat shock protein beta-1 (<i>Bos taurus</i>)	ALPAAAEIGPAYNR SATQSAEITIPVTFQAR
Alpha-2HS-glycoprotein (<i>Bos taurus</i>)	HTFSGVASVESSSGEAFHVSK TPIV'GQPSIPGGPVR
Myosin light chain 6B (<i>Bos taurus</i>)	VELPSLIPVLEK
Prothrombin (<i>Bos taurus</i>)	LGEDPDPDAAIEGR
Vitronectin (<i>Bos grunniens</i>)	NWFGLPGR
Peptidoglycan recognition protein 1 (<i>Bos taurus</i>)	AAQSLACGAAR DVQQTLSPGDELYK
MPO protein (<i>Bos taurus</i>)	VPALNLPWR
Transthyretin (<i>Bos taurus</i>)	TSESGELHGLTTEDK
Endopin 2 (<i>Bos taurus</i>)	LAVSHVIHK
Cartilage matrix protein (<i>Bos taurus</i>)	AGGIELFAIGVGR
Cathelicidin 5 (<i>Bos taurus</i>)	YGPIIVPIIR
Collagen alpha-3(VI) (<i>Bos taurus</i>)	LLTPLTTLTAGQIQQLASTR
Collagen alpha-1(VI) chain precursor (<i>Bos taurus</i>)	AAEYDVVFGER
Collagen alpha-2(I) chain precursor (<i>Bos taurus</i>)	IGQPGAVGPAGIR

Tableau S2 – Liste exhaustive des 22 peptides marqueurs spécifiques de porc identifiés dans les farines animales (cette liste a été créée dans le cadre de la thèse d'Hélène Marbaix).

Protéines	Peptides
Desmin (<i>Sus scrofa</i>)	TSGGAGGLGPLR
Keratin, type I cytoskeletal 19-like (<i>Sus scrofa</i>)	FSAGGAFR
Carbonic anhydrase 3 (<i>Sus scrofa</i>)	GGPLTAAIR HDPSLLPWTASYDPGSAK
Catalase (<i>Sus scrofa</i>)	NAVHTYVQAGSHLAAR
Myosin-7 (<i>Sus scrofa</i>)	DVYVPDDK LLSNLFANYAGADTPVEK
Vimentin (<i>Sus scrofa</i>)	LLQDAVDFSLADAINTEFK SLYTSSPGGVYATR
Heat shock protein beta-1 (<i>Sus scrofa</i>)	PLPPPAIEGPA.AVA.APAYSR
HUMMLC2B (myosin) (<i>Sus scrofa</i>)	HFL EELLTTQCDR
Myoglobin (<i>Sus scrofa</i>)	GHHEAELTPLAQSHATK
Pigment epithelium-derived factor (<i>Sus scrofa</i>)	IGFEWNEDGGS.ATSSPGPR
Heat shock protein beta-6 (<i>Sus scrofa</i>)	LPPGVDPAAVTSALSPEGVLSIQAAPAPAQGPLSPPPAAAK
Myosin-binding protein C, fast-type (<i>Sus scrofa</i>)	ADISSFYIES.AER PEG.AGELDFSGLLK
Calsarcin 3 (<i>Sus scrofa</i>)	AGTPSVPELSSGLELLR TPVPFGLLAGETLPR
Myosin light chain 6B (<i>Sus scrofa</i>)	IQQQGTQDYLEGLR IDFETFLPMLQ.AVAK
Titin (<i>Sus scrofa</i>)	AVEEVEAPPAAVPK
Sarcolumenin (<i>Sus scrofa</i>)	AITQDLPGLLGSLGLGK

Tableau S3 – Liste exhaustive des peptides marqueurs spécifiques de volaille identifiés dans les farines animales.

