Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Analyses peptidomiques pour la détection et l'identification des composants protéiques d'origine animale dans l'alimentation des animaux de rente

Marbaix, Hélène

Award date:
2016

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.

Download date: 02. May. 2026

Université de Namur
Facultés des Sciences – Département de Biologie
Namur Research for Life Sciences (NARILIS)
Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC)
Rue de Bruxelles, 61 ; B-5000 ; Belgique

Analyses peptidomiques pour la détection et l'identification des composants protéiques d'origine animale dans l'alimentation des animaux de rente

Dissertation présentée par
Hélène MARBAIX
En vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Composition du jury :

Prof. Martine RAES (promoteur)
Unité de Recherche en Biologie Cellulaire,
NARILIS, UNamur

Dr Sergio MAURO (co-promoteur)
Centre wallon de Recherches agronomiques,
Dpt Sciences du Vivant, Gembloux

Dr Vincent BAETEN
Centre wallon de Recherches agronomiques,
Dpt Valorisation des Productions, Gembloux

Prof. Thierry ARNOULD (président)
Unité de Recherche en Biologie Cellulaire,
NARILIS, UNamur

Dr Didier VERTOMMEN
Institut de Duve,
UCL, Bruxelles-Woluwe

Dr Philippe DELAHAUT
Centre d'Economie Rurale,
Dpt Santé, Marloie

Dr Josef RASINGER
National Institute of Nutrition and
Seafood Research, Bergen, Norvège

Mars 2016

Remerciements

Me voilà arrivée à la fin de ces 4 années! Qu'est-ce que ça a passé vite ! Cette belle période de ma vie aura été riche en apprentissages scientifiques mais également en amitié et en complicité ! Ce travail n'aurait pas abouti sans de nombreuses personnes que je me dois de remercier.

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir pris le temps de lire attentivement toutes ces pages ! Merci de vos remarques constructives !

Un grand merci à ma promotrice, Martine Raes, pour votre temps plus que précieux, vos conseils et remarques, vos corrections attentives, votre soutien aussi bien professionnellement que personnellement, vos encouragements… ! Malgré un agenda de ministre overbooké, vous avez toujours su vous libérer quand il le fallait. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir cru en moi !

Merci également à Serge Mauro, mon co-promoteur, d'avoir pensé à ce projet super intéressant sans lequel je n'aurais pas pu faire ma thèse !

Merci à l'ensemble du CRA-W et du CER Groupe de m'avoir si bien accueillie ! Merci de m'avoir permis de toucher au moulin ZM 200 et… de m'avoir appris à si bien le nettoyer ! Merci pour tous les échantillons de farines ! Un grand merci à Olivier et Marie-Caroline pour leur bonne humeur permanente et pour m'avoir accompagnée en Norvège et en Irlande ! Marica, vérifier tes extraits digérés vont me manquer ! Attention aux bulles sinon Marc va râler ! Et tu verras, un jour tu croiras aux araignées ! Merci à Nathalie Gillard et Mélanie (alias Simone, euh…) pour leur aide et leurs explications sur le triple quadrupôle !

Je remercie l'ensemble des seniors de m'avoir accueillie en URBC et permis que je fasse ma thèse dans ce chouette labo ! Merci à Viviane pour son aide administrative et son écoute attentive !

Un grand merci aussi à l'ensemble des techniciens passés et présents : Edouard, Maude, Catherine, Antoine, Guy, Martine VS et Noëlle ! Edouard, Chef, l'encyclopédie vivante du labo, tu m'as énormément appris ! J'ai beaucoup aimé travailler et discuter avec toi ! Toujours le sourire, tu fais de la concurrence à Marc dans le foutage de gueule (j'y reviendrais après…) ! Merci de mettre tout le matériel dont j'avais besoin en hauteur pour me rappeler que j'étais la plus petite du labo ! J'espère qu'on aura encore l'occasion de se voir et de boire un bon verre de vin ensemble ! Maude, toi aussi tu m'as beaucoup aidée ! Ah les clean-up ! Je ne pense pas que ça va me manquer… Par contre, nos moments papottes pendant les temps d'incubation me manquent déjà ! Catherine, merci de m'avoir appris les subtilités des digestions et de m'avoir accompagnée en tenue de cosmonaute dans la salle blanche ! Antoine, Guy, Martine et Noëlle : merci pour votre bonne humeur et votre disponibilité !

J'en viens maintenant à une personnalité très importante du labo : Dieu ! Je pourrais écrire des pages pour te remercier de tout ce que tu as fait pour moi ! Déjà me supporter pendant 4 ans !

Remerciements

Ca n'a pas dû être facile tous les jours ! Je me revois encore à mon premier jour, le 1er février 2012, où tu m'as accueillie en URBC ! Je ne savais pas encore à qui j'avais affaire ! Les kiwis collés au bureau, les courses dans le labo pour nous lancer de la glace, les bombardements de frigolite dans le bureau, les complots avec Edouard pour que je me fasse enlever par Al Qaïda ou que j'attrape Ebola, les vannes quotidiennes, le compte à rebours pour la pré-défense et beaucoup d'autres ! Un énorme merci, Oh Dieu de la spectrométrie de masse (fallait que je la place !), pour tout ce que tu m'as appris, pour ta patience, tes conseils, ta disponibilité, tes remarques constructives, ta gentillesse… ! J'avoue, tu vas me manquer ! Tu penseras à moi en buvant ton café ! ;-)

Pendant ces 4 années, de belles amitiés se sont créées ! Tout d'abord, merci à mes premières collègues de bureau Magali, Aude et Silvia de m'avoir accueillie dans le plus beau bureau de l'URBC ! J'ai adoré partager ces années avec vous ! Vous êtes géniales les filles ! Merci à Mélanie pour la compagnie au CER! Merci aux filles du paradis de la chaleur pour leur gentillesse, complicité, humour même dans les moments pénibles de la thèse : p'tit chef, Edith et Anaïs ! Cécé, dédicace spéciale pour notre fou rire dans les maïs ! Merci de m'avoir aidée… C'est bien sûr complètement ironique ! Merci à mon couloir d'adoption : Marc, Patsy, Bush grâce à qui je me sentais moins seule après 18h, les filles du bureau du fond qui vont beaucoup me manquer : p'tit bichon, Madame Lobet, Emilie et Morgane ! Merci pour votre soutien et votre porte toujours ouverte ! Kayleen, merci de m'avoir prêté ton bureau pendant la dure période de rédaction ! Merci à Marie, Elise et Géraldine pour leur soutien et leur gentillesse ! Merci à Dimitri pour ton aide et ta bonne humeur ! Ca été un plaisir de travailler avec toi ! Certains moments de la fête de l'univ 2014 resteront gravés dans ma mémoire !
Ces 4 ans ont vu naitre beaucoup de beaux moments comme de nombreux mariages qui étaient tous géniaux ! On recommencerait bien ! Il y a également eu de moins bons moments et je vous remercie tous de m'avoir soutenue ! Merci aux anciens et nouveaux du labo : Marie G, Annick, Seb, Guil, Aurélie T, Hélène R, Sam, Julien, Anne-K, Eléonore, Kassandra, Jérôme, François, Kathleen, Sophie… Vous avez chacun contribué à rendre ces années magnifiques !

Merci à mes amis, anciens de Gembloux, et à ma famille pour leurs encouragements et leur soutien !

Enfin et pas des moindres, un énorme merci à Geoffrey, mon petit mari ! Merci de m'avoir supportée (parce que oui ça devait parfois être pénible, je le reconnais) et de m'avoir encouragée ! Merci pour ton soutien, ton Amour, ta gentillesse, tes bons petits plats… ! Tu as toujours plus cru en moi que moi-même ! Je t'aime énormément !
Merci à Kinder d'avoir tenu le coup malgré tes problèmes digestifs, à Léo de me faire sortir le dimanche matin et d'être toujours aussi content quand je rentre à la maison et enfin à Brad de toujours garder ton sang-froid !

Bonne lecture à tous,

Hélène.

Résumé

Les farines animales ont été largement utilisées dans l'alimentation du bétail pour leur apport en énergie, protéines, minéraux, graisses… Cependant, l'apparition de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), plus communément appelée « maladie de la vache folle », a conduit à une série de mesures législatives concernant l'utilisation de ces farines animales afin de limiter l'expansion de l'ESB. En effet, il s'est avéré que la transmission la plus probable de cette maladie était liée à l'utilisation de farines animales contaminées par une protéine prion dans l'alimentation des bovins. Suite à une diminution des cas d'animaux infectés grâce à ces interdictions, la Commission Européenne réfléchit sur de potentiels assouplissements de la législation.

Diverses méthodes de détection et d'identification des Protéines Animales Transformées (PATs) existent à ce jour : la microscopie optique et la « Polymerase Chain Reaction » (les deux méthodes officielles), les méthodes proches infrarouges et les méthodes immunologiques. Cependant, ces méthodes présentent des limitations et l'assouplissement de la législation requiert le développement de nouvelles méthodes analytiques afin de déterminer l'origine exacte des PATs.

C'est pourquoi une approche peptidomique a été développée afin de définir l'origine taxonomique et tissulaire des PATs. Nous avons mis au point une méthode de spectrométrie de masse afin de déterminer l'espèce et la source (légale ou pas) des PATs : une extraction protéique au TCA - acétone suivie d'une étape de « clean-up », une digestion tryptique de 5 heures (avec un ratio trypsine/protéines de 1/20) et des analyses MS/MS sans *a priori* à l'aide d'un Q-TOF. Nous avons ainsi pu identifier un certain nombre de peptides biomarqueurs spécifiques d'espèces (pour le bœuf, le porc, le mouton et la volaille), représentatifs de ces farines animales. Parmi ceux-ci, 3 peptides bovins et 4 peptides porcins ont été sélectionnés pour la production d'anticorps polyclonaux de lapin et pour le développement d'une technique de spectrométrie de masse de routine de détection des PATs. La transposition de la technique sans *a priori* à une technique de routine à l'aide d'un triple quadrupôle a été démontrée par la détection des 7 peptides marqueurs dans des échantillons de PATs en seulement 20 minutes. Des farines de porc ainsi qu'un aliment végétal ont été contaminés par des farines bovines à raison de 0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 %. La limite de détection actuelle est de 2 % de contamination bovine. Une approche statistique de type PCA (Principal Component Analysis) sur ces échantillons s'est révélée très puissante, fournissant une empreinte globale des échantillons de PATs à partir de milliers de données MS, ce qui a permis la discrimination entre différentes espèces, la distinction entre une farine porcine contaminée avec 0,1 % de bovin et cette même farine non contaminée, la confirmation des peptides marqueurs précédemment identifiés et la détermination de nouveaux peptides spécifiques. Ces différentes approches peptidomiques (sans *a priori*, ciblée et statistique) apportent des réponses aux limitations des méthodes actuelles et pourraient être considérées comme méthodes analytiques puissantes de seconde ligne pour des contre-analyses lorsqu'il y a un doute sur certains échantillons.

Abstract

Processed Animal Proteins (PAPs) have been widely used in animal feed being a convenient source for providing energy, protein, minerals, fats... However, the emergence of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), more commonly called "mad cow disease", led to a set of legislative measures concerning the use of these PAPs to limit the spread of BSE. Indeed, it has been found that this disease was most likely transmitted due to the use of PAPs contaminated with a prion protein in cattle feed. Following a decrease in the number of cases of infected animals thanks to these bans, the European Commission is considering the possibility of relaxing the legislation.

Several methods of detection and identification of PAPs exist to date: optical microscopy and polymerase chain reaction (official methods), near infrared methods and immunological methods. However, these methods have limitations and the progressive release of the feed ban requires the development of new analytical methods able to determine the exact origin of PAPs.

This is why a peptidomic approach has been developed in order to define the taxonomic and tissue origin of PAPs. We set up a promising MS-based method to determine the species and the source (legal or not) present in PAPs: a TCA-acetone protein extraction followed by a clean-up step, an in-solution tryptic digestion of 5 hours (with a 1/20 protein/trypsin ratio) and mass spectrometry analyses without any *a priori* with a Q-TOF. We were able to identify some species-specific biomarker peptides (in beef, pork, sheep and poultry), representative of these PAPs. Among these, 3 bovine and 4 porcine peptides were selected for the production of rabbit polyclonal antibodies and for the development of a routine mass spectrometric technique to detect PAPs. The possible transposition of the previous technique without any *a priori* to a routine technique using a triple quadrupole was demonstrated by the detection of the 7 peptide markers in PAP samples in only 20 minutes. Porcine PAP and a vegetal feed were contaminated with bovine PAP at 0; 0.1; 0.5; 1; 2; 5 and 10 %. The current limit of detection is 2 % of bovine contamination. A PCA (Principal Component Analysis) statistical approach on these PAP samples was also shown to be powerful, providing a fingerprint of the samples from thousands of MS data, allowing the discrimination between different species, the distinction between a contaminated porcine PAP with 0.1 % of beef and the same uncontaminated PAP, the confirmation of the previously identified peptide markers and the determination of new specific peptides. These different peptidomics approaches (without any *a priori*, targeted and statistical) provide answers to the limitations of current methods and could be considered as powerful analytical second-line methods for counter-analyses on suspicious samples.

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
AMP : Adénosine Monophosphate
AQUA : Absolute QUAntification
ATP : Adénosine Triphosphate
B : binding de l'anticorps en présence de l'échantillon
B0 : binding de l'anticorps en présence du tampon de lyse seul
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
BS : Blind Samples
BSE : Bovine Spongiform Encephalopathy
Ca : Calcium
CE : Commission Européenne
CER : Centre d'Economie Rurale
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CID : Collision-Induced Dissociation
CRA-W : Centre wallon de Recherches agronomiques
Da : Dalton
DLA buffer : DIGE labelling buffer
DTT : Dithiothréitol
ECD : Electron Capture Dissociation
EDTA : Acide éthylène Diamine Tétra Acétique
EFPRA : European Fat Processors and Renderers Association
EFSA : European Food Safety Authority
EIC : Extracted ion Chromatogram
ELISA : Enzyme - Linked ImmunoSorbent Assay
ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine
ESI : Electrospray Ionization
ESTs : Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles
ETD : Electron Transfer Dissociation
ETV : Encéphalopathie Transmissible chez le Vison
EU : European Union
FA : Formic Acid
FMF : Find Molecular Features
FSAI : Food Safety Authority of Ireland
FT-ICR : Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
FVOs : Farine de Viande et d'Os
g : gramme

Abréviations

Gel 1D : Gel d'électrophorèse monodimensionnel
Gel 2D : Gel d'électrophorèse bidimensionnel
GTH : Glycérol Triheptanoate
h : heure
HCl : Acide chlorhydrique
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
3HyP : 3-hydroxyproline
4HyP : 4-hydroxyproline
IAA : Iodoacétamide
ICAT : Isotope Coded Affinity Tag
Ig : Immunoglobuline
iTRAQ : Isobaric Tag for Relative & Absolute Quantification
KCl : Chlorure de potassium
kDa : kilo Dalton
LC : Liquid Chromatography
LESA-MS : Liquid Extraction Surface Analysis-Mass Spectrometry
LIT : Linear Ion Trap
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MaSUN: Plateforme technologique de spectrométrie de masse (UNamur)
MBM : Meat and Bone Meal
MCJ : Maladie de Creutzfeldt Jakob
MDC : Maladie Débilitante Chronique
Mg : Magnésium
mg : Milligramme
min : Minute
MIRs : Mammalian-wide Interspersed Repeats
ml : Millilitre
mM : Millimolaire
MRM : Multiple Reaction Monitoring
MS : Mass Spectrometry
m/z : masse/charge
NARILIS: Namur Research Institute for Lifesciences
NIFES : National Institute of Nutrition and Seafood Research
NIRM : Near Infrared Microscopy
NIRS : Near Infrared Spectroscopy
nm : Nanomètre
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
P : peptide
PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAPs : Processed Animal Proteins

Abréviations

PATs : Protéines Animales Transformées
PC : Principal Component
PCA : Principal Component Analysis
PCR : Polymerase Chain Reaction
PFF : Peptide Fragment Fingerprinting
PMF : Peptide Mass Fingerprinting
ppm : Parts-per-million
Prion : Proteinaceous Infectious Only Particle
PrP : Protéine Prion
PrP^{C} : Protéine Prion Cellulaire
PrP^{res} : Protéine Prion Résistante
PrP^{Sc} : Protéine Prion Scrapie
Q : Quadrupôle
Q-PCR : Quantitative PCR
Q-TOF : Quadrupôle - Time Of Flight
RASFF : Rapid Alert System for Food and Feed
RT : Retention Time
s : seconde
SA-HRP : Streptavidine - Horseradish Peroxidase
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SILAC: Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture
SINEs : Short Interspersed Nucleotide Elements
SRMs : Specified Risk Materials
TBS : Tris-Buffered Saline
TCA : Acide trichloroacétique
TFA : Acide trifluoroacétique
TIC : Total ion Chromatogram
TOF : Time Of Flight
Tris : Trishydroxyméthylaminométhane
TSE : Transmissible Spongiform Encephalopathy
UE : Union Européenne
UHPLC : Ultra High Performance Liquid Chromatography
UNamur : Université de Namur
UNIPROT : Universal Protein Resource
URBC : Unité de Recherche en Biologie Cellulaire
UV : Ultraviolets
µg : microgramme
µl : microlitre

Abréviations

Acides aminés

A ou Ala : Alanine
C ou Cys : Cystéine
D ou Asp : Acide aspartique
E ou Glu : Acide glutamique
F ou Phe : Phénylalanine
G ou Gly : Glycine
H ou His : Histidine
I ou Ile : Isoleucine
K ou Lys : Lysine
L ou Leu : Leucine
M ou Met : Méthionine
N ou Asn : Asparagine
P ou Pro : Proline
Q ou Gln : Glutamine
R ou Arg : Arginine
S ou Ser : Serine
T ou Thr : Thréonine
V ou Val : Valine
W ou Trp : Tryptophane
Y ou Tyr : Tyrosine

Table des matières

Remerciements

Résumé

Abstract

Abréviations

Avant-propos

Introduction 1

1. « Food and feed safety » 1

1.1. Sûreté alimentaire en général 1

1.2. Problématique de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine et des farines animales 4

1.2.1. Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (ESTs) 4

1.2.2. Le prion 5

1.2.3. Le mode de transmission de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) 7

1.3. Législation 10

1.3.1. Législation et régulation 10

1.3.2. Réintroduction de certaines PATs 15

2. Méthodes de détection et d'identification des PATs 16

2.1. Méthodes officielles 17

2.1.1. Microscopie optique 17

2.1.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) 20

2.2. Méthodes proche infrarouge 22

2.2.1. La spectroscopie proche infrarouge (NIRS) 22

2.2.2. La microscopie proche infrarouge (NIRM) 23

2.3. Méthodes immunologiques 24

2.4. Combinaison de différentes méthodes d'identification 28

3. Méthodes protéomiques 29

3.1. Techniques d'ionisation 29

3.1.1. Ionisation par électrospray (ESI) 29

3.1.2. Désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) 30

3.2. Analyseurs de masse 31

3.2.1. Quadrupôle (Q) 31

3.2.2. Temps de vol (TOF) 31

Table des matières

3.2.3. Trappe ionique 32
3.2.4. Orbitrap 32
3.2.5. Spectromètre de masse à transformée de Fourier (FT-ICR) 32
3.3. Spectromètres de masse en tandem 33
3.3.1. TOF-TOF 33
3.3.2. Q-TOF 34
3.3.3. Triple quadrupôle 34
3.4. Identification et analyse des protéines 34
3.4.1. Approche « top-down » 35
3.4.2. Approche « bottom-up » 35
3.5. Analyses bioinformatiques 35
3.5.1. Peptide Mass Fingerprinting (PMF) 36
3.5.2. Peptide Fragment Fingerprinting (PFF) 36
3.5.3. Interprétation des résultats 37
3.5.4. Analyse en composantes principales (PCA) 37
3.6. Protéomique et peptidomique quantitative 38
4. Protéines Animales Transformées et protéomique 40
4.1. Introduction 40
4.1.1. Analyses protéomiques des viandes 41
4.1.2. Analyses protéomiques des PATs dans les farines animales 42
4.2. Revue de quelques protéines pertinentes dans le contexte des Protéines Animales Transformées et farines animales 45
4.2.1. Les collagènes et la gélatine 45
4.2.2. L'ostéocalcine 47
4.2.3. La troponine I 48
4.2.4. Les myosines 49
4.2.5. L'hémoglobine 50
Objectifs 52
Résultats 54
Introduction générale aux résultats 54
Partie 1 : analyses peptidomiques des PATs présentes dans des échantillons de farines animales 55
1. « Identification of proteins and peptide biomarkers for detecting banned Processed Animal Proteins (PAPs) in meat and bone meal by mass spectrometry » 55

Table des matières

1.1. Introduction et résultats préliminaires au manuscrit 55
1.1.1. Résultat préliminaire : traitement mécanique 56
1.1.2. Résultat préliminaire : optimisation de l'extraction protéique 56
1.1.3. Résultat préliminaire : optimisation de la digestion liquide 57
1.2. Manuscrit « Identification of proteins and peptide biomarkers for detecting banned Processed Animal Proteins (PAPs) in meat and bone meal by mass spectrometry » 59
1.3. Résultats complémentaires au manuscrit « Identification of proteins and peptide biomarkers for detecting banned Processed Animal Proteins (PAPs) in meat and bone meal by mass spectrometry » 74
1.3.1. Peptides biomarqueurs de volaille 74
1.3.2. Application de la méthode en routine : analyses supplémentaires en triple quadrupôle 74
1.3.3. Poursuite des expériences portant sur la limite de détection 76
1.3.4. Etude de la fiabilité de la méthode : « blind samples » 77
1.3.5. Aperçu de la mise au point des tests immunologiques de type ELISA compétitif 79
2. Etude de différents protocoles d'extraction protéique pour la détection de protéines animales transformées en vue d'une comparaison inter-laboratoire 84
2.1. Evaluation des protocoles d'extraction sur base du rendement 84
2.2. Evaluation des protocoles d'extraction par gel d'électrophorèse à une dimension 85
2.3. Evaluation des protocoles d'extraction par spectrométrie de masse 85
2.4. Recherche des peptides biomarqueurs dans les échantillons extraits à l'aide des protocoles choisis 87
3. Résultats non publiés : Analyse en Composantes Principales ou Principal Component Analysis (PCA) 89
3.1. Introduction au modèle statistique de la PCA 89
3.1.1. Paramètres utilisés lors du processus de traitement des données avant la PCA 90
3.1.2. Visualisation des résultats par la PCA 91
3.2. PCA sur des échantillons de PATs d'espèces différentes 91
3.3. PCA sur des mélanges de PATs 92
3.4. PCA sur les « blind samples » 93
3.5. Conclusion 94
Partie 2 : analyses peptidomiques des PATs présentes dans des échantillons sanguins 96
4. « Identification of specific bovine blood biomarkers by a non-targeted approach using HPLC ESI tandem mass spectrometry » 96
4.1. Introduction au manuscrit 96

Table des matières

4.2. Manuscrit « Identification of specific bovine blood biomarkers with a non-targeted approach using HPLC ESI tandem mass spectrometry » 97

Conclusions générales, discussion et perspectives 112

Complexité des échantillons de PATs 114

Comparaison des différentes techniques de spectrométrie de masse utilisées 117

Apport des méthodes de spectrométrie de masse développées aux techniques existantes pour la détection et l'identification des PATs 120

Perspectives 122

Conclusion finale 124

Annexes 126

Références 127

Webographie 141

Avant-propos

Le projet « Peptido-génomique », démarré en 2012, avait pour objectif de développer des approches innovantes de types peptidomique et génomique pour la détection et l'identification des composants protéiques d'origine animale dans l'alimentation des animaux de rente. Ce projet est financé par le Service Public Fédéral, Santé Publique, Sécurité de la Chaîne Alimentaire et Environnement. Ce travail a fait l'objet de plusieurs collaborations. L'Université de Namur (URBC-Narilis) et le Centre wallon de Recherches agronomiques (CRA-W, département Sciences du Vivant) sont en charge de la partie peptidomique, le CRA-W (département Valorisation des Productions agricoles) est en charge de la partie génomique et le Centre d'Economie Rurale de Marloie (CER Groupe) se charge de la production d'anticorps, sur base des peptides détectés et séquencés dans le cadre de la partie peptidomique, et de leur exploitation pour le développement de tests ELISA. Signalons qu'en cours de thèse, grâce au réseau de collaborations internationales du CRA-W, une collaboration fructueuse a également été établie avec le NIFES (National Institute of Nutrition and Seafood Research, Norvège).

Deux stratégies expérimentales vont donc être développées pour rencontrer les modifications de la législation sur l'utilisation des protéines d'origine animale dans l'alimentation des animaux de rente (Règlement (EU) N° 56/2013) (Commission, 2013b). La levée de l'interdiction totale des sous-produits animaux est subordonnée à la mise au point d'outils permettant de contrôler l'interdiction du recyclage intra-spécifique et l'utilisation de protéines animales transformées provenant de ruminants. L'analyse de peptides, préalablement mis en solution par digestion enzymatique, au moyen de la spectrométrie de masse et de nouveaux tests par « Polymerase Chain Reaction » (PCR) capables de distinguer l'origine tissulaire des ADN amplifiés sur base des sites de méthylation présents dans leur séquence étaient les deux voies innovatrices proposées dans le cadre de ce projet. Le projet envisageait également des valorisations via des tests en spectrométrie de masse plus en routine, adaptés à des laboratoires d'analyse, et par le développement de tests immunologiques.

Cette thèse traitera uniquement de la partie peptidomique de ce projet, qui a donc porté sur l'analyse d'échantillons de Protéines Animales Transformées (PATs) sur base de la spectrométrie de masse.

Introduction

1. « Food and feed safety »

1.1. Sûreté alimentaire en général

Il faut distinguer la sûreté alimentaire (« food safety ») de la sécurité alimentaire (« food security »). La définition de la **sécurité alimentaire** a beaucoup évolué durant les trente dernières années. Lors du Sommet mondial de l'alimentation en 1996, « la sécurité alimentaire existe lorsque tous les êtres humains ont, à tout moment, la possibilité physique, sociale et économique de se procurer une nourriture suffisante, saine et nutritive leur permettant de satisfaire leurs besoins et préférences alimentaires pour mener une vie saine et active ». Il y a quatre piliers à cette notion de sécurité alimentaire : l'accès, la disponibilité, la stabilité et la qualité. Même si l'accès est la dimension la plus importante, la qualité des produits est de plus en plus mise en avant. C'est de là que découle le concept de **sûreté alimentaire** qui peut être également appelée sécurité sanitaire des aliments. Le règlement (CE) N°178/2002 (Parliament and Council, 2002b) assure la qualité des denrées alimentaires destinées à la consommation humaine et la qualité des aliments pour animaux. Il garantit ainsi la libre circulation de denrées saines et sûres dans le marché intérieur. Aucune denrée alimentaire dangereuse pour la santé et/ou impropre à la consommation ne peut être mise sur le marché. Lorsqu'une denrée alimentaire dangereuse fait partie d'un lot ou d'un chargement, la totalité du lot est présumée dangereuse. L'analyse des risques pour la santé est effectuée en plusieurs phases: l'évaluation, la gestion et la communication auprès du public. Ce processus est conduit de façon indépendante, objective et transparente et est fondé sur les preuves scientifiques disponibles. L' « European Food Safety Authority » (EFSA) a pour mission de fournir des avis et une assistance scientifiques et techniques dans tous les domaines ayant un impact sur la sécurité alimentaire. Elle constitue une source indépendante d'informations et assure la communication sur les risques auprès du grand public. De plus, la législation alimentaire de l'Union Européenne (UE) protège les consommateurs contre les pratiques commerciales frauduleuses ou trompeuses. Les exploitants ont la responsabilité de la traçabilité de leurs produits à toutes les étapes de la production, de la transformation et de la distribution. Si un exploitant considère qu'un aliment est nocif pour la santé humaine ou animale, il engage immédiatement les procédures de retrait du marché et en informe les autorités compétentes. Lorsque le produit a déjà atteint le marché, l'exploitant informe les consommateurs et rappelle ses produits. Il existe un système d'alerte rapide pour la gestion des urgences et des crises appelé « Rapid Alert System for Food and Feed » (RASFF) qui associe les pays de l'Union Européenne, la Commission et l'EFSA. Il permet des échanges d'information concernant, entre autres, les mesures visant à restreindre la mise en circulation ou retirer des aliments du marché. En cas de risque alimentaire, les informations diffusées au

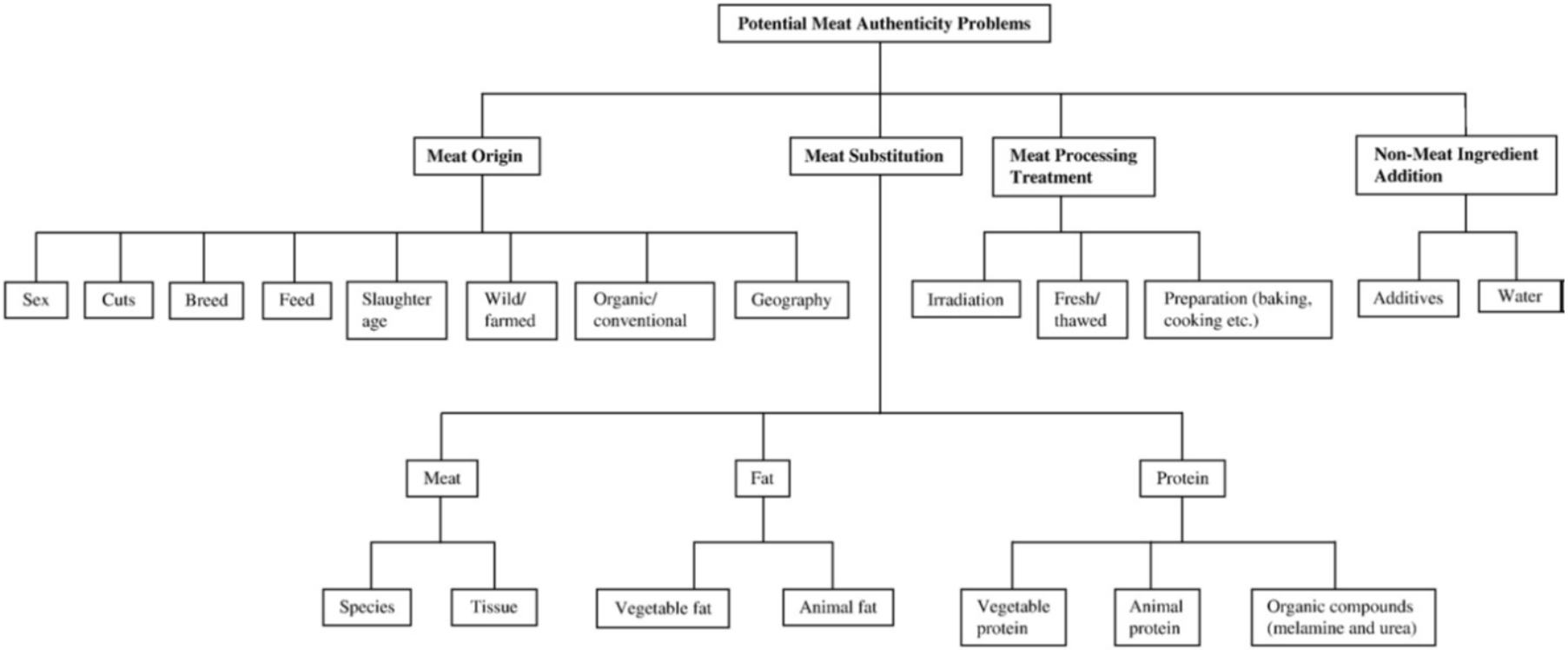


Figure 1. Problèmes potentiels d'authentification de la viande : l'origine de la viande, les substitutions de viande, les modifications de traitement et transformation des viandes et l'addition de divers produits non carnés (Ballin, 2010).

sein du système d'alerte sont mises à la disposition du grand public. Cette législation (Règlement (CE) N° 178/2002) vise également à protéger la santé et le bien-être des animaux, la santé des plantes et l'environnement (Parliament and Council, 2002b).

Les consommateurs sont en droit de demander des informations claires et fiables sur les produits qu'ils consomment. Ces informations seront à la base de leurs choix. Par exemple, un produit peut être ou ne pas être choisi sur base de préoccupations religieuses, culturelles ou éthiques. Un musulman fera attention à l'absence de porc dans sa nourriture, un végétarien à l'absence de viande, certaines personnes préfèreront des produits issus de l'agriculture biologique, d'autres ne mangeront pas de viande de cheval par considération éthique ou religieuse (Judaïsme)… D'un point de vue religieux et culturel, l'identification de porc dans les produits de viande est une demande de plus en plus courante. Von Bargen *et al.* (2013) ont développé une méthode basée sur la spectrométrie de masse qui permet la détection d'une adultération par de la viande de cheval et de porc. L'étiquetage précis des aliments est dès lors un élément essentiel afin de garantir une bonne sûreté alimentaire. Dans le but de protéger le consommateur d'un étiquetage erroné, la déclaration quantitative des ingrédients est exigée : les étiquettes doivent indiquer la quantité de tous les constituants contenus dans le produit commercialisé. Dans le cas des produits de viande, cela implique de quantifier séparément chacune des espèces présentes dans l'aliment (Sentandreu and Sentandreu, 2011).

Les principaux points clés liés à l'authentification de la viande ont été examinés par Ballin (Figure 1). Il a établi quatre catégories principales faisant souvent l'objet de fraude : l'origine de la viande, les substitutions de viande, les modifications de traitement et transformation des viandes et enfin l'addition de divers produits non carnés. Les problèmes d'authentification liés à l'origine de la viande peuvent inclure le sexe, la race, la découpe, l'alimentation de l'animal, l'origine géographique, l'âge d'abattage ou encore les conditions d'élevage (sauvage vs. élevage, biologique vs. conventionnel). A titre d'exemple, la « Food Safety Authority of Ireland » (FSAI) a utilisé les technologies basées sur l'ADN pour identifier du saumon élevé en Norvège vendu comme étant du saumon sauvage d'Ecosse (O'Mahony, 2013). Les fraudes en matière de substitutions de viande sont associées soit à l'addition d'autres espèces, soit au remplacement par d'autres espèces ou tissus de moindre valeur. Les problèmes associés aux techniques de transformation de la viande peuvent inclure la détection de viandes irradiées ou la différenciation des viandes fraiches et congelées. Les pratiques frauduleuses liées à l'addition de produits non carnés traitent de l'utilisation de colorants et d'agents chimiques afin d'augmenter artificiellement l'apparence de fraicheur de la viande. Des conservateurs peuvent également être utilisés pour prolonger la fraicheur de la viande, des arômes pour imiter le fumage naturel de la viande, etc. L'addition d'eau représente une pratique frauduleuse importante car elle permet d'augmenter artificiellement le poids de la viande et ainsi d'augmenter la rentabilité à la vente (Ballin, 2010).

Introduction

Dans le cas de fraude sur les produits viandeux, le cas le plus commun d'adultération est le remplacement de viande de haute qualité par des viandes de moindre qualité, ce qui entraine une augmentation du profit des acteurs de la chaîne alimentaire (Sentandreu *et al.*, 2010). Par exemple, le prix du bœuf est deux fois plus élevé que le prix du porc. La substitution frauduleuse de bœuf par du porc est donc une action qui rapporte de l'argent mais qui compromet la sûreté alimentaire des consommateurs (von Bargen *et al.*, 2014). Le scandale de la viande de cheval, par exemple, a fait la une des médias en 2013. Ce sont des inspecteurs irlandais qui ont identifié les premiers le problème en détectant de la viande de cheval dans des hamburgers de bœuf congelés (O'Mahony, 2013). Par la suite, c'est au Royaume-Uni que des lasagnes au bœuf ont été analysées comme contenant entre 80 et 100 % de viande de cheval, la viande de cheval étant dans certains pays meilleur marché que la viande de bœuf. En effet, en 2013, 50 000 tonnes de viande de bœuf contenaient de la viande de cheval et 5 à 7,5 % des échantillons analysés en Europe se sont révélés positifs pour la présence de viande de cheval non déclarée. Cette affaire a souligné la complexité de notre chaîne d'approvisionnement alimentaire, pointant le problème d'un étiquetage frauduleux des denrées alimentaires. Suite à une crise de confiance des consommateurs, la Commission Européenne, en collaboration avec les pays membres, a prévu des plans d'action à plus ou moins long terme afin d'éviter tout nouveau scandale. Par exemple, les lois sur l'identification des chevaux ont été renforcées de façon à ce qu'aucun cheval non destiné à la chaîne alimentaire ne se retrouve dans notre nourriture ou encore des contrôles non annoncés et des sanctions financières ont été mises en place en cas de fraudes volontaires ainsi que des lois plus strictes en relation avec l'étiquetage. Suite à ces actions, la situation s'est clairement améliorée en 2014 (European Commission, 2015a).

Comme on a pu le voir, la fraude sur les produits carnés implique diverses procédures illégales, lesquelles doivent être contrôlées par les autorités au moyen de méthodes robustes, fiables et sensibles de manière à détecter le plus d'incidents possibles qu'ils soient volontaires ou accidentels. Il existe énormément d'équipes qui travaillent sur cette problématique et sur l'identification de divers constituants dans les aliments. Nous parlerons dans ce manuscrit essentiellement de détection de produits carnés et de sous-produits animaux mais la détection de toxines (Molto *et al.*, 2000; Tamura *et al.*, 2011), d'éléments traces (Cordeiro *et al.*, 2013; D'Amato *et al.*, 2004), de nanoparticules (Contado, 2015; Periasamy *et al.*, 2015) etc. dans l'alimentation tient également une place importante dans la sûreté alimentaire.

Outre les fraudes volontaires, les contaminations biologiques constituent aussi un problème et, parmi celles-ci, nous nous focaliserons sur la crise de la maladie de la vache folle.

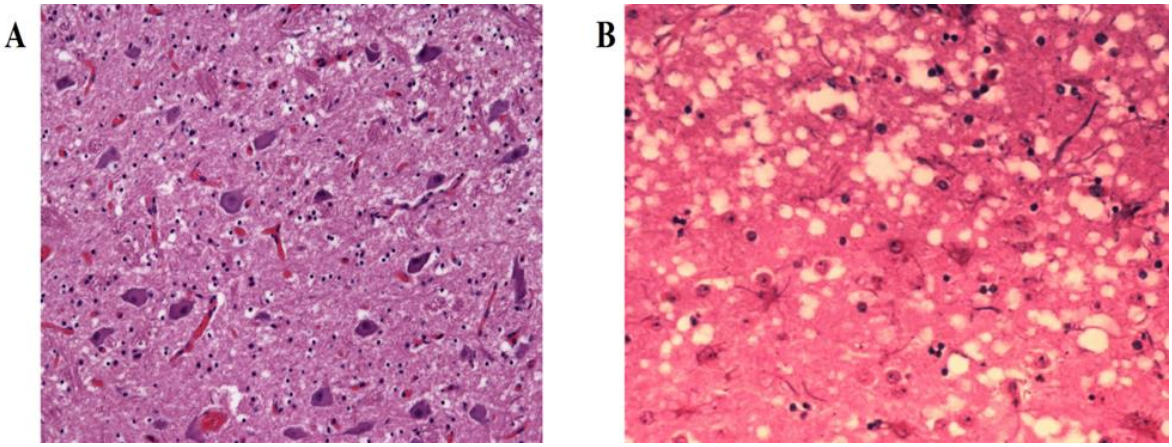
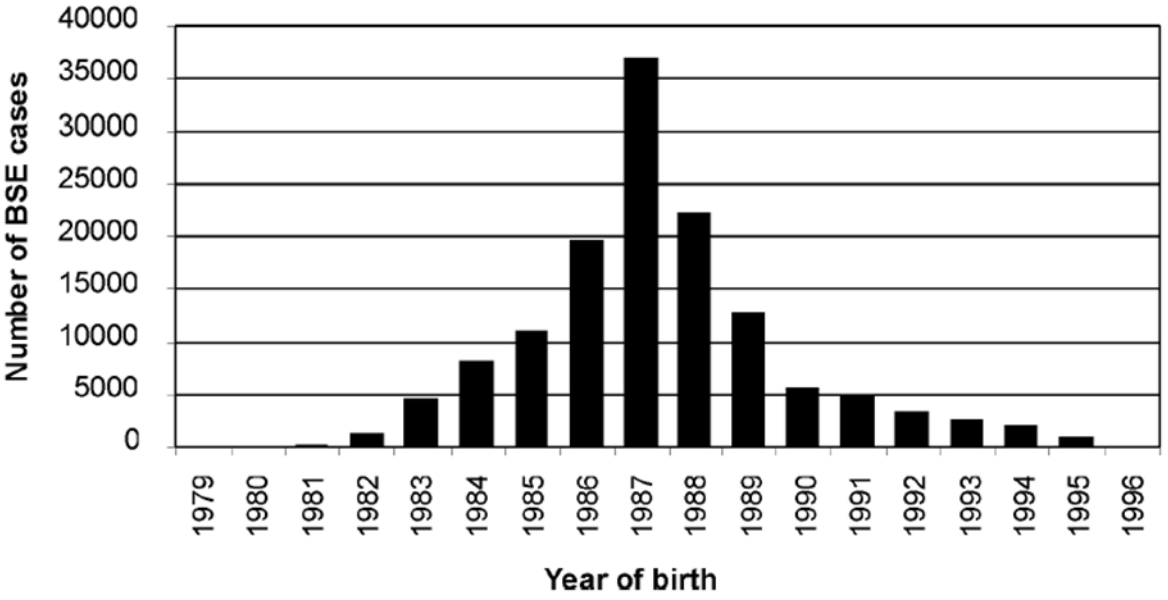
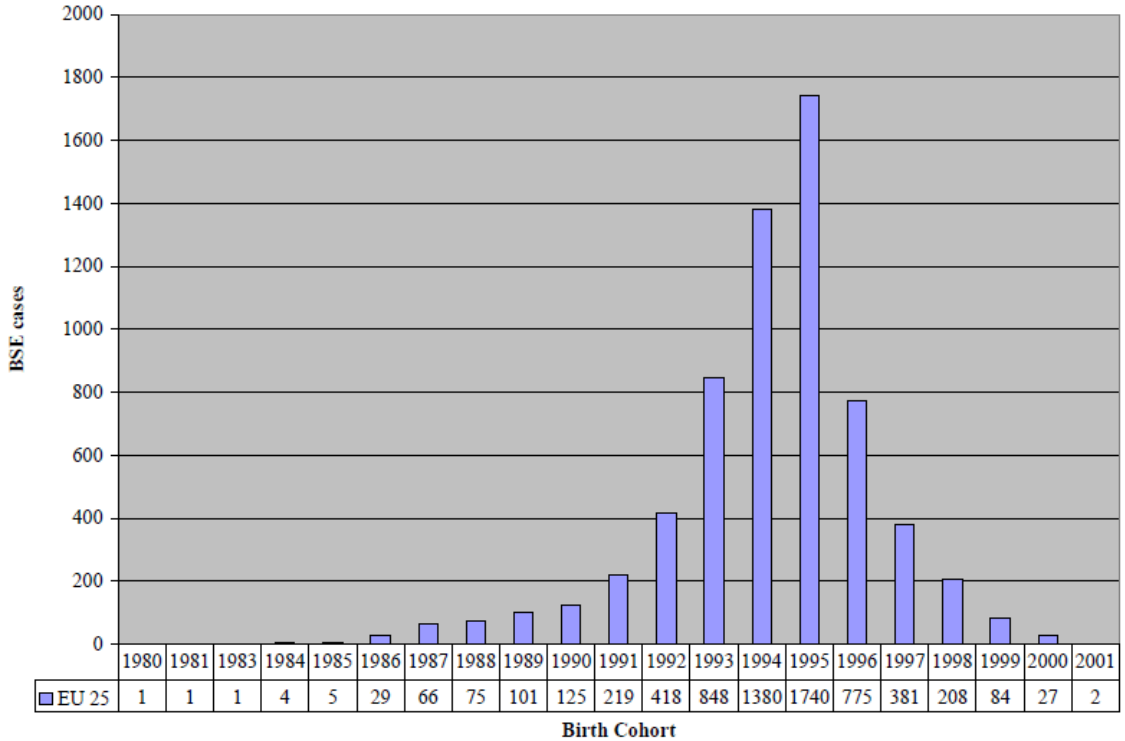


Figure 2. Coupe histologique dans un cerveau de bovin atteint par l'encéphalopathie spongiforme bovine. A) Coupe histologique d'un cerveau sain, avec coloration spécifique du tissu neuronal. B) Coupe histologique d'un cerveau d'un animal malade, dans lequel un certain nombre de vacuoles peuvent être observées, les espaces créés par ces vacuoles faisant penser à une éponge, d'où le nom d'encéphalopathie spongiforme (Webographie N°1).

A



B



	1980	1981	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
EU 25	1	1	1	4	5	29	66	75	101	125	219	418	848	1380	1740	775	381	208	84	27	2

Figure 3. Nombre de cas d'ESB par année de naissance. A : en Grande-Bretagne (Smith and Bradley, 2003). B : en Europe (Commission, 2005).

1.2. Problématique de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine et des farines animales

1.2.1. Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (ESTs)

Il peut y avoir des failles involontaires dans ce système de sûreté alimentaire, comme en témoignent les encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs). Les ESTs sont un groupe de maladies infectieuses neuro-dégénératives rares et mortelles qui sont caractérisées par une période d'incubation relativement longue et l'absence de réponse immunitaire. Elles sont diagnostiquées grâce aux signes cliniques et à une étude histologique post-mortem du cerveau montrant le dépôt de plaques amyloïdes et la présence de lésions spongieuses caractéristiques (Figure 2) (Fishbein, 1998). Cette famille de maladies touche les êtres humains et les animaux et inclut des maladies telles que la maladie de Creutzfeldt Jakob (MCJ) et de kuru chez l'homme, l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) chez le bovin, la tremblante chez les petits ruminants (ovins et caprins), la maladie débilitante chronique (MDC) chez les cervidés et l'encéphalopathie transmissible chez le vison (ETV) (European Commission, 2015b).

La tremblante ou scrapie peut être transmise horizontalement (d'un animal à l'autre ou par l'environnement) ou verticalement (de la brebis à l'agneau) et se caractérise par une période d'incubation de plus d'un an. Les environnements qui ont abrité des moutons infectés par cette maladie semblent rester contaminés par l'agent infectieux pendant de longues périodes malgré des mesures de désinfection et d'éradication (Fishbein, 1998). Les signes cliniques apparaissent principalement chez les animaux âgés de 2 à 5 ans et comprennent des tremblements, une perte de poids, une salivation excessive, du prurit intense avec perte des poils et abrasions de la peau, un manque de coordination des membres postérieurs, des modifications du comportement avec nervosité, dépression ou agressivité. La tremblante n'est pas transmissible à l'homme (European Commission, 2015b).