Protéine	Peptides	Echantillons
Myosin-11 OS= Gallus gallus GN=MYH11 PE=1 SV=4	DNADLANEIR	L HCl N7 HCl
	IAQLEELDEEHSNIETMSDR	L HCl N5 HCl
	LQIEVENVTSLLEAESK	N5 HCl N6 HCl N7 HCl N8 HCl, TCA L HCl I HCl
	EEMAEELASANSGR	L HCl
Uncharacterized protein OS= Gallus gallus GN=MYH15 PE=4 SV=2 myosin heavy chain subfragment	DLEEATLHYEATAAALR	L HCl
Hemoglobin subunit alpha-a OS=Gallus gallus GN=HBAA PE=1 SV=2	VVAALIEAANHIDDIAGTSLK	N5 HCl N7 HCl N8 HCl, TCA L HCl, TCA I HCl, TCA
Myosin-9 OS= Galus gallus GN=MYH9 PE=2 SV=2	QISVLQQQAVEAR	N6 HCl
Desmin (fragment) OS= Gallus gallus PE=2 SV=1	TFGGGTSRVFPR	N6 HCl, TCA N8 TCA I TCA L HCl
	TSVPTLSTFR	N5 HCl, TCA N6 HCl, TCA N8 TCA I HCl, TCA L TCA
Vimentine OS= Gallus gallus GN=VIM PE=2 SV=1	YVSASPGGVYATK	N5 HCl, TCA N6 TCA N7 HCl N8 TCA I HCl, TCA L HCl
Uncharacterized protein (fragment) OS= Gallus gallus GN= KRT4 PE=3 SV=2 keratin type II cytoskeletal 5	STALGGFGAGGICR	N5 TCA N8 HCl
	LLQEQSPTTSTR	N6 HCl I HCl
Uncharacterized protein (fragment) OS= Gallus gallus GN=KRT8 PE=3 SV=2 keratin type II cytoskeletal 8	ATLETAIAEAEER	N5 HCl N6 HCl N8 HCl I HCl
Uncharacterized protein OS= Gallus gallus GN=KRT75 PE=3 SV=2	LDALLEIDFLR	N7 HCl
Hemoglobin subunit alpha-D OS=Gallus gallus GN=HBAD PE=1 SV=1	AASHQEEFGAEALTR	N5 HCl, TCA N6 HCl, TCA N7 HCl N8 HCl, TCA L HCl, TCA I HCl, TCA
	NVDNLSQAMAELSNLHAYNLR	N5 HCl, TCA N6 HCl, TCA N7 HCl N8 HCl, TCA L HCl, TCA I HCl, TCA

Proteine	Peptides	Echantillons
Filamin OS= Gallus gallus PE=2 SV=1	AALDVEVSGPGK	N5 HCl, TCA L TCA
	AYGPGIEPTGNVVK	N5 HCl N6 HCl N8 HCl L HCl
	FGGPHIAGSPFK	N5 HCl N6 HCl L HCl
	FNEEHIPDSPFVVTAAAPNSDAAR	L HCl
	MELMECEPGEFR	N5 HCl N6 HCl N8 HCl L TCA, HCl I HCl
	SAPGVVGPAAEDLDFDILR	N5 HCl, TCA N6 HCl N7 HCl L HCl, TCA
	SPFGVTVSPAVELGR	N5 HCl, TCA N6 TCA N8 TCA, HCl L HCl, TCA I HCl, TCA
	TTHFDILTAGAGPGSPDVVVTDPGGR	N5 HCl, TCA N8 HCl, TCA L HCl, TCA
	VDISTEELPDGTGR	N5 HCl N7 HCl L HCl I HCl
	VEAGPGAESSVVR	N5 HCl, TCA N6 HCl, TCA L HCl, TCA I TCA
	VSVGPGSHPNK	L HCl
	SPFEVQVAPAGGAPK	N5 HCl, TCA N8 TCA L TCA I TCA
	QLYSVAYVVR	N5 HCl I HCl
	VTAQGPGIEPTGNVANR	N5 HCl N8 HCl I HCl
	ERGEHLLVLK	N8 HCl L HCl
	VVYTPMAPGSYLIAIK	N5 HCl N6 HCl I HCl
	APVAAPFDPTK	N8 HCl I TCA
	VHSPSGAVEECHISEVTEDEK	N5 HCl L HCl
CqABP260 OS= Gallus gallus PE=2 SV=1 Filamin C	SVPVAVESAGPGLHR	N5 HCl L HCl
	VLASGPGLSPSGVPASLPVEFAIDAR	N5 HCl
	AVVPSGGPHVVGAR	N5 TCA
	AYGPGLEPQGNVVLQPAR	N5 HCl
	FTAAEEGQLR	L HCl
	LLGWVQHR	N5 TCA
450 kDa protin (fragment) OS= Gallus gallus PE=2 SV=1	SPSGGGVEAAVEDR	N5 TCA I TCA L HCl