L'ESB, également appelée « maladie de la vache folle », est une maladie neuro-dégénérative du système nerveux central des bovins. L'ESB a été diagnostiquée pour la première fois au Royaume-Uni en 1986 et en Belgique en 1997 (Smith and Bradley, 2003). Durant la période allant de 1988 à la fin 1997, plus de 170 000 cas ont été signalés dans plus de 34 000 exploitations au Royaume-Uni (Fishbein, 1998), avec un pic de 37 280 cas en 1992 (Reaney and Jørgensen, 2012). Les bovins nés en 1987 sont donc responsables du pic de l'épidémie de 1992, en tenant compte de la période d'incubation (5 ans en moyenne) (Figure 3). Le bétail et les aliments exportés du Royaume-Uni ont causé de plus petites épidémies dans les pays européens (Smith and Bradley, 2003). Plus de 3 800 cas ont été détectés en dehors du Royaume-Uni, incluant 13 pays membres de l'Union Européenne ainsi que le Japon, le Canada et les USA (Gavier-Widén *et al.*, 2005). Des experts suggèrent que trois millions de bovins infectés sont entrés de façon inaperçue dans la chaîne alimentaire humaine et animale

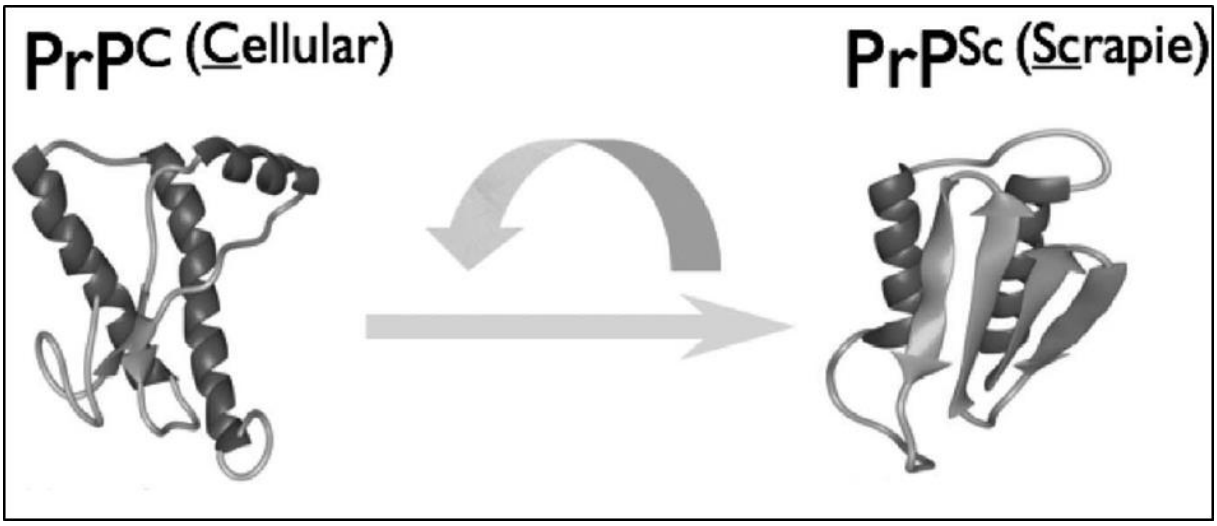


Figure 4. Conversion de la protéine prion normale (forme cellulaire PrP^{C}) en forme anormale (PrP^{Sc}). Cette conversion implique un changement de conformation, avec une diminution de la teneur en hélices alpha et une augmentation de celle en feuillets bêta (Webographie N°3).

(Hedlin *et al.*, 2012). Les symptômes les plus courants de l'ESB sont des changements de comportement, un manque de coordination, des difficultés à marcher ou à rester debout, une diminution de la production de lait et une forte perte de poids. Cependant, cette maladie a déjà été détectée chez des animaux ne présentant pas de symptôme ou manifestant des signes atypiques de la maladie. La période minimale d'incubation est de 2 ans avec une moyenne de 4 à 6 ans mais elle peut également être plus longue. 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. L'ESB est une zoonose (Smith and Bradley, 2003) et est donc transmissible à l'homme par voie orale, déclenchant une nouvelle variante de la maladie de Creutzfeldt Jakob (Webographie N°2). Cette nouvelle maladie a été diagnostiquée pour la première fois en 1996, 10 ans après le premier cas d'ESB chez les bovins, et est caractérisée par des symptômes similaires à ceux décrits pour l'ESB tels que l'ataxie, la démence et des spasmes musculaires (European Commission, 2015b; Gavier-Widén *et al.*, 2005).

1.2.2. Le prion

La cause de ces maladies est un nouveau type d'agent infectieux transmissible, une protéine de l'hôte infecté, transformée et appelée prion, forme contractée de « **pro**teinaceous **in**fectious particle », ayant un poids moléculaire d'environ 27-30 kDa, sans acide nucléique (Gavier-Widén *et al.*, 2005; Prusiner, 1998; Reaney and Jørgensen, 2012). Ces protéines infectieuses, contrairement aux virus et bactéries, sont résistantes à la chaleur, aux rayons ultra-violets, aux rayonnements ionisants et aux désinfectants comme le formaldéhyde et le glutaraldéhyde (Fishbein, 1998; Giles *et al.*, 2008; Prusiner, 1998). La caractéristique de toutes les maladies à prion est un métabolisme anormal résultant d'une accumulation de cette protéine prion, définie comme étant une particule infectieuse protéique à laquelle il manque un acide nucléique (Fishbein, 1998). En réalité, deux isoformes de la protéine prion ont été décrites : la forme dite normale (protéine prion cellulaire : PrP^{C}) et la forme dite infectieuse (protéine prion scrapie : PrP^{Sc} ou protéine prion résistante : PrP^{res}). La forme normale (PrP^{C}), d'approximativement 220 acides aminés, est retrouvée de manière physiologique au sein des cellules mammaliennes (en grande quantité dans les neurones, mais également en quantité moindre mais significative dans le muscle, le cœur, le sang, les intestins, les organes reproducteurs tels que les testicules et l'utérus) et aurait un rôle dans le métabolisme du cuivre ainsi que des effets neuro-protecteurs. La forme anormale (« misfolded » ou mal repliée) (PrP^{Sc}) est, quant à elle, résistante à la protéinase K et forme des agrégats à l'intérieur et à l'extérieur des cellules au sein du cerveau des espèces infectées (Hedlin *et al.*, 2012). Lors de l'infection, la forme anormale, qui est l'élément principal de l'agent transmissible, convertit la PrP^{C} en PrP^{Sc} insoluble et résistante aux protéases (Fishbein, 1998). Cette conversion de la protéine cellulaire normale en isoforme pathogène anormale implique un changement de conformation, avec une diminution de la teneur en hélices alpha et une augmentation de celle en feuillets bêta (Figure 4). Ces changements de conformation sont accompagnés de modifications des propriétés physico-chimiques de la

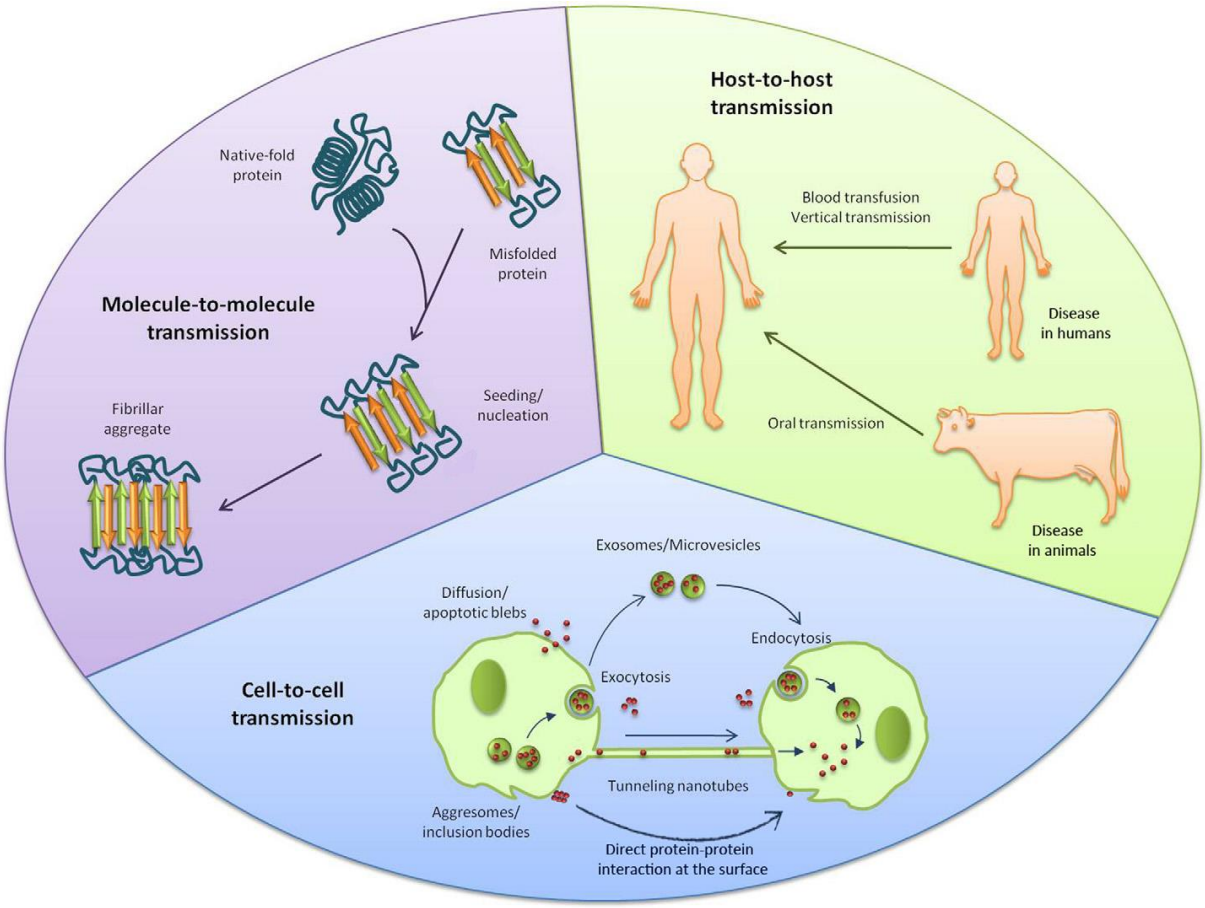


Figure 5. Transmission des protéines mal repliées entre molécules, cellules et individus. La transmission de protéines telle que le prion peut se faire à différents niveaux, y compris molécule à molécule, cellule à cellule et hôte à hôte (Moreno-Gonzalez and Soto, 2011).

protéine prion et favorisent son agrégation intra- et extracellulaire, donnant lieu aux lésions et symptômes des ESTs (Prusiner, 1998). En outre, ce mauvais repliement peut être transmis d'une cellule à l'autre, contribuant à la propagation de lésions au sein du tissu infecté (Figure 5) (Moreno-Gonzalez and Soto, 2011).

La présence de cette protéine prion est considérée comme un marqueur de la maladie. Le diagnostic des ESTs est donc basé sur la détection des protéines prions anormales ou sur l'identification de lésions caractéristiques. Il n'existe pas de tests non invasifs capables de détecter l'ESB sur animaux vivants. Les signes cliniques de la maladie, bien que caractéristiques, sont insuffisants pour un diagnostic définitif et fiable. De plus, aucune réaction du système immunitaire n'est observée car la protéine prion n'est pas reconnue comme étant étrangère. Il a été montré que la forme PrP^{Sc} était présente dans le sang des animaux infectés. Toutefois, la concentration de PrP^{Sc} dans le sang est 100 à 1 000 fois plus faible que dans le cerveau. La protéine prion pathogène a été détectée à faible concentration dans l'urine des animaux infectés et Bosque *et al.* (2002) ont également démontré que le prion pouvait s'accumuler dans le muscle squelettique. Toutefois, l'examen clinique post-mortem du cerveau d'un animal malade reste le moyen le plus fiable 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 système nerveux central, ces vacuoles se formant principalement au niveau du corps cellulaire des neurones (Figure 2). 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. La plupart des tests de dépistage rapide sont effectués par ELISA ou par Western blot. Les tests ELISA utilisent un anticorps anti-PrP reconnaissant la forme native et la forme mal repliée, afin de fixer la protéine PrP sur une plaque multi-puits. Un deuxième anticorps anti-PrP, couplé à différents systèmes de détection, est ensuite utilisé pour détecter les protéines PrP. Les techniques de Western blot permettent de révéler des patterns de glycosylation caractéristiques de la forme PrP^{Sc}, avec 3 bandes protéiques différentes. Ces trois bandes, qui sont la signature de toutes les ESTs, correspondent à une forme diglycosylée dominante, une forme monoglycosylée un peu moins intense et à une forme non glycosylée moins abondante aux alentours de 29, 25 et 20 kDa respectivement. Des variations dans l'intensité de détection du signal pour chaque bande, la position sur le gel et l'immuno-réactivité avec divers anticorps monoclonaux ou polyclonaux sont exploitées pour tenter de distinguer les différentes formes de PrP^{Sc}. Des tests de spécificité plus élevée sont utilisés afin de confirmer le diagnostic tels qu'un examen histologique du cerveau avec une analyse immuno-histochimique ou la détection de fibrilles du prion grâce à la microscopie électronique (Gavier-Widén *et al.*, 2005).

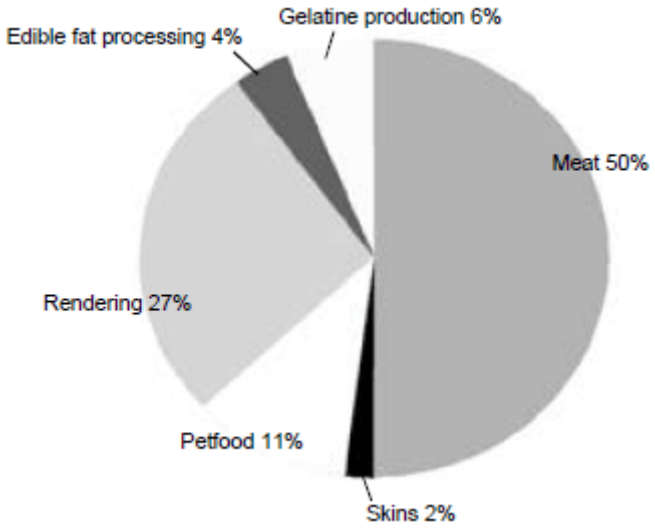


Figure 6. Estimation de l'utilisation d'un animal abattu (en % de poids). Cinquante pourcents sont consommés sous forme de viande par l'être humain, le reste étant valorisé sous forme de sous-produits (Woodgate and van der Veen, 2004).

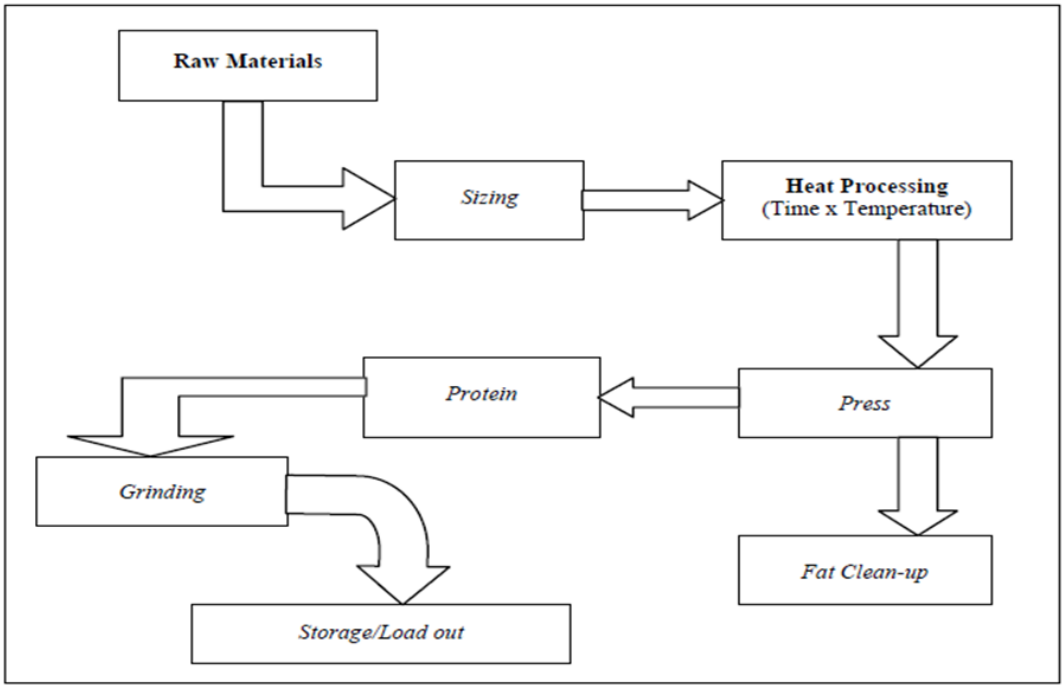


Figure 7. Schéma simplifié du processus d'équarrissage. La matière première animale (« raw materials ») est tout d'abord découpée en morceaux d'une taille déterminée. Ces morceaux sont ensuite cuits à la vapeur suivant une température et un temps de cuisson déterminés en fonction de la nature du matériel. 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 and Hamilton, 2006).

1.2.3. Le mode de transmission de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB)

Très rapidement, il s'est avéré que la transmission la plus probable de l'ESB était liée à l'utilisation de farines animales contaminées par la protéine prion dans l'alimentation des bovins (European Commission, 2015b; Hedlin *et al.*, 2012; Reaney and Jørgensen, 2012; Smith and Bradley, 2003; Taylor and Woodgate, 2003). Toutefois, la cause exacte du premier cas d'ESB reste un mystère (Hedlin *et al.*, 2012; Reaney and Jørgensen, 2012; Smith and Bradley, 2003). Il a cependant été suggéré que l'ESB se soit développée spontanément chez les bovins par l'intermédiaire d'une mutation somatique ou germinale affectant la protéine PrP^C ou que les bovins aient été infectés par une autre espèce comme le mouton (Hedlin *et al.*, 2012).

Le développement de l'industrie d'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 70-80. On estime à environ la moitié du poids total d'un animal destiné à la production de viande, de lait ou d'œufs et donc consommée par l'être humain. L'autre moitié, n'étant pas consommée, représente une quantité impressionnante de matière première, également appelée « sous-produits » (Figure 6). En Europe, environ 17 millions de tonnes de sous-produits animaux sont générés par l'industrie de la viande chaque année (Woodgate and van der Veen, 2004). 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, des 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'autre fins (Meeker and Hamilton, 2006). C'est dans cette optique 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 animaux au moyen de différentes techniques physiques et chimiques. La Figure 7 représente un schéma du processus d'équarrissage. La matière première (carcasses et déchets) est tout d'abord 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 de façon à extraire et séparer la graisse (qui servira à la fabrication de savon par exemple), l'eau et les fractions protéiques. Ces dernières sont broyées puis stockées jusqu'à utilisation (Meeker and Hamilton, 2006; Reaney and Jørgensen, 2012; Smith and Bradley, 2003; Taylor and Woodgate, 2003). Bien que ces fractions protéiques étaient à l'origine vendues comme fertilisant, il s'est rapidement avéré qu'elles pouvaient assurer une croissance supérieure des animaux de rente par rapport à ceux nourris exclusivement avec des protéines végétales (Denton *et al.*, 2005). En effet, les farines de viande et d'os (FVOs) sont plus riches en

Tableau 1. Composition nutritionnelle des 4 farines de protéines animales les plus courantes (Meeker and Hamilton, 2006).

Item	Meat and Bone Meal	Blood Meal[2]	Feather Meal	Poultry By-Product Meal
Crude Protein, %	50.4	88.9	81.0	60.0
Fat, %	10.0	1.0	7.0	13.0
Calcium, %	10.3	0.4	0.3	3.0
Phosphorus, %	5.1	0.3	0.5	1.7
TME_N, kcal/kg	2,666[3]	3,625	3,276	3,120
Amino Acids				
Methionine, %	0.7	0.6	0.6	1.0
Cystine, %	0.7	0.5	4.3	1.0
Lysine, %	2.6	7.1	2.3	3.1
Threonine, %	1.7	3.2	3.8	2.2
Isoleucine, %	1.5	1.0	3.9	2.2
Valine, %	2.4	7.3	5.9	2.9
Tryptophan, %	0.3	1.3	0.6	0.4
Arginine, %	3.3	3.6	5.6	3.9
Histidine, %	1.0	3.5	0.9	1.1
Leucine, %	3.3	10.5	6.9	4.0
Phenylalanine, %	1.8	5.7	3.9	2.3
Tyrosine, %	1.2	2.1	2.5	1.7
Glycine, %	6.7	4.6	6.1	6.2
Serine, %	2.2	4.3	8.5	2.7

[1] National Research Council, 1994.
[2] Ring or flash-dried.
[3] Dale, 1997.
TME_N = true metabolizable energy nitrogen corrected.

protéines, en lipides, en phosphore (7 fois plus), en fer et en zinc que la farine de soja par exemple. Une FVO est typiquement composée de 50 % de protéines, 35 % de cendres, 8-12 % de graisse et 4-7 % d'eau (Reaney and Bremer, 2012). Le Tableau 1 montre la teneur élevée en protéines des 4 types de farines animales les plus courantes. En plus des protéines, ces farines sont aussi d'excellentes sources d'acides aminés, de lipides, d'acides gras essentiels, de minéraux et de vitamines (Meeker and Hamilton, 2006). En Europe, plus de 3 millions de tonnes de protéines animales transformées sont produites chaque année (Taylor and Woodgate, 2003).

L'apparition de l'ESB résulte d'un certain nombre de changements introduits en 1981-1982 dans le processus de fabrication des farines animales pour des raisons économiques : le passage de la production par lots à un système en flux continu, une augmentation de la proportion de FVOs dans l'alimentation des animaux passant de 1 % à 12 % et la suppression de l'utilisation des solvants d'extraction hydrocarbonés (donnant des farines avec une teneur en graisses plus élevée qu'auparavant). Le fait de restreindre l'utilisation de solvants dans la production des farines animales a éliminé deux étapes importantes qui permettaient de réduire le risque biologique : l'exposition prolongée aux solvants organiques à des températures élevées et l'élimination des traces de ces solvants par un traitement des farines à la vapeur, lequel a été remplacé par une technique d'extraction à la chaleur (Fishbein, 1998). Tout porte à croire qu'à cause de ces changements, il y a eu une faille dans le processus, mettant en péril l'objectif majeur d'inactiver toute forme d'agent pathologique transmissible pouvant être responsable de maladies telle que la protéine prion. En effet, il est apparu que lors de la production des farines animales, les conditions de température et de pression utilisées n'étaient pas efficaces à 100 % pour inactiver totalement l'agent infectieux (Meeker and Hamilton, 2006; Schreuder *et al.*, 1998; Taylor and Woodgate, 2003). Ces changements auraient donc permis à la maladie de dépasser un seuil d'infectiosité, seuil au-dessus duquel une certaine quantité de protéine prion infectieuse a pu initier et provoquer une épidémie comme l'épidémie de la vache folle qu'a connue l'Europe dans les années 90 (Reaney and Jørgensen, 2012). Les bovins les plus concernés étaient ceux du troupeau laitier où les veaux sont nourris avec des aliments concentrés à un âge très précoce (Smith and Bradley, 2003). Ces données suggèrent que la plupart des bovins infectés l'ont été durant leurs six premiers mois de vie (Fishbein, 1998). Puisque la période d'incubation de l'ESB est de 4 à 6 ans en moyenne, il est fort probable qu'un certain nombre d'animaux infectés (ayant été nourris avec des farines animales contaminées) soient entrés à leur tour dans la chaîne alimentaire humaine et animale, faisant perdurer ainsi le cycle de la maladie (Reaney and Jørgensen, 2012).

Depuis 1994, cinq méthodes de traitement des déchets animaux sont approuvées par la Commission Européenne (Parliament and Council, 2002a; Woodgate and van der Veen, 2004). La température de cuisson ainsi que le temps requis pour ce processus représentent les facteurs principaux déterminant la qualité des produits finaux (graisse, eau et protéines), ces

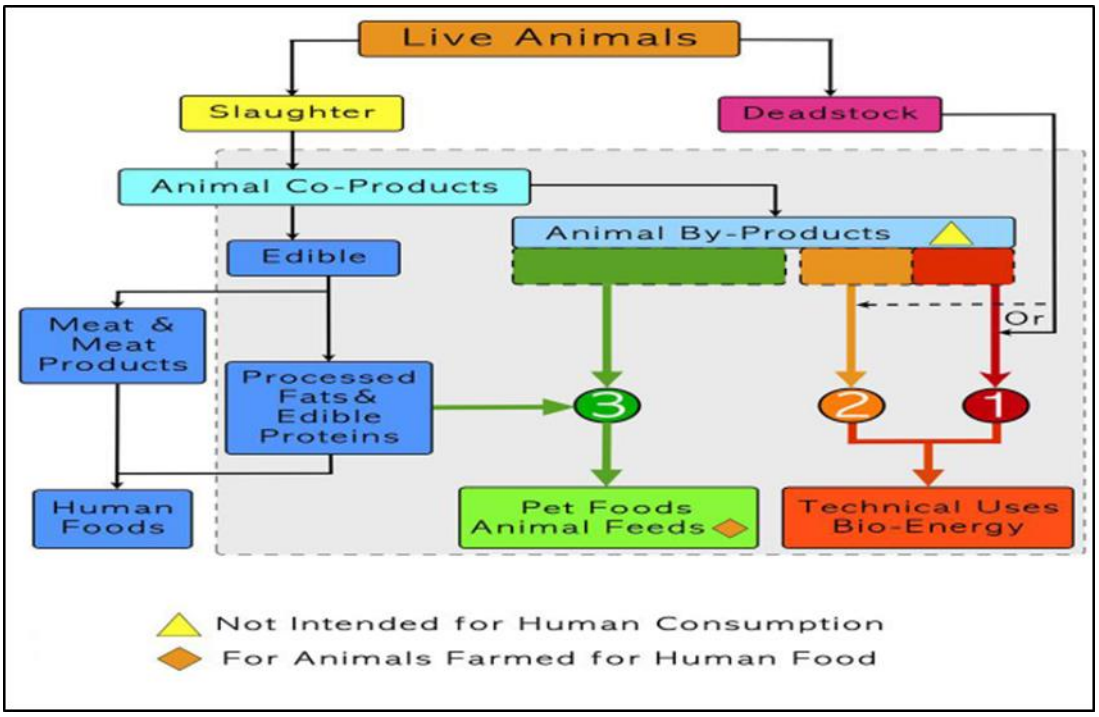


Figure 8. Schéma de production des différentes catégories de sous-produits animaux. Les catégories 1 (rouge) et 2 (orange) sont utilisées comme source d'énergie (bioénergie), tandis que les sous-produits animaux correspondant à la catégorie 3 (vert) sont destinés à la consommation animale (EFPRA) (Margry and de Jong, 2012).

facteurs étant également influencés par la composition et la nature des déchets animaux utilisés. De manière générale, ces 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. 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'EFPRA (European Fat Processors and Renderers Association) et selon le règlement (CE) N°1774/2002 (Parliament and Council, 2002a), les sous-produits animaux sont différenciés en trois catégories selon leur risque sanitaire (Figure 8). 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. La **catégorie 1** comprend par exemple des animaux suspectés d'être infectés par l'ESB, des animaux tués dans le contexte d'éradication d'une épidémie, des ruminants trouvés morts ou des animaux de compagnie. La **catégorie 2** comprend entre autres, les tubes digestifs porcins, les produits d'origine animale autres que ceux de la catégorie 1 qui ne répondent pas aux exigences vétérinaires, des non-ruminants trouvés morts ou du sang de ruminant. Les sous-produits provenant de ces deux catégories sont soit détruits, soit utilisés pour produire de l'énergie (bioénergie). Depuis le 1er juillet 2008 (Commission, 2007c), les usines d'équarrissage doivent identifier les produits dérivés de ces deux premières catégories en y incorporant un marqueur chimique, le glycérol triheptanoate (GTH), de façon à éviter l'entrée de ces matériaux dans la chaîne alimentaire. Le GTH est une graisse artificielle composée de glycérol estérifié avec trois acides n-heptanoïques. Cette substance stable au processus d'équarrissage n'est pas trouvée dans la nature, est disponible dans le commerce et a déjà été utilisée comme marqueur pour le beurre. Le GTH est un marqueur adapté pour la graisse pure ou pour des produits contenant de la graisse tels que les farines animales (von Holst *et al.*, 2009). La **troisième catégorie** correspond à des sous-produits qui pourraient convenir à la consommation humaine mais n'étant pas utilisés pour la production de nourriture humaine pour diverses raisons commerciales ainsi que du sang provenant d'autres animaux que les ruminants. C'est seulement à partir de cette troisième catégorie que sont issues les Protéines Animales Transformées (PATs). Les matériaux de la catégorie 3 ne peuvent provenir que d'animaux bons pour la consommation humaine tués dans des abattoirs. Une série de documents assure la traçabilité depuis la ferme jusqu'à l'abattoir (Margry and de Jong, 2012). On peut donc distinguer les PATs actuelles des anciennes FVOs. Durant les années 70-80, les FVOs sont produites à partir de n'importe quelle espèce d'animaux, y inclus les animaux trouvés morts, les déchets d'abattoir et de boucherie (produits des catégories 1 et 2). Les PATs, quant à elles, incluent des produits variés comme les FVOs, les farines de viande, les farines d'os et les farines de sang mais sont composées uniquement des produits de la catégorie 3 qui sont des produits aptes à la consommation humaine.

L'émergence de l'ESB et l'escalade de l'épidémie ont eu un impact important sur l'industrie de l'élevage aussi bien au Royaume-Uni qu'en Europe. En mars 1996, la vente de produits bovins a diminué immédiatement de 40 % en Grande-Bretagne, les marchés de l'exportation ont été complètement perdus et le prix du bœuf a diminué de 25 % (Reaney and Jørgensen, 2012). Au Royaume-Uni seulement, on estime que le coût de cette épidémie a dépassé les 6 milliards de dollars US (Smith, 2003).

De nombreuses mesures ont été mises en place dans les années 90 afin de limiter l'expansion de l'ESB. Un certain nombre d'interdictions concernant l'utilisation des protéines animales dans l'alimentation du bétail ont ainsi vu le jour.

1.3. Législation

1.3.1. Législation et régulation

La crise de l'ESB et les décès qui en ont résulté ont conduit à une revendication de la part des consommateurs, des scientifiques et des représentants du gouvernement pour obtenir une plus grande garantie de la sûreté et de la surveillance de la chaîne alimentaire. Dans les années qui suivirent l'apparition de l'ESB en Grande-Bretagne en 1986, de nombreuses dispositions réglementaires ont été prises afin de limiter l'expansion de la maladie et d'éviter l'introduction de protéines animales potentiellement contaminées dans la chaîne alimentaire.

En juillet 1988, le Royaume-Uni a interdit l'utilisation des protéines de ruminants dans l'alimentation de ruminants. Toutefois, à cause du long temps d'incubation de l'ESB, il a fallu un délai d'approximativement 5 ans avant de constater une diminution du nombre d'animaux infectés. Ces dispositions ont cependant été renforcées en novembre 1994 avec l'interdiction d'utilisation de toute forme de protéines venant de mammifères dans l'alimentation des ruminants (Reaney and Jørgensen, 2012). De son côté, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a établi en 1996 une série de recommandations : (a) les animaux suspectés d'EST et les tissus susceptibles de contenir le prion ne peuvent entrer dans la chaîne alimentaire, (b) tous les pays doivent mettre en place une surveillance de l'ESB, (c) tous les pays doivent interdire l'utilisation de tissus ruminants dans l'alimentation des ruminants, (d) le lait et les produits laitiers sont considérés sains, (e) la gélatine et la graisse sont considérées saines seulement si des procédures d'équarrissage efficaces sont utilisées (Liu *et al.*, 2011). De plus, la mise en place d'une meilleure traçabilité du bétail permet de contenir d'éventuels foyers de la maladie. En décembre 1996, plus d'un million de bovins ont été abattus dans le cadre d'un effort continu visant à retirer de la chaîne alimentaire les animaux susceptibles d'être contaminés (Fishbein, 1998). Cependant, ces mesures n'ont pas empêché 44 000 bovins nés après ces interdictions de contracter l'ESB (Figure 3). Ce constat implique que, malgré l'interdiction des farines animales de ruminants dans leur alimentation, 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 de ruminants infectés. Des enquêtes sur ces cas ont conclu

Tableau 2. Produits animaux autorisés et non autorisés dans les aliments pour animaux (Règlement (CE) N° 999/2001) (Commission, 2010). A : autorisé ; NA : non autorisé.

	Farmed animals other than fur animals			Pets and fur animals
	Ruminants	Non ruminants (except fish)	Fish	
Processed animal proteins except blood meal and fish meal	NA	NA	NA	A
Blood meal from ruminants	NA	NA	NA	A
Blood products from ruminants	NA	NA	NA	A
Gelatine from ruminants	NA	NA	NA	A
Hydrolysed proteins other than those derived from non ruminants or from ruminant hides and skins	NA	NA	NA	A
Blood meal from non ruminants	NA	NA	A	A
Fishmeal	NA[4]	A	A	A
Blood products from non ruminants	NA	A	A	A
Di and tricalcium phosphate of animal origin	NA	A	A	A
Hydrolysed proteins from non ruminants or from ruminant hides and skins	A	A	A	A
Non ruminant gelatine	A	A	A	A
Egg, egg products, milk, milk products, colostrum	A	A	A	A
Animal proteins other than the above-mentioned ones	NA	A	A	A

[4] Milk replacers containing fishmeal and intended only for unweaned ruminants are authorised.

Tableau 3. Protéines animales transformées et autres produits animaux interdits ou autorisés dans l'alimentation animale (Margry and de Jong, 2012).

Animal by-product Processing Industry	Species	Feed Compound feed for Ruminants	Pigs	Poultry	Aqua feed	Fur feed	Petfood
Blood meal	Ruminants C3 k **	†	†	†	†	†	†
	Ruminants C3 a+b **	†	B	B	B	v	v
	Porcine	†	†	B	v	v	v
	Poultry	B	B	†	v	v	v
Meat meal	Ruminants	†	B	B	B	v	v
	Porcine	†	†	B	B	v	v
	Poultry	B	B	†	B	v	v
Feather meal	Poultry	B	B	†	B	v	v
Fat	Ruminants	v	v	v	v	v	v
	Porcine	v	v	v	v	v	v
	Poultry	v	v	v	v	v	v
Blood products	Ruminants	B	B	B	B	v	v
(Haemoglobin -, Blood plasma -	Porcine	B	v	v	v	v	v
and Whole Blood Powder)	Poultry	B	v	v	v	v	v
Gelatine	Ruminants	B	B	B	B	v	v
	Porcine	v	v	v	v	v	v
	Poultry	v	v	v	v	v	v
DCP / TCP	All species	B	v	v	v	v	v
Milk products		v	v	v	v	v	v
Egg products		v	v	v	v	v	v
Fish meal		B	v	v	v	v	v
Hydrolysed proteins		v	v	v	v	v	v

LEGEND:	according to 1774/2002; 808/2003 and 999/2001; 1234/2003; 1292/2005:
†	never allowed
B	ban (temporary according to 999/2001; 1234/2003; 1292/2005)
v	already allowed

** C3 a = parts of slaughtered animals fit for human consumption
C3 b = parts of slaughtered animals rejected as unfit but no signs of communicable diseases + derived from carcasses fit for human consumption
C3 k = Blood from animals without clinical signs

que la cause la plus probable était l'utilisation d'aliments contenant des farines contaminées produites avant le bannissement de 1988. En effet, ces aliments pouvaient encore être utilisés à destination des porcs et des volailles et se sont certainement retrouvés également dans l'alimentation des ruminants. Des mesures plus rigoureuses afin de combattre cette contamination croisée ont été introduites en avril 1996 au Royaume-Uni avec l'interdiction de l'utilisation des farines animales de mammifères dans l'alimentation du bétail, des poissons et des chevaux (Smith and Bradley, 2003).

La description de la législation sur l'utilisation des sous-produits en Europe est complexe car elle est en constante évolution depuis 1994. De plus, deux législations notables stipulent les conditions d'utilisation des sous-produits dans l'alimentation, à savoir le règlement (CE) N° 999/2001 (Parliament and Council, 2001) se concentrant sur le contrôle des ESTs et le règlement (EC) N° 1774/2002 (Parliament and Council, 2002a) (abrogé en 2009 par le règlement (EC) N°1069/2009 (Parliament and Council, 2009)) traitant de l'utilisation sûre des sous-produits animaux non destinés à la consommation humaine (Vermeulen *et al.*, 2012).

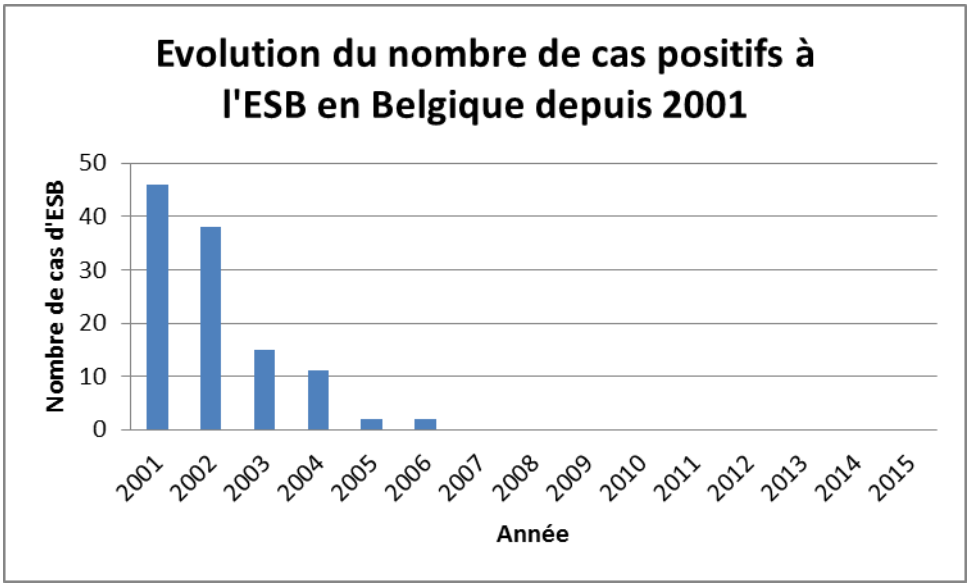
En Europe, la première interdiction afin de contrôler la propagation de l'ESB a été introduite en 1994 par la décision (CE) N° 381/94 (Commission, 1994), qui interdit l'utilisation des MBM de mammifères dans l'alimentation des ruminants. En 1996, la Commission a publié la décision (CE) N° 449/96 (Commission, 1996) exigeant que les sous-produits de mammifères soient soumis à une cuisson sous pression à la vapeur de minimum 133 °C à 3 bars pendant au moins 20 minutes avant leur utilisation potentielle en alimentation animale. Ensuite, la première interdiction de 1994 a été renforcée en 2001 par le règlement (CE) N° 999/2001 (Parliament and Council, 2001) (« TSE Regulation ») qui est à la base de la législation sur les PATs et qui fixe les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication des ESTs. Ces règles englobent notamment des mesures en matière de surveillance, d'alimentation animale, de détection rapide, d'isolation, d'abattage et de destruction. Ce règlement interdit l'utilisation de toute protéine animale transformée dans l'alimentation de tous les animaux de consommation. Toute présence de constituants interdits est considérée comme une violation de la loi, soit une tolérance zéro. Par dérogation à cette règle, un certain nombre de produits animaux sont autorisés dans les aliments pour animaux (Tableau 2), comme par exemple l'utilisation des farines de poissons pour les non-ruminants. L'annexe IV de ce règlement permet l'utilisation de produits laitiers, de graisse animale, de certains produits de sang, de gélatine, de phosphate di- et tricalcique, d'œufs et des protéines hydrolysées. Les PATs comme les farines de viande, les farines de plumes, les produits de sang de ruminant et la gélatine de ruminant sont autorisées seulement pour la nourriture des animaux à fourrure et animaux domestiques (Tableaux 2 et 3). En ce qui concerne les protéines animales à base de poisson (« fishmeal »), celles-ci sont autorisées dans l'alimentation des porcs, des volailles et des poissons (Commission, 2008). Après cela, l'interdiction du recyclage intra-spécifique a été introduite par le règlement (CE) N° 1774/2002 (Parliament and Council, 2002a) interdisant

l'alimentation des animaux avec des protéines transformées de la même espèce, cette pratique étant considérée comme "à risque" mais également comme une forme de cannibalisme.

La première priorité de la Commission Européenne est de protéger la santé animale et publique et de veiller à la sécurité des aliments de la ferme à la fourchette. À cette fin, la Commission a présenté un ensemble complet et rigoureux de mesures contre l'ESB, applicables dans toute l'Union Européenne (European Commission, 2015b). Ces mesures incluent :

- des inspections vétérinaires: tous les animaux présentés à l'abattage doivent subir une inspection vétérinaire pour s'assurer que les cas suspects ne pénètrent pas dans la chaîne alimentaire humaine et animale (depuis le 9 avril 1990).
- l'interdiction des farines de viande et d'os: il existe une interdiction de nourrir des bovins, ovins et caprins avec des FVOs de mammifères (depuis juillet 1994).
- le traitement des déchets de ruminants: il existe des normes strictes pour le traitement des déchets de ruminants (depuis le 1er janvier 1995). Ces normes, qui ont été renforcées le 1er avril 1997, exigent que tous les déchets de mammifères utilisés pour la production de farines animales soient cuits sous pression.
- un suivi et une surveillance: il existe des mesures de surveillance pour la détection, le contrôle et l'éradication de l'ESB (depuis le 1er mai 1998), impliquant une surveillance passive par les vétérinaires et les agriculteurs (identification de cas cliniques suspects) et une surveillance active au travers de tests. Jusqu'à la mi-2000, la majorité des cas d'ESB ont été détectés par la surveillance passive à savoir l'examen et le signalement obligatoire des animaux soupçonnés de présenter des symptômes cliniques de l'ESB.
- l'élimination des « specified risk materials » (SRMs) : les matières à risques spécifiées telles que la moelle épinière, le cerveau, les yeux, les amygdales, le thymus, la rate et les intestins, doivent être retirées des bovins, des moutons et des chèvres avant qu'ils n'entrent dans la chaîne alimentaire (depuis le 1er octobre 2000). Ces tissus représentent 99 % des tissus infectieux pour un bovin atteint de l'ESB (Smith and Bradley, 2003). L'élimination des SRMs est la mesure la plus importante en termes de protection de la santé publique contre l'ESB. D'autant plus que les diverses conditions de température et de pression utilisées sont connues pour ne pas inactiver complètement le prion pathogène.
- l'abattage d'animaux potentiellement infectés: les animaux susceptibles d'avoir reçu des aliments infectés doivent être abattus (depuis juillet 2001). Les animaux du même âge provenant du même troupeau susceptibles d'avoir reçu la même alimentation doivent également être abattus. Selon la situation épidémiologique et la traçabilité des animaux, il peut également être nécessaire d'abattre d'autres animaux du même troupeau. De plus, la descendance la plus récente de femelles atteintes d'ESB doit être abattue, du fait de la potentielle transmission verticale ou materno-foetale.

A



B

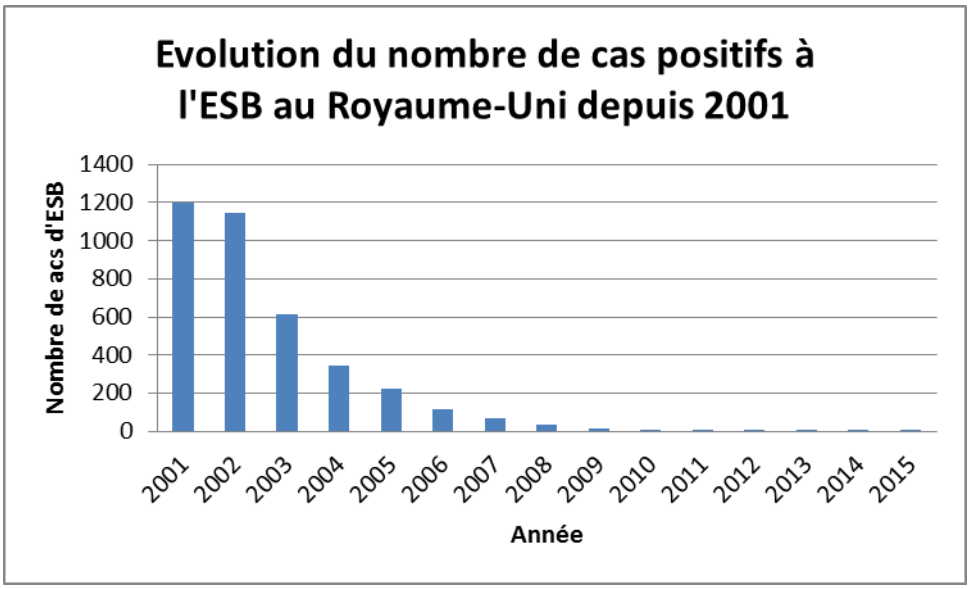


Figure 9. Evolution du nombre de cas positifs à l'ESB en Belgique (A) et au Royaume-Uni (B) depuis 2001 (Webographie N°4).

En plus de l'examen obligatoire de tous les animaux présentant des signes évocateurs de l'ESB, des tests post mortem rapides doivent être effectués sur certains animaux (depuis janvier 2001) : les animaux présentant des signes de l'ESB lors de l'inspection ante-mortem à l'abattoir, tous les bovins âgés de plus de 30 mois abattus pour la consommation humaine et les bovins trouvés morts à la ferme ou dans les transports (European Commission, 2015b).

En 2005, la Commission Européenne a publié un document intitulé « The TSE Roadmap » (Commission, 2005). Celui-ci présente les principales mesures en place concernant l'ESB, décrit la législation de l'Union Européenne et propose d'éventuels assouplissements de cette législation. C'est un document de réflexion sur les amendements possibles des mesures concernant l'ESB à court et moyen terme (2005-2009) mais également à long terme (2009-2014) à la suite d'une amélioration de la situation. Selon ce document, des assouplissements de certaines mesures d'interdiction des PATs pourraient être envisagés sans mettre en danger la santé des consommateurs ou la politique d'éradication de l'ESB. Ces assouplissements auraient même un impact positif sur la compétitivité des agriculteurs et des industries de l'Union Européenne. Cependant, cette feuille de route souligne que toute modification ou relaxation devront être fondées sur base d'avis scientifiques. En 2005, l'EFSA a suggéré une augmentation de l'âge pour l'élimination de la colonne vertébrale (SRM) de 12 à 21 voire 30 mois vu la rareté extrême des cas d'ESB détectés chez les jeunes animaux (24 mois appliqué au 1er janvier 2006 ; 30 mois appliqué en avril 2008). Depuis 2001, la tolérance zéro est appliquée. Dans ce document, l'introduction d'un seuil de tolérance à l'égard d'une faible présence de FVOs dans l'alimentation est envisagée sans compromettre les mesures d'éradication. Suite à un cas d'ESB dans un troupeau, une alternative est également proposée afin de reporter l'abattage du troupeau entier à la fin de vie productive des animaux ou de permettre aux animaux de rentrer dans la chaîne alimentaire suite à un résultat négatif de test à l'ESB. Cet assouplissement permettrait non seulement de réduire l'impact économique mais aussi les conséquences sociales de la destruction complète des troupeaux.

Une importante modification de l'utilisation des PATs dans l'alimentation animale a été introduite par le règlement (CE) N° 1923/2006 (Parliament and Council, 2006) interdisant de façon permanente l'utilisation des PATs dans l'alimentation des ruminants. Toutefois, il existe une dérogation dans le règlement (CE) N° 956/2008 (Commission, 2008) concernant l'utilisation de farine de poisson pour les jeunes ruminants en tant que substitut au lait maternel (Liu *et al.*, 2011) car cette farine constitue une source protéique très digeste dont la digestibilité est inférieure à celle du lait mais supérieure à celle de la plupart des protéines d'origine végétale. De plus, elle présente un bon profil en acides aminés par rapport aux sources de protéines végétales utilisées dans les aliments de substitution au lait.

Dans le prolongement de la tendance positive de réduction de l'épidémie d'ESB déjà observée en 2005 (Figure 9), la Commission Européenne a de nouveau publié en 2010 un document

Tableau 4. Liste non exhaustive des principaux textes législatifs concernant l'utilisation des PATs dans l'alimentation animale en Europe.

Numéro du texte législatif	Contenu du texte législatif
Décision (CE) N° 381/94	Interdit l'utilisation des PATs de mammifères dans l'alimentation des ruminants
Décision (CE) N° 449/96	Exige la cuisson sous pression des sous-produits animaux mammifères de minimum 133 °C à 3 bars pendant au moins 20 min
Règlement (CE) N° 999/2001	Interdit l'utilisation des PATs dans l'alimentation de tous les animaux de consommation
Règlement (CE) N° 1774/2002	Classe les sous-produits animaux en 3 catégories Interdit le recyclage intra-spécifique
The TSE Roadmap 1 (2005)	Réflexion sur des assouplissements des interdictions des PATs
Règlement N° 1923/2006	Interdit de façon permanente l'utilisation des PATs dans l'alimentation des ruminants
The TSE Roadmap 2 (2010)	Réflexion sur des assouplissements des interdictions des PATs Examine la possible introduction d'un seuil de tolérance des PATs à 2 %
Règlement (EC) N° 56/2013	Réintroduit les PATs de porc et de volaille dans l'alimentation des poissons d'élevage

Tableau 5. PATs autorisées ou non d'après la législation européenne actuelle concernant l'alimentation du bétail au moyen de protéines animales transformées. Les croix encadrées en vert représentent les PATs qui seront probablement réintroduites dans l'alimentation des non-ruminants dans un futur proche (selon les directives de la Commission (CE) N° 56/2013).

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

X : Prohibé

✓ : Autorisé

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

**Interdiction de nourrir les poisons d'élevage avec des PATs de poisson d'élevage mais autorisation avec des PATs de poisson de mer

intitulé « The TSE Roadmap 2 » (Commission, 2010). C'est un document de réflexion sur les amendements possibles des mesures concernant l'ESB pour la période allant de 2010 à 2015. L'objectif pour les prochaines années est de poursuivre la révision de la législation tout en assurant un niveau élevé de sécurité des aliments et cela toujours sur base d'avis scientifiques. Considérant le risque de transmission de l'ESB à des non-ruminants à partir de non-ruminants comme très peu probable, une levée de l'interdiction de l'utilisation des PATs de non-ruminants dans l'alimentation des non-ruminants pourrait être envisagée tout en gardant l'interdiction du recyclage intra-spécifique. Une telle mesure serait cependant acceptable seulement si des techniques analytiques sont disponibles afin de déterminer l'origine des espèces de PATs. Avec la réintroduction de certaines PATs de non-ruminants dans l'alimentation, l'EFPRA demande d'examiner la possibilité d'introduire un seuil de tolérance. L'EFPRA recommande un seuil de tolérance de 2 % pour la présence de PATs de ruminants dans les PATs de non-ruminants comme niveau ayant un impact négligeable sur les risques d'ESTs.

Le Tableau 4 présente la liste des principaux textes législatifs qui se sont succédés entre 1994 et 2013 en Europe concernant les PATs dans l'alimentation animale et le Tableau 5 résume la législation actuelle. Les trois interdictions les plus importantes dans l'histoire de la législation des PATs sont donc l'interdiction des protéines de mammifères dans l'alimentation des ruminants (de 1994 à 2001), l'interdiction de toutes les protéines animales dans l'alimentation des animaux de consommation (de 2001 à 2013), l'interdiction du recyclage intra-spécifique (en 2002) restant la norme absolue.

La manière dont ces produits doivent être traités est fixée dans le règlement (CE) N° 1069/2009 (Parliament and Council, 2009) et dans l'annexe IV de son règlement d'exécution (UE) N° 142/2011 (Commission, 2011). Ce règlement définit les conditions de collecte, de transport, de stockage, de transformation, d'utilisation, de destruction et de mise sur le marché de tous les produits d'origine animale qui ne sont pas destinés à la consommation humaine. Il existe 7 méthodes de transformation. Les PATs de mammifères doivent obligatoirement être soumises à un traitement de 133 °C pendant 20 minutes à 3 bars tandis que les PATs de non-mammifères, les produits de sang de porc ainsi que les farines de poisson sont soumis à des traitements moins drastiques (de 80 °C pendant 120 min à 120 °C pendant 50 min). Toutes les températures sont à atteindre à cœur (Commission, 2011).

En vertu des règlements de l'UE, les importations doivent satisfaire aux mêmes normes de sécurité que les produits fabriqués dans les états membres. Le 1er Juillet 2007, le règlement (CE) N° 722/2007 (Commission, 2007b) est entré en vigueur, modifiant le règlement (CE) N° 999/2001. Ce règlement catégorise les pays tiers en trois groupes en fonction de leur risque d'ESB: risque négligeable, risque contrôlé ou risque indéterminé. Les états membres et les pays tiers sont classés en fonction de leur risque d'ESB dans la décision 2007/453/CE de la

Commission (Commission, 2007a), revue le 4 août 2015 par la décision (UE) 2015/1356 (Commission, 2015).

1.3.2. Réintroduction de certaines PATs

L'efficacité des interdictions et contrôles décrits précédemment s'est clairement traduite par la diminution de cas d'animaux infectés par la maladie de la vache folle. Depuis le pic de l'épidémie en 1992 (37 280 cas au Royaume-Uni), ce nombre est passé de 8 149 cas en 1996 à 1 443 cas en 2000, 37 cas en 2008 (Reaney and Jørgensen, 2012) et seulement 2 cas en 2015. Cependant, ces prohibitions ciblaient également de nombreux déchets de protéines de haute qualité impliquant une perte économique et écologique importante. Il est estimé que la réintroduction des PATs dans l'alimentation du bétail apportera une valeur ajoutée d'environ 350 millions d'euros par an dans le domaine agro-alimentaire. Avec le secteur de l'aquaculture en pleine expansion, il est indispensable d'avoir des protéines de haute qualité et les PATs de non-ruminants produites à partir des porcs et des volailles montrent un grand potentiel pour répondre à cette demande (Margry and de Jong, 2012).

L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) a conclu en 2007 que le risque d'exposition à l'ESB, à travers de faibles quantités de produits contenant des PATs contaminées, est négligeable pour l'homme (EFSA, 2007). De plus, la présence de moins de 0,1 % de PATs (la limite de détection des méthodes officielles) de ruminants dans l'alimentation du bétail n'a pas d'incidence pour la santé. Le taux d'incorporation moyenne des PATs dans l'aliment pour le bétail terrestre est en général de 5 %. Ceci suggère que, pour une réintroduction sûre des PATs de non-ruminants, une limite de détection de 2 % pour des méthodes décelant des PATs de ruminants dans des PATs de non-ruminants serait suffisante (Margry and de Jong, 2012).

Pour diverses raisons économiques (soutien d'une filière durement touchée par la crise de la vache folle) et écologiques (limitation des stocks de déchets), la volonté de réintroduire certaines protéines animales dans l'alimentation du bétail s'est intensifiée ces dernières années. Bien que les protéines de ruminants ainsi que l'alimentation intra-spécifique seront toujours prohibées, aucune exclusion définitive n'est envisagée concernant les autres PATs existantes. Ainsi, une des principales volontés est de réintroduire les PATs de non-ruminants à l'alimentation animale. Un premier pas a été franchi en juin 2013, avec la réintroduction des protéines de porc et de volaille dans l'alimentation des poissons d'élevage, comme décrit par le règlement (EU) N° 56/2013 (Commission, 2013b). L'étape suivante serait de réintroduire les protéines de porc dans l'alimentation des volailles et les protéines de volaille dans l'alimentation des porcs (cadres verts dans le Tableau 5). Selon l'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 protéines animales transformées. Ensuite, parce que les tests développés afin de vérifier la composition de ces PATs ont fortement évolué. Aussi, il apparait que le risque de transmission de l'ESB (ou autre forme d'EST) via

l'alimentation des non-ruminants par des protéines de non-ruminants est tout à fait négligeable, tant que l'alimentation intra-spécifique reste prohibée (EFSA, 2011).

Les sous-produits animaux peuvent être considérés comme sans danger si les normes suivantes sont appliquées : un approvisionnement sûr, un traitement efficace et une utilisation contrôlée. L'application de ces principes permettra la réintroduction de certains sous-produits dans la chaîne alimentaire (Woodgate and van der Veen, 2004). Cette optique de réintroduction de certaines farines animales et la volonté de faire respecter la législation actuelle concernant l'utilisation de ces PATs impliquent le développement de techniques d'analyse visant à déterminer leur composition et à les caractériser tant au niveau de l'espèce que du type de produit. Les différentes méthodes existantes vont à présent être détaillées.

2. Méthodes de détection et d'identification des PATs

Vers la fin des années 1990 et le début des années 2000, de nombreuses méthodes de détection des PATs ont vu le jour. Celles-ci visent 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. Pratiquement, ces techniques tendent donc à observer, déterminer et évaluer au sein d'un échantillon quelconque la présence de toute particule animale n'étant pas autorisée selon les différentes législations mises en place en Europe. La législation étant complexe en termes d'espèces et de tissus autorisés, il est nécessaire d'avoir des méthodes de détection répondant à ces critères. Un éventail des méthodes existantes pour la détection des PATs est décrit dans ce chapitre à savoir la microscopie optique, la réaction en chaîne par polymérase, la spectroscopie et microscopie proche infrarouge ainsi que les méthodes immunologiques. D'autres méthodes, comme la chromatographie liquide qui se base sur la détection de différents dipeptides (la carnosine ou β-alanyl-L-histidine est essentiellement présente chez les mammifères tandis que l'ansérine ou β-alanyl-N-méthylhistidine est principalement trouvée chez les volailles (Schonherr, 2002; van Raamsdonk *et al.*, 2007) et les méthodes olfactométriques (Campagnoli *et al.*, 2004) se basant sur la détection de différentes odeurs à l'aide d'un nez électronique sont plus rarement appliquées.

Les méthodes de détection des sous-produits animaux doivent viser des cibles qui sont encore détectables après le traitement de production des PATs. Or, l'ADN est dégradé à la température de 133 °C et les protéines sont généralement dénaturées ou dégradées (Vermeulen *et al.*, 2012). Dans un premier temps, les différentes techniques se sont appliquées à atteindre la limite de détection la plus basse possible sans se soucier de la détermination de l'espèce car l'interdiction des PATs était totale à partir de 2001. Maintenant que la législation fait une distinction au niveau des espèces, les techniques de détection doivent également être capables d'identifier l'espèce présente dans les PATs. Il est

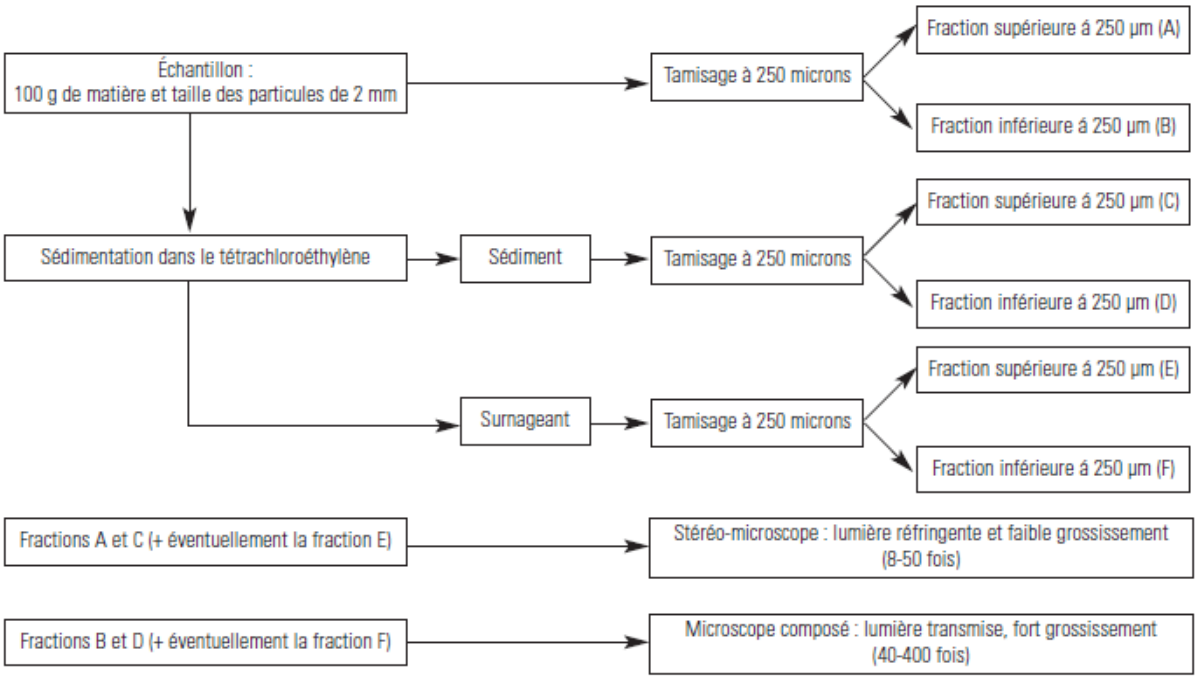


Figure 10. Protocole appliqué aux échantillons destinés à une analyse en microscopie optique (Plouvier *et al.*, 2012).

généralement accepté que les méthodes analytiques doivent avoir une sensibilité de détection jusqu'à 0,1 % avec un taux de faux positifs inférieur à 5 % (Gizzi *et al.*, 2004). L'introduction possible d'un seuil de tolérance de 2 % de PATs de ruminants dans les PATs de non-ruminants représente un nouveau défi nécessitant des outils de contrôle qui seraient en mesure de quantifier avec précision le niveau des PATs (Fumière *et al.*, 2009). Il a cependant été démontré qu'une quantification est quasi impossible aussi bien par microscopie que par PCR ou immunologie (Veys and Baeten, 2010). Toutefois, les techniques en proche infrarouge montrent un certain potentiel pour la quantification des PATs dans les aliments (Vermeulen *et al.*, 2012).

2.1. Méthodes officielles

Il existe deux méthodes reconnues par la Commission Européenne comme étant des méthodes de contrôle officielles pour la détection et la caractérisation des PATs dans les aliments pour animaux : la microscopie optique depuis 1998 et la réaction en chaîne par polymérase (PCR) depuis 2013.

2.1.1. Microscopie optique

La microscopie optique consiste à analyser différents fragments présents dans un aliment dans le but de détecter la présence de PATs. En 1998 (directive (CE) N° 88/1998) (Commission, 1998), la Commission Européenne déclare la microscopie optique comme première méthode officielle pour la détection et la caractérisation des PATs dans les aliments pour animaux. La directive (CE) N° 88/1998 est abrogée par la directive (CE) N° 126/2003 (Commission, 2003) et par le règlement (CE) N° 152/2009 (Commission, 2009), tout en conservant la microscopie optique comme seule méthode de contrôle officielle.

Le règlement (EU) N° 51/2013 (Commission, 2013a) détaille le protocole utilisé pour la microscopie optique dans son annexe VI : « Méthodes d'analyse applicables en matière d'identification des constituants d'origine animale pour le contrôle officiel des aliments pour animaux ». « Les constituants d'origine animale susceptibles d'être présents dans les aliments pour animaux sont identifiés sur la base de caractéristiques typiques et identifiables au microscope telles que les fibres musculaires et autres particules de viande, les cartilages, les os, la corne, les poils, les soies, le sang, les plumes, les coquilles d'œuf, les arêtes et les écailles de poisson » (Commission, 2013a). Les particules d'os sont les plus fréquemment observées par microscopie car elles sont les plus résistantes au traitement thermique des PATs (Liu *et al.*, 2011).

En pratique (Figure 10), la détermination microscopique d'un point de vue qualitatif est réalisée sur différents sous-échantillons obtenus à partir de l'aliment de départ (ou après broyage si nécessaire): la matière première, la fraction concentrée et son surnageant. La fraction concentrée, appelée aussi sédiment, est obtenue grâce à un processus de sédimentation dans le tétrachloroéthylène qui permet de recueillir des particules d'une densité

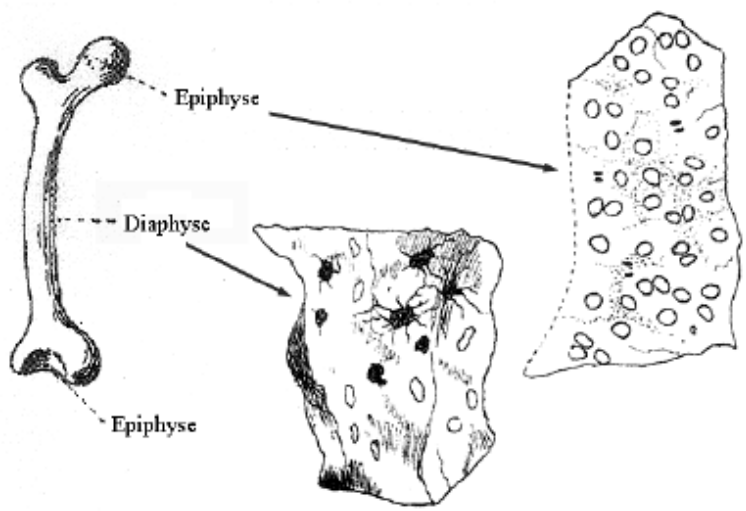


Figure 11. Différentes structures des os provenant des FVOs de mammifères (Gizzi *et al.*, 2003) (adapté de Schweizer, 1931). Au niveau des diaphyses, on peut voir des lamelles circulaires autour des canaux de Havers. Au niveau des épiphyses, il n'y a pas de canalicules.

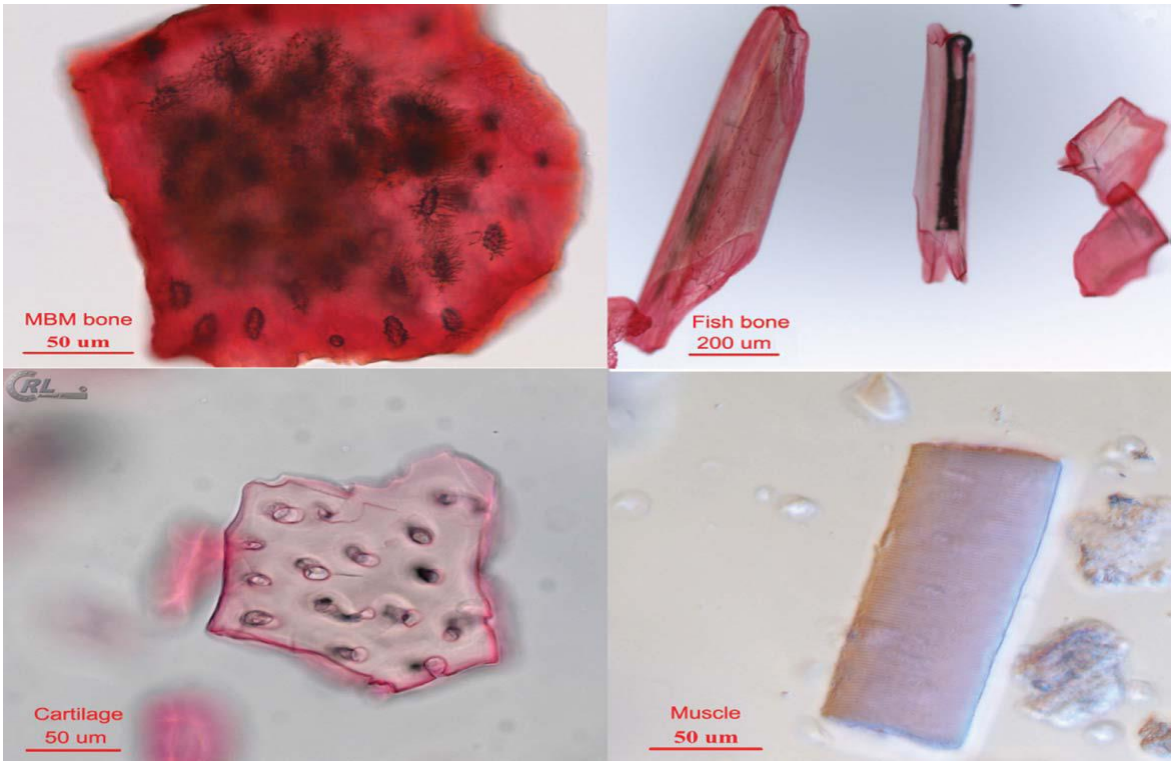


Figure 12. Vue au microscope d'os (mammifères et poissons), de cartilage et de muscle de différentes espèces présentes dans les PATs (Liu *et al.*, 2011).

Tableau 6. Tableau de critères d'observation et d'identification par microscopie optique de particules d'os issus de différentes espèces animales présentes au sein des PATs (Plouvier *et al.*, 2012, adapté de Gizzi *et al.*, 2003).

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

bien définie (c'est-à-dire la fraction la plus dense). Le sédiment est composé de minéraux, de fragments d'os, d'arêtes, d'écailles et de dents tandis que son surnageant contient des fibres musculaires, des cartilages, des soies ou encore de la corne. Un autre avantage de la sédimentation est le dégraissage de l'échantillon, qui permet d'avoir une vision claire de celui-ci (Gizzi *et al.*, 2003). Pour cette sédimentation, des entonnoirs de sédimentation fermés peuvent être utilisés. La matière première et le sédiment ainsi que son surnageant sont tamisés et les fractions obtenues sont examinées au moyen d'un stéréo microscope (pour la fraction avec les particules de taille supérieure à 250 µm) ou d'un microscope composé (pour la fraction avec les particules de taille inférieure à 250 µm). Divers milieux de montage, comme l'huile de paraffine, sont utilisés pour la préparation des lames. Les propriétés physico-chimiques de ces milieux de montage permettent de maintenir l'air à l'intérieur des lacunes des os, ce qui facilite la détection de la structure par l'analyste. En effet, la forme des lacunes est différente selon l'origine des particules (mammifères, poissons, oiseaux). La directive (CE) N° 126/2003 (Commission, 2003) autorise également l'utilisation de différents réactifs de coloration comme le rouge d'alizarine (coloration des os en rouge) et la cystine pour mieux mettre en évidence des structures telles que les os et les écailles de poisson d'une part et les poils et les plumes d'autre part (Fumière *et al.*, 2009). Le réactif de Fehling peut également être utilisé pour mettre en évidence les muscles (Liu *et al.*, 2011). Les caractéristiques discriminantes des fragments d'os sont la forme, la structure, la couleur et l'opacité de ces fragments ; la forme, la taille et la densité des lacunes ainsi que la visibilité des canalicules (Van Raamsdonk *et al.*, 2012; van Raamsdonk *et al.*, 2007). La structure d'un os long typique se compose d'une partie centrale (diaphyse) et d'extrémités terminales (les épiphyses) (Figure 11). Au niveau des diaphyses, on trouve de l'os lamellaire compact ou cortical et on peut voir des lamelles circulaires autour des canaux de Havers. Des lacunes contenant des ostéocytes sont agencées le long des lamelles, reliées entre elles et au canal central par un réseau très fin de canalicules creusés dans la matrice osseuse. Dans le cartilage, les chondrocytes forment des trous de forme globulaire et il n'y a pas de canalicules. Certaines de ces caractéristiques histologiques spécifiques peuvent encore être reconnues après l'abattage des animaux et le traitement des sous-produits. Par exemple, les particules d'os des mammifères sont facilement reconnaissables grâce à la présence de nombreux canaux de Havers d'où partent un grand nombre de canaux de Volkmann transversaux reliant entre eux ces différents canaux. Les particules osseuses de volaille, quant à elles, ont un aspect plus effilé et anguleux avec des lacunes plus globulaires, tandis que celles de poisson sont plutôt tubulaires et aux bords parallèles, tel que décrit dans Liu *et al.* (2011) (Figure 12). Toutefois, l'aspect général et la couleur des sédiments est la première indication de l'origine des FVOs (Tableau 6). Les particules osseuses de mammifères, à bords généralement lisses, sont de couleur blanche ou crème tandis que celles de volaille ont généralement une couleur plus foncée et apparaissent plus tranchantes et cassantes (« crispy »). Tous ces fragments d'os sont opaques à la différence des arêtes de poisson, qui sont plus transparentes. La distinction entre la farine de poisson et les sous-produits d'animaux terrestres est aisée grâce à la forme et l'apparence des

lacunes et canalicules. Par contre, distinguer les volailles des mammifères est beaucoup plus compliqué (Gizzi *et al.*, 2003). On peut obtenir un indice sur la distinction entre les volailles et les mammifères grâce à la largeur des fibres musculaires et à la longueur des sarcomères. L'analyse des fibres musculaires seule n'est pas suffisante mais elle peut appuyer l'identification réalisée sur base des fragments d'os (van Raamsdonk *et al.*, 2007). D'autres types de particules telles que celles produites à partir de poils, de morceaux de plumes, de coquilles d'œufs, d'écailles de poisson ou encore de branchies peuvent aider à confirmer la présence de farines animales dans l'aliment. Les poils vont désigner des mammifères, des morceaux de plumes et des coquilles d'œuf vont indiquer la présence de volaille, etc. (Liu *et al.*, 2011).

Le règlement (EU) N° 56/2013 contient également une procédure pour quantifier les PATs dans les aliments par microscopie classique. Cette quantification ne peut être réalisée que si des particules d'os ou des écailles de poisson sont présentes dans les sédiments. La formule suivante est utilisée : (S x c) / (W x f) x 100, où S est le poids des sédiments (mg), c (ou d dans le cas du poisson) est un facteur de correction pour l'estimation de la portion d'os (ou des écailles) dans les sédiments (%), W est le poids de l'échantillon utilisé pour la sédimentation (mg) et f est un facteur de correction pour la proportion d'os dans l'échantillon examiné en fonction du type des PATs présentes (%) (Fumière *et al.*, 2009). Cependant, la quantification est extrêmement ardue. Van Raamsdonk *et al.* (2005) ont conclu qu'il était difficile d'estimer le facteur f dans un échantillon dont la composition est inconnue. Veys *et al.* (2007) ont déduit que c'était le facteur c et non pas le facteur f qui posait problème car la directive n'explique pas comment évaluer ce facteur. De plus, il dépend complètement de la capacité de l'analyste à différencier les os ou les écailles des autres composants de l'échantillon. Une autre faiblesse de la quantification par microscopie est qu'elle est calculée grâce aux sédiments et donc elle se base uniquement sur les particules de haute densité comme les particules d'os mais ne prend pas en compte l'entièreté des PATs de l'échantillon (Veys *et al.*, 2012). Veys et *al.* (2010) ont amélioré cette méthode de quantification en travaillant sur trois points :

- la préparation de lames permanentes à l'aide d'un adhésif optique préservant les marqueurs morphologiques des particules osseuses permettant ainsi l'analyse de particules suspectes par différents opérateurs et laboratoires ;
- une procédure de comptage utilisant un réticule avec une grille de comptage dans l'oculaire (« counting grid eyepiece reticle ») ;
- des définitions détaillées des facteurs de correction afin d'estimer au mieux les particules osseuses animales (ainsi que les fragments d'écailles) dans les sédiments.

L'un des avantages de cette méthode microscopique est qu'elle permet de détecter la présence de PATs à des concentrations très faibles, allant jusqu'à moins de 0,1 %, tout en présentant un faible taux de faux négatifs (Liu *et al.*, 2011). Cependant, bien que la microscopie optique

permette de détecter la présence de particules animales dans un mélange complexe, cette méthode ne permet pas, à elle seule, une identification taxonomique des particules analysées. L'expérimentateur ne peut déterminer avec certitude à quelle espèce appartient tel ou tel fragment observé. En effet, cette technique peut distinguer un os de poisson d'un os terrestre mais ne peut différencier un os bovin d'un os porcin par exemple (Woodgate and van der Veen, 2004). Son efficacité est également fortement dépendante de la présence d'os dans l'ingrédient et de l'expérience de l'analyste. Cependant, la microscopie est moins affectée que les autres techniques par l'impact du traitement drastique des PATs (Vermeulen *et al.*, 2012). Le coût d'une analyse microscopique se situe entre 80 et 100 euros par échantillon.

En résumé, la technique de microscopie est donc très sensible. Toutefois, la détermination de l'espèce reste imprécise et se limite à la distinction animaux terrestres versus poissons, la distinction entre mammifères et oiseaux étant plus difficile. De plus, la méthode est utilisée pour la quantification des PATs mais cette dernière requiert l'utilisation de facteurs introduisant des erreurs (Fumière *et al.*, 2009). Celle-ci s'applique uniquement sur le sédiment, riche en particules denses, ce qui pose le problème de représentativité des fragments analysés. D'autres méthodes d'identification des PAT ont donc été élaborées, ces méthodes alternatives servant principalement de support additionnel à l'analyse microscopique.

2.1.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

La réaction en chaîne par polymérase est une technique mise au point dans les années 1980 dont le but est d'amplifier de manière exponentielle un fragment d'acides nucléiques spécifique et de longueur définie. Cette technique a été mise à profit pour analyser l'ADN présent dans des particules animales dans les aliments pour animaux (Plouvier *et al.*, 2012). En 1998, l'Institut National Italien de la santé a appliqué cette méthode de détection afin d'identifier les matières d'origine bovine dans les aliments (Tartaglia *et al.*, 1998). Le RIKILT (Institute of Food Safety, University of Wageningen), en coopération avec l'Université d'Utrecht, a développé un test PCR spécifique au ruminant pour la détection de FVOs dans les aliments (Aarts *et al.*, 1998). En 2000, Wang *et al.* (2000) ont réduit le temps d'analyse de 24 heures à 2 heures en simplifiant la préparation de l'échantillon. En 2001, les premières méthodes PCR pour la détection d'espèces hors ruminants apparaissent avec la mise au point d'un test pour l'identification des espèces ovine, porcine et de volaille dans les FVOs (Lahiff *et al.*, 2001). Au cours des années, la méthode n'a cessé d'être améliorée jusqu'à atteindre une limite de détection de 0,1 % sur des échantillons traités à hautes températures. Les PATs, malgré leur traitement à 133 °C et à 3 bars pendant 20 minutes, contiennent encore assez d'ADN non dégradé pour pouvoir réaliser une PCR avec une bonne sensibilité et spécificité (Fumière *et al.*, 2006).

Depuis 2013, la PCR est également considérée, au même titre que la microscopie optique, comme méthode de contrôle officielle dans l'Union Européenne. « Une nouvelle méthode de détection des constituants d'origine animale fondée sur la réaction d'amplification en chaîne

par polymérase (PCR) a été validée par le laboratoire de référence de l'Union Européenne pour la détection de protéines animales dans les aliments pour animaux. Une étude organisée en collaboration avec les laboratoires nationaux de référence des États membres a démontré que la nouvelle méthode était suffisamment robuste pour être utilisée comme méthode officielle de contrôle dans l'Union. Cette nouvelle méthode permet de détecter la présence de constituants d'origine animale dans les aliments pour animaux et de déterminer l'espèce d'origine de ces constituants » (Commission, 2013a).

La PCR est une technique d'amplification d'un fragment d'ADN basée sur une réaction enzymatique en chaîne qui théoriquement permet de doubler le nombre de cibles à chaque cycle. Les cibles sont des séquences d'ADN spécifiques d'une espèce ou d'un groupe d'espèces présentes dans chaque cellule d'un organisme. Plusieurs cibles courantes existent qui seront amplifiées via des amorces pour détecter de l'ADN de mammifère, ruminant, bovin, mouton, porc, poulet, volaille, oiseau ou poisson. De cette façon, on peut concevoir différentes amorces combinées (par exemple pour les cibles bovin, ruminant et mammifère) pour analyser un échantillon. Toutefois, une attention particulière est accordée à d'autres taxons ou espèces telles que les rongeurs, et en particulier les souris et rats. En effet, leur détection dans les aliments pourrait être utile afin d'expliquer de très faibles traces de particules animales terrestres trouvées dans les matières premières (Fumière *et al.*, 2009). Tenant compte de l'état dégradé de l'ADN après le traitement thermique caractéristique des PATs, les études se sont orientées sur des cibles présentes en grand nombre de copies par cellule. C'est le cas de l'ADN mitochondrial pouvant être présent en plusieurs centaines de copies par cellule et sur des amplicons courts (<100 pdb) afin d'augmenter la probabilité de les détecter. Certains auteurs ont également exploité des séquences présentes au niveau de répétitions dispersées caractéristiques d'un grand nombre de mammifères (mammalian-wide interspersed repeats ou MIRs) (Tajima *et al.*, 2002) ou encore au niveau des SINEs (short interspersed nucleotide elements) (Prado *et al.*, 2007). La localisation de la cible est également d'une grande importance. Il est plus judicieux de choisir une cible chevauchant deux gènes. Ainsi, deux espèces pouvant contenir les mêmes gènes, mais agencés différemment dans le génome, sont plus facilement distinguées, ce qui permet de réduire les problèmes de spécificité et d'augmenter la sensibilité du test (Fumière *et al.*, 2006).

Le règlement (EU) N° 51/2013 détaille le protocole utilisé pour la PCR dans son annexe VI. La PCR requiert une étape d'extraction afin d'isoler les acides nucléiques non dégradés encore présents dans les échantillons. C'est une étape très importante pour une détection efficace. En effet, les fragments d'ADN ne sont pas extraits avec la même efficacité selon qu'ils soient petits ou grands, en particulier pour les techniques d'extraction qui utilisent la précipitation d'ADN, étant donné que les plus petits fragments ne précipitent pas aussi facilement que les grands (Hird *et al.*, 2006). La PCR est ensuite réalisée sur une fraction de cet extrait. Pendant la réaction, une cible ADN bien définie, si elle est présente, est multipliée plusieurs millions

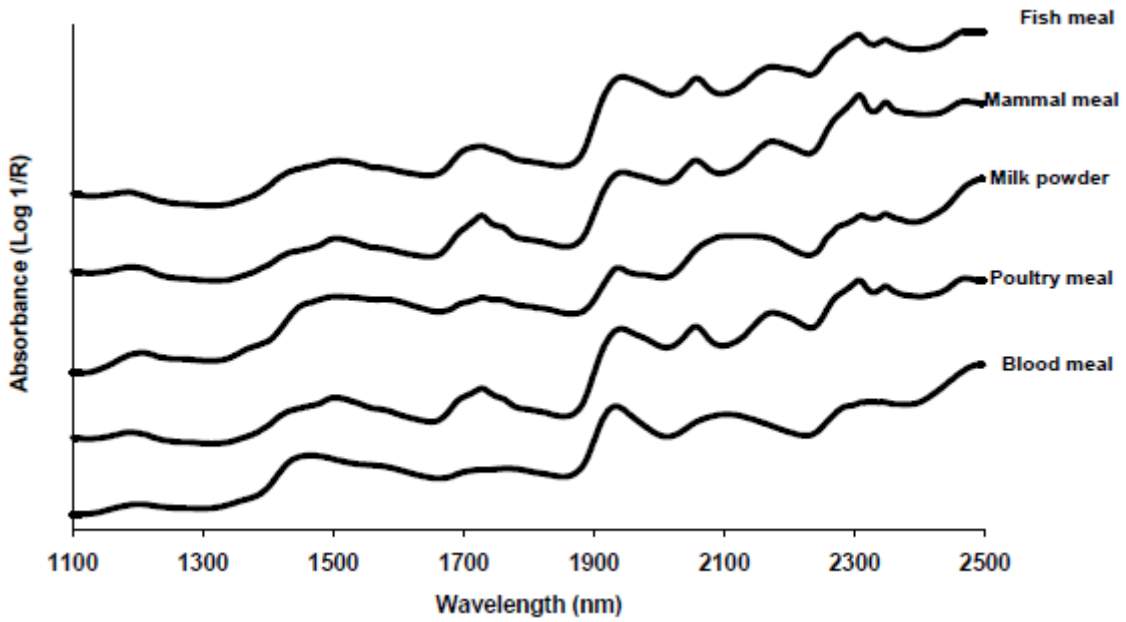


Figure 13. Spectres infrarouge de différents sous-produits animaux (Gizzi *et al.*, 2003). Avec la spectroscopie proche infrarouge, la détection des PATs est basée sur un seul spectre NIR correspondant à la moyenne des scans de l'échantillon.

de fois afin de la rendre détectable. Les segments d'ADN produits sont appelés amplicons et donnent lieu à un signal fluorescent lorsqu'une PCR en temps réel est réalisée. En effet, la PCR en temps réel ou PCR quantitative (Q-PCR) est une technique 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 ou d'un groupe d'espèces.

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). Cette méthode atteint, comme la microscopie, une limite de détection de 0,1 % (Fumière *et al.*, 2009). L'inconvénient majeur de la PCR est qu'elle n'arrive pas à faire la distinction entre l'ADN venant des produits autorisés (lait et produits laitiers par exemple) et l'ADN venant des produits interdits (Margry and de Jong, 2012). En effet, l'ADN détecté ne provient pas uniquement des PATs. Les ingrédients autorisés tels que le lait, les œufs, le sang, la graisse, les protéines hydrolysées, etc. peuvent contenir de l'ADN et provoquer des faux-positifs (Fumière *et al.*, 2012). Cette méthode permet seulement d'identifier la présence d'ADN d'une espèce (bovin, porc…) mais ne permet pas de confirmer la nature exacte de la particule identifiée (muscle, os, graisse, sang…). La PCR est également un procédé coûteux (jusqu'à 150 euros par échantillon), non seulement pour les réactifs, mais aussi pour le matériel, en particulier quand un thermocycleur en temps réel est nécessaire (Gizzi *et al.*, 2003).

2.2. Méthodes proche infrarouge

2.2.1. La spectroscopie proche infrarouge (NIRS)

La spectroscopie proche infrarouge (NIRS) est l'une des techniques d'analyse le plus largement utilisée dans le secteur de l'alimentation (Alomar *et al.*, 2003) et est basée sur la mesure de l'absorbance par les biomolécules présentes dans les échantillons analysés, ceux-ci étant illuminés à des longueurs d'onde sélectives (780 à 2500 nm) du spectre électromagnétique. Plusieurs études ont démontré l'application de cette technique NIRS dans la détection des PATs (De la Haba *et al.*, 2007b; De la Haba *et al.*, 2009; Garrido-Varo and Fernandez, 1998; Garrido-Varo *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008). La Figure 13 représente les spectres infrarouge de différents sous-produits animaux. Avec la NIRS, la détection des PATs est basée sur un seul spectre NIR correspondant à la moyenne des scans de l'échantillon. Cela implique que le spectre d'absorption spécifique des PATs est « dilué » par les spectres d'absorption des autres ingrédients de l'échantillon (Yang *et al.*, 2011). L'une des principales caractéristiques de cette méthode est qu'elle requiert souvent une masse élevée de l'échantillon à analyser (10 à 100 g), ce qui permet de tenir compte de l'hétérogénéité intrinsèque des échantillons et de réduire le risque de faux négatifs résultant de procédures d'échantillonnage inappropriées (Gizzi *et al.*, 2003). Les avantages de cette technique sont entre autres sa rapidité, l'absence d'utilisation de

solvants, une bonne reproductibilité, la simplicité de préparation des échantillons et leur non destruction. Cependant cette méthode ne détecte pas une seule cible comme une molécule ou une protéine spécifique et exige l'analyse d'un grand nombre d'échantillons de référence différents (van Raamsdonk *et al.*, 2007). Sa limite majeure est qu'elle ne peut faire la distinction entre les différentes espèces de mammifères. Néanmoins, elle peut être utilisée comme technique de dépistage en première ligne, combinée à des méthodes plus précises mais plus coûteuses pour les échantillons suspects (Fumière *et al.*, 2009; Perez-Marin *et al.*, 2012).

2.2.2. La microscopie proche infrarouge (NIRM)

Les premières études sur les méthodes proche infrarouge (Garrido-Varo and Fernandez, 1998; Piraux and Dardenne, 1999) ont été réalisées en 1998 montrant le potentiel de ces techniques afin de déterminer la présence de farines animales dans les aliments pour bétail. Depuis 1998, le CRA-W (Centre wallon de Recherches agronomiques) est un pionnier dans le développement de techniques microscopiques proche infrarouge basées sur le microscope NIR et sur le « NIR imaging system » afin de détecter et de quantifier les PATs.

La microscopie proche infrarouge combine les avantages de la microscopie optique (détection basée sur la présence de particules animales peu affectée par le traitement propre aux PATs) et les avantages de la spectroscopie (détection basée sur la composition chimique des tissus animaux présents). La NIRM est une technique d'analyse des PATs similaire à la microscopie optique, hormis que celle-ci caractérise les différentes particules au moyen d'un spectre proche infrarouge. En effet les différentes particules d'un mélange illuminées par un faisceau infrarouge produisent un spectre d'absorption dans le proche infrarouge (1,112 - 2,500 nm) différent en fonction de la composition de la particule illuminée. On peut obtenir des spectres infrarouge de cent et même mille particules à partir de l'analyse d'un seul ingrédient. Cette technique présente un avantage majeur par rapport à la microscopie optique classique : l'analyse de chaque particule est évaluée selon ses propriétés chimiques propres de façon tout à fait objective et non sur base de son apparence (Boix *et al.*, 2012). En pratique, différentes particules d'un mélange sont étalées sur une plaque et amenées au microscope proche infrarouge. En utilisant le pointeur du microscope, un faisceau infrarouge est ensuite dirigé vers chaque particule et les spectres proche infrarouge de chacune de celles-ci sont récoltés. La détermination de la présence de particules de PATs est faite par comparaison des spectres obtenus avec des librairies de référence (Fernandez Pierna *et al.*, 2012). Par microscopie proche infrarouge, si la proportion de PATs dans l'aliment est faible, il faut analyser un grand nombre de particules si l'on veut observer au moins une particule de PATs avec une probabilité suffisante (Vermeulen *et al.*, 2012). La principale limitation de cette technique est donc la collecte séquentielle des spectres (particule par particule pour un grand nombre de particules), qui prend du temps et est coûteuse. Pour réduire le temps d'analyse, une option est de travailler uniquement sur le sédiment de façon à réduire la quantité d'échantillon à analyser. L'objectif de cette étape de sédimentation est de concentrer les particules de PATs et

d'éliminer les particules non spécifiques. Un protocole ciblé sur la fraction sédimentée de l'échantillon, laquelle contient une grande partie des particules à haute densité comme les particules osseuses, a été développé par Baeten *et al.* (2005). Cette méthode, grâce à laquelle on obtient des résultats similaires à la microscopie optique, peut être utilisée pour détecter la présence de PATs à des concentrations relatives aussi faibles que 0,05 %.

Depuis 2001, dans le cadre d'un projet de recherche belge, le CRA-W a développé une méthode basée sur l'utilisation d'une caméra proche infrarouge afin de détecter la présence de PATs dans les aliments. La caméra NIR (aussi appelée « NIR imaging system ») prend séquentiellement des images à différentes longueurs d'onde d'une zone d'échantillon prédéfinie. Ce système, combinant les avantages des méthodes spectroscopiques et microscopiques, permet d'analyser environ 500 particules en 5 minutes, ce qui réduit fortement le temps d'analyse. Combinée à une méthode chimiométrique (SVM : Support Vector Machines) comme algorithme de classification permettant l'automatisation, la méthode « NIR imaging » a montré des résultats prometteurs (Dardenne *et al.*, 2002; Fernandez Pierna *et al.*, 2004).

Les techniques NIR répondent à tous les critères en termes de rapidité de réponse, de fiabilité et de rentabilité. Elles permettent d'analyser un échantillon en quelques secondes et ne sont pas destructives, permettant ainsi des analyses supplémentaires sur les particules douteuses. Les techniques NIRM et « NIR imaging » peuvent atteindre une limite de détection de 0,1 % et sont les seules méthodes adaptées à une quantification. Cependant, la discrimination au niveau de l'espèce doit encore être améliorée (Vermeulen *et al.*, 2012). La différenciation entre les PATs d'origine terrestre et les sous-produits de poissons peut se faire grâce à ces techniques (De la Haba *et al.*, 2007a; Tena *et al.*, 2014). En ce qui concerne la discrimination des différentes espèces d'origine terrestre, les résultats de plusieurs études tendent à indiquer que la discrimination pourrait être possible. Toutefois, en raison de chevauchements éventuels des spectres NIR entre les différents groupes d'espèce, la technique ne peut donner qu'une indication sur l'origine spécifique des PATs détectées. De plus, la NIRM peut être utilisée comme méthode de dépistage car elle ne demande pas de personnel spécialement formé et peut être automatisée. Cependant, la détermination de l'espèce est limitée et l'équipement est coûteux (Fumière *et al.*, 2009).

2.3. Méthodes immunologiques

Les tests immunologiques sont basés sur la reconnaissance spécifique d'une protéine grâce à l'affinité anticorps-antigène. Ces méthodes ont été appliquées pendant longtemps et avec succès pour la détection de la présence de viande crue ou modérément cuite dans la nourriture (Ayaz *et al.*, 2006; Vermeulen *et al.*, 2012). Différents modèles ont été développés mais, dans le domaine de la détection des PATs, seul l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ainsi que les tests de migration rapide « dipstick » sont utilisés. La première méthode

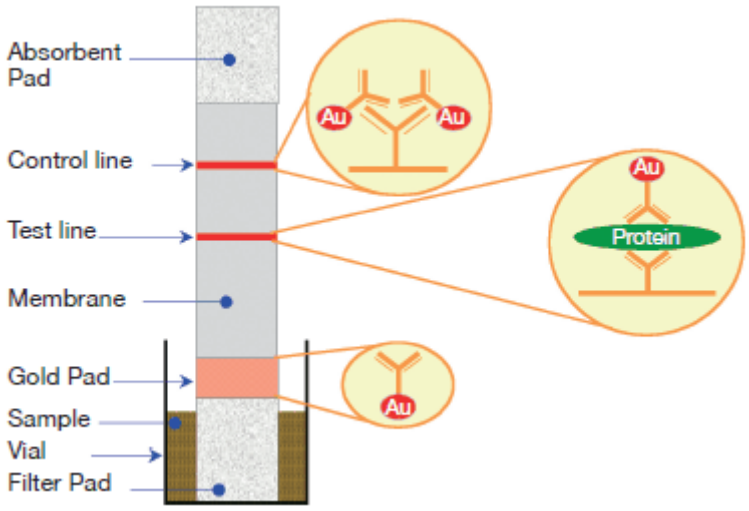


Figure 14. Schéma général d'un "dipstick"(Fumière *et al.*, 2009). La tigette est plongée dans l'extrait de protéines à analyser. Si la protéine cible est présente, il se forme des complexes protéines-anticorps spécifiques qui sont révélés en rouge grâce à l'or colloïdal.

nécessite l'utilisation de l'équipement typique d'un laboratoire comme un lecteur de plaques tandis que les « dipsticks » peuvent être utilisés sur site sans équipement spécifique.