Protéine	Peptides	Echantillons
Apolipoprotein A-1 OS=Gallus gallus GN=APOA1 PE= 1 SV=2	LISFLDELQK	N5 HCl, TCA N6 HCl, TCA N7 HCl N8 HCl, TCA L HCl, TCA I HCl, TCA
Uncharacterized protein OS=Gallus gallus GN=KRT10 PE=4 SV=2 keratin type 1 cytoskeletal 10	ISSGGGGCGSGSGGGGGGSSCGIR	L HCl
Heat shock protein beta-1 OS=Gallus gallus GN=HCPB1 PE=3 SV=2	LLPSESALLPAGSPYGR	N5 HCl, TCA N6 HCl, TCA N8 HCl, TCA L HCl, TCA I HCl, TCA
	RVPFTFLTSPSWEPFR	N5 HCl, TCA N6 HCl, TCA N8 HCl L HCl, TCA I HCl
Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform OS= Gallus gallus GN=MYLPF PE=1 SV=2	KSFLEELLTQCDR	N7 HCl
ATP synthase subunit alpha OS= Gallus gallus GN=ATPSA1W PE=2 SV=2	FESAFLAHVLSQHEALLSTIR	N5 HCl I HCl
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP), mitochondrial OS= Gallus gallus GN=PCK2 PE=1 SV=2	DVMAELEGLEER	N5 TCA, HCl N6 TCA, HCl N8 TCA I TCA, HCl L TCA, HCl
	EYYGENFGADLPR	N5 HCl, TCA N6 HCl, TCA N8 TCA I HCl, TCA L HCl
	FVWPFGFHNR	N5 HCl N6 HCl, TCA N8 HCl, TCA I HCl, TCA L HCl
	GFFGVAPGTSSR	N6 HCl, Tca N8 TCA L TCA
	GVPLVVEAFGWR	N5 HCl, TCA N6 HCl, TCA N8 HCl, TCA L HCl, TCA I HCl, TCA
	YLEHWLSTGLR	N5 HCl, TCA N6 HCl, TCA N8 HCl, TCA L HCl, TCA I HCl, TCA
	LFHVNWFLR	N5 TCA N6 HCl
	VLAWIFGR	N5 HCl, TCA N6 HCl, TCA N7 HCl N8 HCl, TCA L HCl, TCA I HCl, TCA

Protéine	Peptides	Echantillons
Serum albumin OS=Gallus gallus GN=ALB PE=4 SV=2	PLPSIILDEICQVEK	N7 HCl
	MPQVPTDLLLETQK	N8 TCA
	QSDINTCFGEEGANLIVQSR	N5 HCl N7 HCl N8 HCl, TCA L HCl I HCl
	TNCDLLHDHGEADFLK	N7 HCl
	FVHDSIGVHK	N8 TCA
	RHPEFSIQLIMR	N8 HCl
Creatine kinase M-type OS= Gallus gallus GN=CKM PE=2 SV=1	LSVEALNSLEGEFK	N5 HCl N8 HCl, TCA I TCA L HCl, TCA
Annexin OS=Gallus gallus GN=ANXA1 PE=3 SV=1	HEIDLNEIK	N5 HCl N7 HCl
Uncharacterized protein (fragment) OS= Gallus gallus Gn=Gga 10533 titin isoform X2 et X3	VSAENIVGIGR	N6 HCl
	NAVGVSFPR	N8 HCl
	TELILPAATR	N5 HCl
Apolipoprotein AIV OS=Gallus gallus GN=apoAIV PE=2 SV=1	AQLSPLAQELQEALR	N5 HCl, TCA N6 HCl, TCA N7 HCl L HCl, TCA I HCl
	QIQQELAEIQAK	N5 HCl