La méthode immuno-enzymatique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) repose sur la reconnaissance d'un antigène par un anticorps spécifique. Cette spécificité est à la base du développement de méthodes de détection spécifiques et robustes. Les anticorps peuvent être soit monoclonaux (reconnaissant un seul épitope d'un antigène donné), soit polyclonaux (reconnaissant différents épitopes d'un antigène donné). Dans le cas d'un échantillon de PATs, l'antigène représente une protéine animale (ou un fragment dérivé), laquelle est reconnue par un anticorps spécifique de cette protéine. En pratique, un anticorps « de capture » est immobilisé dans le fond des puits d'une plaque 96 puits. Celui-ci est capable de fixer une protéine d'intérêt spécifique. On ajoute ensuite une solution contenant un extrait protéique dans chaque puits. La protéine spécifique de l'anticorps se lie à l'anticorps immobilisé, les autres protéines étant éliminées grâce à différents lavages. Par l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à une enzyme (phosphatase alcaline ou peroxydase de raifort par exemple) et reconnaissant la protéine d'intérêt, la protéine recherchée dans le mélange est facilement identifiable généralement grâce à une réaction colorimétrique en présence d'un substrat chromogène. Appliquée à l'analyse des PATs, la méthode ELISA permet donc en principe de détecter la présence de protéines spécifiques (de muscle, d'os, de sang,…) dans un mélange complexe. L'avantage majeur de cette technique est qu'elle permet de tester un grand nombre d'échantillons en une fois. Par contre, un point critique est la bonne fixation de l'anticorps primaire dans les puits de la plaque. En effet, la performance du test peut être fortement compromise par une mauvaise fixation de l'anticorps primaire (Reaney and Bremer, 2012). Cependant la plus grande difficulté est liée à la préservation ou non des propriétés antigéniques de la protéine ciblée, en particulier dans le cas de PATs, comme nous le décrirons plus en détails plus loin dans ce chapitre.

L'immuno-détection des PATs peut également se faire grâce l'utilisation de « dipsticks » ou tigettes. Le schéma d'un de ces tests est représenté à la Figure 14. Les antigènes détectés sont, par exemple, des protéines de muscles de ruminants, stables à haute température (> 100 °C), telles que la troponine I. Des anticorps de capture de la protéine sont immobilisés sur la tigette. La tigette est plongée dans l'extrait de protéines à analyser. Si la protéine cible est présente, il se forme des complexes protéines-anticorps spécifiques, ces derniers étant conjugués à de l'or colloïdal. Ces complexes seront capturés au niveau de la bande spécifique et révélés en rouge grâce à l'or colloïdal. Les anticorps marqué à l'or colloïdal, non complexés avec l'antigène, seront capturés par un anticorps anti-IgG au niveau d'une bande de contrôle placée au-dessus de la bande de résultat, validant le bon fonctionnement du test (Plouvier *et al.,* 2012). L'avantage considérable de cette technique est sa facilité d'utilisation et le fait qu'on puisse facilement l'utiliser sur le terrain sans connaissances scientifiques

particulières. Toutefois, la sensibilité est moindre comparée à l'ELISA (Reaney and Bremer, 2012).

Ansfield est le premier, en 1994, à proposer une méthode utilisant des anticorps polyclonaux contre des antigènes thermostables résistants au processus d'équarrissage (Ansfield, 1994). Le procédé consiste en une technique d'extraction spécifique impliquant un traitement thermique suivi d'une précipitation au sulfate d'ammonium en deux étapes. La première étape élimine les protéines interférentes (comme par exemple la gélatine) qui pourraient affecter la reconnaissance immunologique et la seconde étape concentre les protéines cibles sur lesquelles un ELISA double sandwich est appliqué afin de détecter les PATs de ruminants et de porc dans les aliments pour animaux (Ansfield *et al.*, 2000a; Ansfield *et al.*, 2000b). Ce test a été soumis à un essai de validation mais a échoué à détecter des PATs traitées dans les conditions requises par la règlementation (133 °C/3 bars/20min) (van Raamsdonk *et al.*, 2007). Chen *et al.* (2002) ont publié le développement d'un test ELISA basé sur des anticorps monoclonaux dirigés contre la **troponine I**. Cette protéine myofibrillaire isolée du muscle strié squelettique présente certaines caractéristiques : elle est thermostable, elle montre des différences au niveau de sa structure moléculaire pour différents groupes taxonomiques et elle est fortement représentée dans le muscle. Cependant, les auteurs n'ont pas testé une limite de détection plus basse que 1 %. La sensibilité de cette méthode reste donc incertaine. Une étude récente propose une technique de quantification de la troponine I dans la viande crue et cuite, comprenant une extraction de protéines ainsi qu'un ELISA de type sandwich. Cette méthode, adaptée à la détection de troponine I dans la viande de mammifères (bœuf, porc, agneau et cheval) mais non adaptée pour la viande de volaille, a une limite de détection de 4,8 ng de troponine I/ml d'extrait protéique (Zvereva *et al.*, 2015). Kim *et al.* (2004a, 2004b) ont développé un test ELISA également basé sur un anticorps monoclonal mais dirigé contre la **h-caldesmone**, protéine dont la séquence primaire n'est pas affectée après une cuisson à 130 °C pendant 1 heure. Celle-ci est présente dans tous les types de muscles lisses mais absente du muscle strié squelettique. Fait intéressant, la réponse du test augmente lorsque la température et la durée du traitement thermique sont augmentées de 90 à 130 °C et de 10 à 120 min. La limite de détection est basse (0,05 %) mais une réaction croisée a été signalée pour la gélatine, la farine de plumes et la farine de poisson. En 2012, Kreuz *et al.* (2012) démontrent que l'**ostéocalcine** est une protéine spécifique prometteuse pour la détection sensible (0,1 %) des PATs dans les aliments composés ou dans la farine de poisson, avec une excellente spécificité pour les FVOs de bovins dans ces matrices. Cette équipe a développé un ELISA basé sur des anticorps polyclonaux dirigés contre l'ostéocalcine bovine, qui permet la détection de PATs de bovins dans les aliments pour animaux. Il faut cependant souligner que l'ostéocalcine est sensible aux traitements thermiques (Buckley *et al.*, 2012).

Des kits spécifiquement consacrés à la détection de farines de ruminants sont proposés par différentes sociétés comme le test « Reveal for ruminants » commercialisé par Neogen

Corporation (Lansing, MI, USA), qui est un test de migration rapide ciblant la **troponine I**, protéine musculaire stable à la chaleur. La limite de détection de ce test est de 2 % mais un certain nombre de faux-positif ont été signalés, attribués en partie à la présence de graisse animale. Un autre test développé par Strategic Diagnostics Inc. (SDI – Newark, DE, USA), « Feedcheck », détecte les PATs de mammifères en utilisant le tissu conjonctif comme cible. Cependant, un grand nombre de faux négatifs ainsi qu'une réaction croisée avec les farines de poissons donnant lieu cette fois à des faux positifs ont été observés. Un test ELISA d'inhibition (ou par compétition) pour détecter les PATs de ruminants dans les FVOs, dans les aliments pour animaux et dans les farines de poisson a été proposé par AntibodyShop (Gentofte, Danemark) mais le nombre élevé de faux négatifs suggère que cette méthode ne semblait pas robuste (Gizzi *et al.*, 2004; von Holst *et al.*, 2006). La société américaine Elisa Technologies Inc. (Gainesville, FL, USA) commercialise le kit MELISA-TEK qui est capable de différencier la **troponine I** de ruminant et de porc d'autres troponines animales par des anticorps monoclonaux spécifiques et semble avoir des performances intéressantes (Fumière *et al.*, 2009). Un anticorps monoclonal spécifique de la troponine I est immobilisé dans les puits d'une plaque et capte la troponine I présente dans les échantillons ou les contrôles. Après une étape de lavage, un second anticorps monoclonal spécifique de la troponine I, qui a été biotinylé, va se lier à la troponine I présente dans le puits. Après une seconde étape de lavage, un conjugué streptavidine-peroxydase de raifort (SA-HRP) est ajouté et se lie à l'anticorps secondaire biotinylé. Les conjugués SA-HRP non liés sont éliminés par lavage. Le substrat chromogène TMB est ajouté, celui-ci est oxydé par la HRP, ce qui provoque un changement de couleur proportionnel à la quantité de troponine I initialement liée au puits. Enfin, une solution d'arrêt est ajoutée après un certain temps et l'intensité de la couleur est évaluée en utilisant un lecteur de plaque ELISA. Ce kit est capable de détecter 1 % de FVOs de ruminant ou de porc dans les aliments (Sigma-Aldrich).

Les avantages majeurs de ces techniques immunologiques sont leur faible coût, leur rapidité ainsi que leur facilité de mise en œuvre, qui ne nécessite donc pas de connaissances techniques avancées (Reaney and Bremer, 2012). Cependant, ces techniques ont l'inconvénient de ne pas être encore assez bien caractérisées. En effet, les anticorps actuellement utilisés pour reconnaitre une protéine animale dans une farine ne sont pas toujours assez spécifiques, ce qui réduit la sensibilité et la spécificité de détection de ces méthodes (Liu *et al.*, 2011). De plus, les anticorps utilisés ciblent en général des protéines thermostables mais ne tiennent pas toujours compte de l'altération de ces protéines durant le traitement thermique drastique appliqué aux PATs. On peut donc se demander s'il n'est pas plus pertinent 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. Des interférences sont également possibles avec des produits ruminants autorisés comme le lait (Gizzi *et al.*, 2003).

2.4. Combinaison de différentes méthodes d'identification

Chaque méthode d'analyse apporte une part d'information, sans pour autant répondre complètement 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 aliments sans pouvoir déterminer l'espèce exacte d'où provient cette particule. La méthode PCR, relativement sensible (0,1 %), permet quant à elle l'identification de l'espèce d'où provient une particule mais ne peut en confirmer l'origine tissulaire. Elle se heurte aussi à la mauvaise qualité de l'ADN résiduel dans les PATs. Les méthodes immunologiques permettent en principe l'identification de l'espèce et peuvent confirmer l'origine tissulaire (os, muscle, poils,…) mais sont sujettes à des faux négatifs et à des faux positifs dus à des réactions croisées. De plus, leur sensibilité et spécificité de détection sont assez limitées. Elles sont d'ailleurs d'autant plus limitées étant donné l'altération des antigènes analysés suite aux procédés thermiques drastiques nécessaires à la fabrication des PATs. Il est donc préférable de combiner plusieurs techniques afin de tirer parti des avantages de chacune et d'obtenir toutes les informations demandées par la législation (distinctions taxonomique et tissulaire).

Une approche intéressante est la combinaison du niveau de détection très bas de la microscopie comme méthode de dépistage avec l'identification par d'autres méthodes comme, par exemple, les tests immunologiques ou la PCR comme méthodes de confirmation. Seuls les échantillons positifs à la microscopie sont alors confirmés. Les tests immunologiques ainsi que la PCR sont capables d'indiquer la source de protéines animales afin de soutenir l'interdiction intra-spécifique. Un autre scénario possible est d'analyser les échantillons en utilisant un test immunologique sous forme de « dipsticks », suivi d'une confirmation par microscopie classique. Un tel scénario combine l'avantage de la rapidité des « dipsticks » à la fiabilité élevée de la microscopie. Un développement prometteur est la combinaison de la technique NIRM avec la PCR. La microscopie proche infrarouge peut distinguer une particule animale autorisée d'une particule interdite. La PCR appliquée à cette dernière peut déterminer l'espèce dont elle provient, si elle contient encore de l'ADN en quantité et qualité suffisantes (Bremer *et al.*, 2012; Fumiere *et al.*, 2010). La méthode « FISH » pour « Fluorescence *In Situ* Hybridization », a également été exploitée dans le contexte d'analyses de PATs (Lecrenier *et al.*, 2014). Elle combine la spécificité de la détection d'une séquence d'ADN avec la sensibilité de la microscopie. Cette technique cytogénétique est utilisée classiquement pour détecter et localiser la présence de séquences d'ADN spécifiques dans des coupes histologiques. L'hybridation *in situ* (ISH) a été initialement développée par Pardue et Gall (1969) et par John *et al.* (1969), avec des sondes ADN marquées par un isotope radioactif, la détection étant effectuée par autoradiographie. Dans la technique FISH, la fluorescence a remplacé la radioactivité. Les protocoles FISH sont maintenant basés sur l'hybridation spécifique d'une sonde marquée par fluorescence avec sa séquence cible complémentaire. Les hybrides formés entre les sondes et leurs cibles d'ADN sont détectés en utilisant la microscopie à fluorescence. Cette méthode a permis de déterminer l'origine bovine et

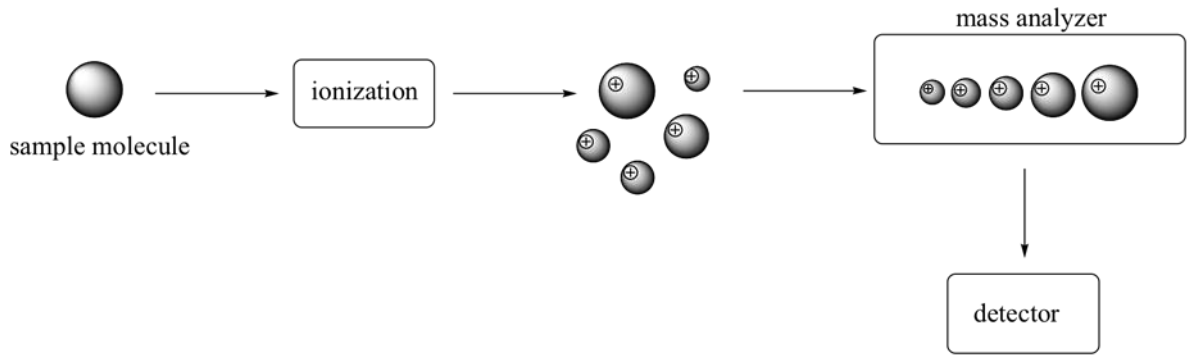


Figure 15. Les spectromètres de masse comportent tous, malgré leur diversité, un système d'ionisation des molécules, un analyseur de masse et un système de détection (Webographie N°5).

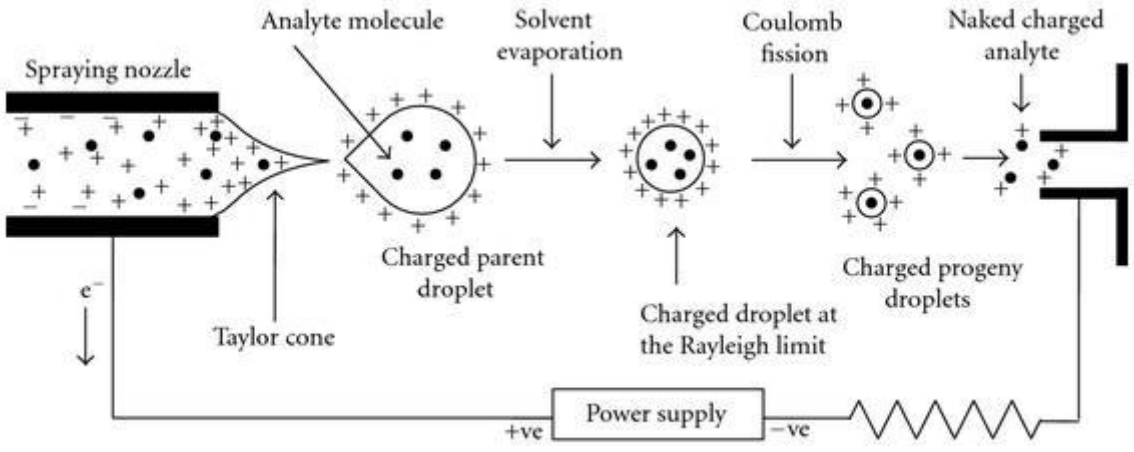


Figure 16. Principe de l'ionisation par électrospray. Les molécules sont ionisées grâce à un champ électrique qui permet la vaporisation du liquide sous forme de gouttelettes (Webographie N°6).

ruminant de particules d'os traités drastiquement, sans étape de déminéralisation nécessaire (Lecrenier *et al.*, 2014).

Bien que les résultats suggèrent le potentiel combiné de ces méthodes, certaines limitations restent cependant difficiles à contourner comme l'impossibilité d'identification du tissu prohibé. 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. Parmi celles-ci, la spectrométrie de masse semble une technique adéquate et prometteuse pour prouver la présence de matériel prohibé (van Raamsdonk *et al.*, 2007). Celle-ci va être détaillée dans le chapitre suivant.

3. Méthodes protéomiques

La protéomique se réfère à l'étude des protéines, que ce soit à l'échelle de leur identification, structure, fonctions ou interactions avec d'autres protéines, dans un système biologique donné à un moment donné. C'est une discipline qui 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). Les méthodes protéomiques ont fait leur entrée récemment dans le domaine de l'authentification de la viande et des produits dérivés. Ce sont en général des protéines et peptides spécifiques à une espèce donnée qui sont détectés et identifiés par spectrométrie de masse. En effet, il est connu que la structure primaire des protéines résiste relativement bien aux traitements thermiques (von Bargen *et al.*, 2014). Ce chapitre décrit les différentes méthodes protéomiques basées sur la spectrométrie de masse (techniques d'ionisation et analyses de protéines/peptides) d'un point de vue général. Un spectromètre de masse est un appareil qui comporte une source d'ionisation des molécules, un analyseur de masse qui permet de séparer les ions formés suivant leur rapport masse sur charge et un détecteur qui amplifie et mesure le signal. Celui-ci est ensuite enregistré et un spectre de masse est créé (Figure 15). Dans les paragraphes suivants, nous présenterons de manière non exhaustive les principales techniques d'ionisation ainsi que les analyseurs de masse utilisés en protéomique.

3.1. Techniques d'ionisation

Il existe plusieurs techniques d'ionisation qui varient entre autres selon la taille et la volatilité des molécules à analyser. Nous ne reprendrons ici que les techniques classiquement utilisées en analyse protéomique pour les protéines et les peptides.

3.1.1. Ionisation par électrospray (ESI)

Le principe de l'ionisation par électrospray est de transférer, sans fragmentation, des molécules d'une phase liquide vers une phase gazeuse (Figure 16). L'électrospray a comme caractéristique de générer des ions multichargés. L'ionisation est réalisée grâce à un fort

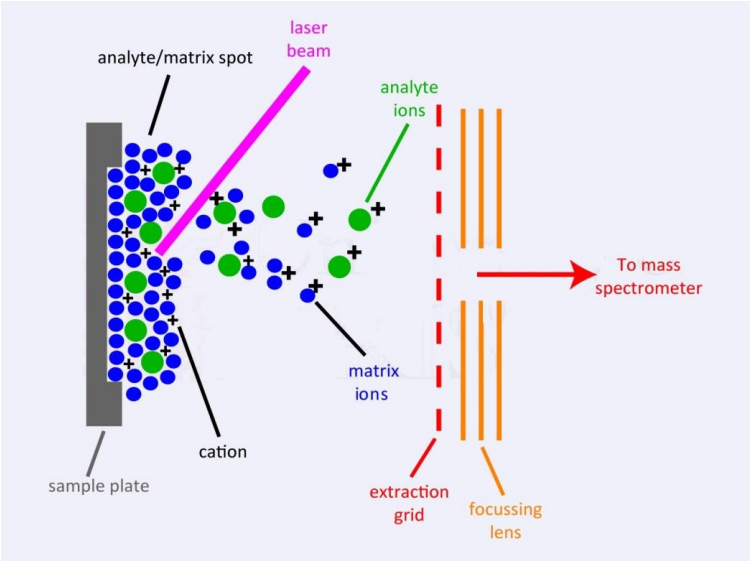


Figure 17. Principe de la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI). Les peptides/protéines à analyser sont déposés sur une plaque où ils co-cristallisent avec de petites molécules (en bleu) ayant la capacité d'absorber l'énergie émise à la longueur d'onde du laser. La matrice emmagasine l'énergie qui sera ensuite rapidement libérée par une expansion thermique. Les molécules libérées (en vert) et mises en phase gazeuse sont alors envoyées vers le spectromètre de masse (Webographie N°7).

champ électrique qui est appliqué en sortie d'un capillaire et qui permet la vaporisation du liquide sous forme de fines gouttelettes. Ce potentiel électrique a dès lors la capacité de charger les ions positivement par protonation ou négativement par déprotonation des biomolécules (Bruins, 1998; Ho *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003).

Une source électrospray est, en général, couplée à un système de séparation en phase liquide tel que la chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Le couplage avec le spectromètre de masse se fait via un capillaire qui permet la nébulisation du liquide grâce à l'apport d'un gaz neutre tel que l'azote. A la sortie du capillaire, les molécules se retrouvent sous la forme de fines gouttelettes chargées. Celles-ci sont soumises à deux phénomènes : la répulsion des molécules chargées entre elles et l'élimination du solvant au moyen du gaz nébulisateur et du chauffage de la source. Ces gouttelettes voient leur taille diminuer, par l'évaporation du solvant, et donc voient leur densité de charge augmenter (Bruins, 1998). Leur taille diminue de plus en plus jusqu'au moment où chaque molécule ionisée est désorbée et se retrouve en phase gazeuse. Ces ions gazeux (multichargés) sont alors envoyés vers l'analyseur du spectromètre de masse. Généralement, les analyseurs utilisés avec un électrospray sont de type quadrupôle (Q), temps de vol (TOF), trappe ionique ou à transformée de Fourier (FT-ICR) (voir Point 3.2.).

3.1.2. Désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

La désorption/ionisation laser assistée par matrice est une seconde approche permettant l'ionisation de molécules. Cette méthode n'utilise pas de potentiel électrique mais un laser comme vecteur d'énergie pour ioniser les molécules (Figure 17). Les peptides/protéines à analyser sont déposés sur une plaque où ils co-cristallisent avec de petites molécules ayant la capacité d'absorber l'énergie émise à la longueur d'onde du laser. Il s'agit classiquement de lasers UV émettant de la lumière de 337 à 355 nm (Lin *et al.*, 2003). Les molécules les plus souvent utilisées comme matrice sont l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique pour les peptides et l'acide sinapinique ou l'acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique pour les protéines. En absorbant cette énergie, la matrice protège les peptides d'une fragmentation directe en emmagasinant l'énergie qui sera ensuite rapidement libérée par une expansion thermique de la matrice et des biomolécules. Des fractions de matrice et de molécules se retrouvent ainsi 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 (Lin *et al.*, 2003). Généralement, ce type d'ionisation est utilisée pour analyser des mélanges de peptides ou de protéines moins complexes par rapport à l'ESI (Aebersold and Mann, 2003). De plus, les ions générés par une source MALDI sont généralement monochargés, contrairement à ceux produits par une source ESI. L'analyseur souvent employé avec cette source est de type temps de vol (TOF) (voir Point 3.2.).

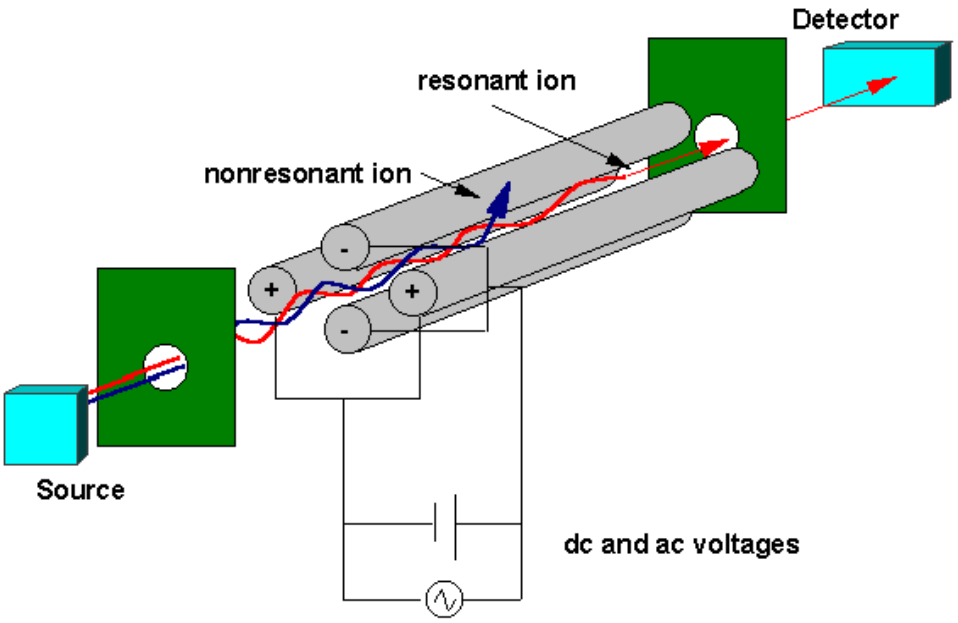


Figure 18. Principe du fonctionnement du quadrupôle. Les ions sont sélectionnés selon leur rapport m/z grâce à un voltage continu (dc ou « direct current ») et à un voltage alternatif (ac ou «alternative current ») appliqués aux quatre barres métalliques. Les ions dont le rapport m/z est sélectionné auront une trajectoire oscillante stable jusqu'au détecteur (parcours rouge), les autres ions s'écraseront sur les barres ou s'échapperont du système à cause d'une trajectoire oscillante instable (parcours bleu) (Webographie N°8).

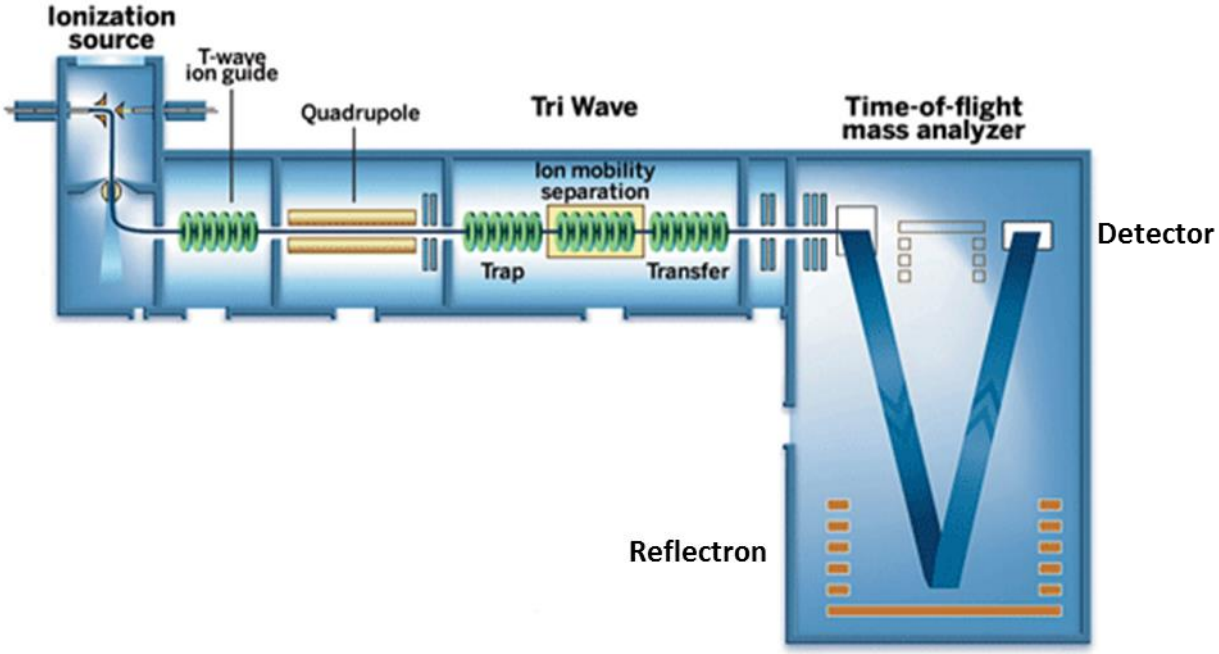


Figure 19. Principe du fonctionnement du temps de vol (TOF). Les ions sont envoyés vers le tube de vol. Leur temps de parcours jusqu'au détecteur dépend de leur énergie cinétique et de leur rapport m/z. Le réflectron permet de grouper les ions ayant le même rapport m/z mais une énergie cinétique différente (Webographie N°9).

3.2. Analyseurs de masse

Après leur ionisation, les molécules sont ensuite envoyées vers l'analyseur du spectromètre de masse. L'analyseur de masse a pour fonction de séparer les ions suivant leur rapport masse sur charge (m/z). De manière générale, un analyseur est évalué selon deux critères principaux : sa résolution et sa précision de masse. La résolution est définie par la capacité de l'analyseur à séparer deux masses différentes. La précision de masse est la différence entre la masse théorique d'une molécule et sa masse mesurée. La précision de masse est liée à la résolution. Ainsi, un instrument possédant une faible résolution aura par conséquent une précision de masse plus faible (Lin *et al.*, 2003).

3.2.1. Quadrupôle (Q)

Le quadrupôle est composé de quatre électrodes en forme de barres métalliques cylindriques disposées parallèlement deux à deux (Figure 18). Un voltage positif est appliqué à une paire de ces barres métalliques et un voltage négatif à l'autre paire, conférant une polarité différente aux barres adjacentes. De plus, une combinaison d'une tension continue et d'une tension alternative de fréquence ω est appliquée à chaque paire. Les ions qui traversent le quadrupôle ont alors une trajectoire oscillante particulière en fonction de leur rapport m/z mais également du voltage soumis à ces barres métalliques. Le quadrupôle permet donc de sélectionner certains ions en fonction de leur rapport m/z car ceux-ci oscilleront tout au long du quadrupôle jusqu'au détecteur avec une trajectoire stable. Par contre, les ions dont le rapport m/z n'est pas sélectionné auront alors une trajectoire oscillante instable qui ne leur permettra pas d'atteindre le détecteur (Lin *et al.*, 2003). Une utilisation du quadrupôle en mode scan est aussi possible. Le voltage augmente alors à l'intérieur d'une gamme d'intensités permettant à chaque instant de ne laisser passer que des ions ayant un rapport m/z bien défini (Chalkley, 2010).

3.2.2. Temps de vol (TOF)

L'analyseur de masse à temps de vol accélère des groupes d'ions grâce à un champ électrique et les différencie selon leur temps de traversée du tube de vol jusqu'au détecteur (Figure 19). Les ions démarrent tous avec la même énergie cinétique mais comme ils n'ont pas le même rapport m/z, ils n'arrivent pas en même temps au niveau du détecteur. En effet, au plus un ion est léger, plus vite il traversera le tube de vol. Le TOF a la capacité d'associer à chaque ion une valeur précise de son rapport m/z rien qu'en mesurant son temps de vol (Chalkley, 2010; Cotter, 1989; Lin *et al.*, 2003). Afin d'augmenter la résolution d'analyse, cet analyseur peut également être équipé d'un réflectron, qui permet de grouper les ions ayant le même rapport m/z mais une énergie cinétique différente. Si deux ions d'énergie cinétique faiblement différente mais de même rapport m/z sont envoyés dans le TOF, l'ion avec la plus grande énergie cinétique pénètrera plus profondément dans le réflectron avant d'être réfléchi et envoyé vers le détecteur. Ce dispositif permet aux ions avec le même rapport m/z d'arriver au même moment au détecteur et ainsi d'augmenter la performance de l'analyseur que ce soit au niveau de la résolution ou de la précision de masse (Chalkley, 2010; Hirsch *et al.*, 2004).

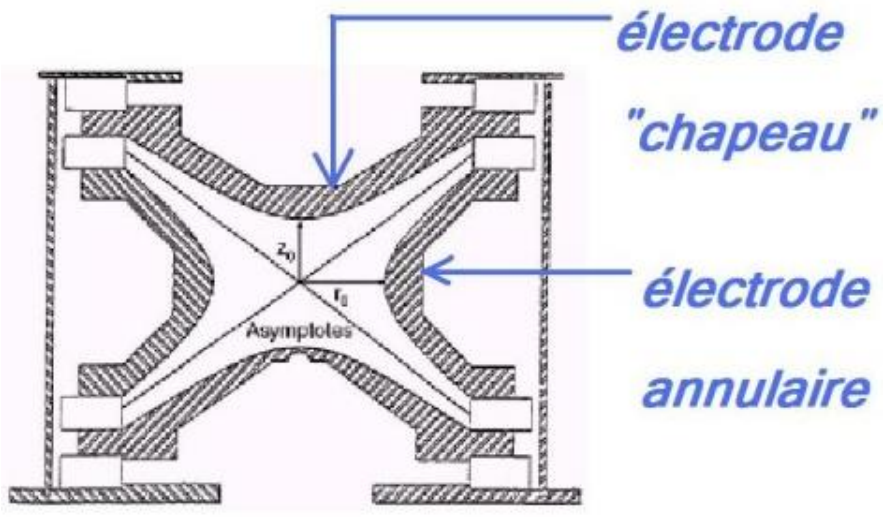


Figure 20. Principe du fonctionnement de la trappe ionique. Cet analyseur comporte une électrode annulaire et deux électrodes « chapeau ». La chambre ou trappe ionique est soumise à un voltage permettant de piéger les ions au centre de celle-ci. Ces ions peuvent soit être envoyés vers le détecteur où leur rapport m/z sera mesuré (analyse MS), soit être fragmentés (CID) pour être ensuite envoyés vers le détecteur (analyse MS/MS) (Webographie N°10).

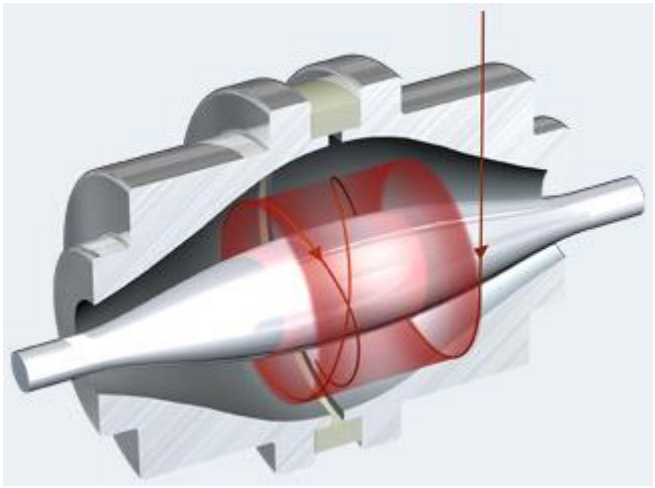


Figure 21. Principe du fonctionnement de l'orbitrap. Les ions sont injectés dans l'espace séparé par deux électrodes. Suivant son rapport m/z, l'ion va osciller autour de l'électrode centrale avec une fréquence caractéristique. La mesure de cette fréquence permet d'atteindre une grande précision et de séparer des ions de masses moléculaires très proches (Webographie N°11).

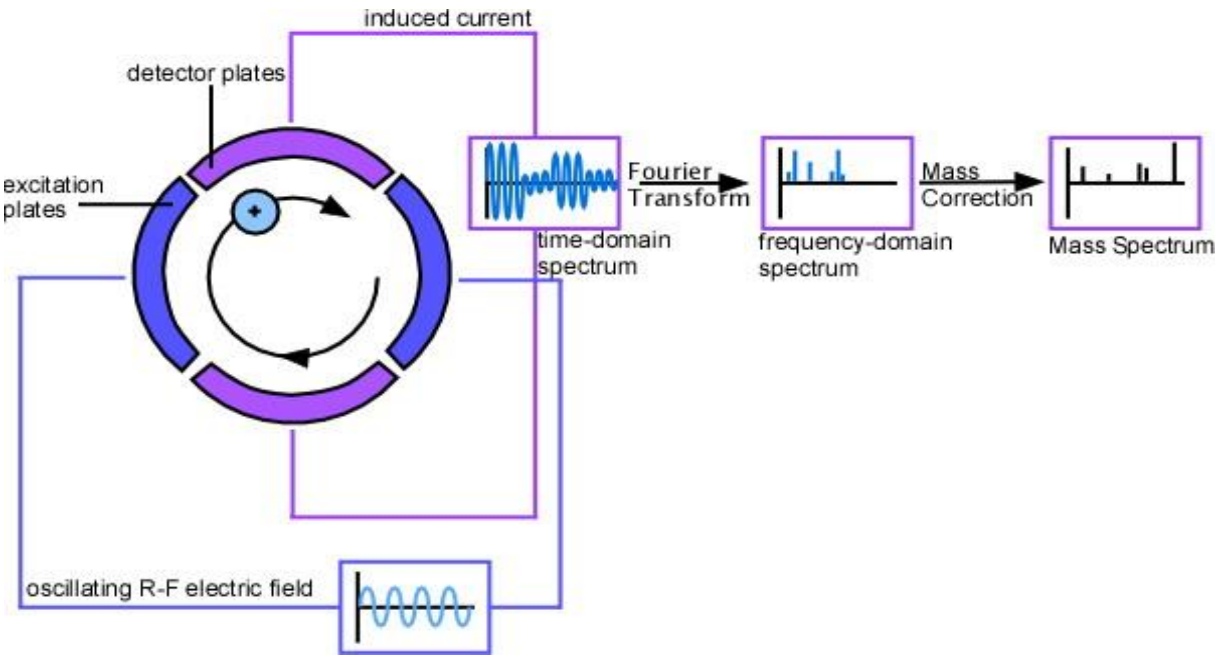


Figure 22. Principe du fonctionnement du spectromètre de masse à transformée de Fourier (cyclotron à résonance des ions) (FT-ICR). Les ions sont soumis à un champ magnétique leur permettant d'osciller au centre de cet analyseur. L'oscillation est fonction du rapport m/z. Ces ions sont ensuite détectés sous la forme d'un signal électrique. Ce dernier est converti en un spectre de masse grâce au principe de la transformée de Fourier (Webographie N°12).

3.2.3. Trappe ionique

L'analyseur de type trappe ionique est constitué d'une électrode annulaire, en forme de diabolo, couverte par deux électrodes, les électrodes « chapeaux » définissant un espace où circulent les ions, ce qui permet de réaliser la sélection, le piégeage et la fragmentation des peptides dans la même enceinte (Chalkley, 2010). La chambre ou trappe ionique est soumise à un voltage permettant de piéger les ions au centre de celle-ci (Figure 20) (Glish and Vachet, 2003). En faisant varier ce champ électrique, la trajectoire des ions va être déstabilisée de façon à les éjecter de la trappe successivement vers le détecteur, en fonction de leur rapport m/z (analyse MS). Dans le cas des peptides, il est également intéressant de retenir les ions afin que ceux-ci soient fragmentés en entrant en collision avec un gaz inerte (hélium) pour être ensuite envoyés vers le détecteur. C'est cette approche qui permet de déterminer leur séquence en acides aminés (MS/MS). Cet analyseur a l'avantage d'être moins coûteux et de permettre une analyse rapide, mais a des limites en terme de précision de masse, ce qui restreint aussi sa résolution (Aebersold and Mann, 2003).

3.2.4. Orbitrap

Un analyseur de type orbitrap est composé d'une électrode creuse en forme de tonneau, à l'intérieur de laquelle est placée une seconde électrode de forme fusiforme (Figure 21). En raison de sa forme particulière, les ions injectés dans l'orbitrap sont soumis à plusieurs forces les faisant osciller autour de l'électrode centrale. Le mouvement des ions se décompose ainsi : un mouvement circulaire autour de l'électrode centrale et un mouvement oscillatoire de va-et-vient. C'est le rapport m/z des ions qui définit la fréquence d'oscillation. Celle-ci est détectée et convertie en rapport m/z au moyen de la transformée de Fourier (Chalkley, 2010; Scigelova *et al.*, 2011). Il est également possible de réaliser des spectres MS/MS en envoyant les ions sélectionnés vers un analyseur de type trappe ionique où ces ions seront fragmentés puis dirigés vers un détecteur. L'avantage de ce type d'analyseur est sa très haute résolution ainsi qu'une très bonne précision de masse pour les ions précurseurs. Néanmoins, comparé aux autres analyseurs, le temps d'analyse est nettement plus élevé quand on travaille en haute résolution (Hu *et al.*, 2005).

3.2.5. Spectromètre de masse à transformée de Fourier (FT-ICR)

Le spectromètre de masse à transformée de Fourier (FT-ICR) fait partie de la famille des trappes ioniques. Cependant, il utilise un champ magnétique de forte intensité pour piéger des ions en son centre (Figure 22). Les ions introduits dans cet analyseur sont soumis à un champ magnétique qui les fait osciller en fonction de leur rapport m/z. Dès lors, les ions ayant un même rapport m/z oscilleront de la même manière entre deux plaques détectrices et pourront ainsi être détectés par la mesure d'un courant ionique lors du passage de ces ions d'une plaque à une autre (Lin *et al.*, 2003). Ce signal est ensuite converti en une valeur de m/z grâce à la transformée de Fourier (Scigelova *et al.*, 2011). Cet analyseur possède une très grande sensibilité, une très haute résolution et une grande précision de masse. Cependant, ses coûts d'achat et de fonctionnement élevés ainsi que sa faible capacité à fragmenter les peptides font

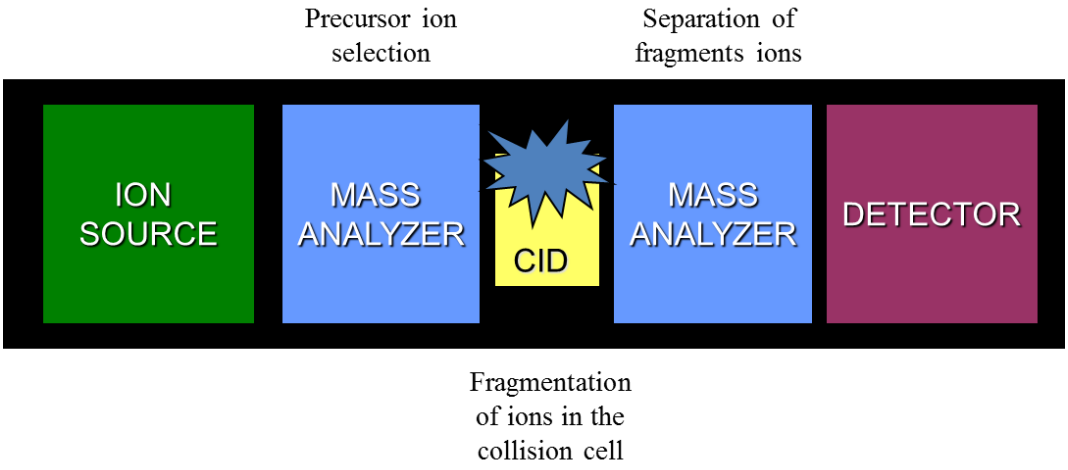


Figure 23. Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse en tandem. Le spectromètre de masse en tandem est composé d'une source d'ionisation, d'un premier analyseur de masse qui permet de sélectionner les ions précurseurs, d'une cellule de collision qui permet de fragmenter les ions, d'un deuxième analyseur de masse qui permet de séparer les fragments des ions et enfin d'un détecteur (cours de spectrométrie de masse de M. Dieu).

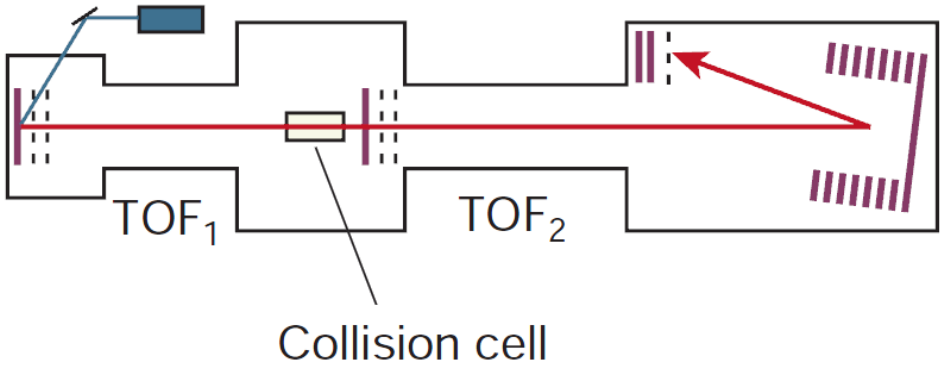


Figure 24. Principe du fonctionnement du spectromètre de masse hybride de type TOF-TOF (Aebersold and Mann, 2003).

que ce type d'appareillage est peu utilisé en analyse de routine (Aebersold and Mann, 2003; Marshall *et al.*, 1998).

3.3. Spectromètres de masse en tandem

Les différents analyseurs de masse décrits ci-dessus possèdent des caractéristiques leur permettant de fournir des informations sur les protéines ou les peptides détectés. On peut aussi combiner plusieurs de ces analyseurs afin de profiter de leurs avantages. Ces spectromètres de masse en tandem ou hybrides vont permettre de fournir des informations comme la séquence en acides aminés d'une protéine ou d'un peptide grâce à la fragmentation d'ions stables. Cette donnée est critique pour déterminer l'origine taxonomique et tissulaire d'un peptide ou d'une protéine.

Un spectromètre de masse en tandem est toujours composé d'une source d'ionisation, d'un premier analyseur de masse, d'une cellule de collision qui permet de fragmenter les ions, d'un deuxième analyseur de masse et enfin d'un détecteur (Figure 23). Dans le premier analyseur, les ions sont sélectionnés selon leur rapport m/z. Les ions non sélectionnés sont quant à eux déviés de leur parcours. Les ions sélectionnés (ions mères ou précurseurs) pénètrent alors dans la cellule de collision où ils entrent en collision avec les atomes d'un gaz inerte tel que l'argon ou l'azote. Cette collision produit la dissociation des ions mères au niveau de leur lien peptidique. C'est ce qu'on appelle la dissociation induite par collision ou CID (collision-induced dissociation) : un ion mère donne naissance à plusieurs ions filles. Ces ions filles sont ensuite séparés selon leur rapport m/z dans le second analyseur. La détection des ions, au niveau d'un détecteur en fin de parcours, permet alors de créer un spectre de masse correspondant aux fragments issus de l'ion mère. Il existe en analyse protéomique un autre mode de fragmentation, l'« electron transfer dissociation » (ETD), qui permet notamment de caractériser les modifications post-traductionnelles des protéines (Kim and Pandey, 2012). Les spectromètres de masse hybrides présentés ci-dessous sont des spectromètres MS/MS dans l'espace, c'est-à-dire que l'isolement des ions précurseurs et l'analyse des fragments de ces ions ne se fait pas dans la même enceinte. Il existe également des spectromètres MS/MS dans le temps, comme les trappes ioniques par exemple, où l'isolement des ions précurseurs et l'analyse des fragments se font dans la même enceinte mais à un moment différent.

3.3.1. TOF-TOF

Certains spectromètres de masse dits en tandem utilisent deux analyseurs de masse de type temps de vol séparés l'un de l'autre par une cellule de collision (Figure 24). Un spectromètre de masse de type TOF-TOF est généralement connecté à une source MALDI et permet un séquençage très sensible des peptides analysés. Cependant, comme le MALDI permet seulement de produire des ions monochargés, l'information obtenue lors de la fragmentation n'est pas aussi riche qu'avec une ionisation en électrospray (Medzihradszky *et al.*, 2000).

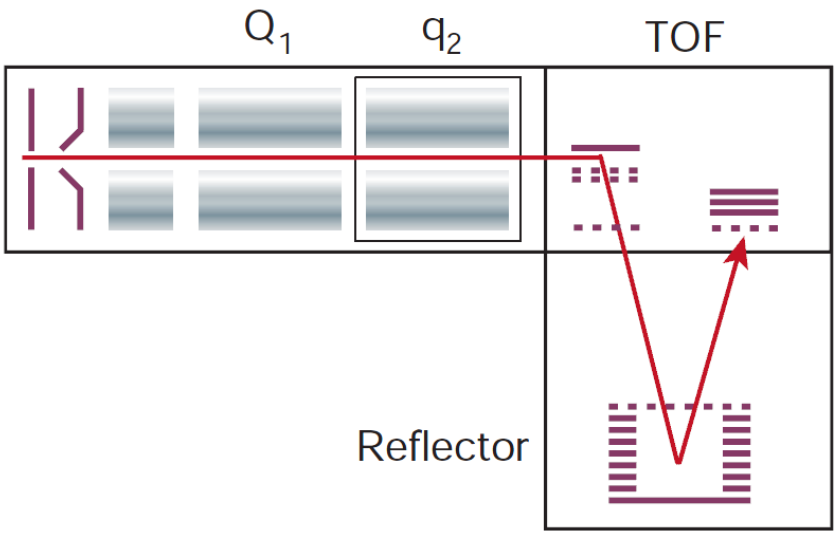


Figure 25. Principe du fonctionnement du spectromètre de masse hybride de type Q-TOF (Aebersold and Mann, 2003).

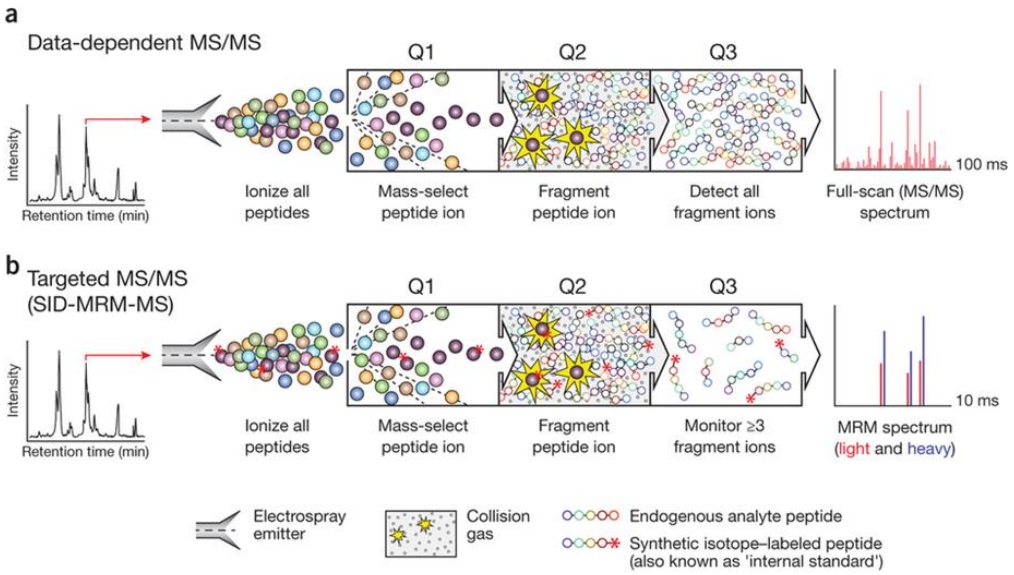


Figure 26. Principe du fonctionnement du spectromètre de masse hybride de type triple Q. Le premier quadrupôle (Q1) sélectionne les ions selon leur rapport m/z, le deuxième quadrupôle (Q2) fait office de cellule de collision et le troisième quadrupôle (Q3) détermine les rapports m/z des ions filles. La source d'ionisation est ici un électrospray. (a) Soit la détection se fait sur tous les fragments ioniques. Un spectre MS/MS est alors obtenu. (b) Soit on cible uniquement quelques fragments d'intérêt (appelés transitions). Un spectre MRM est alors obtenu. Une quantification peut être réalisée grâce à des standards internes (astérisques) (Gillette and Carr, 2013).

3.3.2. Q-TOF

Un spectromètre de masse de type Q-TOF est un spectromètre de masse hydride combinant un analyseur de type quadrupôle et un analyseur de type temps de vol (Figure 25). Cet appareillage est couramment utilisé puisqu'il possède une grande sensibilité, une grande résolution ainsi qu'une grande précision de masse (Aebersold and Mann, 2003; Chalkley, 2010; Lin *et al.*, 2003).

3.3.3. Triple quadrupôle

Un spectromètre de masse de type triple quadrupôle (triple Q) associe dans un même appareil 3 analyseurs de type quadrupôle placés en série (Figure 26). Selon le mode opératoire utilisé, l'appareillage permet de varier les analyses. Premièrement, le triple Q peut être utilisé afin de mesurer le rapport m/z de composés intacts. Dans ce cas, les deux premiers quadrupôles transmettent les ions vers le dernier quadrupôle qui fonctionne selon un mode scan, mesurant ainsi le rapport m/z de chaque molécule ionisée. Deuxièmement, le triple Q peut être configuré en vue de fragmenter les molécules analysées. Dans cette configuration, plus courante, le premier quadrupôle sélectionne les ions ayant un rapport m/z spécifique et ces ions sont envoyés vers le second quadrupôle. Celui-ci fonctionne comme une cellule de collision. Dans ce type de spectromètre de masse hybride, l'efficacité de collision est élevée. Le dernier quadrupôle est enfin utilisé en mode scan de façon à déterminer le rapport m/z des ions filles (Chalkley, 2010). La sélection des fragments, ainsi que celle des ions précurseurs, est possible. On peut soit détecter tous les fragments ioniques (ion précurseur + ions filles) (Figure 26 a), soit cibler uniquement quelques fragments prédéfinis appelés « transitions » (Figure 26 b) (Gillette and Carr, 2013). L'appareil, alors en mode « Multiple Reaction Monitoring » (MRM), est très spécifique permettant des mesures quantitatives précises. En effet, on peut utiliser des peptides marqués par des isotopes stables comme standards internes par exemple. Cette technique, appelée technique des peptides AQUA, permet de réaliser la quantification absolue de peptides ou protéines contenus dans un échantillon biologique grâce au rapport d'intensité observé entre le signal correspondant au peptide natif et le signal correspondant au peptide AQUA présent en quantité connue (Sentandreu *et al.*, 2010). Ce type de spectromètre de masse est donc très bien adapté à la détection et la quantification d'une molécule particulière. Le triple quadrupôle est sensible et rapide mais a une résolution plus faible que le Q-TOF. Un compromis doit souvent être fait entre sensibilité et résolution.

3.4. Identification et analyse des protéines

En protéomique, deux stratégies expérimentales afin d'identifier et de caractériser les protéines et peptides analysés sont essentiellement décrites: l'analyse directe des protéines en spectrométrie de masse (approche « top-down ») et l'analyse des peptides issus de la fragmentation des protéines par digestion enzymatique (approche « bottom-up »). Que ce soit pour l'une ou pour l'autre technique, l'identification des peptides et des protéines se fait par comparaison entre les spectres obtenus expérimentalement et les spectres théoriques (Figure 27).

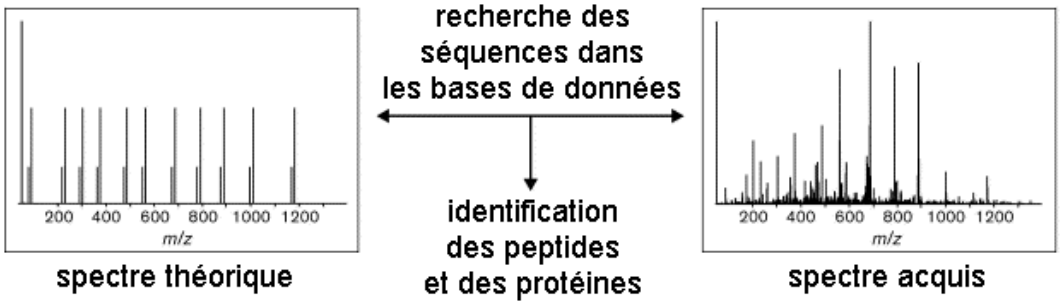


Figure 27. Comparaison des spectres obtenus avec les spectres théoriques et identification des peptides et protéines (Webographie N°13).

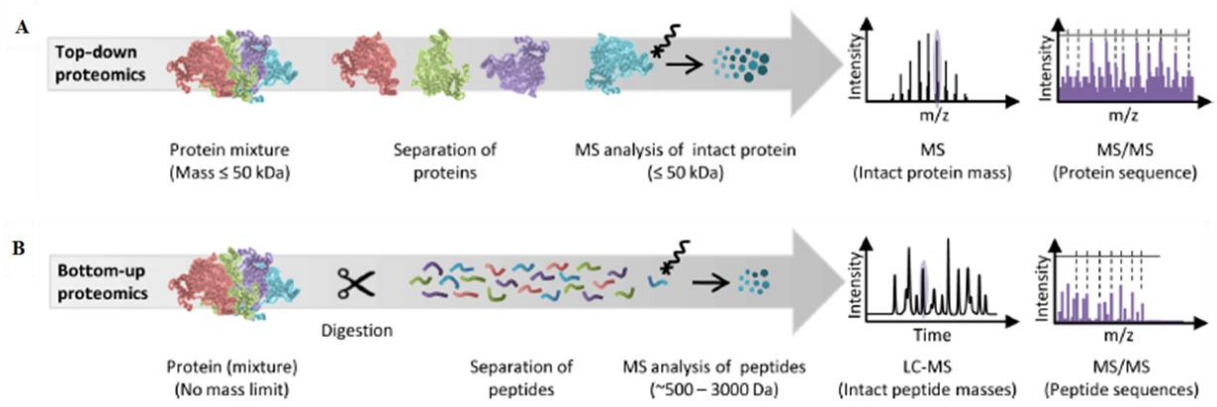


Figure 28. Principe de l'approche protéomique « top-down » (A) et « bottom-up » (B) (Switzar *et al.*, 2013). L'approche « top-down » consiste en l'analyse directe de protéines sans traitement enzymatique préalable. L'approche « bottom-up » consiste en l'analyse de peptides obtenus à partir d'un mélange plus ou moins complexe de protéines ayant été préalablement digérées enzymatiquement.

3.4.1. Approche « top-down »

En spectrométrie de masse, l'approche protéomique « top-down » consiste en l'analyse directe de protéines sans traitement enzymatique préalable (Figure 28 A). Les protéines sont donc introduites intactes dans le spectromètre de masse où elles vont être ionisées puis fragmentées dans la cellule de collision. Il existe plusieurs méthodes de fragmentation des protéines: la dissociation activée par collision (Piras *et al.*, 2015), la dissociation par capture d'électrons (ECD) ou encore la dissociation par transfert d'électrons (ETD) (Kim and Pandey, 2012; Wu *et al.*, 2007). C'est sur base des produits de cette fragmentation qu'on obtient des informations sur la masse et la séquence en acides aminés de ces protéines. L'appareil utilisé doit être adapté à la grande taille des molécules introduites dans le spectromètre de masse et requiert donc une précision de masse et une résolution suffisantes. C'est pour ces raisons que la méthode « top-down » n'est généralement possible qu'avec des spectromètres de masse de type orbitrap ou à transformée de Fourier (FT-ICR). Toutefois, cette approche présente des limitations, puisqu'elle ne permet d'analyser que des protéines dont le poids moléculaire reste inférieur à ± 50 kDa (Han *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2003; McLafferty *et al.*, 2007; Ouvry-Patat *et al.*, 2009; Switzar *et al.*, 2013).

3.4.2. Approche « bottom-up »

Cette stratégie consiste en l'analyse de peptides en spectrométrie de masse en tandem obtenus à partir d'un mélange plus ou moins complexe de protéines ayant été préalablement digérées enzymatiquement (Figure 28 B). Même si d'autres protéases peuvent être utilisées, c'est généralement la trypsine qui va être utilisée pour digérer les protéines. La trypsine a la capacité de produire des fragments protéiques en clivant les protéines au niveau C-terminal de leurs résidus lysine (K) et arginine (R). Vu le nombre moyen de résidus lysine et arginine dans la majorité des protéines, on estime que la trypsinisation produit en moyenne des peptides d'environ 14 acides aminés (Switzar *et al.*, 2013). Cette méthode de digestion, non restreinte à une taille limite des protéines, présente une très grande efficacité et un haut degré de spécificité. Les peptides issus de la digestion enzymatique sont donc aisément analysables en spectrométrie de masse (Burkhart *et al.*, 2012). Ces peptides sont ensuite séparés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) selon divers critères tels que l'hydrophobicité et la charge. Cette chromatographie permet de décomplexifier le mélange de peptides et engendre ainsi un meilleur séquençage de ces peptides. Les peptides séparés sont alors analysés, soit en mode MS de façon à obtenir la masse de chaque peptide, soit en mode MS/MS permettant d'acquérir la séquence en acides aminés de chaque peptide (Aebersold and Mann, 2003; Lin *et al.*, 2003; Switzar *et al.*, 2013). L'analyse bioinformatique des données permet ensuite d'identifier la protéine dont proviennent les peptides.

3.5. Analyses bioinformatiques

Comme expliqué ci-dessus, la spectrométrie de masse permet de déterminer le profil protéique et peptidique d'un échantillon. Deux méthodes peuvent être utilisées afin de caractériser les molécules présentes dans l'échantillon : la méthode « Peptide Mass

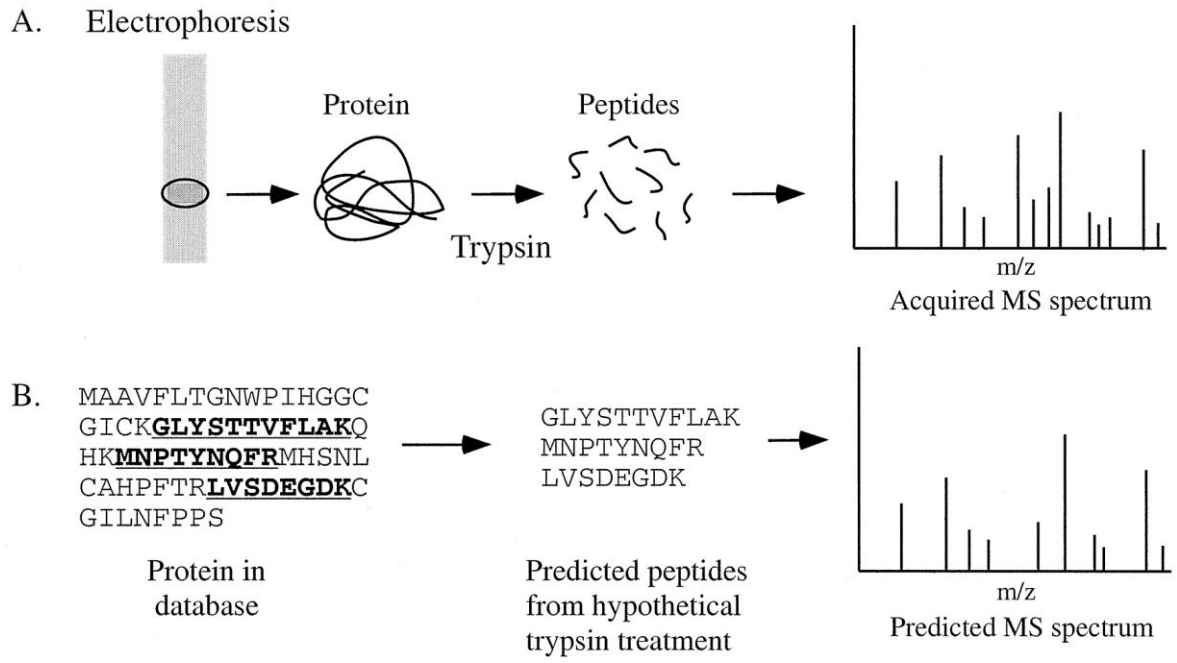


Figure 29. Principe du peptide mass fingerprinting (PMF). (A) Une protéine inconnue est digéré par la trypsine. Les peptides sont analysés par spectrométrie de masse et un spectre MS est obtenu. (B) Une protéine théorique est digérée *in silico* par la trypsine également. Un spectre MS théorique est obtenu. La comparaison entre les spectres de masse expérimentaux (A) et théoriques (B) permet l'identification de la protéine inconnue (Graves and Haystead, 2002).

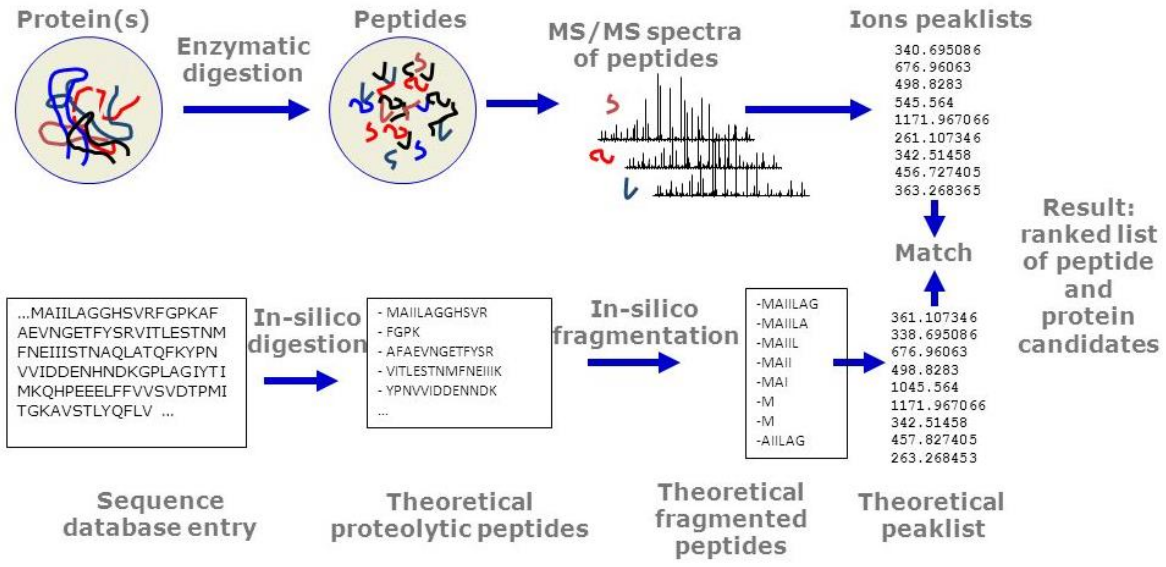


Figure 30. Principe du peptide fragment fingerprinting (PFF). Une protéine inconnue est digérée par la trypsine et les peptides sont analysés par une analyse MS/MS. La « peaklist » (liste des rapports m/z de chaque ion obtenu) est comparée à une liste théorique obtenue *in silico* par digestion de protéines contenues dans les bases de données et fragmentation de peptides théoriques. Les masses de ces fragments peptidiques sont comparées aux masses expérimentales grâce à un moteur de recherche de type Mascot (Webographie N°15).

Fingerprinting » (PMF) et la méthode « Peptide Fragment Fingerprinting » (PFF) (Barbarini and Magni, 2010). La méthode PMF est réservée à une analyse MS (où les peptides sont analysés selon leur rapport m/z sans être fragmentés) alors que la méthode PFF est réservée à une analyse MS/MS (où les peptides sont fragmentés puis analysés selon leur rapport m/z). Les données brutes acquises par le détecteur du spectromètre de masse seront préalablement traitées de façon à réduire le bruit de fond et à optimiser les signaux relevants. On assigne une charge à chaque ion et un spectre de masse en bâton est créé. Ensuite, une « peaklist » (liste qui associe les masses mesurées à leur abondance) est créée et confrontée aux banques de données UNIPROT ou NCBInr afin d'identifier les protéines et peptides. La comparaison entre les données expérimentales et les données théoriques est réalisée grâce à un moteur de recherche tel que Mascot. Celui-ci va, *in silico*, sur base des séquences digérer théoriquement les protéines se trouvant dans les bases de données (SwissProt ou NCBInr par exemple) selon les paramètres utilisés pour l'expérience (taxonomie, enzyme, modifications fixes ou variables, précisions des masses…). Il obtiendra ainsi des "peaklists" théoriques. Mascot va comparer les listes théoriques et expérimentales et calculer, à l'aide de différents algorithmes, un score (Peptide score) de probabilité de correspondance entre les masses des peptides théoriques et les masses des peptides expérimentaux. Plus le score est élevé, plus la confiance dans la concordance entre les peptides théoriques et expérimentaux est grande. Pour chaque protéine identifiée, Mascot calcule un score (Protein score) qui correspond à la combinaison des différents scores des peptides identifiés. La comparaison entre ces deux listes permettra d'identifier les peptides et donc les protéines présentes dans l'échantillon (Webographie N°14).

3.5.1. Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

Dans la méthode du « Peptide Mass Fingerprinting » (Figure 29) (Graves and Haystead, 2002), les masses peptidiques expérimentales obtenues lors d'un scan MS sont comparées à une liste de masses peptidiques obtenues *in silico*, sur base de la structure primaire des protéines pour un type de digestion donnée, souvent la trypsinisation (Reece *et al.*, 2012). Il est donc possible de déterminer à quelle protéine appartient un peptide présent dans l'échantillon par comparaison des masses des peptides analysés avec les masses des peptides théoriques. Un moteur de recherche tel que Mascot, SEQUEST ou PHENYX fait le lien entre les données brutes obtenues expérimentalement et les banques de données permettant ainsi cette comparaison (Thiede *et al.*, 2005). Néanmoins, la méthode PMF ne s'applique efficacement qu'à des mélanges de protéines de complexité limitée, car plus un échantillon est complexe, plus la difficulté de faire un « matching » entre peptides observés et peptides théoriques est grande. De plus, des erreurs peuvent être commises si un organisme est peu ou pas séquencé dans les bases de données (Reece *et al.*, 2012).

3.5.2. Peptide Fragment Fingerprinting (PFF)

Par la méthode du « Peptide Fragment Fingerprinting » (Figure 30), on détermine la séquence en acides aminés des peptides présents dans l'échantillon grâce aux masses des fragments

peptidiques obtenues lors d'un scan MS/MS. En effet, lors d'une analyse MS/MS, une liste comprenant les masses des ions précurseurs associées aux rapports m/z des fragments obtenus est créée (« peaklist »). Il est alors possible d'identifier les peptides sur base de leur séquence par comparaison entre les masses expérimentales et les masses théoriques contenues dans les bases de données et par inférence, d'identifier les protéines. Ces listes théoriques sont générées *in silico* par digestion des protéines présentes dans les bases de données et fragmentation des peptides théoriques. Des moteurs de recherche tel que Mascot permettent la comparaison entre les « peaklists » obtenues et théoriques. Certains paramètres (l'enzyme utilisée, des bases de données particulières ciblées sur l'origine taxonomique de l'échantillon analysé…) peuvent être imposés au moteur de recherche de façon à faciliter le processus d'identification et diminuer le temps d'analyse (Reece *et al.*, 2012).

3.5.3. Interprétation des résultats

Une fois la recherche en base de données réalisée, il est nécessaire d'interpréter les résultats obtenus. Différents algorithmes vont permettre de déterminer un score d'identification entre les peptides expérimentaux et les peptides théoriques. Par exemple, pour le moteur de recherche Mascot, ce score est basé sur un calcul représentant la probabilité que la concordance observée entre un peptide expérimental et un peptide théorique soit due au hasard (score = -10 x Log (P), où P représente la probabilité). La meilleure concordance entre deux peptides (c'est-à-dire celle qui ne sera pas due au hasard) possède une faible probabilité et un score élevé. Ensuite, les données brutes sont stockées dans une plateforme bioinformatique telle que ProteinScape (Bruker). Celle-ci permet de centraliser les données acquises par le spectromètre de masse et de faire le lien avec les moteurs de recherche comme Mascot. Un autre logiciel tel que Scaffold (Proteome Software) peut également être utilisé afin d'exploiter les résultats. Ce logiciel reprend les données du moteur de recherche Mascot, applique ses propres algorithmes de validation et permet ainsi de détecter des peptides spécifiques à une espèce au sein d'un cluster (famille) de protéines. Toutefois, une validation supplémentaire des peptides marqueurs est indispensable en les contrôlant grâce à l'outil « Basic Local Alignement Search Tool » (BLAST) qui permet un alignement de ces peptides contre les séquences théoriques des protéines de la banque de données NCBInr. Ces différents logiciels mettent en évidence les peptides identifiés dans la séquence complète de la protéine. Plus la couverture de séquence est élevée, plus cette protéine est bien représentée dans les échantillons et est donc une protéine intéressante pour l'identification de peptides biomarqueurs.

3.5.4. Analyse en composantes principales (PCA)

Lors d'une analyse en spectrométrie de masse de mélanges complexes tels que les PATs, des milliers de données sont obtenues. Cette complexité entrave la visualisation globale des échantillons et rend ardue la comparaison des échantillons entre eux. L'analyse en composantes principales (PCA) permet de pallier ces difficultés. La PCA est une analyse statistique non supervisée permettant de décomplexifier des quantités importantes de données

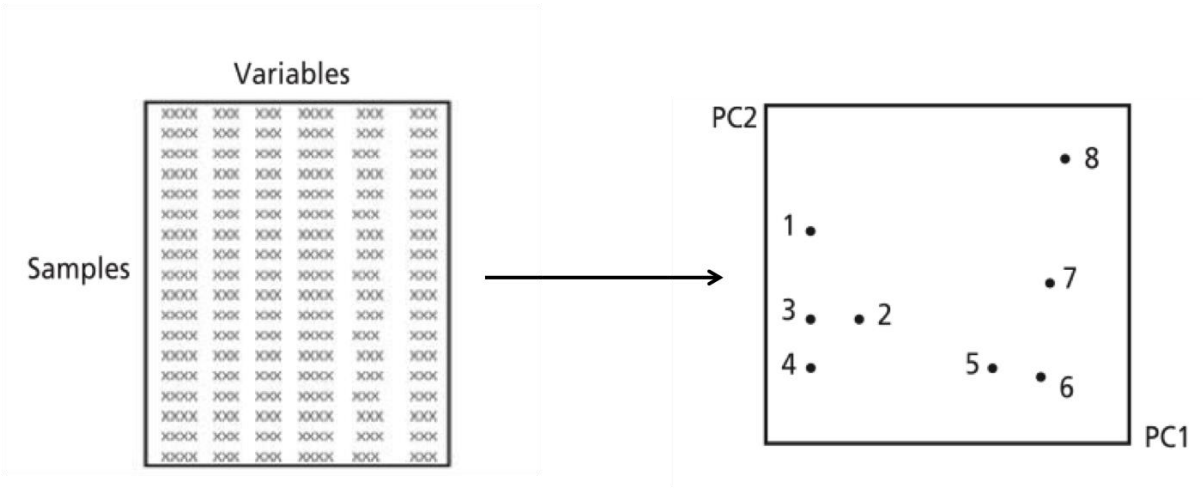
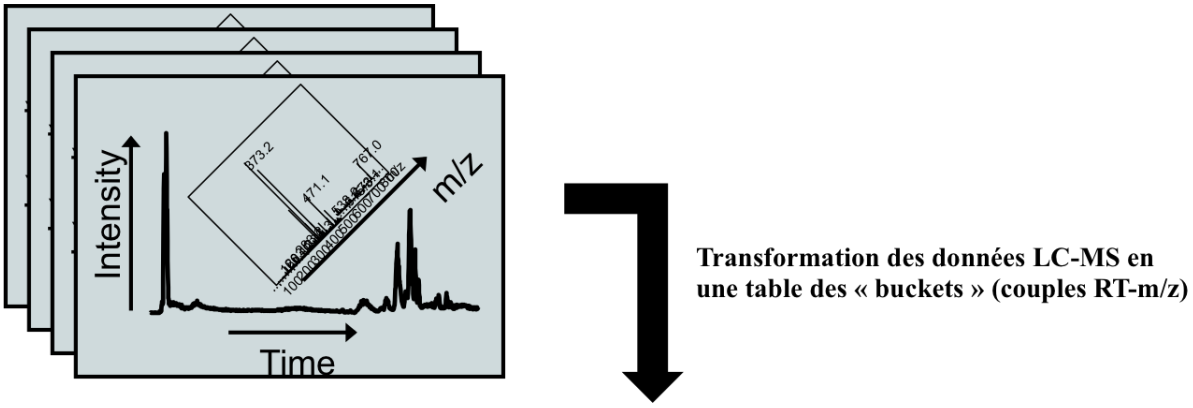


Figure 31. Principe de l'Analyse en Composantes Principales (PCA). La PCA est une analyse statistique non supervisée qui permet de décomplexifier des quantités importantes de données tout en conservant un maximum d'information. Ces données sont transformées en un graphe dont l'abscisse et l'ordonnée représentent, par exemple, les PC1 et PC2 c'est-à-dire la direction des deux plus grandes variances dans un échantillon (Massart and Vander Heyden, 2004).



	.....	Analysis 1	Analysis 2	Analysis 3	...
1min-495 m/z		500	50	5	
1min-496m/z		0	25	0	
....		500	50	5	

Figure 32. 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 - rapport m/z, ces couples étant également associés à une intensité (manuel de ProfileAnalysis, Bruker).

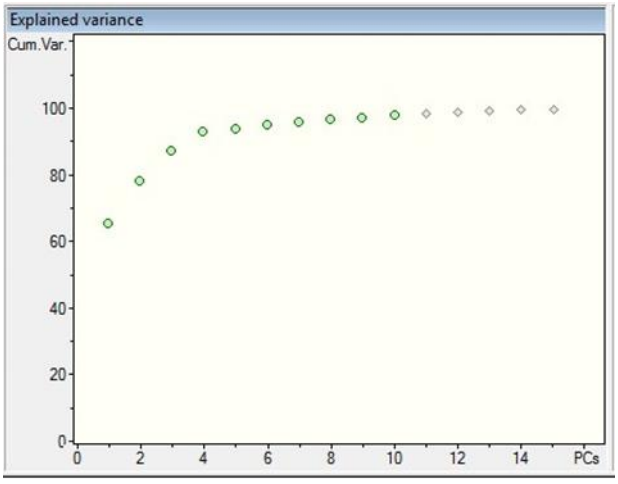


Figure 33. Graphe de la variance expliquée au niveau du logiciel "Profile Analysis". Celui-ci exprime la variance cumulative de chaque composante en fonction du nombre des composantes

dans un grand nombre d'analyses, tout en conservant un maximum d'informations (Massart and Vander Heyden, 2004; Ringner, 2008) (Figure 31). La PCA permet d'identifier et de visualiser les variables les plus influentes dans un groupe de données. Pour une analyse en spectrométrie de masse (LC-MS), les données sont représentées en trois dimensions : le temps de rétention (RT), le rapport m/z et l'intensité du pic. Le logiciel « Profile Analysis » (Bruker) va d'abord réduire ces 3 dimensions en un tableau à 2 dimensions qu'on appelle la table des « buckets » (Figure 32). Ce tableau représente l'association des « buckets » (couple rapport m/z et temps de rétention des peptides) à leur intensité. Une fois cette table créée, la PCA proprement dite est réalisée. Le résultat de cette analyse statistique se présente en deux graphes : le « Scoring plot » et le « Loading plot ». Ces graphes permettent une visualisation globale de l'ensemble des échantillons. Chaque point du « Scoring plot » représente une analyse LC-MS, c'est-à-dire un réplicat technique. La PCA permet donc, entre autres choses, d'estimer la répétabilité des analyses. Chaque point du « Loading plot » représente un « bucket » (couple RT-m/z). L'abscisse de ces graphes est la PC1, qui représente la direction de la plus grande variance entre les échantillons, tandis que l'ordonnée de ces graphes est la PC2, qui représente la direction de la seconde plus grande variance observée entre les échantillons. La PCA peut toutefois être réalisée selon d'autres composantes principales (PC1 avec PC 3, PC 2 avec PC 4, etc.). Ces différentes composantes expliquent un certain pourcentage de la variance entre les échantillons. Ce paramètre est important afin de juger la validité du modèle PCA. Au niveau du logiciel « Profile Analysis », un graphe exprime la variance cumulative de chaque composante en fonction du nombre des composantes (Figure 33). Le fait de travailler avec les 2 voire 3 premières composantes principales simplifie l'interprétation des données mais réduit également le bruit de fond, la variance expliquée par les composantes supérieures étant souvent due au bruit de fond. Ce type d'analyse permet donc d'avoir une vue générale des échantillons sans besoin de séquençage (Gastinel, 2012).

3.6. Protéomique et peptidomique quantitative

Dans ce travail, nous nous sommes uniquement intéressés à la présence ou à l'absence de matériel prohibé car pour l'instant la tolérance zéro est toujours d'application. Toute présence de constituants interdits est donc considérée comme une violation de la législation. Si un seuil de tolérance à l'égard d'une faible présence de FVOs dans l'alimentation devait être d'application à l'avenir, il faudrait alors pouvoir quantifier la présence des peptides marqueurs. Différentes méthodes de quantification avec ou sans marquage peuvent être utilisées en protéomique (pour une revue récente, voir (Dallas *et al.*, 2015)).

La quantification sans marquage (ou « label-free ») peut être réalisée par extraction des intensités des signaux peptidiques (« ion count ») (MS) ou par comptage des spectres de séquençage correspondant aux peptides identifiés pour une protéine (« spectral count ») (MS/MS). Dans la première approche, les signaux correspondant aux rapports m/z des peptides (« Extracted ion Chromatogram » ou EIC) sont extraits du chromatogramme général (« Total ion Chromatogram » ou TIC), et l'aire sous le pic ou l'intensité du signal sont

mesurées afin de comparer, après normalisation, les abondances des peptides au sein des différents échantillons. La seconde approche totalise le nombre de fois où un peptide est sélectionné pour la fragmentation et identifié dans une expérience. Les résultats sont exprimés par l'indice d'abondance des protéines (« exponentially modified Protein Abundance Index » ou emPAI) qui utilise la corrélation entre le nombre de peptides observés expérimentalement et le nombre de peptides observables par protéine, ou par le facteur d'abondance des spectres (« Normalised Spectral Abundance Factor » ou NSAF) qui prend en compte la longueur des protéines. Ce type de quantification sans marquage a de nombreux avantages : il ne nécessite aucune préparation supplémentaire de l'échantillon et permet l'utilisation de petites quantités d'échantillons. Son principal inconvénient est l'important temps machine nécessaire du fait du besoin de plusieurs réplicats. Cette approche a été utilisée par exemple pour découvrir de nouveaux peptides biomarqueurs pour la maladie de Crohn (Nanni *et al.*, 2009) et des dysfonctionnements rénaux (Ling *et al.*, 2010).

La quantification avec marquage peut être de type isobarique ou isotopique. Le marquage isobarique, tel que l'iTRAQ (Isobaric Tag for Relative & Absolute Quantification) par exemple, permet de multiplexer plusieurs échantillons en une seule analyse, ce qui améliore le rendement et permet une quantification plus précise du fait de la co-ionisation des peptides cibles. La quantification en spectrométrie de masse est souvent réalisée avec des échantillons marqués par des isotopes. L'avantage de ce marquage est que la fragmentation du peptide n'est pas nécessaire pour effectuer la quantification, ce qui permet de quantifier davantage de peptides. Plusieurs stratégies de marquage isotopique peuvent être utilisées pour quantifier les peptides endogènes, telle que la technique SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) où le marquage se fait généralement sur les acides aminés lysine et/ou arginine ou encore la technique ICAT (Isotope Coded Affinity Tag) qui est un marquage spécifique à la cystéine et donc dépendant de la présence de cet acide aminé.

Une fois les séquences peptidiques identifiées, la technique MRM permet également une quantification basée sur la détection de fragments spécifiques formés lors de la dissociation du peptide. Cette technique, utilisée généralement avec un spectromètre de masse de type triple quadrupôle (point 3.3.3.), est très sensible et spécifique. Bien que cette technique soit, à la base, une méthode de quantification sans marquage, elle est généralement combinée avec des isotopes stables afin d'obtenir des informations quantitatives absolues. Son principal inconvénient est que les séquences peptidiques doivent être identifiées *a priori* afin de déterminer les transitions à mesurer. Cette approche a été utilisée pour la quantification de peptides biomarqueurs de différentes maladies dans le sérum (Sano *et al.*, 2014) et l'urine (Chen *et al.*, 2012) mais également pour la quantification de peptides dans les aliments (Lahrichi *et al.*, 2013).

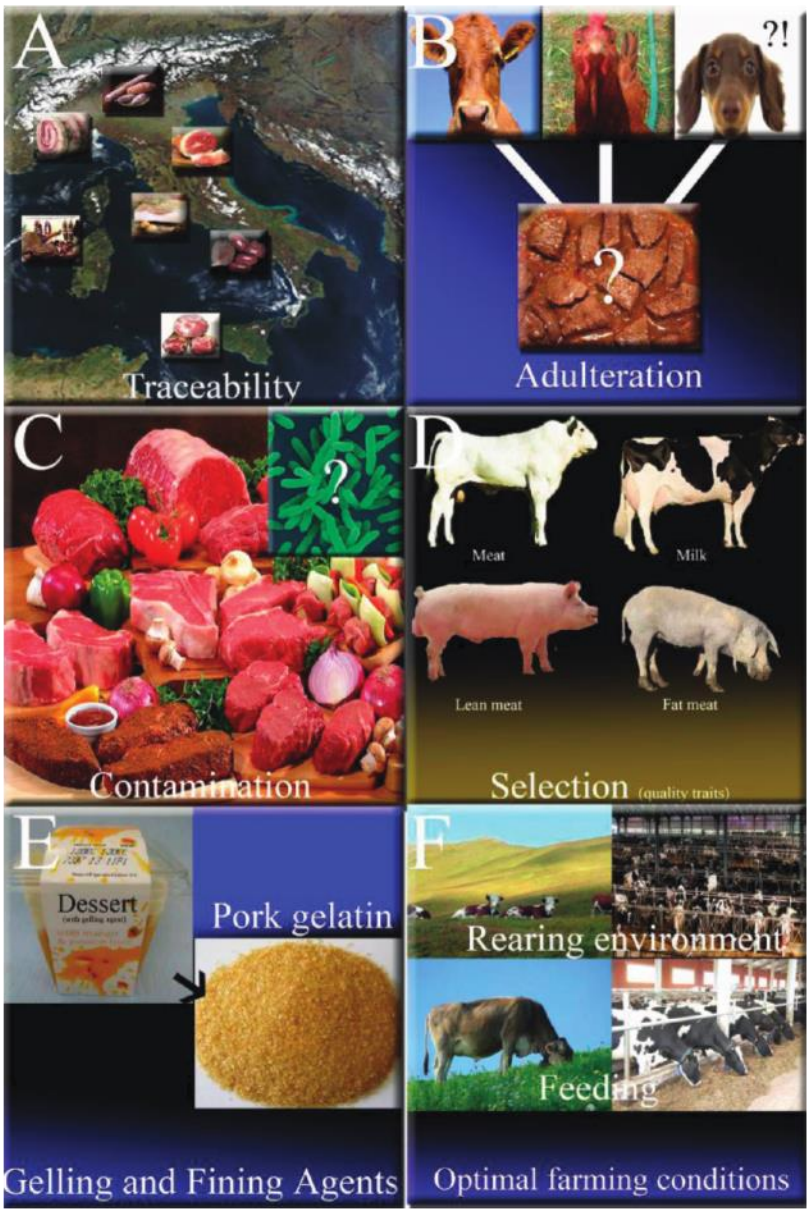


Figure 34. Différentes applications de la protéomique à la qualité et à la sécurité alimentaire. (A) Traçabilité des aliments pour valoriser les produits régionaux. (B) Détermination d'adultération des aliments en distinguant les différentes espèces de viande. (C) Détermination de contamination microbienne ou parasitaire des aliments. (D) Détermination des profils protéomiques pour améliorer les stratégies de sélection. (E) Détermination de l'origine des agents gélifiants grâce à des protéines/peptides biomarqueurs. (F) Compréhension de l'influence des conditions d'élevage sur la qualité de la viande ou du lait (D'Alessandro and Zolla, 2012).

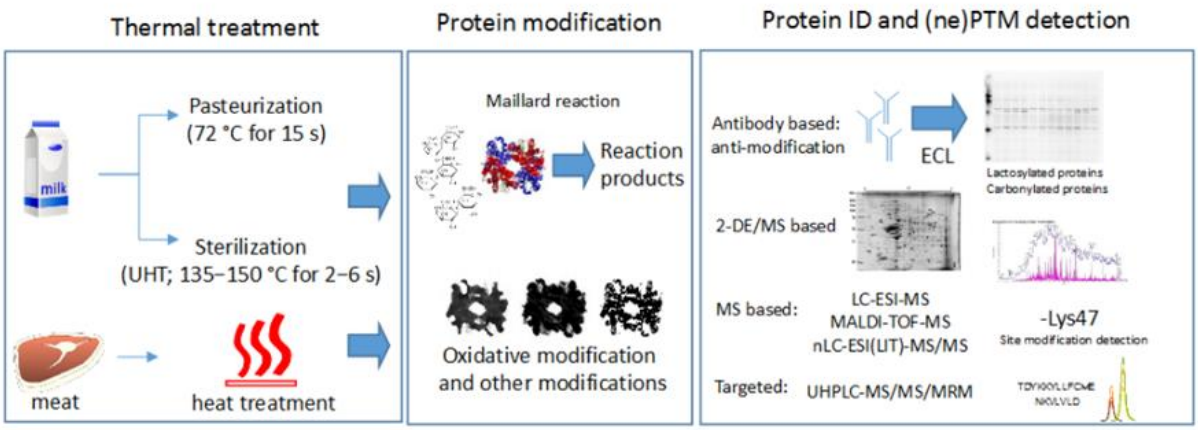


Figure 35. Application de la protéomique à l'analyse des modifications des protéines dans les aliments traités thermiquement. Lors du traitement thermique des aliments, les protéines sont soumises à des modifications. Les protéines sont tout d'abord extraites des aliments traités et ensuite séparées selon différentes techniques. Ces protéines peuvent être analysées par plusieurs approches : techniques immunologiques, protéomique bottom-up ou top-down. Enfin, les données expérimentales sont analysées avec l'aide d'un logiciel bioinformatique (Piras *et al.*, 2015).

4. Protéines Animales Transformées et protéomique

4.1. Introduction

La traçabilité alimentaire, aussi bien pour l'homme que pour les animaux consommés par l'homme, est très importante pour la protection des consommateurs, particulièrement quand un aliment est jugé dangereux pour la santé. Le règlement général de la législation alimentaire (Parliament and Council, 2002b) définit la traçabilité comme la capacité de tracer et de suivre la nourriture à travers les étapes de production, de transformation et de distribution. Ce concept oblige les entreprises à être capables d'identifier au moins le fournisseur immédiat et le destinataire suivant immédiat d'un produit. Il fournit aux consommateurs des renseignements exacts sur les produits et permet le retrait des aliments dangereux du marché. La traçabilité alimentaire permet donc de gérer les risques associés à un aliment en remontant à leur source et ainsi d'isoler rapidement le problème afin d'éviter que des produits qui ne seraient pas sûrs n'atteignent les consommateurs.

L'exigence d'identifier la composition, les modes de production ainsi que l'origine géographique des produits a suscité un grand intérêt pour le développement de méthodes analytiques afin d'évaluer la qualité et l'authenticité des produits alimentaires. La sensibilité, la spécificité et la vitesse des techniques basées sur la spectrométrie de masse en ont fait un bon candidat pour faire face à ces défis. Depuis quelques années, la protéomique couplée à la spectrométrie de masse est devenue une technologie majeure pour la caractérisation des protéines et des peptides alimentaires (Figure 34). L'application de techniques pour l'analyse qualitative et quantitative de mélanges complexes de protéines contenues dans les préparations alimentaires joue un rôle important dans la compréhension de leur nature, structure, propriétés fonctionnelles et donne des informations cruciales concernant l'impact de ces produits sur la santé humaine et animale. En effet, les protéines et les peptides sont les principaux constituants des denrées alimentaires et jouent donc un rôle décisif dans la détermination de leurs propriétés nutritionnelles et fonctionnelles. Les méthodes protéomiques permettent donc maintenant de traiter de la qualité des aliments (goût, saveur, consistance,…), mais aussi de la majorité des problèmes de sécurité et sûreté alimentaire (y inclus la détection de pathogènes et d'allergènes) ainsi que des questions sur la certification et la traçabilité des produits. Enfin, elles permettent également d'évaluer des modifications post-traductionnelles liées aux traitements de fabrication et en particulier aux traitements thermiques (Figure 35) (D'Alessandro and Zolla, 2012; Mamone *et al.*, 2009; Piras *et al.*, 2015).

Parmi les différents aspects techniques associés à la protéomique, 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

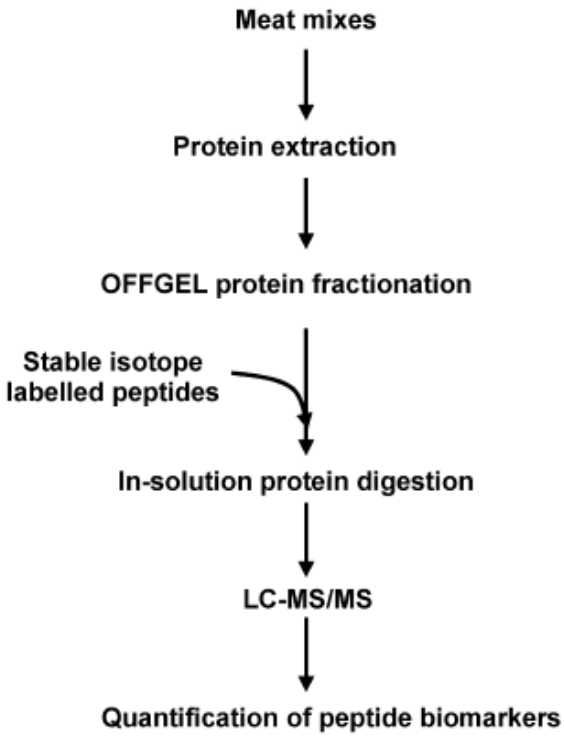


Figure 36. Schéma de la méthode développée par Sentandreu (2010) pour la détection quantitative de peptides biomarqueurs d'espèces dans des mélanges de viande (Sentandreu *et al.*, 2010).

que la protéomique appliquée à l'identification des espèces présentes dans les aliments et dans les PATs a été récemment développée.

4.1.1. Analyses protéomiques des viandes

Les récents scandales de l'industrie agro-alimentaire mettent en évidence la nécessité d'améliorer la traçabilité des aliments et plus particulièrement de la viande dans le but de déterminer son origine. Les analyses protéomiques peuvent en effet être utilisées à des fins d'identification et de traçabilité des produits alimentaires (D'Alessandro and Zolla, 2012; Piras *et al.*, 2015; Sentandreu and Sentandreu, 2011). Une méthode robuste, fiable et sensible a été développée en 2010 par Sentandreu afin de détecter la viande de poulet dans des mélanges de viande. Cette méthode comprend l'extraction de protéines myofibrillaires, un enrichissement des protéines cibles en utilisant une technique de fractionnement OFFGEL, une digestion en solution de la myosine (light chain 3) à l'aide de la trypsine et une analyse des peptides générés par LC-MS/MS (système LC-ESI couplé à un spectromètre de masse de type trappe ionique). En utilisant cette approche, une détection de 0,5 % de viande de poulet dans de la viande de porc est possible avec un haut degré de confiance. Une quantification de la viande de poulet a pu être réalisée à l'aide de la technique des peptides AQUA (Absolute QUAntification) qui sont des peptides marqués par un isotope stable, incorporés dans le protocole entre le fractionnement et la digestion (Figure 36), et dont la séquence est choisie à partir des séquences peptidiques spécifiques identifiées au préalable. Ces peptides, utilisés comme standards internes, sont plus lourds et peuvent donc être repérés par leur différence de masse par rapport au peptide natif. La quantité initiale du peptide AQUA étant connue, la comparaison de l'aire des pics correspondant au peptide natif et au peptide marqué permet de calculer la quantité de peptide natif dans l'échantillon. Une relation linéaire a été observée entre la quantité de peptides biomarqueurs et la quantité de poulet présent dans le mélange (Sentandreu *et al.*, 2010).

Des analyses protéomiques basées sur l'identification de particules de cheval et de porc dans des viandes de bœuf Halal ont également été réalisées, permettant ainsi à certaines communautés de respecter leurs préceptes (von Bargen *et al.*, 2014; von Bargen *et al.*, 2013). Douze peptides biomarqueurs spécifiques de la viande de porc et/ou de cheval ont été identifiés. Les peptides les plus abondants pour la viande de cheval, de bœuf et de porc, identifiés par une approche protéomique non ciblée, ont été utilisés ensuite avec un spectromètre de type triple quadrupôle en mode MRM pour développer une méthode ciblée. Ce type d'analyse est très sensible car cible uniquement quelques peptides. De plus, ce type d'appareil est largement répandu dans les laboratoires de routine. En mode MRM simple, le premier quadripôle (Q1) filtre un ion précurseur spécifique, la cellule de collision (Q2) génère des fragments (ions) qui sont filtrés dans le troisième quadrupôle (Q3) (Figure 26). En utilisant cette approche MRM, la limite de détection du cheval ou du porc dans du bœuf était de 0,55 %. Pour atteindre une sensibilité encore meilleure et améliorer le ratio signal-bruit de fond, l'équipe de von Bargen a utilisé le mode MRM^3 avec un spectromètre de type QTRAP.

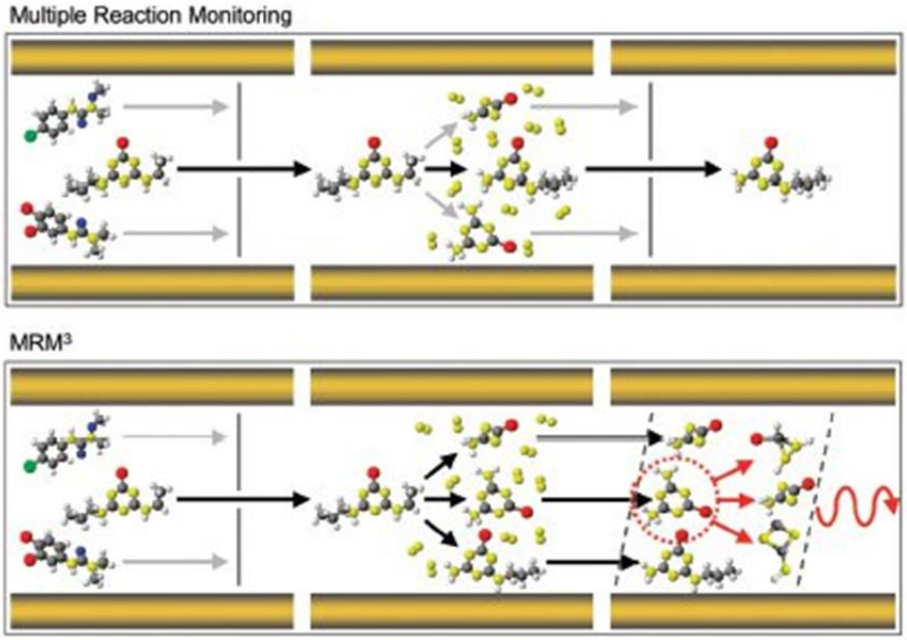


Figure 37. Comparaison des techniques MRM et MRM^3 (Webographie N°16). En mode MRM simple, le premier quadripôle (Q1) filtre un ion précurseur spécifique, la cellule de collision (Q2) génère des fragments qui sont filtrés dans le troisième quadrupôle (Q3). En mode MRM^3, le premier quadrupôle (Q1) filtre le premier ion précurseur, la cellule de collision (Q2) génère des ions filles par fragmentation et ceux-ci sont piégés et isolés dans le troisième quadrupôle (Q3) fonctionnant comme une trappe ionique linéaire (LIT, Linear Ion Trap). Le Q3 isole ensuite un second ion précurseur et engendre une deuxième génération d'ions qui sont analysés au niveau d'un détecteur.

En mode MRM^3, le premier quadrupôle (Q1) filtre le premier ion précurseur, la cellule de collision (Q2) génère des ions filles par fragmentation et ceux-ci sont piégés et isolés dans le troisième quadrupôle (Q3) fonctionnant comme une trappe ionique linéaire (LIT, Linear Ion Trap). Le Q3 isole ensuite un second ion précurseur et engendre une deuxième génération d'ions qui sont analysés au niveau d'un détecteur (Figure 37). En comparaison au mode MRM, le MRM^3 fournit une sélectivité plus élevée en raison d'une étape de fragmentation supplémentaire. Cette approche a permis à l'équipe de von Bargen de détecter du porc et du cheval à des concentrations relatives inférieures à 0,25 %. Ils ont réussi à atteindre une limite de détection de 0,13 % de porc dans du bœuf grâce au QTRAP 6500 équipé d'une micro-LC (von Bargen *et al.*, 2013).

En 2015, Flaudrops *et al.* ont développé deux méthodes MALDI-TOF-MS qui ne demandent pas de préparation compliquée d'échantillons. La première permet de déterminer l'origine de la viande (porc, bœuf, cheval, veau et poulet) à partir de viandes crues et transformées, la seconde permet d'identifier l'origine de la gélatine (porc ou bœuf) dans des préparations alimentaires. Ils ont ainsi pu détecter jusqu'à 1 % de gélatine dans des bonbons et jusqu'à 20 % de gélatine de porc dans de la gélatine de bœuf. L'équipe de Montowska *et al.* (2013, 2014a, 2014b) a présenté une nouvelle méthode utilisant la spectrométrie de masse ambiante (LESA-MS) pour l'authentification de produits carnés. Cette technique, fortement simplifiée par rapport aux autres méthodes protéomiques, nécessite une préparation minimale des échantillons sans étape de fractionnement. La préparation de l'échantillon est limitée uniquement à des processus de lavage et de digestion. Leur étude a démontré que des mélanges complexes de protéines et de peptides peuvent être étudiés efficacement en utilisant cette approche. Vingt-cinq marqueurs peptidiques spécifiques et stables au processus ont été détectés dans des échantillons transformés fabriqués à partir de viande de bœuf, de porc, de cheval, de poulet et de dinde. Plusieurs peptides dérivés de protéines myofibrillaires et sarcoplasmiques sont effectivement suffisamment résistants au traitement pour servir de marqueurs spécifiques des produits transformés.

Toutefois, toutes ces études portent sur la détection de certains peptides dans des viandes crues ou cuites mais pas sur du matériel fortement transformé comme les PATs. La sensibilité de toutes ces méthodes risque probablement d'être diminuée dans ces échantillons exposés à des traitements thermiques plus drastiques.

4.1.2. Analyses protéomiques des PATs dans les farines animales

Ces dernières années, de nombreux développements apportés dans le domaine de la spectrométrie de masse font de cette méthode un choix évident pour l'analyse des protéines présentes dans une farine animale. Les analyses protéomiques donnent un aperçu de toutes les protéines présentes dans un échantillon sans connaissance préalable de cet échantillon (Reece *et al.*, 2012). De plus, ces techniques ont le potentiel de fournir une identification non ambigüe des espèces par la caractérisation de séquences d'acides aminés spécifiques (avec une

masse unique) au sein des protéines. Cette technique a d'ailleurs fait ses preuves dans diverses études protéomiques destinées à l'identification de protéines animales (voir Point 4.1.1.). Les systèmes les plus souvent utilisés sont le Q-TOF et le MALDI-TOF, ayant tous deux un pouvoir de résolution suffisant (van Raamsdonk *et al.*, 2007). La spectrométrie de masse a la capacité de répondre aux exigences requises par la Commission Européenne sur l'utilisation des PATs. En effet, cette méthode d'analyse permet en principe de déterminer de manière précise l'origine taxonomique d'un peptide issu d'une protéine animale particulière, et cela même dans un échantillon complexe. Elle donne également des informations sur l'origine tissulaire de l'échantillon analysé. Cette technique permet donc de fournir des renseignements précis sur la composition d'un échantillon de PATs (d'un point de vue taxonomique et tissulaire), ce que les autres techniques d'analyses décrites au Point 2 ne pouvaient que partiellement réaliser.

L'identification de peptides marqueurs spécifiques d'espèces présentes dans les PATs représente une des nombreuses applications d'approches protéomiques basées sur la spectrométrie de masse. Cependant, l'étude des protéines présentes dans une farine animale doit faire face à un défi technique majeur. Le protéome d'un organisme est beaucoup plus complexe que son génome en raison de modifications post-traductionnelles *in vivo* (méthylation, hydroxylation, glycosylation, phosphorylation, acétylation,…) et des quantités variables de protéines individuelles. Il existe également des modifications post-mortem. Parmi celles-ci, signalons :

- la **protéolyse** conduisant à une augmentation des fragments peptidiques causée par des protéases. Elle diminue le poids moléculaire des protéines, augmente leur solubilité et diminue le nombre de peptides tryptiques identifiables ;
- l'**oxydation** de la méthionine (causée par l'exposition de la viande à l'air) et l'oxydation des lipides (causée par une longue exposition de la viande congelée à l'air) ;
- en outre, le traitement à haute température et haute pression que subissent les PATs induit également des **modifications post-traductionnelles non-enzymatiques**, comme la déamidation (décalage de masse de +1 pour la déamidation de l'asparagine et de la glutamine), la racémisation (changement de la stéréochimie des acides aminés mais pas de la masse moléculaire), la glycation (non disponibilité d'une lysine par la fixation d'un sucre réducteur ou d'un aldéhyde, et par conséquent une difficulté de clivage pour la trypsine) et la conversion de la glutamine en pyro-glutamate. Ces modifications affectent les masses des acides aminés et compliquent les analyses et le séquençage des peptides (Reece *et al.*, 2012).

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 de détection (Lin *et al.*, 2003).

Un MALDI-TOF a été utilisé par Ocaña *et al.* (2004) afin de détecter la présence de gélatine, choisie comme substance marqueur pour les PATs interdites. Les spectres totaux ESI-MS/MS peuvent être utilisés comme « fingerprints » pour identifier et confirmer de façon reproductible la présence de gélatine dans un échantillon. Cette méthode comporte une hydrolyse de la gélatine avec de l'acide chlorhydrique suivie d'une détection de 4 peptides dérivés (m/z de 828, 915, 957 et 1044) par MALDI-TOF MS et LC-ESI-MS/MS. Les peptides marqueurs peuvent être détectés à des concentrations de 100 ng/ml de gélatine. Le rapport de l'aire des pics du peptide m/z 1044 et du standard interne (m/z 556) est représentatif de la quantité totale de gélatine présente dans l'échantillon.

Une méthode a été développée en 2011 dans le but de distinguer les PATs d'origine porcine des PATs d'origine bovine et cela par la détection de l'ostéocalcine. En effet, cette petite protéine (6 kDa), considérée comme relativement thermostable, est peu conservée et sa séquence primaire est très variable d'une espèce de mammifère à l'autre. Balizs et al. (2011) ont utilisé un MALDI-TOF et un Q-TOF pour identifier l'ostéocalcine native dans les échantillons de FVOs de bovin. Toutefois, la sensibilité du spectromètre de masse de type MALDI-TOF n'était pas suffisante à cause du traitement thermique des échantillons (133 °C). L'analyse est donc basée sur la détection de fragments peptidiques tryptiques spécifiques de l'espèce. Cette méthode peut être appliquée comme méthode de confirmation des tests immunologiques (Balizs *et al.*, 2011).

Une série de méthodes telles que l'extraction en phase solide (SPE), l'électrophorèse sur gel, la capture par immuno-affinité et des analyses LC-MS/MS ont été présentées par Reece *et al.* (2012), l'objectif de cette étude étant l'identification des espèces des protéines animales présentes dans les FVOs et dans les aliments pour animaux, à la fois en présence et en absence de fragments d'os. Des échantillons d'os ont subi une déminéralisation à l'HCl, une gélatinisation, une digestion tryptique et des analyses en spectrométrie de masse à l'aide d'un MALDI-TOF et d'un ESI-TOF. Plusieurs peptides permettant de différencier le collagène alpha-1(I) de bovin, de porc et de poulet ont été identifiés. Cette équipe a également montré la possibilité d'utiliser l'ostéocalcine pour confirmer que les os détectés dans les aliments pour animaux appartiennent soit à des poissons ou à des mammifères marins. Un peptide de la troponine I bovine a été détecté après extraction de cette protéine à partir d'échantillons de FVOs, séparation des protéines par SDS-PAGE, digestion tryptique de la bande de gel correspondant à la troponine et analyses de spectrométrie de masse en tandem avec un spectromètre de masse de type trappe ionique. Cinq peptides de myosine de volaille ont également été mis en évidence après l'extraction de la protéine d'intérêt provenant d'échantillons d'aliments, un enrichissement des fragments de myosine par immuno-affinité, une dénaturation des complexes anticorps-myosine et une purification des fragments de

Tableau 7. Différents types de collagène, leur composition, leur distribution et les pathologies associées (Jain *et al.*, 2014).

Type	Class	Composition	Distribution	Pathology
I	Fibrillar	$\alpha1[I]_2\alpha2[I]$	Abundant and widespread: Dermis, bone, tendon, ligament	Osteogenesis imperfecta, Ehler-Danlos syndrome, Osteoporosis
II	Fibrillar	$\alpha1[II]_3$	Cartilage, Vitreous	Osteoarthrosis, Chondrodysplasia
III	Fibrillar	$\alpha1[III]_3$	Skin, Blood Vessels, Intestine	Ehler-Danlos syndrome, Arterial aneurysms
IV	Network	$\alpha1[IV]_2\alpha2[IV]$ $\alpha3[IV]\alpha4[IV]\alpha5[IV]$ $\alpha5[IV]_2\alpha6[IV]$	Basement membranes	Alport syndrome
V	Fibrillar	$\alpha1[V]_3$ $\alpha1[V]_2\alpha2[V]$ $\alpha1[V]\alpha2[V]\alpha3[V]$	Widespread: Bone, dermis, cornea, placenta	Ehler-Danlos syndrome
VI	Network	$\alpha1[VI]\alpha2[VI]$ $\alpha3[VI]^d$ $\alpha1[VI]\alpha2[VI]\alpha4[VI]$	Widespread: Bone, dermis, cornea, cartilage	Bethlem myopathy
VII	Anchoring fibrils	$\alpha1[VII]_2\alpha2[VII]$	Dermis, Bladder	Epidermolysis bullosa acquisita
VIII	Network	$\alpha1[VIII]_3$ $\alpha2[VIII]_3$ $\alpha1[VIII]_2\alpha2[VIII]$	Widespread: Dermis, brain, heart, kidney	Fuchs endothelia corneal dystrophy
IX	FACIT	$\alpha1[IX]\alpha2[IX]\alpha3[IX]$	Cartilage, Cornea, Vitreous	Osteoarthrosis, Multiple epiphyseal dysplasia
X	Network	$\alpha1[X]_3$	Cartilage	Chondrodysplasia
XI	Fibrillar	$\alpha1[XI]\alpha2[XI]\alpha3[XI]$	Cartilage, Intervertebral disc	Chondrodysplasia, Osteoarthrosis
XII	FACIT	$\alpha1[XII]_3$	Dermis, Tendon	-
XIII	MACIT	-	Endothelial cells, Dermis, Eye, Heart	-
XIV	FACIT	$\alpha1[XIV]_3$	Widespread: Bone, dermis, cartilage	-
XV	MULTIPLEXIN	-	Capillaries, Testis, Kidney, Heart	-
XVI	FACIT	-	Dermis, Kidney	-
XVII	MACIT	$\alpha1[XVII]_3$	Hemidesmosomes in epithelia	Generalised atrophic epidermolysis bullosa
XVIII	MULTIPLEXIN	-	Basement membrane, Liver	Knobloch syndrome
XIX	FACIT	-	Basement membrane	-
XX	FACIT	-	Cornea (chick)	-
XXI	FACIT	-	Stomach, Kidney	-
XXII	FACIT	-	Tissue junctions	-
XXIII	MACIT	-	Heart, Retina	-
XXIV	Fibrillar	-	Bone, Cornea	-
XXV	MACIT	-	Brain, Heart, Testis	Amyloid formation
XXVI	FACIT	-	Testis, ovary	-
XXVII	Fibrillar	-	Cartilage	-
XXVIII	-	-	Dermis, Sciatic nerve	Neurodegenerative disease

FACIT=Fibril-associated collagens with interrupted triple helices, MACIT=Membrane-associated collagens with interrupted triple helices

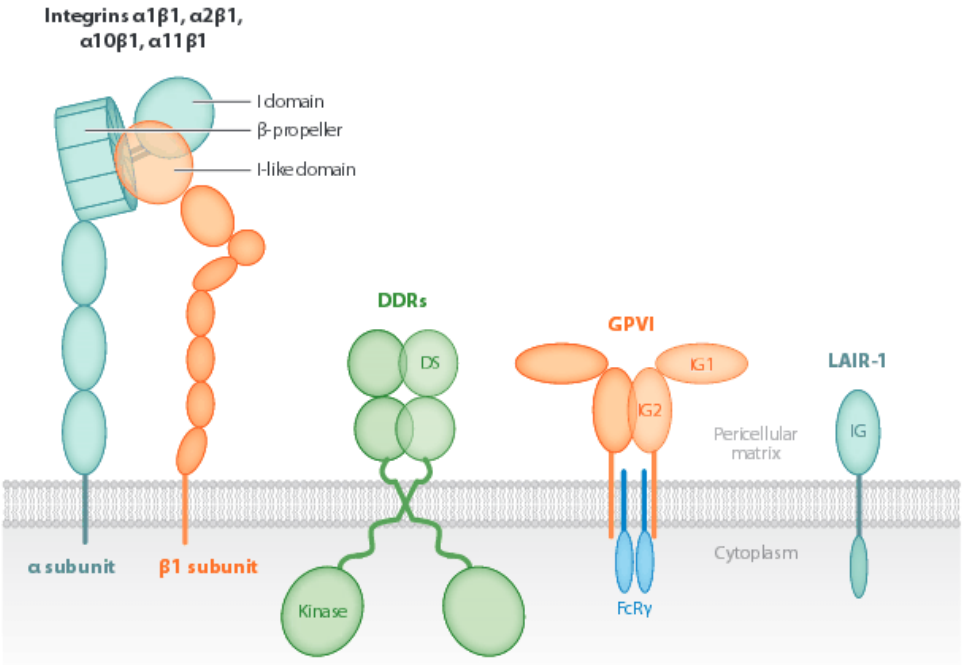


Figure 38. Schéma des différents récepteurs du collagène : intégrines, « discoidin domain receptors » (DDRs), glycoprotéines VI (GPVI), « leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 » (LAIR-1) (Leitinger, 2011).

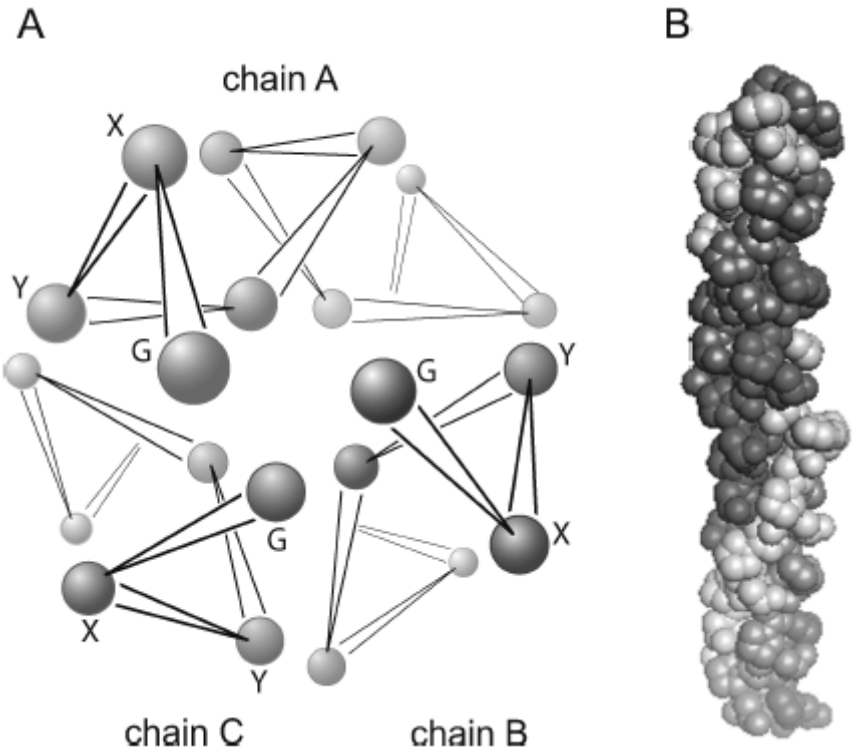


Figure 39. Structure en triple hélice du collagène. A : vue le long de l'axe moléculaire (carbones α seulement) montrant la disposition des chaines polypeptidiques et les emplacements des résidus Gly-Xaa-Yaa. B : vue de profil montrant la torsion hélicoïdale vers la droite (Hulmes, 2008).

myosine par électrophorèse à 2 dimensions. Cette dernière était suivie d'une digestion tryptique et de l'analyse des peptides par nano UPLC-ESI MS/MS.

Maintenant que nous avons vu les différentes applications de la protéomique à l'analyse des viandes et des PATs, une déduction des principales protéines susceptibles d'être présentes dans les FVOs est plus aisée. Les farines animales sont essentiellement composées de tissu conjonctif de soutien, d'os, de restes de muscle et de sang. Il est donc fort probable que les PATs contiennent des proportions non négligeables de collagènes, de protéines d'os spécifiques telles que l'ostéocalcine, de protéines de muscle telle que la troponine ou la myosine et de protéines de sang telle que l'hémoglobine.

4.2. Revue de quelques protéines pertinentes dans le contexte des Protéines Animales Transformées et farines animales

4.2.1. Les collagènes et la gélatine

Les collagènes sont les protéines structurelles les plus abondamment retrouvées dans le royaume animal avec plus de 28 types différents (Tableau 7) (Jain *et al.*, 2014). Les collagènes jouent un rôle structurel majeur dans la matrice extracellulaire et dans les tissus de soutien classiques et spécialisés tels que les cartilages et les tissus osseux. Ils contribuent, selon l'orientation des fibres de collagènes, à l'organisation des tissus et de ce fait aux propriétés mécaniques. Ils interagissent avec les cellules par l'intermédiaire de plusieurs familles de récepteurs (Figure 38) (Leitinger, 2011) et régulent leur prolifération, leur adhérence ou leur migration et leur différenciation (Ricard-Blum, 2011). La famille de collagènes la plus abondante avec environ 90 % du collagène total est représentée par les collagènes formant des fibrilles (type I, II, III, V et XI). Ceux-ci sont en effet impliqués dans la formation de réseaux fibrillaires et microfibrillaires dans les matrices extracellulaires des tissus de soutien, mais aussi d'autres tissus, et ils participent également aux membranes basales soutenant les feuillets épithéliaux. Ils sont donc l'élément structurel majeur de tous les tissus conjonctifs et sont également présents dans le tissu interstitiel de pratiquement tous les organes parenchymateux où ils contribuent à la stabilité des tissus et des organes et maintiennent leur intégrité structurelle (Gelse *et al.*, 2003).

La probabilité que les PATs contiennent une quantité importante de ces protéines est donc élevée, puisque certaines de ces farines sont majoritairement constituées de particules d'os et de tissus conjonctifs. Les collagènes les plus représentés dans les PATs sont ceux des types I à III. Les os sont riches en collagène de type I (le type le plus résistant et le plus abondant) tandis que les cartilages sont composés principalement de collagène de types II et les tissus conjonctifs classiques des types I et III (Eyre and Muir, 1975). Ces trois types possèdent la même structure de trois chaînes polypeptidiques enroulées en une triple hélice. Pour les collagènes I et II, il y a 2 chaînes α1 (I ou II) identiques et une chaîne α2 (I ou II) codées par des gènes différents. Le collagène de type III comporte 3 chaînes α1 (III) identiques (Figure

39) (Hulmes, 2008). Les collagènes fibrillaires se caractérisent par une très bonne stabilité à la chaleur et résistent bien au clivage des liaisons peptidiques lorsqu'on les chauffe (Vuorio and de Crombrugghe, 1990). Chaque chaîne α est composée de 337-343 (dépendant du type de collagène) triplets d'acides aminés qui sont des répétitions de Gly-Xaa-Yaa, où les résidus glycine sont placés à l'intérieur de la triple hélice et Xaa et Yaa peuvent être n'importe quel acide aminé mais souvent la proline (Hulmes, 1992). Approximativement 50 % des résidus proline portent un groupe hydroxyle et l'ampleur de l'hydroxylation des prolines est dépendante de l'espèce. Cette hydroxylation constitue en effet la modification la plus importante au sein d'une chaîne α de collagène (Vitagliano *et al.*, 2001). Colgrave *et al.* (2008) ont d'ailleurs exploité cette modification pour estimer la proportion de collagène dans des échantillons de muscle. La couverture de séquence des collagènes dans les échantillons de PATs est généralement meilleure pour la chaîne α1 (I) que pour la chaîne α2 (I). Les séquences de collagènes de bovin et de volaille sont bien représentées dans les bases de données publiques mais les collagènes porcins sont protégées par un brevet (Bell *et al.*, 2001). Les collagènes des espèces contaminantes comme le rat, la souris, le lapin, le pigeon… ne sont pas encore caractérisés de manière complète dans les bases de données publiques (Reece *et al.*, 2012). Des peptides biomarqueurs dérivés de collagène (chaîne α2 (I)) ont été identifiés par Buckley *et al.* en utilisant un spectromètre de masse de type MALDI-TOF de façon à identifier les espèces de divers fragments d'os (Buckley *et al.*, 2008; Buckley *et al.*, 2009; Buckley *et al.*, 2010). Ces biomarqueurs sont utilisés non seulement pour l'identification des PATs mais également dans le contexte de recherches archéologiques à partir de fragments d'os anciens car ce sont des protéines très résistantes.

La gélatine est un mélange de polypeptides de haut poids moléculaire résultant de l'extraction et de l'hydrolyse partielle du collagène provenant en autres des os, de la peau, des tendons et des tissus conjonctifs d'animaux de catégorie 3 (Eyre and Muir, 1975; Mariod and Adam, 2013; Reaney and Bremer, 2012) (Figure 8). La gélatine est composée de plusieurs polypeptides plus digestibles et solubles dans l'eau que les collagènes natifs, contenant tous les acides aminés essentiels sauf le tryptophane. Sa composition en acides aminés varie en fonction de l'espèce. Ce produit est très largement utilisé dans les industries cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires pour ses propriétés épaississantes et gélifiantes. La gélatine de porc est relativement bon marché, facilement disponible et présente dans de nombreuses préparations alimentaires telles que les bonbons et les desserts. En plus des gélatines d'animaux terrestres, il existe également des gélatines de poissons et d'insectes (Mariod and Adam, 2013). Le procédé de fabrication de la gélatine semble éliminer et/ou inactiver l'agent responsable de l'ESB (Grobben *et al.*, 2004). Des peptides marqueurs sont disponibles pour différencier la gélatine bovine de la gélatine porcine (Zhang *et al.*, 2009). Cette protéine a également été suggérée comme marqueur pour détecter les aliments pour animaux contaminés par des PATs (Fernandez Ocana *et al.*, 2005; Ocaña *et al.*, 2004).

```
Bos taurus (Cattle)     YLDHW LGAPA PYPDP LEPKR EVCEL NPDCD ELADH 35
Sus scrofa (Pig)        ....G ..... ..... ...R. ..... ..... ..... 35
Gallus gallus (Chicken) HYAQD S.VAG AP.N. ..AQ. ..... S.... ....Q 35

Bos taurus (Cattle)     IGFQE AYRRF YGPV 49
Sus scrofa (Pig)        ..... ..... ..IA 49
Gallus gallus (Chicken) ..... ..... .... 49
```

Figure 40. Alignement des séquences de l'ostéocalcine de différentes espèces (bovin, porc, poulet). Les points indiquent les acides aminés identiques (Balizs *et al.*, 2011).

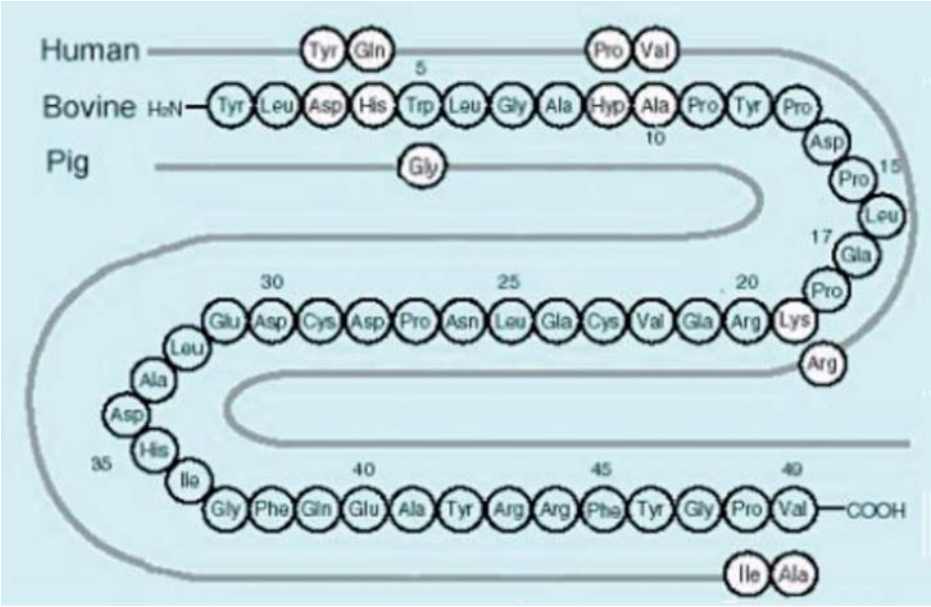


Figure 41. Comparaison de la séquence en acides aminés de l'ostéocalcine pour trois espèces différentes (humain, bovin, porc) (Reece and Jørgensen, 2012).

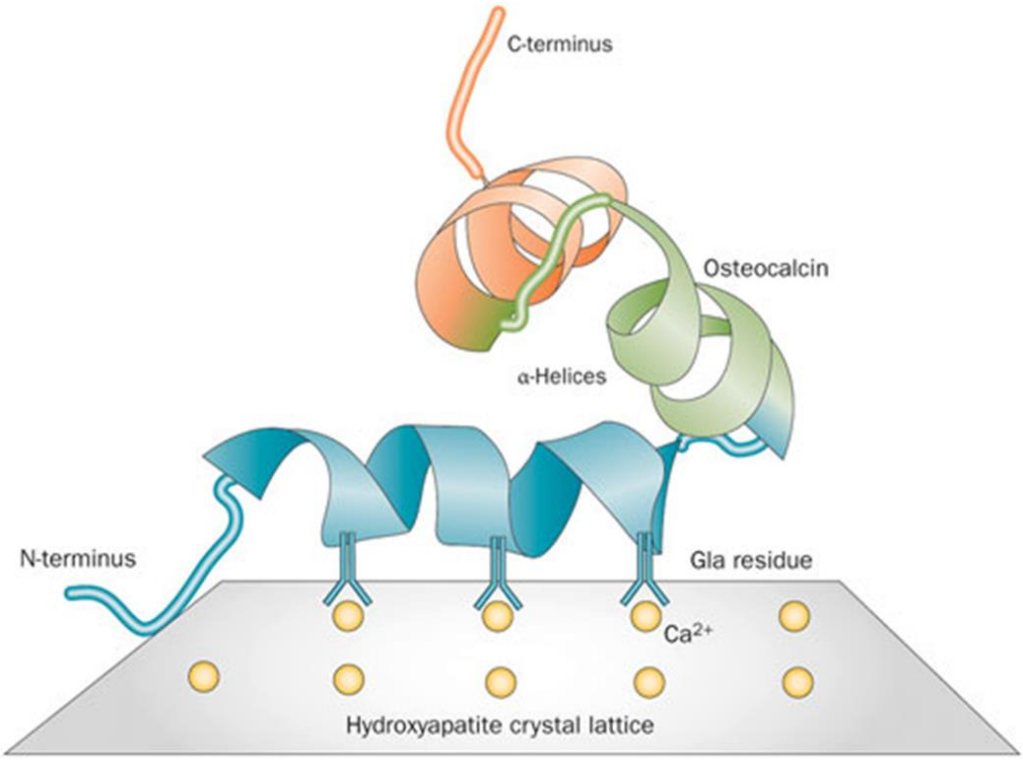


Figure 42. Structure de l'ostéocalcine. Trois résidus d'acides gamma-carboxyglutamique (Gla) forment une hélice qui fixe étroitement des ions Ca^{2+} présents au niveau des cristaux d'hydroxyapatite dans la matrice extracellulaire des os (Booth et *al.*, 2013).

Les collagènes sont donc très abondants, résistants et fournissent une information sur l'origine tissulaire. Toutefois, le fait que le collagène soit une protéine très grande (environ 1000 acides aminés) et fortement modifiée pourrait toutefois causer des difficultés dans l'analyse de données pour une méthode de dépistage en routine. C'est pour ces raisons que l'on s'intéresse également à des protéines plus petites et moins conservées, plus appropriées pour une analyse de routine (Balizs *et al.*, 2011).

4.2.2. L'ostéocalcine

Nous avons vu, dans le Point 2.3., l'importance que pouvait avoir l'ostéocalcine dans les tests immunologiques. Kreuz *et al.* ont démontré que c'était une protéine spécifique prometteuse pour la détection des PATs dans les aliments composés. De plus, Balizs *et al.* ont également utilisé cette protéine afin de distinguer l'origine des PATs (bovin ou porc) par spectrométrie de masse (Point 4.1.2.) dans les farines animales.

L'ostéocalcine est un constituant universel et abondant des os calcifiés, dont la synthèse est dépendante de la vitamine K. Elle est produite par les ostéoblastes et est présente en grande concentration dans les os (10 à 20 % des protéines autres que les collagènes). Sa concentration dans le sérum est étroitement liée au métabolisme osseux et sert de marqueur biologique pour l'évaluation clinique des maladies osseuses (Calvo *et al.*, 1996). Sa séquence est constituée de seulement 49 acides aminés pour l'humain, le singe et la vache et de 50 acides aminés pour le poulet. Sa taille est d'environ 5900 Da. La structure primaire de l'ostéocalcine a été déterminée pour au moins vingt espèces différentes de vertébrés (Figures 40 et 41). Sa région centrale est fortement conservée chez les animaux tandis que la séquence N-terminale varie entre les différentes espèces (Huq *et al.*, 1984). Toutefois, l'ostéocalcine de poisson diffère de l'ostéocalcine d'animaux terrestres par sa région centrale (Nishimoto *et al.*, 2003). Cette protéine a la particularité de comporter 3 résidus d'acides gamma-carboxyglutamique (Gla) formant une hélice compacte, qui fixe étroitement des ions Ca^{2+} présents au niveau des cristaux d'hydroxyapatite dans la matrice extracellulaire des os (Figure 42) (Booth *et al.*, 2013). Sa conformation change de façon importante lorsque le Ca^{2+} est lié : la teneur en hélices α augmente tandis que le contenu en feuillets β diminue (Hauschka and Carr, 1982). En plus de se lier à l'hydroxyapatite, l'ostéocalcine a des fonctions dans la signalisation cellulaire et le recrutement des ostéoclastes (Chenu *et al.*, 1994) et des ostéoblastes (Bodine and Komm, 1999) qui ont, respectivement, un rôle dans la résorption osseuse et le dépôt osseux. L'ostéocalcine existe également sous une forme circulante sous-carboxylée, régulant entre autres le métabolisme du glucose.

En raison de sa petite taille, de sa structure compacte et de sa position dans les lacunes des os, l'ostéocalcine est bien protégée contre la dégradation post-mortem (Balizs *et al.*, 2011). Effectivement, cette biomolécule a été retrouvée dans un os d'homme de Neandertal datant de 55 000 ans (Nielsen-Marsh *et al.*, 2005), dans des ossements fossilisés de bovin allant de 12 000 ans à 13 millions d'années ainsi que dans des dents de rongeurs de 30 millions d'années

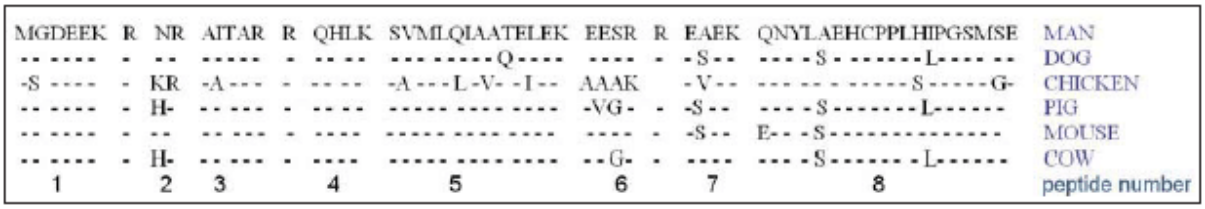


Figure 43. Alignement de la séquence N-terminale de la troponine I de différentes espèces. Les points indiquent les acides aminés identiques. Les séparations dans la séquence identifient les endroits où la trypsine coupe théoriquement les protéines (aux lysines (K) et arginines (R)). Les troponines I de porc et de bovin peuvent être différenciées par les peptides 6 et 7 (Reece and Jørgensen, 2012).

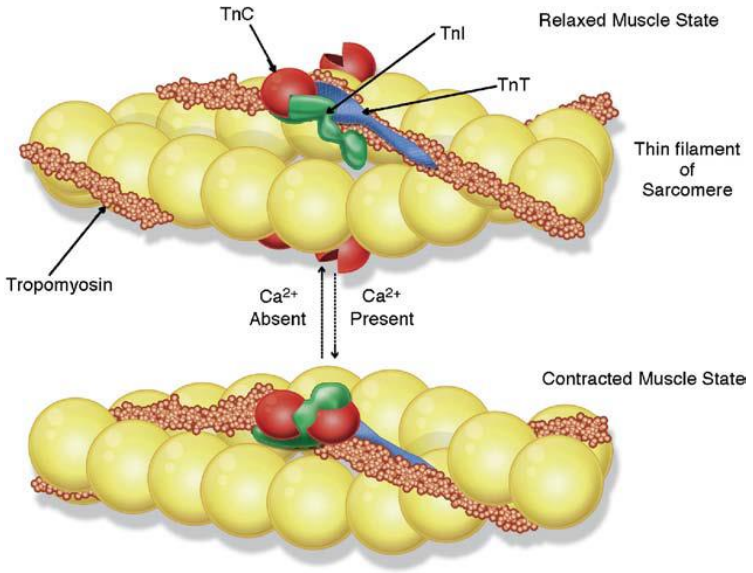


Figure 44. Structure du complexe troponine constitué de la troponine C, I et T et interaction avec les protéines contractiles (Shave *et al.*, 2010). La troponine C est une protéine acide liant le calcium. La troponine I est une protéine basique inhibant l'interaction actine-myosine. La troponine T est une protéine basique se liant à la tropomyosine.

(Ulrich *et al.*, 1987). Dans une étude évaluant la capacité de liaison des anticorps ciblant l'ostéocalcine, il a été montré que même la cuisson d'os humains ou bovins à 120 °C pendant une nuit n'affectait pas ses propriétés antigéniques. Par ailleurs, des expériences sur la résistance des os de bovin à la cuisson (100 °C pendant 195 h) ont détecté par MALDI-MS de l'ostéocalcine encore intacte après ce traitement (McNulty *et al.*, 2002). Buckley et *al.* (2012) soulignaient cependant qu'elle était sensible aux traitements thermiques de production des farines animales. En effet, ils ne sont pas parvenus à détecter cette protéine par spectrométrie de masse dans des échantillons de FVOs de bovin, mouton, porc et poulet traités à différentes températures (133, 137, 141 et 145°C).

4.2.3. La troponine I

En plus des fragments d'os, on retrouve aussi des résidus de fibres musculaires comme principaux composants des PATs (van Raamsdonk *et al.*, 2007). Deux familles de protéines musculaires ont suscité beaucoup d'attention pour l'analyse des PATs : les troponines et les myosines. Comme nous l'avons vu dans le Point 2.3 la troponine I a déjà été exploitée pour de nombreux tests immunologiques, dont certains sont disponibles dans le commerce pour la détection des PATs de ruminants (Chen *et al.*, 2002; Zvereva *et al.*, 2015). Ces derniers sont basés sur la détection de régions de la troponine I spécifiques aux ruminants. La Figure 43 représente les séquences N-terminales de la troponine I de différentes espèces. Malheureusement, les séquences ovine et caprine ne sont pas encore complètement connues.

Le complexe troponine est composé de trois protéines régulatrices (Figure 44) : la troponine C, une protéine acide liant le calcium; la troponine I, une protéine basique qui inhibe l'interaction actine-myosine; et la troponine T, une protéine basique qui se lie à la tropomyosine (Greaser and Gergely, 1973; Shave *et al.*, 2010). Ce complexe est localisé sur les microfilaments d'actine à des intervalles de 38,5 nm et, avec la tropomyosine, forme le système protéique qui régule l'hydrolyse du $MgATP^{2-}$ par la myosine en réponse aux changements de concentration en Ca^{2+} au sein du sarcoplasme (Syska *et al.*, 1976). La troponine I, en conjonction avec la troponine C et T, est une protéine qui contrôle le processus de contraction des fibres musculaires en séquestrant des ions calcium. Trois isoformes de la troponine I ont été identifiées dans le muscle squelettique et le muscle cardiaque (Wilkinson and Grand, 1978). Ces isoformes conservent une homologie significative dans leurs moitiés C-terminales tandis que les régions N-terminales sont très divergentes. Une caractéristique distinctive de la troponine I cardiaque est la présence d'une longue extension N-terminale contenant un site cible spécifique pour la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique, laquelle a été impliquée dans la réponse du muscle cardiaque à la stimulation β-adrénergique (Ausoni *et al.*, 1994). La troponine I inhibe l'activité ATPase de l'actomyosine stimulée par les ions Mg^{2+}. Cette propriété est accrue par l'interaction avec la tropomyosine et est indépendante de la concentration en Ca^{2+} (Perry *et al.*, 1973). Cependant, en présence de la troponine C, l'activité inhibitrice de la troponine I est neutralisée. Cette protéine reste en

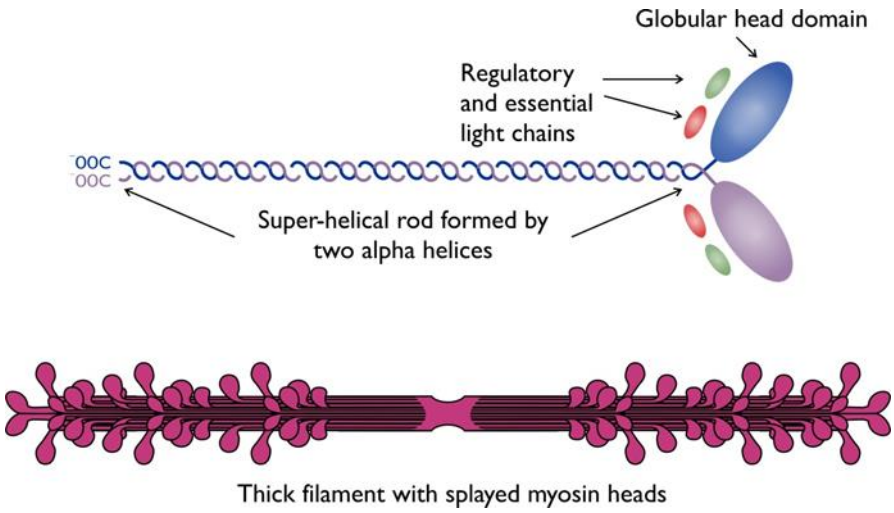


Figure 45. Schéma de la structure de la myosine (Webographie N°17). La myosine est une protéine multimérique asymétrique avec une longue queue et deux têtes globulaires. Elle contient deux chaînes lourdes, qui constituent les domaines de tête et de queue, et 4 chaînes légères liées aux chaînes lourdes.

solution même après un traitement à haute température, ce qui explique le fait qu'on puisse la retrouver dans les PATs.

4.2.4. Les myosines

Chez les mammifères, les myosines sont encodées par 29 gènes et appartiennent à 9 classes différentes, dont les myosines de classe II ou myosines conventionnelles sur lesquelles nous nous focaliserons, car ce sont celles particulièrement abondantes dans les muscles (squelettique, cardiaque et lisse). Les myosines sont donc des protéines abondantes dans la viande. Vu que les échantillons de PATs contiennent des restes de muscle, on peut supposer que des myosines puissent être identifiées en spectrométrie de masse à partir des extraits de PATs. Le muscle squelettique contient en effet 70 à 100 mg de myosine par gramme de muscle frais, ce qui correspond à 40 - 50 % des protéines musculaires totales. Nous décrirons ici les myosines conventionnelles de muscle squelettique, les mieux connues. Par souci de clarté, nous parlerons de myosine au singulier, tout en rappelant qu'il existe plusieurs isoformes différentes, encodées par des gènes différents.

La myosine est une globuline, soluble à une concentration élevée en sel et insoluble à une concentration faible en sel. La myosine est une protéine multimérique asymétrique avec une longue queue et deux têtes globulaires (Figure 45). Son poids moléculaire est d'environ 500 000 Da. Elle contient deux chaînes lourdes, chacune d'environ 2000 acides aminés de longueur, qui constituent les domaines de tête et de queue. Elle contient également 4 chaînes légères (de 16 à 23 kDa) qui se lient aux chaînes lourdes. Au niveau des régions C-terminales, les deux chaînes lourdes sont enroulées l'une autour de l'autre pour former une structure en double hélice α. A l'autre extrémité (région N-terminale), les deux chaînes sont pliées en structures globulaires distinctes pour former deux têtes, chacune de celles-ci interagissant avec les deux chaînes légères. La myosine conventionnelle est donc une protéine hexamérique. Chaque tête possède un site de liaison à l'actine et présente une activité ATPasique activée par l'actine. La queue a la capacité d'interagir avec les queues d'autres molécules de myosine pour former un filament bipolaire. Il existe différentes isoformes de chaînes lourdes dans le muscle strié squelettique, certains associées à une vitesse de contraction rapide, d'autres à une vitesse de contraction lente. Une des propriétés importantes de la myosine est sa capacité à se lier de façon très spécifique avec l'actine. Le complexe formé est alors appelé actomyosine. Une autre fonction de la myosine est d'hydrolyser l'ATP (Warrick and Spudich, 1987).

Cette protéine présente une variabilité de séquence importante dans le domaine C terminal (queue de la molécule) et semble donc un bon choix pour la discrimination d'espèces. Cependant, ce n'est pas une protéine particulièrement robuste car elle se dénature en dessous de 100 °C et se fragmente à des températures élevées. Malgré cela, des peptides de myosine sont souvent identifiés par spectrométrie de masse à partir des extraits de PATs (Reece *et al.*, 2012). En effet, Montowska *et al.* ont identifié une vingtaine de peptides marqueurs de

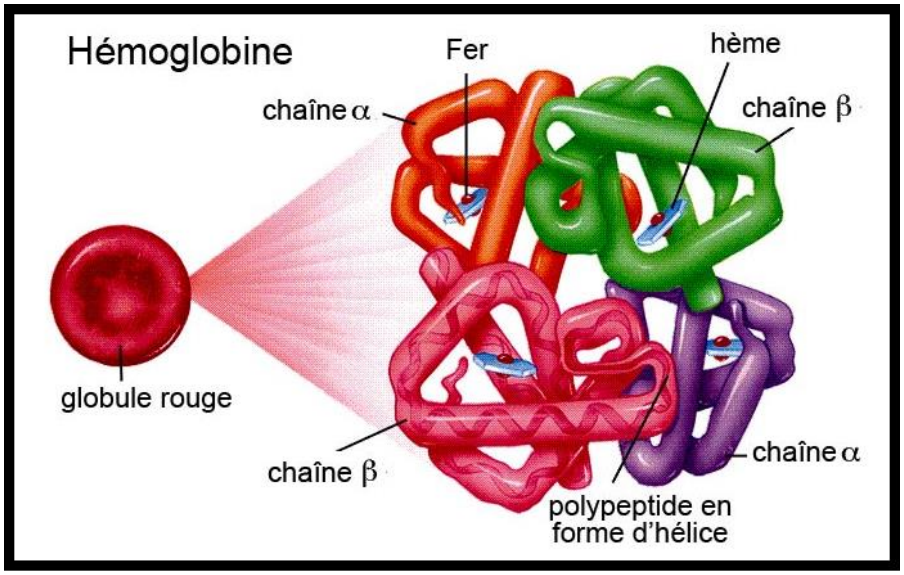


Figure 46. Structure de l'hémoglobine (Webographie N°18). L'hémoglobine est un tétramère constitué de 4 chaînes polypeptidiques, appelées globines, qui sont 2 chaînes α et 2 chaînes β. Chaque globine entoure un groupe hème contenant du fer.

myosine dans des échantillons de viande de bœuf, porc, cheval, poulet et dinde grâce à une nouvelle technique de spectrométrie de masse ambiante appelée « LESA-MS ». Cette technique requiert une préparation minimale des échantillons sans fractionnement et permet l'identification non ambigüe et simultanée de peptides et protéines du muscle squelettique (Montowska *et al.*, 2015).

4.2.5. L'hémoglobine

Les fragments tissulaires dont sont extraites les PATs contiennent généralement du sang et donc de l'hémoglobine. Il est alors prévisible de trouver des traces d'hémoglobine dans les PATs. Taylor *et al.* (1993) ont démontré qu'après un traitement de morceaux de viande en autoclave pendant 1 heure à 121 °C, une hydrolyse partielle des chaînes de globine a été observée. Toutefois, les fragments peuvent encore être utilisés pour identifier l'espèce de l'hémoglobine et donc les espèces présentes dans les PATs.

L'hémoglobine est la principale protéine des érythrocytes circulant dans le sang des vertébrés et transportant l'oxygène jusqu'aux différents tissus. Sa concentration dans le sang s'élève à 15 g par 100 ml (Hardison, 1996). L'hémoglobine est un tétramère constitué de 4 chaînes polypeptidiques (Figure 46), appelées globines, qui sont 2 chaînes α constituées chacune chez l'homme de 141 acides aminés et 2 chaînes β constituées chacune de 146 acides aminés. Les séquences en acides aminés des deux types de globines sont à 50 % identiques. L'hémoglobine est donc composée de quatre protéines globulaires qui entourent chacune un groupe hème contenant du fer. Chacune des chaînes adopte une conformation spatiale lui donnant une forme globuleuse et ménageant une « poche » superficielle dans laquelle est logé l'hème. Cette structure est bien adaptée à sa fonction spécifique du transport de l'oxygène (Hill *et al.*, 1962). L'hémoglobine est en effet une protéine de transport à deux voies : le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus et le retour du dioxyde de carbone des tissus vers les poumons. Dans la circulation artérielle, l'hémoglobine a une forte affinité pour l'oxygène et une faible affinité pour le dioxyde de carbone, les phosphates organiques et les ions hydrogène et chlorure. Dans la circulation veineuse, ces affinités sont inversées (Marengo-Rowe, 2006). L'oxygène se lie de façon réversible à un atome de fer. Les mouvements et les interactions entre les sous-unités α et β conduisent à la liaison des molécules d'oxygène à ce tétramère, ce qui lui permet de récupérer facilement l'oxygène dans les poumons et de le transporter jusqu'aux tissus périphériques (Hardison, 1996). L'oxygénation de l'hémoglobine provoque une modification de sa conformation tridimensionnelle : la molécule d'oxyhémoglobine est un peu plus compacte que celle de la désoxyhémoglobine. Les hèmes subissent en effet des modifications conformationnelles lors de la fixation du dioxygène et l'atome de fer se déplace. Quand la protéine est dans une conformation tendue (désoxyhémoglobine), les sous-unités de la molécule sont fixées par des ponts salins et des liaisons hydrogènes et les poches de l'hème sont étroites, ce qui empêche l'entrée d'oxygène. Quand l'hémoglobine est dans une conformation relâchée (oxyhémoglobine), les poches de l'hème sont assez larges pour laisser entrer l'oxygène

facilement. L'absorption de l'oxygène lorsque la molécule est dans sa structure tendue se fait par une pression sur les liaisons jusqu'au moment où elles cèdent toutes et permettent à la molécule de passer à sa structure relâchée (Imamura, 1996).

On ne trouve que peu de données sur la présence éventuelle d'hémoglobine dans les farines animales. Cependant, Buckley *et al.* (2012), qui comparent par des approches protéomiques des farines animales exposées à des températures croissantes (de 135 à 145 °C), détectent la présence d'hémoglobine et ce pour diverses espèces, même pour les farines traitées à 145 °C.

Objectifs

L'utilisation des Protéines Animales Transformées ou PATs dans l'alimentation du bétail a été interdite suite à l'émergence de l'encéphalopathie spongiforme bovine dans les années 90. En effet, la cause de cette épidémie fut l'utilisation de farines animales infectées par une protéine infectieuse appelée protéine prion. Cette interdiction a tout d'abord concerné uniquement les ruminants et a ensuite été totale, s'appliquant à toutes les espèces de mammifères. Suite à ces mesures, l'épidémie a progressivement diminué jusqu'à se manifester seulement par des cas rares. Vu ce recul de la maladie et pour des raisons économiques et écologiques évidentes, ces interdictions ont petit à petit été levées en partie avec dans un premier temps la réintroduction des PATs de volaille et porc dans l'alimentation des poissons. Ces changements au niveau de la législation amènent dès lors des changements au niveau des techniques de détection passant d'une technique devant détecter seulement les particules tissulaires animales à une technique capable d'identifier aussi bien l'origine taxonomique que l'origine tissulaire. Les deux méthodes officielles à ce jour, à savoir la microscopie optique et la PCR, ont plusieurs limitations. La microscopie différencie une particule d'os d'un organisme terrestre d'une particule d'os marin provenant de poisson sans identification de l'espèce et avec une discrimination limitée du tissu en sachant différencier un os d'un cartilage ou d'un muscle. La PCR, quant à elle, sait très bien faire la distinction entre espèces mais ne parvient pas à identifier le tissu. Ce qui peut poser problème, si par exemple, on détecte des particules terrestres en microscopie et des signaux ruminant et porc en PCR, il est possible que l'aliment contienne des PATs de porc et des produits laitiers de bovin ou qu'il contienne des PATs de bovin et du sang de porc. Le premier cas est autorisé en aquaculture alors que le second est interdit. Le besoin d'une technique pouvant apporter des réponses à ces cas problématiques se fait ressentir. C'est dans ce but qu'une méthode protéomique utilisant la spectrométrie de masse a été développée. En effet, de par sa haute résolution, la spectrométrie de masse a le pouvoir de fournir une identification à la fois taxonomique et tissulaire d'un échantillon de PATs. Cette méthode permettra donc de répondre aux besoins de la législation lorsque les PATs de volaille seront réintroduites dans l'alimentation des porcs et les PATs de porc seront réintroduites dans l'alimentation des volailles, l'espèce critique restant toujours le bovin. Pour l'instant la tolérance zéro est toujours d'application. Toutefois, si un seuil de tolérance de 2 % était accepté au niveau de la législation, cette méthode devrait dont être capable de détecter 2 % de PATs de ruminants dans des PATs de non ruminants.

L'objectif général de cette thèse est donc de développer des protocoles expérimentaux de spectrométrie de masse afin de définir les origines **taxonomiques** et **tissulaires** des protéines présentes dans les échantillons de PATs. Pour faire cela, il faudra établir le profil peptidique

de ce type d'échantillon en générant un maximum de fragments peptidiques par digestion enzymatique. On pourra alors, parmi ces fragments peptidiques, séquencer certains peptides et identifier les protéines dont ils proviennent, ces peptides pouvant être utilisés comme des biomarqueurs spécifiques d'espèces et de tissus. Vu le traitement thermique lors de la production des PATs, une approche expérimentale sans *a priori* pour la détection de ces peptides a été privilégiée par rapport à une approche théorique. L'avantage par rapport à une approche *in silico* est la certitude que ces peptides soient effectivement détectés.

Il y a deux voies de valorisation à ce projet. D'une part, la production d'anticorps polyclonaux de lapins spécifiques des marqueurs identifiés par spectrométrie de masse dans le but de réaliser des tests immunologiques de type ELISA. Ces tests sont réalisés au Centre d'Economie Rurale (CER Groupe). D'autre part, un protocole simple et court d'identification des espèces présentes dans les PATs par spectrométrie de masse sera mis au point en analyse de routine, via un spectromètre de masse de type triple quadrupôle. Cette méthode, si elle est efficace sur les PATs, sera utilisée comme méthode de seconde ligne pour des contre-analyses lorsqu'il y a un doute sur certains échantillons, vu le coût élevé de la technique. A l'avenir, il serait envisageable d'équiper quelques laboratoires nationaux de référence de spectromètres de masse de type triple quadrupôle.

Résultats

Introduction générale aux résultats

Les résultats se structurent en deux parties. La première partie traitera du développement d'analyses peptidomiques des PATs présentes dans des échantillons de farines animales. Dans la deuxième partie, nous appliquerons la méthodologie mise au point pour des analyses peptidomiques sur un autre type d'échantillons riches en protéines et pertinents dans le contexte de l'alimentation animale : des échantillons sanguins.

La **première partie** est scindée en trois points. Comme nous l'avons vu dans les objectifs, le but de cette thèse est de développer des protocoles expérimentaux de spectrométrie de masse afin de définir les origines taxonomiques et tissulaires des protéines présentes dans les échantillons de PATs

- Le premier point présente les expériences préalables de mises au point d'un protocole d'identification des protéines et peptides présents dans les PATs visant à optimiser les différentes techniques de traitement mécanique, d'extraction protéique, de digestion à la trypsine et de spectrométrie de masse. Ces résultats sont suivis du manuscrit « Identification of proteins and peptide biomarkers for detecting banned Processed Animal Proteins (PAPs) in meat and bone meal by mass spectrometry », accepté dans « Journal of Agricultural and Food Chemistry ». **Manuscrit accepté 1.**
- Le deuxième point présente une étude de différents protocoles d'extraction protéique pour la détection de protéines animales transformées en vue d'une comparaison inter-laboratoire. Ce travail résulte d'une collaboration postérieure à la naissance du projet Peptido-génomique. Effectivement, au cours du projet, plusieurs collaborations ont vu le jour. La première s'est initiée suite à la présentation de nos résultats lors du « Second annual meeting, NFR project Safety-PAP » à Bergen en Norvège (08/05/14). Suite à cette rencontre, notre équipe et celle du NIFES (The National Intitute of Nutrition and Seafood Research) ont démarré une collaboration étroite visant une étude inter-laboratoire d'approches peptidomiques valorisée sous forme de manuscrit soumis dans « Journal of Proteomics - special issue Foodomics ». **Manuscrit 2.**
- Enfin, le troisième point traite des résultats encore non publiés qui étudient le potentiel de l'analyse en composantes principales (PCA) comme méthode d'analyse complémentaire des PATs.

La **deuxième partie** est née d'une collaboration avec l'équipe de Vincent Baeten au CRA-W, et plus particulièrement avec Marie-Caroline Lecrenier. Nous avons ici transposé le protocole développé lors du premier manuscrit (Point 1) à l'analyse d'autres types d'échantillons que sont les produits sanguins. **Manuscrit 3.**

Partie 1 : analyses peptidomiques des PATs présentes dans des échantillons de farines animales

1. « Identification of proteins and peptide biomarkers for detecting banned Processed Animal Proteins (PAPs) in meat and bone meal by mass spectrometry »

1.1. Introduction et résultats préliminaires au manuscrit

Le premier manuscrit traite de la mise au point d'un protocole d'identification des protéines et des peptides présents dans les PATs dans le but d'identifier des peptides biomarqueurs et ainsi de pouvoir détecter des produits prohibés. Nous avons donc travaillé sur les différentes étapes de l'analyse des PATs et en particulier sur le traitement mécanique, l'extraction protéique, la purification de l'extrait, l'électrophorèse dans le cas d'une analyse gel-dépendante, la trypsinisation ainsi que sur l'analyse en spectrométrie de masse. Certaines optimisations telles que les optimisations du traitement mécanique et de l'extraction protéique, les essais de réduction du temps de la digestion liquide dans le cas d'une analyse gel indépendante n'ont pas été développées dans le manuscrit et feront l'objet de ce Point 1.1.

Nous avons en effet travaillé sur 2 types de protocoles : une analyse gel-dépendante et une analyse gel-indépendante. Ce second type d'analyse est privilégié dans les laboratoires de routine et plus facilement transposable à des laboratoires et agences de sécurité alimentaire.

Dans le cas de l'analyse gel-dépendante, il a tout d'abord fallu choisir avec quel type de gel nous allions travailler. Nous avons testé une électrophorèse en 2 dimensions mais ces gels n'ont pas fourni de bons résultats, présentant des « smears » et non des spots distincts (résultats non montrés). De plus, leur coût en temps et en argent convient difficilement à une application en routine. Ayant renoncé aux gels 2 D, différents types de gels à 1 dimension ont été expérimentés : gel Tris-Glycine (tampon Laemmli) 4-15 %, gel Tris-Glycine (tampon Laemmli) 12 %, gel Tris-Glycine (tampon Laemmli) 18 %, gel tricine (tampon Tris-tricine-SDS) 10 % et gel urée (tampon Laemmli) 12,5 %. Les gels Tris-Glycine 4-15 % et 12 % ne séparaient pas de façon optimale les protéines de faibles poids moléculaires. Les gels tricine montraient, quant à eux, une séparation des bandes bien marquée. Les gels les plus pertinents à utiliser dans ce cas-ci sont, soit les gels Tris-Glycine 18 %, soit les gels tricine 10 %. Notre choix s'est porté sur les gels Tris-Glycine 18 % pré-coulés, faciles à manipuler, avec un gain de temps appréciable.

A la suite de ces résultats d'optimisations préliminaires, nous présenterons l'article dans l'état actuel des choses, c'est-à-dire accepté pour publication dans « Journal of Agricultural and Food Chemistry ». Les résultats PCR des échantillons utilisés dans le manuscrit sont



Figure 47. Fatsprep 24 et récipients.



Figure 48. Moulin ZM 200 (Retsch).

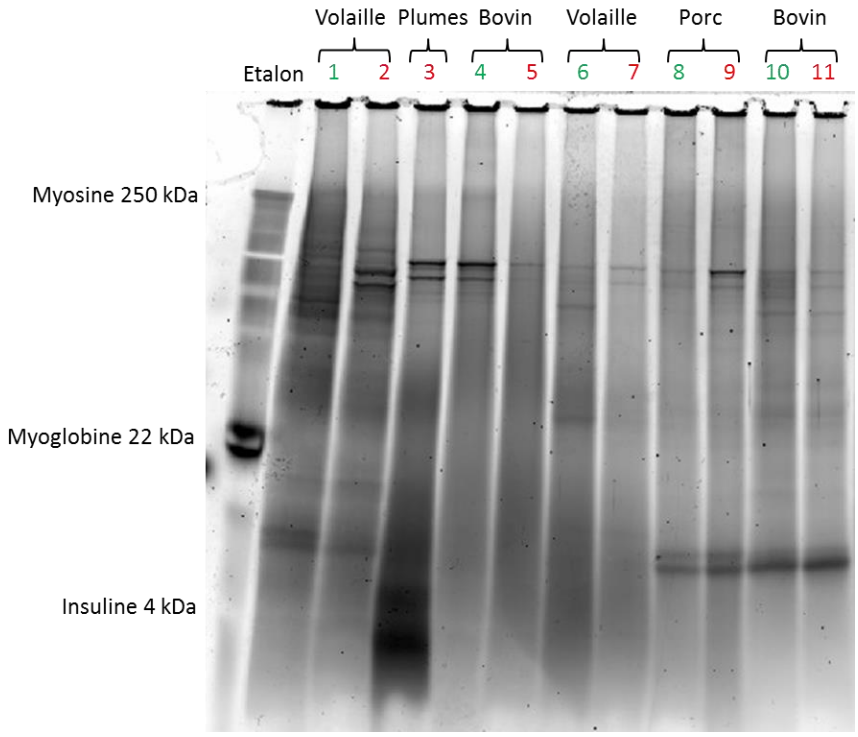


Figure 49. Gel Tris-glycine 18 % illustrant l'effet du traitement mécanique. Les pistes marquées en vert (1, 4, 6, 8 et 10) représentent les échantillons broyés au **moulin ZM 200** et les pistes marquées en rouge (2, 3, 5, 7, 9 et 11) représentent les échantillons broyés au **FastPrep 24**.

représentés dans le Tableau 23 des annexes. Une partie de résultats non publiés complémentaires à ce manuscrit sera présentée au Point 1.3.

1.1.1. Résultat préliminaire : traitement mécanique

Le traitement mécanique des farines a pour but de réduire la taille des particules et ainsi de faciliter l'extraction des protéines. Différentes conditions (5) ont été testées: un broyage solide avec le FastPrep 24, un broyage en solution liquide dans le TCA - acétone avec le FastPrep 24, un broyage solide avec le moulin ZM 200 à 0,5 mm, un broyage à l'azote liquide et une sonication.

Le FastPrep 24 (Figure 47) se trouve au département des Sciences du Vivant du CRA-W. La farine est disposée dans des tubes contenant des billes. L'appareil agite ces tubes de façon à faire rentrer en collision les billes et la farine. Un broyage en solution liquide a également été testé avec ce même appareil. Le principe est identique à l'exception que l'on rajoute 1 ml de TCA - acétone dans le tube avec la farine et les billes dans le but d'avoir une action chimique en plus de l'action mécanique. Le moulin ZM 200 (Figure 48) se trouve au département Valorisation des Productions du CRA-W. Les particules de farines passent à travers une grille constituée de trous de 0,5 mm dans ce cas-ci. Ce dispositif permet d'obtenir une granulométrie des particules bien maitrisée tant au niveau de la taille des particules que de la répétabilité et de la reproductibilité du broyage. Plusieurs gels ont été réalisés dans le but de comparer ces différents traitements mécaniques. Le broyage à l'azote liquide et la sonication n'ont pas apporté d'amélioration au niveau de la résolution des bandes sur gel (résultats non montrés). La Figure 49 montre un gel à une dimension comparant l'efficacité du broyage avec le moulin ZM 200 et le broyage en solution liquide (TCA - acétone) avec le FastPrep 24. La quantité de protéines déposée sur gel 1 D est toujours de 15 µg. Les pistes marquées en vert (1, 4, 6, 8 et 10) représentent les échantillons broyés au moulin ZM 200 et les pistes marquées en rouge (2, 3, 5, 7, 9 et 11) représentent les échantillons broyés au FastPrep 24. Tout d'abord on observe la présence de quelques bandes nettes, malgré les traitements drastiques subis. On remarque également qu'il n'y a pas de différence flagrante entre ces 2 traitements, bien que le nombre de bandes différentes tende à être supérieur avec le moulin ZM 200. De plus, le broyage solide avec le FastPrep 24 présente un inconvénient majeur, car il est difficile de séparer les billes de la farine après broyage. Enfin, le broyage au moulin offre un avantage non négligeable de par la calibration de la farine (0,5 mm) qui est tout à fait homogène et uniforme. Nous avons donc retenu le broyage au moulin ZM 200 comme le traitement mécanique le plus adéquat.

1.1.2. Résultat préliminaire : optimisation de l'extraction protéique

Il existe une grande diversité de protocoles d'extraction de protéines. Nous avons testé 5 protocoles différents d'extraction en nous inspirant de la littérature (Méchin *et al.*, 2007; Seddon *et al.*, 2004; Yong-feng *et al.*, 2011), d'un projet précédent sur les farines animales suivi par les mêmes promoteurs et financés par le SPF et de l'expertise de l'URBC sur

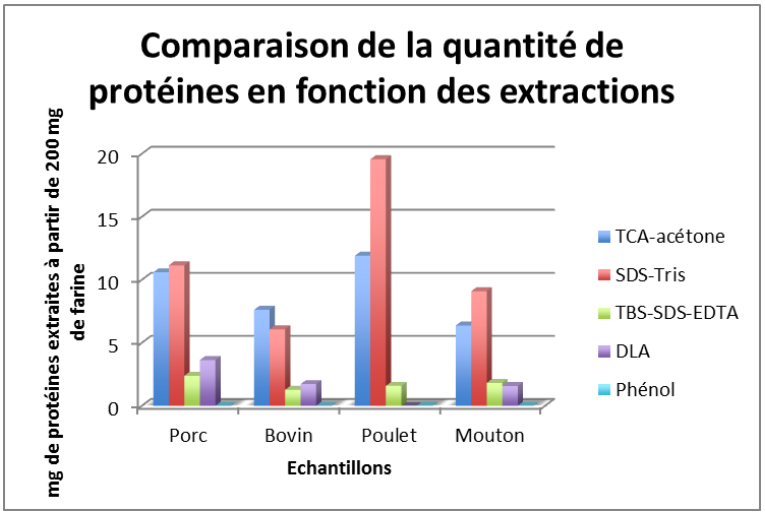


Figure 50. Quantité de protéines (mg) de plusieurs échantillons de PATs de différentes espèces en fonction des 5 extractions testées sur 200 mg de farine comme matériel de départ. Cette expérience a été réalisée en double sur 4 échantillons différents.

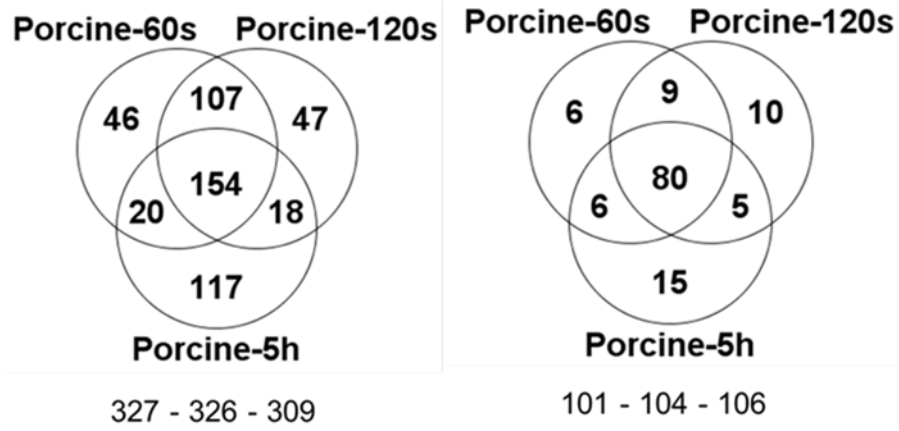
d'autres projets : extraction au TCA - acétone, au SDS 2 % - Tris 1 M, au TBS - SDS - EDTA, au DLA et au phénol. La Figure 50 illustre la quantité de protéines (mg) obtenue en fonction des 5 extractions testées sur 200 mg de farine comme matériel de départ, pour différents échantillons. On remarque que les 2 extractions assurant le meilleur rendement d'extraction sont celles à base de TCA - acétone et de SDS - Tris tandis que l'extraction au phénol est inefficace dans tous les cas. Les extractions au TBS - SDS - EDTA et au DLA fournissent une quantité de protéines assez basse, comparativement aux extractions au TCA - acétone et au SDS. Nous avons également réalisé plusieurs gels pour voir les profils de bandes protéiniques (non montrés). Pour les extractions au TBS - SDS - EDTA et au phénol, nous n'avons observé que peu de bandes protéiques, en particulier pour les protéines de faible poids moléculaire. Sur base de ces résultats, nous avons conclu que les 2 extractions les plus efficaces étaient l'extraction au TCA - acétone et l'extraction au SDS - Tris, le SDS pouvant poser problème pour les analyses en spectrométrie de masse. Nous reviendrons sur ce point. C'est l'extraction au TCA - acétone qui sera privilégiée dans le manuscrit présenté au Point 1.2. Signalons qu'à ce stade, la comparaison entre extractions est quantitative, mais il faudra aussi évaluer l'effet des extractions en termes de nombre de peptides/protéines différents identifiés (Point 2.3.).

Au cours du projet, nous avons reçu plusieurs échantillons de farines d'os. Ce type de produit nous a aussi aiguillés sur une extraction à l'HCl. Ce dernier est en effet connu pour déminéraliser les os et permettre une meilleure extraction des collagènes, protéines abondantes au sein de la matrice osseuse (Buckley *et al.*, 2008; Buckley *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2007; Urist and Strates, 2009). Ce type d'extraction sera discuté dans le deuxième point des résultats.

1.1.3. Résultat préliminaire : optimisation de la digestion liquide

Etant donné que les gels ne donnent qu'une information limitée (Figure 49), ce qui est attendu vu les traitements drastiques subis par les PATs, nous avons travaillé essentiellement via des analyses gel-indépendantes. Dans ce cas, les extraits protéiques obtenus sont directement digérés à la trypsine après extraction et analysés au spectromètre de masse. Plusieurs conditions de digestion des extraits protéiques ont été testées (voir manuscrit au Point 1.2.). Les résultats indiquent que les meilleures conditions de digestion sont une trypsinisation de 5 heures avec un rapport trypsine/protéines de 1/20 et ensuite un temps d'analyse chromatographique de 215 minutes (tests de 125, 185, 215 et 275 minutes : résultats non montrés). Nous avons toutefois tenté de réduire au maximum le temps consacré à cette étape. Pour ce faire, nous avons effectué des tests afin de voir si la réduction des ponts disulfures au moyen de DTT et l'alkylation au moyen d'iodoacétamide (pour empêcher la reformation de ces ponts disulfures) sont vraiment nécessaires avant la digestion enzymatique en elle-même. L'iodoacétamide est un agent alkylant réagissant avec les résidus cystéine libres en bloquant leur réoxydation (Gundry *et al.*, 2009). Ainsi, la protéine se retrouve sous une conformation dépliée, offrant un accès plus aisé à l'enzyme au niveau des sites de clivage. Vu les conditions

A



B

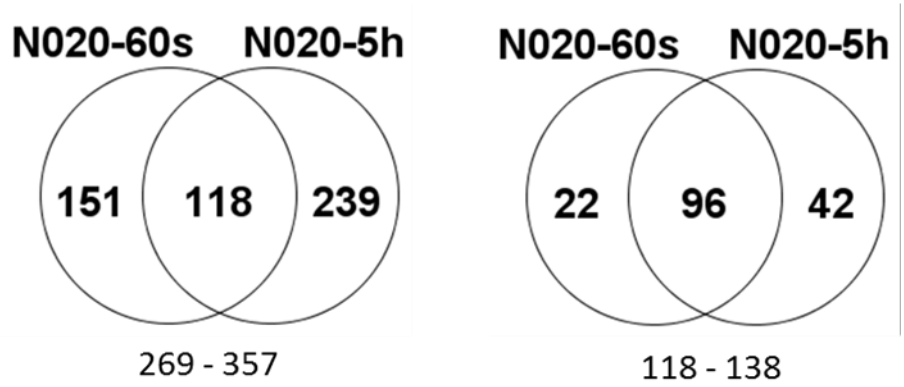


Figure 51. Diagrammes de Venn illustrant le nombre de peptides (à gauche) et le nombre de protéines (à droite) identifiés pour différents temps de digestion testés pour un échantillon de porc (A) et pour un échantillon de bovin (B). 60 s et 120 s : sonication en présence de trypsine pendant 60 et 120 secondes. 5 h : trypsinisation pendant 5 heures (sans sonication). Cette expérience a été réalisée sur 4 échantillons différents. Ces diagrammes représentent les résultats pour un échantillon de porc et pour un échantillon de bovin. La tendance est la même pour l'ensemble des échantillons.

drastiques de production des farines animales, on peut supposer que les protéines extraites à partir de ces FVOs sont déjà présentes sous une conformation dépliée étant donné l'instabilité des résidus cystéines à hautes températures (Volkin and Klibanov, 1987). On observe également que les séquences des peptides identifiés sont pauvres en cystéines. En étudiant les modifications présentes sur les peptides identifiés, très peu de modifications carbamidométhyles peuvent être observées. Ceci tend donc à confirmer l'hypothèse selon laquelle peu de cystéines sont retrouvées dans les séquences des protéines constitutives des PATs. Nos résultats suggèrent que les étapes de réduction et d'alkylation, qui prennent un certain temps, ne seraient donc pas indispensables en routine.

Le temps de digestion enzymatique reste, même pour une durée de cinq heures, une étape limitante au développement d'un protocole de routine. Switzar *et al.* (2013) ont démontré que ce temps pouvait être réduit jusqu'à 60 secondes avec l'utilisation d'ultrasons combinés avec la digestion enzymatique (Lopez-Ferrer *et al.*, 2005; Rial-Otero *et al.*, 2007). Nous avons donc testé trois temps de digestion différents : 60 secondes avec sonication, 120 secondes avec sonication et le temps habituel de 5 h sans sonication sur un échantillon de porc, pris comme référence (Figure 51 A). Les échantillons « 60 s » et « 120 s » ont été digérés grâce à une sonde ultrasonique, à une amplitude de 70 % et en mode continu (cycle de 1) (Hielscher Ultrasound Technology, USA). Nos résultats confirment l'efficacité de la sonication, avec peu de différences entre 60 et 120 secondes. Cependant, ces digestions rapides ne sont pas toujours reproductibles (Switzar *et al.*, 2013). Dans une analyse ultérieure, nous avons comparé 60 secondes de trypsinisation avec sonication et 5 heures de trypsinisation sans sonication sur un échantillon de bovin (Figure 51 B). Le nombre de peptides et protéines identifiés était supérieur pour la trypsinisation longue. C'est pourquoi nous avons préféré garder les 5 h de digestion pour les analyses ultérieures, mais les résultats avec sonication sont encourageants dans le but de développer un protocole d'analyse plus court et efficace et cette digestion rapide pourrait être utilisée par la suite en laboratoire de routine.

1.2. Manuscrit « Identification of proteins and peptide biomarkers for detecting banned Processed Animal Proteins (PAPs) in meat and bone meal by mass spectrometry »

Hélène Marbaix*,[1,2], Dimitri Budinger[1], Marc Dieu[1,3], Olivier Fumière[4], Nathalie Gillard[5], Philippe Delahaut[5], Sergio Mauro[2], Martine Raes[1]

[1] *URBC-NARILIS, University of Namur, Rue de Bruxelles 61, 5000 Namur, Belgium*
[2] *CRA-W, Walloon Agricultural Research Center, Biotechnology Department, Gembloux, Belgium*
[3] *MaSUN, Mass spectrometry facility, University of Namur, Namur, Belgium*
[4] *CRA-W, Walloon Agricultural Research Center, Valorisation of Agricultural Products Department, Gembloux, Belgium*
[5] *CER Groupe, Centre d'Economie Rurale, Marloie, Belgium*

Corresponding Author
*E-mail: helene.marbaix@unamur.be. Telephone: +32 81724126.

Notes
The authors declare no competing financial interest.

Contributions des auteurs
Hélène Marbaix a assuré le travail expérimental, aidée par Marc Dieu, Dimitri Budinger et Nathalie Gillard. Hélène Marbaix a rédigé le manuscrit dans le cadre de sa thèse de doctorat. Olivier Fumière a fourni les échantillons de PATs, avec les données PCR, a conseillé Hélène Marbaix concernant les aspects législatifs et relu le manuscrit. Philippe Delahaut, Sergio Mauro et Martine Raes sont les PI en charge du programme de recherche et de la supervision de la rédaction du manuscrit.

ABSTRACT

The outbreak of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in the UK in 1986, with Processed Animal Proteins (PAPs) as the main vector of the disease, has led to their prohibition in feed. The progressive release of the feed ban required the development of new analytical methods to determine the exact origin of PAPs from meat and bone meal. We set up a promising MS-based method to determine the species and the source (legal or not) present in PAPs: a TCA-acetone protein extraction followed by a clean-up step, an in-solution tryptic digestion of 5 hours (with a 1/20 protein/trypsin ratio) and mass spectrometry analyses, first without any *a priori* with a Q-TOF, followed by a targeted triple quadrupole analysis. Using this procedure, we were able to overcome some of the major limitations of the official methods to analyze PAPs, detecting and identifying prohibited animal products in feeding stuffs by the monitoring of peptides specific for beef, pork and sheep in PAPs.

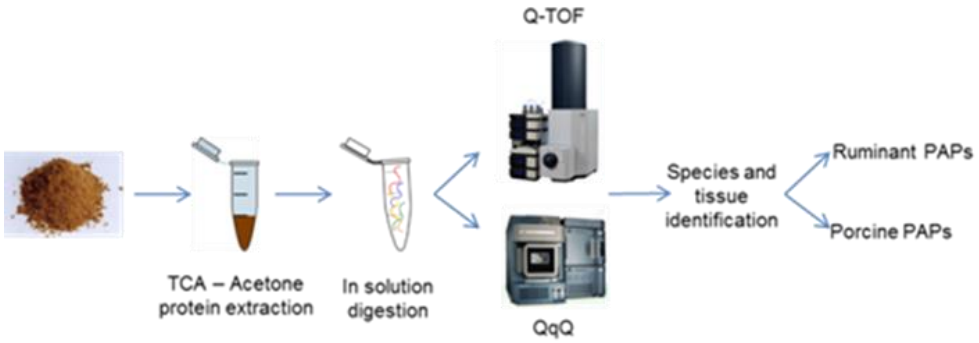


Figure of abstract. Workflow of the developed peptidomic approach.

KEYWORDS: Animal feed, PAPs, protein extraction, in-solution digestion, mass spectrometry, peptide biomarker, beef, pork

Table 1. Current legislation for ruminants and porcine products. x : prohibited; v: allowed.

Products	Ruminant feed	Pig feed	Poultry feed	Aqua feed
Ruminant blood meal	x	x	x	x
Ruminant blood products	x	x	x	x
Ruminant meat meal	x	x	x	x
Ruminant gelatine	x	x	x	x
Milk products	v	v	v	v
Porcine blood meal	x	x	x	v
Porcine blood products	x	v	v	v
Porcine meat meal	x	x	x	v
Porcine gelatine	v	v	v	v

INTRODUCTION

The development of feeds with high nutritional value for animal consumption has led to consider products of animal origin amongst the best candidates to support cattle nutritional needs. Indeed, animal by-products provide higher levels of fat, proteins, minerals and even some essential vitamins as nutriment and energy source.[1] According to European Commission (EC) regulation n°1069/2009[2], animal by-products are differentiated within three categories. The first two categories contain animal materials that do not fulfill veterinary requirements while the third category contains "animals fit for human consumption slaughtered in a slaughterhouse" but that are not proposed for human consumption for commercial reasons.[3] The latest category is the only one that is used for the production of PAPs.[2] In order to be suitable for consumption, these animal by-products undergo different rendering processes (133 °C - 20 min - 3 bars for mammalian PAPs, 121 °C - 20 min - 3 bars for fish and poultry PAPs) approved by the EC.[4]

Despite the importance of PAPs and their recognition as a valuable source of proteins, the outbreak of BSE in the United Kingdom in 1986 and its spread to other European countries led to the introduction of different bans.[5] Indeed, it appeared that PAPs were the most probable vectors of the BSE disease.[6] Since BSE originated from bovine cattle, the first feed ban prohibited the use of mammalian PAPs in ruminant feed.[7] The present reinforced EU feed ban prohibits the use of all mammalian and avian PAPs in animal feed[8] except for pet food and fish farming feed.[9] Currently, the EU is working on the reintroduction of some PAPs for diverse economic reasons.[10] The main purpose is the reintroduction of some banned PAPs, such as poultry materials for pork feed and pork materials for poultry feed, while maintaining the feed ban on ruminant materials and intraspecific recycling.

In order to respect the European feed bans and to fulfill the demand for the reintroduction of some PAPs, various analytical methods have been developed to analyze PAPs and their composition. In 1998, the EC[11, 12] declared the optical light microscopy as the first official method for the detection and characterization of PAPs in feed. This method detects the presence of constituents of animal origin and allows the distinction between terrestrial and fish bone particles. However, the major limitation of light microscopy remains the lack of species specificity.[13] Due to changes in the legislation[9] (need for species identification), a second method was accepted as official in 2013: the Polymerase Chain Reaction. This method allows a reliable species identification but is unable to distinguish the origin of the product. A positive PCR signal does not discriminate between legal or illegal ruminant DNA (for example a positive signal for ruminants does not allow a differentiation between bovine meat and milk products).[14] Table 1 summarizes the current legislation for ruminant and porcine products.[9] Neither microscopy nor PCR can detect both the species and the legal origin of the product. The current limitations in PAP analyses have promoted the development of new analytical methods. Amongst the latter, peptidomics is particularly well suited for the detection of residual proteins of animal origin in a tissue- and species-specific way.[15] Proteomics might indeed become pivotal for food analysis.[16, 17] Many proteomic studies[18-24]

have been conducted on raw materials or on meat but proteomic studies applied to PAPs remain scarce[25-28]. These studies focus on a particular protein or tissue in order to detect the presence of PAPs.

PAPs are very heterogeneous and complex samples, hard to analyze, due to the drastic rendering and production treatments. Therefore, the aim of this paper was to describe a more global PAP detection method covering a larger range of residual proteins. The first goal of this work was the development of a new method of prohibited PAP identification by mass spectrometry with a Q-TOF that led us to identify peptide biomarkers without *a priori*. Therefore, extraction and digestion protocols were developed and optimized. In a second step, we were interested in the possible transfer of this technique to a targeted routine triple quadrupole mass spectrometer. To improve the detection of species and (il)legal tissue, various sets of biomarkers are proposed.

MATERIALS AND METHODS

Samples. PAP samples of beef (6), pork (9) and sheep (4) meat and bone meal were provided by the CRA-W (Centre wallon de Recherches agronomiques) and by the EFPRA (European Fat Processors and Renderers Association). Samples were crushed at 0.5 mm using the ultra-centrifugal mill ZM 200 from Retsch (Germany). One vegetal feed for horses was also analyzed as a negative control for PAPs. The samples were stored at 4 °C.

TCA-acetone protein extraction. 1.8 ml of acetone with 10 % TCA and 0.3 % DTT was added to 200 mg of PAP sample and stored at - 20 °C overnight. Each sample was centrifuged for 10 min at 16 000 g at 4 °C (1-15PK Refrigerated Microcentrifuge, Sigma, USA) and the supernatant discarded. The remaining pellet was washed twice in 1.8 ml of acetone with 0.3 % DTT and once in 1.8 ml of 90 % acetone with 0.3 % DTT, with an incubation period of 30 min at - 20 °C followed by a centrifugation after each washing. The supernatant was discarded and the pellet was suspended in 300 µl of DLA (urea 7 M, thiourea 2 M, Tris 30 mM, CHAPS 4 %). The sample was mixed for 1 h at 1400 rpm at 12 °C on a thermomixer (Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf, Germany) and centrifuged for 10 min at 16 000 g. The supernatant was transferred to a new tube and stored at - 20 °C. Protein concentration was determined by the Pierce method using BSA as the protein standard. A 2-D Clean-Up step (2-D clean up kit, GE Healthcare, USA) was used in order to remove contaminants and detergents present in the samples. At the end of the "Clean-up" step, samples were solubilized in DLA for the SDS-PAGE analysis and in RapiGest SF Surfactant 0.2 % (Waters, USA) for the gel-free analysis.

SDS-PAGE. Protein extracts (15 µg) were mixed with the electrophoretic buffer (Tris-aminomethane 0.25 M, glycine 1.92 M, SDS 1 %, pH 8.5-8.9) diluted 10 times to reach a total volume of 12 µl. Four µl of NuPAGE blue - LDS Sample Buffer (Novex by LifeScience, USA) and 1.6 µl of DTT (0.5 M) were added to the sample. The sample was centrifuged,

heated for 2 min at 85 °C and loaded on the Novex 18 % Tris-Glycine gel. SeeBlue Plus2 Prestained Standard protein kit was used as the protein standard. A constant voltage of 125 V was applied. After migration, the gel was washed for 2 x 30 min in 200 ml of a fixing solution (40 % ethanol, 10 % acetic acid), for 5 min in ddH_2O and stained overnight with Krypton Protein Stain 10 % (Thermo Scientific, USA). After staining, the gel was placed for 5 min in a destaining solution (5 % acetic acid) and for 15 min twice in ddH_2O. The protein profiles of PAPs were visualized using the Typhoon gel scanner (Typhoon 9420, Amersham Biosciences, GE).

In-gel tryptic digestion. Gel lanes were cut into small pieces (approximately 90), introduced into a 96-well plate and washed with 150 µl ddH_2O and with 100 µl acetonitrile. After that, gel pieces were dried at 56 °C for 10 min. Once the gel pieces shrunken, reduction and alkylation were achieved by incubation with 100 µl DTT (10 mM) at 600 rpm for 45 min at 56 °C on a thermomixer, followed by incubation with 80 µl iodoacetamide (55 mM) for 30 min in the dark. The gel pieces were washed 4 times: with 50 µl ddH_2O/50 µl acetonitrile, with 100 µl acetonitrile, with 100 µl ammonium bicarbonate (100 mM) and finally with 100 µl acetonitrile, with an incubation period of 10 min at 900 rpm on a thermomixer between each wash. The samples were dried at 37 °C for 20 min and incubated with 18 µl trypsin (Trypsin Gold 6.25 ng/µl, Mass Spectrometry Grade, Promega, USA) for 45 min on ice to allow trypsin to diffuse into the gel matrix. The excess of trypsin was discarded. The gel pieces were covered with 60 µl ammonium bicarbonate (50 mM) and incubated overnight at 37 °C to allow protein digestion within the gel matrix. The supernatant was recovered and stored at - 20 °C prior to mass spectrometry analysis.

In-solution tryptic digestion. Samples (20 µg) were reduced by 0.2 µl DTT (1 M) and incubated at 500 rpm for 45 min at 37 °C on a thermomixer. They were then alkylated using 1.5 µl iodoacetamide (550 mM) and incubated in the dark at 500 rpm for 45 min at 37 °C. Thereafter, 0.22 µl $CaCl_2$ (100 mM) and trypsin (Trypsin Gold 1 µg/µl, Mass Spectrometry Grade, Promega, USA with a trypsin/protein ratio of 1/20 or 1/50 depending on the experiment) were added. Samples were then incubated at 300 rpm for 5, 14 or 24 h (depending on the experiment) at 37 °C. To remove RapiGest SF Surfactant and to stop the trypsin action, trifluoroacetic acid was added (pH < 2) and each sample was incubated at 300 rpm for 30 min at 37 °C. It was then centrifuged and the supernatant was recovered and stored at - 20 °C prior to mass spectrometry analysis.

Mass spectrometry (Q-TOF). The peptides were analyzed using an ESI-MS/MS maXis Impact UHR-TOF (Bruker, Germany) coupled with a UltiMate 3000 nano-UPLC system (Thermo, USA). The amount of proteins injected was 3 µg. The digests were separated by reverse-phase liquid chromatography using a 75 µm x 250 mm reverse phase Thermo column (Acclaim PepMap 100 C18, Thermo, USA) in an Ultimate 3000 liquid chromatography

system. The flow rate was 300 nl/min. Mobile phase A was 95 % water - 5 % acetonitrile, 0.1 % formic acid. Mobile phase B was 20 % water - 80 % acetonitrile, 0.1 % FA. The digest was injected on a precolumn for a desalting step, and the organic content of the mobile phase was increased linearly from 4 % B to 30 % B in 160 min and from 30 % B to 90 % B in 25 min, and then washed with 90 % B for 10 min and equilibrated with 4 % B for 20 min, for a total of 215 min. The column effluent was connected to a CaptiveSpray (Bruker). In survey scan, MS spectra were acquired for 0.5 sec in the mass to charge (m/z) range between 50 and 2200. The most intense peptides ions 2+ to 4+ were sequenced during a cycle time of 3 sec. The collision-induced dissociation (CID) energy was automatically set according to m/z ratio and charge state of the precursor ion. MaXis and Thermo systems are piloted by Compass Hystar 3.2 (Bruker).

Data analysis (Q-TOF). Peak lists were created using DataAnalysis 4.2 (Bruker) and saved as MGF files for use with ProteinScape 3.1 (Bruker), with Mascot 2.4 as search engine (Matrix Science). Enzyme specificity was set to trypsin and the maximum number of missed cleavages per peptide was set at two. Carbamidomethylation of cysteine, oxidation of methionine, conversion of glutamine in pyroglutamate and hydroxylation of proline and lysine (only for collagens database search) were allowed as variable modifications, except for the in-gel analysis where the carbamidomethylation of cysteine was fixed. Mass tolerance for monoisotopic peptide window was 10 ppm and the MS/MS tolerance window was set to 0.05 Da. The peak lists were searched against two databases: the first one contains whole proteins of 4 different taxa (ruminantia, suina, aves and rodentia) ("AllUniprot": 616520 entries) and the second one contains only collagens of 4 different taxa (ruminantia, suina with the porcine collagen α1(I) and α2(I) chain sequences present in a patent[29], aves and rodentia) ("CollagenUniprot": 2865 entries), with an automatic decoy database search. Scaffold 4.3 (Proteome Software) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95 % probability by the Peptide Prophet algorithm[30] with Scaffold delta-mass correction. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 5 % probability to achieve an FDR less than 1 % and contained at least 2 identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm[31]. To validate the results and confirm the species, candidate peptides were blasted against NCBI.

Mass spectrometry (MRM). For the application in routine analysis, a triple quadrupole mass spectrometer was used. For the UHPLC, a Waters Acquity system (Waters, Manchester, UK) was used. Chromatography was performed on a 1.7-µm Acquity BEH130 C18 column (2.1 × 150 mm). 10 µl of a standard (10 µg/ml) composed of the 7 synthetic peptides were injected. For the samples, the amount of proteins injected was 10 µg. The flow rate was 0.3 ml/min and mobile phases A and B were respectively 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in acetonitrile. The applied elution program was a three-linear-step gradient: 0-1 min, 85 % A;

Table 2. Mass spectrometric parameters for the analysis with the triple quadrupole (Waters Xevo TQS) tandem mass spectrometer.

Peptide	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK	789.7 (+++)	893.4 (b8)	35	27
		807.4 (y7)	35	27
		1474.8 (y14)	35	27
SATQSAEITIPVTFQAR	607.3 (+++)	818.5 (y7)	35	21
		622.3 (y5)	35	21
		889.4 (b9)	35	21
ALPAAAIEGPAYNR	707.4 (++)	919.5 (y8)	35	25
		990.5 (y9)	35	25
		620.3 (y5)	35	25

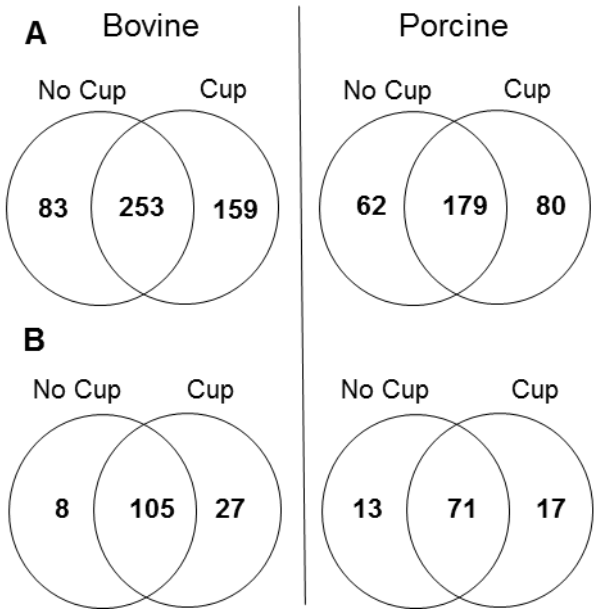


Figure 1. Effects of a "Clean-up" on the number of identified peptides (A) and proteins (B). Venn's diagrams illustrating the numbers of identified unique peptides (A) and proteins (B) without "Clean-up" (No Cup) and with "Clean-up" (Cup) on bovine and porcine samples. This experiment was carried out on 6 different samples. These diagrams represent an example for a bovine sample and a porcine sample. The trend is the same for all samples.

1-14 min, linear gradient from 85 % to 5 % A; 14-16 min, 5 % A, 16–16.5 min, from 5 % to 0 % A; 16.5-17 min, 0 % A; 17-17.5 min, from 0 % to 85 % A, and finally reconditioning of the column until minute 20. During the HPLC analysis, the column was maintained at 40 °C and the samples at 15 °C.

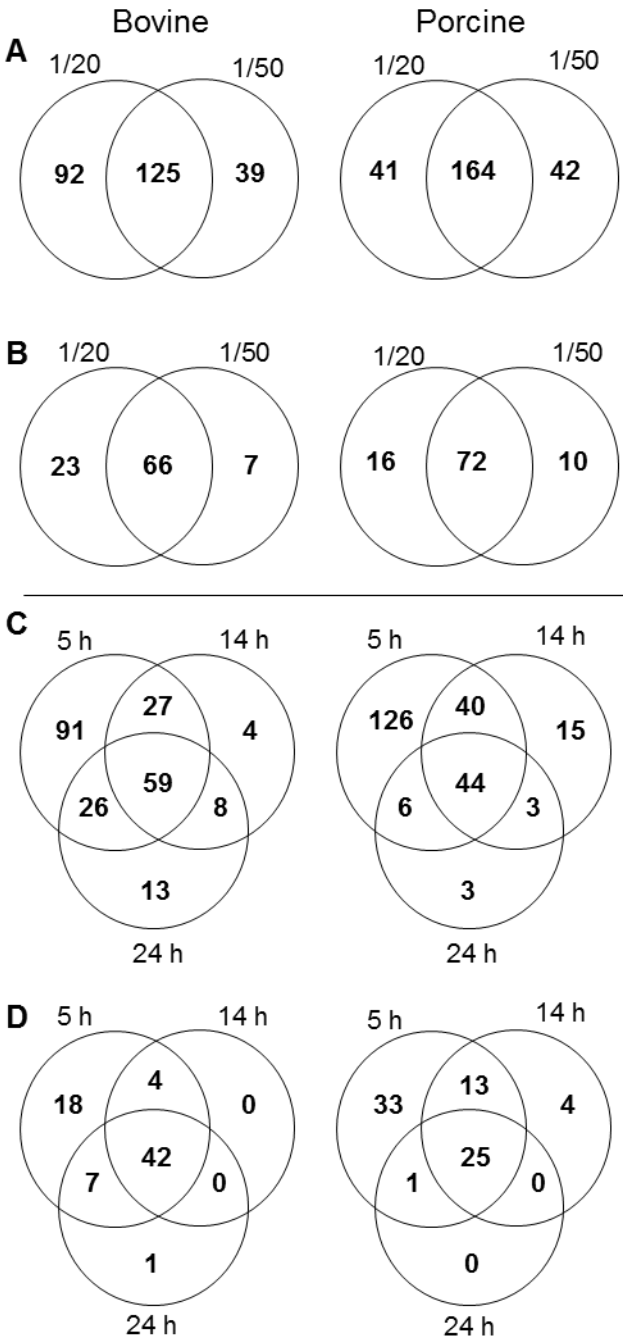
MS was performed with a Waters Xevo TQS tandem mass spectrometer (Waters, Manchester, UK), in the positive ion electrospray mode with multiple reaction monitoring (MRM). Nitrogen was used as the cone gas and desolvation gas at flow rates of 250 l/h and 1200 l/h, respectively. The other MS/MS parameters were: capillary voltage, 2.0 kV; source temperature, 150 °C; desolvation temperature, 500 °C; collision gas flow, 0.12 ml/min. Data collection and subsequent processing were performed with the QUANLYNX software. MRM design was performed using the open-source software Skyline. To improve the specificity of the MS/MS method, only MRM where the m/z of the product ion was higher than the m/z of the parent ion were selected. After running of incurred samples, at least five transitions were monitored for each targeted peptide. Selected precursor ion and charge states, selected product ions and corresponding fragments and optimized MS parameters are presented in Table 2 for the three precursor ions selected.

RESULTS AND DISCUSSION

Proteins were extracted using a TCA-acetone based protein extraction followed by a "Clean-up" step

A TCA-acetone protein extraction, well described in the literature for complex samples[32-35], was selected after several trials comparing different classical extraction protocols (data not shown), both for gel-dependent and gel-free protocols. TCA-acetone extraction was quite reproducible regarding the yield of extracted proteins combined with the highest number of different identified peptides and proteins after MS analysis. SDS-Tris was quantitatively more efficient, with higher protein yield, but with lower numbers of different identified peptides and proteins (data not shown).

To further improve both qualitatively and quantitatively the protein samples for MS analysis, we wanted to evaluate a "Clean-up" step following protein extraction. Indeed, the "Clean-up" process is supposed to precipitate and concentrate proteins but also to eliminate some contaminants present in the extracts (such as lipids) or reagents incompatible with mass spectrometry added during the extraction. However, "Clean-up" is costly and time-consuming. That is why we decided to evaluate the effectiveness of this step on our samples. We analyzed different samples (pork and beef) with and without "Clean-Up" by mass spectrometry to evaluate the number of identified proteins and peptides. As shown in Figure 1, the number of unique peptides (A) and proteins (B) identified is higher after "Clean-up" both in bovine and in porcine samples. Because the "Clean-Up" step was shown to reproducibly improve the peptidomic analysis for several samples, it was kept in our subsequent analyses, despite its cost.



Supplementary Figure 1. Optimization of the trypsinization steps. A, B. Venn's diagrams illustrating the number of unique peptides (A) and proteins (B) identified for two different trypsin/protein ratios (1/20 or 1/50) on bovine and porcine samples. According to a preliminary study (5 h versus 24 h, data not shown), the extracts were digested during 5 hours. C, D. Venn's diagrams illustrating the number of unique peptides (C) and proteins (D) identified for three different trypsin digestion times (5, 14 or 24 h) on bovine and porcine samples. The trypsin/protein ratio was 1/20. This experiment was carried out on 8 different samples. These diagrams represent an example for a bovine sample and a porcine sample. The trend is the same for all samples.

After the protein extraction, two different protocols were investigated: a gel-dependent and a gel-free protocol. For the gel-dependent method, a 1D gel was run followed by an in-gel tryptic digestion and MS analyses. For the gel-free method, the protein extracts underwent directly an in-solution tryptic digestion and MS analyses in order to determine the peptide profile of PAP samples.

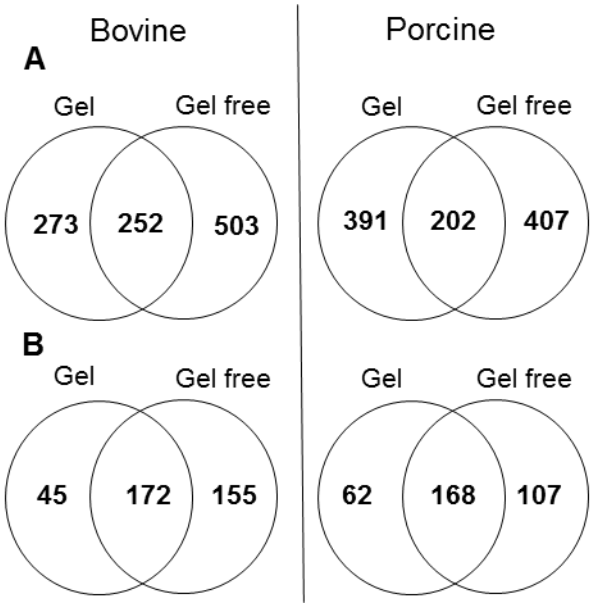
Comparative study of in-solution digestion parameters

Prior to MS analyses, extracts need to undergo an enzymatic digestion of the proteins into peptides, which is an unavoidable step, critical for the quality of protein identification. The most widely applied method for protein digestion involves the use of enzymes such as trypsin, considered as the gold standard in proteomics.[36] We selected a typical protocol involving a reduction with DTT and an alkylation with iodoacetamide, followed by trypsin digestion. Generally, for proteins extracted for instance from tissue, digestion is performed during 16 - 18 hours (overnight digestion). However due to the drastic rendering process, we wanted to check the efficiency of tryptic digestion, testing in particular different digestion times and trypsin/protein ratios.

In a preliminary study, we tested two different digestion times: 5 and 24 hours. We obtained surprisingly more identifications of peptides/proteins with 5 hours of digestion compared to 24 hours (data not shown). Two different trypsin/protein ratios (1/20 and 1/50) were tested with the 5 h of digestion. As shown in the supplementary Figures 1 A and B, digestion was more efficient with the 1/20 ratio leading to a higher number of identifications, compared to the 1/50 ratio. An intermediate time was also evaluated. Therefore, samples were incubated for 5 and 24 hours, but also 14 hours with a 1/20 trypsin/protein ratio followed by ESI-Q-TOF MS/MS analyses. In both bovine and porcine samples (supplementary Figures 1 C and D), the number of identified unique peptides (C) and proteins (D) was higher for the 5 hours digestion. These data confirms that the number of identifications decreased for the longer trypsinization times suggesting a degradation of the peptides. This observation could be explained by the alteration and fragmentation of PAPs due to the rendering process, as described for osteocalcin by Buckley et al.[37] In summary, amongst the different conditions tested on various PAP samples, we selected a trypsin digestion with a trypsin/protein ratio of 1/20 during 5 hours.

Comparative study between gel-dependent and gel-free methods

First, we used a gel-dependent approach. SDS-PAGE separates proteins according to their molecular weight but with PAPs we obtained low resolution gels, with a limited number of clear and reproducible bands and with smears, most probably due to the rendering process. For the gel method, the 1D gel was processed for an in-gel tryptic digestion before the MS analysis. For the gel-free method, the protein extracts underwent directly an in-solution tryptic digestion. We compared the number of identified unique peptides and proteins in both conditions (gel and gel-free). We observed that the number of identified unique peptides and



Supplementary Figure 2. Comparison of the gel-dependent and independent approaches. Venn's diagrams illustrating the number of unique peptides (A) and proteins (B) identified for the gel-dependent and gel-free method on bovine and porcine samples. All the 1D gel bands were excised by using a scalpel and the in-gel digestion was performed. The in-solution digestion was performed with a trypsin/protein ratio of 1/20 during 5 hours, prior to MS/MS analysis. This experiment was carried out on 4 different samples. These diagrams represent an example for a bovine sample and a porcine sample. The trend is the same for all samples.

proteins was higher for the gel-free method than for the 1D gel electrophoresis (supplementary Figure 2). The gel-free protocol, limiting handling, also reduces the risk of contamination by human keratin and is more suited for routine analyses, cheaper and faster than electrophoresis.

In conclusion, we selected a gel-free protocol based on the following workflow: TCA-acetone protein extraction, "Clean-up" step, in-solution digestion and LC-MS/MS analyses. This workflow was applied to identify specific peptide markers in PAPs.

Identification of peptide biomarkers

The final goal of this study was to identify specific species and tissue peptide markers found in PAPs among the most abundant and/or the most robust proteins, with a particular focus on specific peptides for prohibited PAPs and animal products in animal feed. A theoretical search on proteins supposed to be present in PAPs, does not predict their chance to resist the process, which varies from protein to protein. That is why we chose an experimental approach to detect without any *a priori* residual proteins and peptides resistant to the drastic rendering process applied to the PAP samples studied in this work. To do so, software programs like Scaffold and ProteinScape were used. The search for peptide biomarkers relies on the identification probability score (that must be at least 95 %), the number of sequencing for each peptide and the use of BLAST to confirm the identified species. One of the challenges associated with the peptidomic analysis of PAPs is the strong sequence homology observed between the different species of interest. Most of the identified proteins display sequence homologies close to 90 % between the relevant target species, which is a major hurdle for identifying specific peptides. This strong sequence homology explains the difficulty to determine species-specific peptide markers. All potential peptide markers were searched against the NCBInr database using BLAST to exclude homology with other animal species. To consider a peptide as a reliable biomarker to detect prohibited PAPs, it has to be specific for the target species, it must belong to a protein from an unauthorized product (Table 1) and finally, it must be present ideally in all the samples.

Collagens are the major proteins of connective tissue, cartilage and bone extracellular matrix. They represent over half of the protein in animals[38] and are known to be quite resistant, persisting through the animal feed rendering process.[27] Hence, they are very abundant in PAPs. However collagens are very difficult to analyze because they are very complex, undergoing extensive posttranslational modifications. That is why two "homemade" databases were created. One included all proteins for relevant taxa (ruminantia, suina, aves and rodentia) with three modifications (carbamidomethylation of cysteine, oxidation of methionine, conversion of glutamine in pyroglutamate) and another database was composed of only collagens for the same taxa but considering one supplementary modification (hydroxylation of proline and lysine) specific to collagens. However we realized that collagens are not necessarily the best candidates for the search of peptide biomarkers to detect prohibited material in PAPs. As already mentioned, they are highly modified and therefore

Table 3. List of prohibited bovine specific peptides identified in different samples of PAPs using MS/MS analyses with the homemade "AllUniprot" and "CollagenUniprot" databases (focused on ruminantia, suina, rodentia and aves). The three peptides in bold were injected in rabbits to produce antibodies. With the focus on these 3 peptides, all beef PAPs samples (n = 6) were detected as bovine.

Protein	UniProt accession	PM (kDa)	Biomarker peptide sequence	AA position
Hemoglobin alpha	P01966	15	VGGHAAEYGAEALER **AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK** LLSHSLLVTLASHLPSDFTPAVHASLDK	18-32 70-91 101-128
Heat shock protein beta-1	Q3T149	22	**ALPAAAIEGPAYNR** **SATQSAEITIPVTFQAR**	58-71 168-184
Hemoglobin beta (*Bos taurus*)	D4QBB3	16	AAVTAFWSK NFGNEFTPVLQADFQK	8-16 116-131
Hemoglobin beta (*Bos javanicus*)	P04346	16	VLDSFSDGMK	66-75
Alpha-2-HS-glycoprotein	B0JYN6	38	HTFSGVASVESSSGEAFHVGK TPIVGQPSIPGGPVR	313-333 334-348
Myosin light chain 6B	Q148H2	23	VELPSLIPVILEK	34-46
Prothrombin	P00735	71	LGEDPDPDAAIEGR	304-317
Peptidoglycan recognition protein 1	Q8SPP7	21	AAQSLLACGAAR DVQQTLSPGDELYK	141-152 166-179
MPO protein	A6QPT4	82	VPALNLAPWR	707-716
Transthyretin	O46375	16	TSESGELHGLTTEDK	69-83
Endopin 2	Q3SZQ8	47	LAVSHVIHK	348-356
Cartilage matrix protein	E1BMV3	54	AGGIELFAIGVGR	171-183
Cathelicidin 5	B9UKL5	18	YGPIIVPIIR	148-157
Collagen alpha-3(VI)	E1BB91	342	LLTPLTTLTAGQIQQLLASTR VSVVALTPSGPVEAFDFAEYQPELFEK	1405-1425 1888-1914
Collagen alpha-1(VI) chain precursor	L8I543	108	AAEYDVVFGER	984-994
Collagen alpha-2(I) chain	L8HQF7	129	GEPGPAGAVGPAGAVGPR IGQPGAVGPAGIR	979-996 1068-1080

Table 4. List of prohibited porcine specific peptides identified in different samples of PAPs using MS/MS analyses with the homemade "AllUniprot" database (focused on ruminantia, suina, rodentia and aves). The four peptides in bold were injected in rabbits to produce antibodies. With the focus on these 4 peptides, all pork PAPs samples (n = 9) were detected as porcine.

Protein	UniProt accession	PM (kDa)	Biomarker peptide sequence	AA position
Desmin	P02540	54	**TSGGAGGLGPLR**	59-70
Carbonic anhydrase 3	Q5S1S4	29	**HDPSLLPWTASYDPGSAK** **GGPLTAAYR**	40-57 81-89
Heat shock protein beta-1	Q5S1U1	23	**PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR**	58-77
Myosin-7	F1S9D6	223	DVYVPDDK LLSNLFANYAGADTPVEK	36-43 616-633
HUMMLC2B (myosin)	A1XQT5	19	HFLEELLTTQCDR	118-130
Myoglobin	P02189	17	GHHEAELTPLAQSHATK	81-97
Myosin-binding protein C, fast-type	F1RH20	128	PEGAGELDFSGLLK ADISSFVIESAER	176-189 597-609
Heat shock protein beta-6	F1RM62	17	LPPGVDPAAVTSALSPEGVLSIQA- APAPAQGPLPSPPAAAK	123-163
Calsarcin 3	Q1AG05	26	TPVPFGGLLAGETLPR AGTPSVPELSSGLELLR	191-206 207-223
Titin	O97771	24	AVEEVEAPPAAVPK	72-85
Sarcalumenin	F1RK48	95	AITQDLPGLLGSLGLGK	840-856

Table 5. List of prohibited ovine specific peptides identified in different samples of PAPs using MS/MS analyses with the homemade "AllUniprot" database (focused on ruminantia, suina, rodentia and aves). With the focus on these 5 peptides, all sheep PAPs samples (n = 4) were detected as ovine.

Protein	UniProt accession	PM (kDa)	Biomarker peptide sequence	AA position
Beta-K globin chain	Q1A2D1	16	FFEHFGDLSNADAVMNNPK HHGNEFTPVLQADFQK	40-58 116-131
Beta-A globin chain	Q1KYZ7	16	HHGSEFTPVLQAEFQK	116-131
Alpha globin chain	Q28743	15	VGGNAGAYGAEALER	18-32
Alpha globin chain	Q28745	15	LLSHTLLVTLACHLPNDFTPAVHASLDK	101-128

Table 6. Presence or absence of the 3 selected bovine peptides in the different bovine samples (4 samples from CRA-W and 2 samples from NIFES). These three peptides were selected for antibody production and for targeted analysis with the triple quadrupole. P1: AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK; P2: ALPAAAIEGPAYNR; P3: SATQSAEITIPVTFQAR. v: present; x : absent; x(v): absent with the Q-TOF but detected with the triple quadrupole.

Bovine samples	P1 bovine	P2 bovine	P3 bovine
1	v	v	v
2	v	v	v
3	x	v	v
4	v	v	x (v)
5	v	v	v
6	v	x (v)	x (v)

Table 7. Presence or absence of the 4 selected porcine peptides in the different porcine samples (5 samples from CRA-W and 4 samples from NIFES). These four peptides were selected for antibody production and for targeted analysis with the triple quadrupole. P1: TSGGAGGLGPLR; P2: PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR; P3: GGPLTAAYR; P4: HDPSLLPWTASYDPGSAK. v: present; x : absent; ; x(v): absent with the Q-TOF but detected with the triple quadrupole.

Porcine samples	P1 porcine	P2 porcine	P3 porcine	P4 porcine
1	v	v	x (v)	v
2	v	v	x	x
3	v	x	x	v
4	v	x	v	x (v)
5	v	v	v	v
6	v	x	v	x (v)
7	v	v	x	x
8	x	v	x	v
9	v	v	v	x

Table 8. Presence or absence of the 5 ovine peptides in the different ovine samples (2 samples from CRA-W and 2 samples from NIFES). P1: FFEHFGDLSNADAVMNNPK; P2: HHGNEFTPVLQADFQK; P3: HHGSEFTPVLQAEFQK; P4: VGGNAGAYGAEALER; P5: LLSHTLLVTLACHLPNDFTPAVHASLDK. v: present; x : absent.

Ovine samples	P1 ovine	P2 ovine	P3 ovine	P4 ovine	P5 ovine
1	v	v	v	v	x
2	v	v	v	v	v
3	v	v	v	v	v
4	x	x	v	v	x

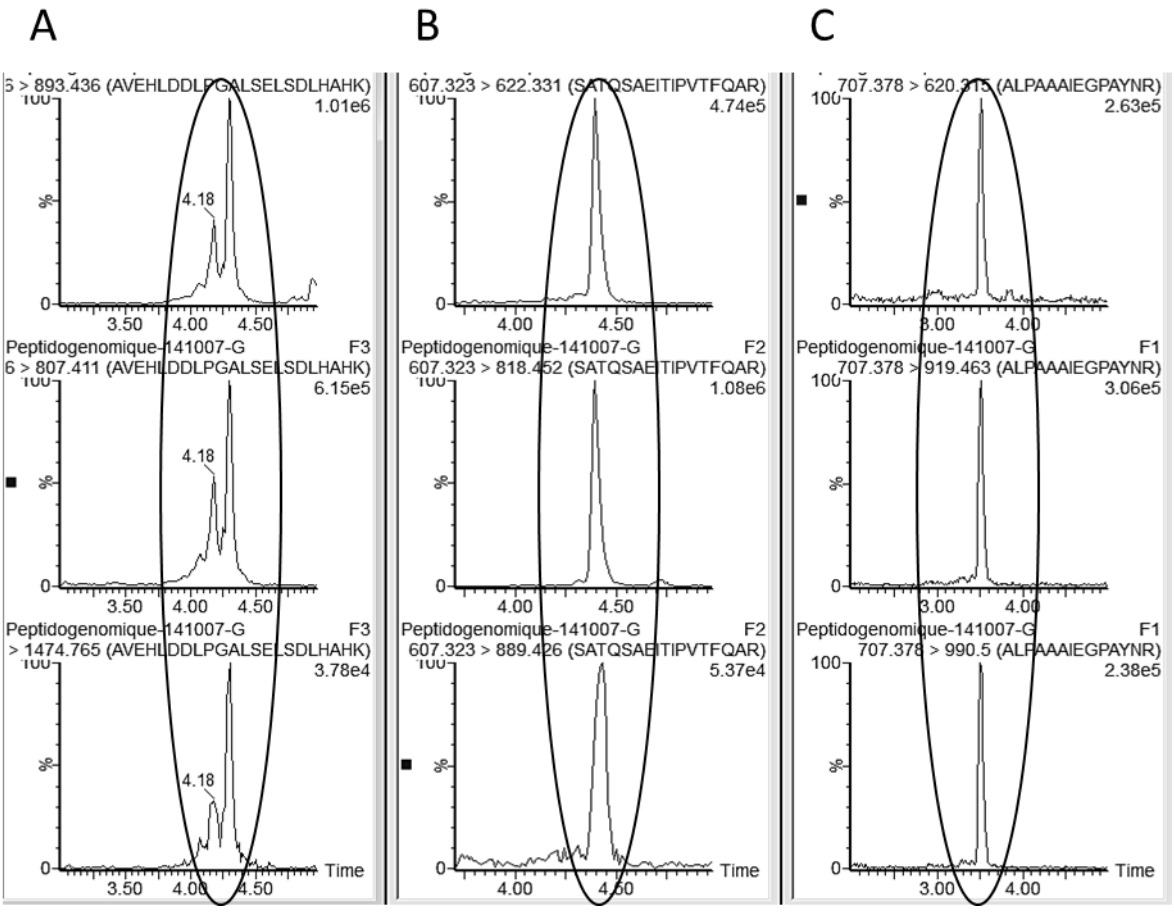


Figure 2. MS analysis of a representative bovine PAP sample using a triple quadrupole mass spectrometer (run of 20 min). The gel-free protocol was applied and the triple quadrupole MS set to target three selected bovine peptides: (A) AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK, (B) SATQSAEITIPVTFQAR, (C) ALPAAAIEGPAYNR. The signal intensity corresponding to 100 % appears in the upper right corner for each transition (cfr Table 2).

not optimal for our study. Moreover collagen peptides are not necessarily relevant biomarkers for the detection of prohibited PAPs, since for instance porcine and poultry gelatin (partially hydrolyzed collagen) is authorized in feeding stuffs (Table 1).

In this study, we identified a certain number of specific peptides: 24 bovine (Table 3) and 15 porcine (Table 4). We identified only 5 ovine specific peptides (Table 5), which was predictable since ovine protein databases remain presently far of complete compared to the other species. All identified peptides were blasted against the entire NCBI database to check their specificity. The experimental confirmation of the peptide specificity is difficult, since it is extremely hard to obtain 100 % pure samples. Among these specific peptides, three bovine peptides (AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK from hemoglobin alpha, ALPAAAIEGPAYNR & SATQSAEITIPVTFQAR from heat shock protein beta-1) and four porcine peptides (TSGGAGGLGPLR from desmin, HDPSLLPWTASYDPGSAK & GGPLTAAYR from carbonic anhydrase 3, PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR from heat shock protein beta-1) were selected in order to produce rabbit antibodies in collaboration with the CER Groupe (Centre d'Economie Rurale, Marloie, Belgium) and to set up ELISAs for the detection of specific markers directly in feeding stuffs (study ongoing). These selected peptides were the most abundant and the most robust in the PAPs analyzed in this study. The peptides of Tables 3, 4 and 5 correspond to prohibited tissues in European countries (blood or muscle from ruminants and muscle from pork) and are thus relevant for the detection of prohibited PAPs in feeding stuffs in Europe. As shown in Table 6, we were able to detect beef in the 6 bovine samples with the set of the 3 most abundant peptides mentioned above. Table 7 shows that we were able to detect pork in the 9 porcine samples with the set of the 4 most abundant peptides cited above. Similar results were obtained for the 4 ovine samples with the 5 ovine peptides (Table 8). We considered the sample positive for a prohibited species when at least one peptide marker was detected. It is quite predictable that all the peptides would not be detected in all the samples given the intrinsic heterogeneity in composition of PAPs samples. That is why a set of 3 to 5 peptides is proposed to reduce the risk of false negatives and to increase the specificity and the sensitivity of the method.

The first and principal strategy in this study was to establish peptide biomarker lists using a Q-TOF mass spectrometer. After this powerful but time-consuming non-targeted approach, we wanted to shift to a targeted routine triple quadrupole mass spectrometer, with high selectivity and reducing the duration of analyses. The most abundant specific peptides for beef (3 markers) and pork (4 markers) identified with the Q-TOF were used for setting up this MS routine assay. After optimization of the collision energy, retention times of target peptides were estimated with synthetic peptides. A search for three bovine selected peptide markers was realized in beef PAP samples. As shown in Figure 2, the three selected bovine peptides were found in beef samples in only 20 minutes. At least three transitions with matching signal ratios and retention time were required to ensure unambiguous identification. Similar results were obtained with the four porcine peptides in pork PAPs (data not shown). In a total run of only 20 min, we were able to detect beef and pork in highly processed PAPs samples. The

Supplementary Table 1. Presence or absence of the 3 selected bovine peptides and the 4 selected porcine peptides in three industrial samples analyzed with the triple quadrupole. P1 bovine: AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK; P2 bovine: ALPAAAIEGPAYNR; P3 bovine: SATQSAEITIPVTFQAR; P1 porcine: TSGGAGGLGPLR; P2 porcine: PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR; P3 porcine: GGPLTAAYR; P4 porcine: HDPSLLPWTASYDPGSAK. v: present; x : absent.

Samples	P1 bovine	P2 bovine	P3 bovine	P1 porcine	P2 porcine	P3 porcine	P4 porcine
Porcine meal treated at 145 °C	x	x	x	v	v	v	x
Bovine meal treated at 137 °C	v	v	v	x	x	x	x
Poultry meal treated at 133 °C	x	x	x	x	x	x	x

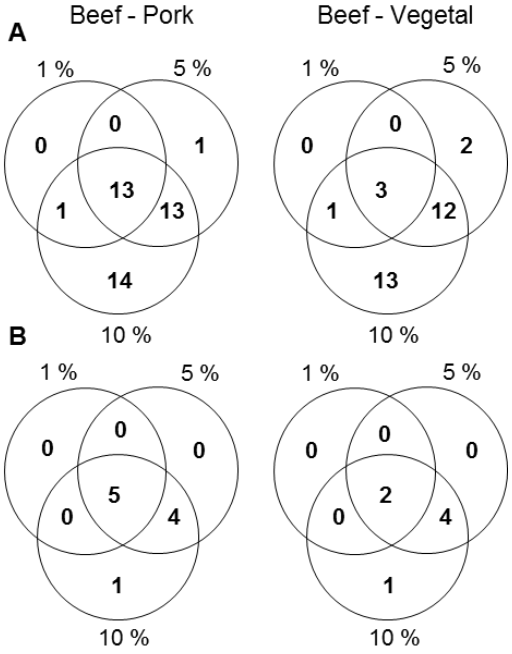


Figure 3. Venn's diagrams illustrating the number of bovine unique peptides (A) and bovine proteins (B) identified in different mixtures of beef PAPs (1, 5 and 10 %) mixed to porcine PAPs or to a vegetal feed. The extracts were digested using trypsin (trypsin/protein ratio: 1/20) during 5 hours, prior to MS/MS analysis with the Q-TOF mass spectrometer. This experiment was carried out on 4 samples. These diagrams represent an example for a beef-pork sample and a beef-vegetal sample. The trend is the same for all samples.

data shown in Tables 6 and 7 also confirm the high selectivity of the targeted approach, since for some samples the presence of peptide biomarkers was detected only with the triple quadrupole.

We have realized a search for the 3 bovine peptides and the 4 porcine peptides with a triple quadrupole on several industrial samples: porcine meal, bovine meal and poultry meal assessed by PCR as pure (Supplementary Table 1). Three of the 4 porcine peptides but none of the bovine peptides were identified in the sample of porcine meal. The 3 bovine peptides but none of the porcine peptides were identified in the sample of bovine meal. None of the bovine and none of the porcine peptides were identified in the sample of poultry meal. Several proteins (heat shock protein beta-1, myosin light chain 2, creatine kinase M-type and filamin C) from Gallus gallus were identified with the Q-TOF in the poultry meal sample. The 3 bovine and the 4 porcine peptides show a good experimental specificity.

Sensitivity of detection

The concept of « zero tolerance » for the presence of ruminant PAPs in non-ruminant PAPs based feeds has spread in some European countries in order to limit the dissemination of BSE. However, the EFPRA suggested that this concept is practically impossible to apply. Based on an EFSA opinion[39], they proposed a level of tolerance of 2 % of ruminant PAPs in non-ruminant PAPs.[40] Therefore, we have evaluated whether our proteomic-based approach was sensitive enough to detect the presence of bovine PAPs at low levels. To estimate the sensitivity of our method, we spiked porcine and vegetal samples with different amounts (0, 1, 5 and 10 %) of beef. The sensitivity and the robustness of our method were evaluated by the detection of bovine material in each mixture using MS/MS analyses with the Q-TOF and with the triple quadrupole.

First MS analyses were realized with the Q-TOF as illustrated in Figure 3, showing the Venn's diagrams with the number of bovine unique peptides (A) and proteins (B) identified in the different mixtures. Bovine peptides and proteins were identified in the two types of mixtures and for all the tested percentages. The number of identifications increased as a function of the percentage of beef in pork PAPs and in vegetal feed. However, no specific bovine peptide was identified in the 1 % w/w beef mix in pork PAPs and only one specific bovine peptide (GEPGPAGAVGPAGAVGPR from collagen alpha-2(I) (*Bos taurus*)) was identified in the 1 % w/w beef mix in vegetal feed. Indeed, given the high homology of several of the identified proteins between the target species, not all the bovine peptides were bovine specific. In the 5 % mix, we identified two specific peptides: AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK and VGGHAAEYGAEALER from hemoglobin subunit alpha (*Bos taurus*). In the 10 % mix, we identified one more specific peptide: NFGNEFTPVLQADFQK from hemoglobin beta (*Bos taurus*).

We have also tested the limit of detection with a routine triple quadrupole mass spectrometer in targeted mode to improve the sensitivity of the analysis. We searched for the three selected bovine peptides (AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK from hemoglobin alpha,

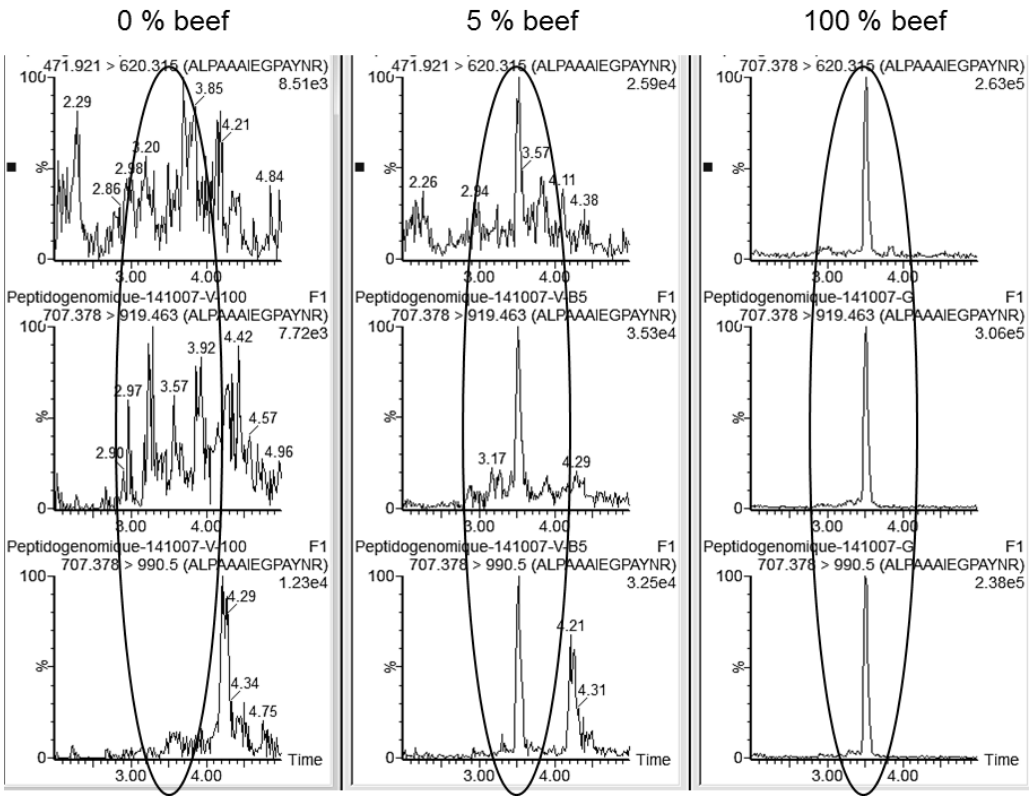


Figure 4. MS analysis of a vegetal feed (0 % beef), a mixture of bovine PAPs in a vegetal feed (5 % w/w beef) and a sample of bovine PAPs (100 % beef) using a triple quadrupole mass spectrometer. The gel-free protocol was applied and the triple quadrupole set to target the bovine peptide ALPAAAIEGPAYNR from heat shock protein beta-1. The signal intensity corresponding to 100 % appears in the upper right corner for each transition.

ALPAAAIEGPAYNR & SATQSAEITIPVTFQAR from heat shock protein beta-1) in all mixtures (pork PAPs and vegetal feed). These three bovine peptides were easily identified in the mixtures of 5 % w/w and 10 % w/w but not in 1 % w/w mix of beef PAPs. Figure 4 shows an example of the search for the peptide ALPAAAIEGPAYNR from heat shock protein beta-1 in the different samples of bovine PAPs mixed to a vegetal feed. This peptide was indeed detected in the 100 % bovine PAP sample and in the mixture containing 5 % w/w of beef PAPs with a retention time at 3 minutes 50, but was not detected in the vegetal feed, that can be considered as a negative control for the selected bovine and porcine markers in MRM. We obtained similar results with 2 other bovine peptides (data not shown). So, bovine PAPs present at 5 % w/w were detected with either the Q-TOF or the triple quadrupole.

Concluding remarks

In this study we propose a workflow using a TCA-acetone protein extraction and a "clean-up" followed by an in-solution tryptic digestion of 5 hours (with a 1/20 protein/trypsin ratio) and mass spectrometry analyses for a peptidomic approach set up to detect prohibited PAPs. This method, able to identify both species and origin of the product, overcomes some of the limitations of the official methods to analyze PAPs. With this technique, it is feasible to detect and identify prohibited PAPs in feeding stuffs taking advantage of 24 bovine, 15 porcine and 5 ovine specific peptides. In case of suspicious feeds, such as for example, samples with terrestrial particles observed by microscopy and positive signals for ruminants and pork by PCR, our MS-based approach allows to distinguish between a banned and an authorized product making the difference between a feed composed of pork PAPs and milk products (allowed for fish) and a feed composed of bovine PAPs and porcine blood (banned). Therefore, this MS-based method improves and refines the current methods used for PAP identification.

ACKNOWLEDGMENT

Hélène Marbaix was supported by a fellowship of the Belgian Federal Public Service of Health, Food Chain Safety and Environment (contract RF 11/6243 PEPTIDO-GENOMIQUE) and by the UNamur (FSR fellowship). The authors thank the CRA-W and the EFPRA for providing the PAPs samples. The MaSUN MS platform is supported by the FNRS/FRFC 2.4.569.09F and the UNamur.

ABBREVIATIONS

PAPs, Processed Animal Proteins; BSE, Bovine Spongiform Encephalopathy; ESI, Electrospray Ionization; MS, Mass Spectrometry; CRA-W, Centre wallon de Recherches agronomiques ; NIFES , National Institute of Nutrition and Seafood Research; TCA; Trichloroacetic Acid; HCl, Hydrochloric Acid; SDS, Sodium Dodecyl Sulfate; DLA buffer, DIGE Labelling buffer; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; PAGE, Polyacrylamide Gel Electrophoresis; LDS, lithium dodecyl sulfate; DTT, Dithiothreitol; Q-TOF, Quadrupole Time-Of-Flight; UHR, Ultra-High Resolution; UHPLC, Ultra High Performance Liquid Chromatography; FA, Formic Acid; CID, Collision-Induced Dissociation; MRM, Multiple Reaction Monitoring; BLAST, Basic Local Alignment Search Tool; CER, Centre d'Economie Rurale ; ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; LIT, Linear Ion Trap; PCR, Polymerase Chain Reaction; w/w, weight in weight

REFERENCES

1. van Raamsdonk, L. W. D.; von Holst, C. B., V.; Berben, G.; Boix, A.; de Jong, J., New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feeds. *Animal Feed Science and Technology* **2007**, *133*, 63-83.
2. Parliament, E.; Council, Regulation (CE) N°1069/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) N° 1774/2002 (Animal by-products Regulation). In Official Journal of European Union, 2009; Vol. L300, pp 1-33.
3. Woodgate, S.; van der Veen, J., The role of fat processing and rendering in the European Union animal production industry. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **2004**, *8*, 283-294.
4. Commission, Commission Regulation (EU) N° 142/2011 of 25 February 2011 implementing Regulation (EC) N° 1069/2009 of the European Parliament and of the Council laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and implementing Council Directive 97/78/EC as regards certain samples and items exempt from veterinary checks at the border under that Directive. In Official Journal of the European Union, 2011; Vol. L54, pp 1-254.
5. Reaney, S.; Jørgensen, J. S., BSE-PAP: the story of a feed safety issue. In *Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs.*, Jørgensen, J. S., Baeten, V., Ed. Les presses Universitaires de Namur: 2012; pp 17-21.
6. Wilesmith, J. W.; Wells, G. A.; Cranwell, M. P.; Ryan, J. B., Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Veterinary Record* **1988**, *123*, 638-44.
7. Parliament, E.; Council, Regulation (EC) N° 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. In Official Journal of the European Communities, 2001; Vol. L147, pp 1-40.
8. Commission, Commission Regulation (EC) N° 1234/2003 of 10 July 2003 amending Annexes I, IV and XI to regulation (EC) N° 999/2001 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) N° 1326/2001 as regards transmissible spongiform encephalopathies and animal feeding. In Official Journal of the European Union 2003; Vol. L173, pp 6-13.
9. Commission, Commission Regulation (EU) N° 56/2013 of 16 January 2013 amending Annexes I and IV to Regulation (EC) N° 999/2001 of the European Parliament and of the

Council laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. In Official Journal of the European Union, 2013; Vol. L21, pp 3-16.
10. Commission, Communication from the Commission to the European Parliament and the Council. The TSE Road map 2, A Strategy paper on Transmissible Spongiform Encephalopathies for 2010-2015. In 2010.
11. Commission, Commission Directive 98/88/EC of 13 November 1998 establishing guidelines for the microscopic identification and estimation of constituents of animal origin for the official control of feedingstuffs In Official Journal of the European Communities, 1998; Vol. L318, pp 45-50.
12. Commission, Commission Regulation (EC) N° 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. In Official Journal of European Union, 2009; Vol. L54, pp 1-130.
13. Liu, X.; Han, L.; Veys, P.; Baeten, V.; Jiang, X.; Dardenne, P., An overview of the legislation and light microscopy for detection of processed animal proteins in feeds. *Microscopy research and technique* **2011**, *74*, 735-43.
14. Axmann, S.; Adler, A.; Brandstettner, A. J.; Spadinger, G.; Weiss, R.; Strnad, I., Species identification of processed animal proteins (PAPs) in animal feed containing feed materials from animal origin. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2015**, *32*, 1089-98.
15. Claydon, A. J.; Grundy, H. H.; Charlton, A. J.; Romero, M. R., Identification of novel peptides for horse meat speciation in highly processed foodstuffs. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2015**, *32*, 1718-29.
16. D'Alessandro, A.; Zolla, L., We are what we eat: food safety and proteomics. *Journal of proteome research* **2012**, *11*, 26-36.
17. Piras, C.; Roncada, P.; Rodrigues, P. M.; Bonizzi, L.; Soggiu, A., Proteomics in food: quality, safety, microbes and allergens. *Proteomics* **2015**.
18. Sentandreu, M. A.; Fraser, P. D.; Halket, J.; Patel, R.; Bramley, P. M., A proteomic-based approach for detection of chicken in meat mixes. *Journal of proteome research* **2010**, *9*, 3374-83.
19. von Bargen, C.; Brockmeyer, J.; Humpf, H. U., Meat authentication: a new HPLC-MS/MS based method for the fast and sensitive detection of horse and pork in highly processed food. *Journal of agricultural and food chemistry* **2014**, *62*, 9428-35.
20. von Bargen, C.; Dojahn, J.; Waidelich, D.; Humpf, H. U.; Brockmeyer, J., New sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of horse and pork in halal beef. *Journal of agricultural and food chemistry* **2013**, *61*, 11986-94.
21. Flaudrops, C.; Armstrong, N.; Raoult, D.; Chabrière, E., Determination of the animal origin of meat and gelatin by MALDI-TOF-MS. *Journal of Food Composition and Analysis* **2015**, *41*, 104-112.
22. Montowska, M.; Pospiech, E., Species-specific expression of various proteins in meat tissue: proteomic analysis of raw and cooked meat and meat products made from beef, pork and selected poultry species. *Food chemistry* **2013**, *136*, 1461-9.
23. Sentandreu, M. A.; Sentandreu, E., Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity. *Meat science* **2011**, *89*, 280-5.
24. Montowska, M.; Alexander, M. R.; Tucker, G. A.; Barrett, D. A., Authentication of processed meat products by peptidomic analysis using rapid ambient mass spectrometry. *Food chemistry* **2015**, *187*, 297-304.
25. Balizs, G.; Weise, C.; Rozycki, C.; Opialla, T.; Sawada, S.; Zagon, J.; Lampen, A., Determination of osteocalcin in meat and bone meal of bovine and porcine origin using

matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry and high-resolution hybrid mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta* **2011**, *693*, 89-99.
26. Lucker, E.; Biedermann, W.; Alter, T.; Hensel, A., GC/MS detection of central nervous tissue as specified BSE risk material in meat products and meat and bone meals: thermal stability of markers in comparison with immunochemistry and RT-PCR. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2010**, *398*, 963-72.
27. Buckley, M.; Collins, M.; Thomas-Oates, J.; Wilson, J. C., Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, *23*, 3843-54.
28. Reece, P.; Chassaigne, H.; Collins, M.; Buckley, M.; Bremer, M.; Grundy, H., Proteomic analysis of meat and bone meal and animal feed. In *Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs.*, Jørgensen, J. S., Baeten, V., Ed. Les presses Universitaires de Namur: 2012; pp 113-124.
29. Bell, M. P.; Nwff, T. B.; Polarek, J. W.; Seeley, T. W. Animal Collagen and gelatines World Patent PCT/O34647. 2001.
30. Keller, A.; Nesvizhskii, A. I.; Kolker, E.; Aebersold, R., Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Analytical chemistry* **2002**, *74*, 5383-92.
31. Nesvizhskii, A. I.; Keller, A.; Kolker, E.; Aebersold, R., A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry* **2003**, *75*, 4646-58.
32. Carpentier, S. C.; Witters, E.; Laukens, K.; Deckers, P.; Swennen, R.; Panis, B., Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* **2005**, *5*, 2497-507.
33. Mechin, V.; Damerval, C.; Zivy, M., Total protein extraction with TCA-acetone. *Methods in molecular biology* **2007**, *355*, 1-8.
34. Hao, R.; Adoligbe, C.; Jiang, B.; Zhao, X.; Gui, L.; Qu, K.; Wu, S.; Zan, L., An Optimized Trichloroacetic Acid/Acetone Precipitation Method for Two-Dimensional Gel Electrophoresis Analysis of Qinchuan Cattle Longissimus Dorsi Muscle Containing High Proportion of Marbling. *PloS one* **2015**, *10*, e0124723.
35. Yong-feng, C.; Zhen, Y.; Bao-hua, Z.; Lu-wei, X.; Pei-jian, T., Application of trichloroacetic acid-acetone precipitation method for protein extraction in bone tissue. *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae* **2011**, *33*, 210-3.
36. Switzar, L.; Giera, M.; Niessen, W. M., Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *Journal of proteome research* **2013**, *12*, 1067-77.
37. Buckley, M.; Penkman, K. E.; Wess, T. J.; Reaney, S.; Collins, M. J., Protein and mineral characterisation of rendered meat and bone meal. *Food chemistry* **2012**, *134*, 1267-78.
38. Ocaña, M. F.; Neubert, H.; Przyborowska, A.; Parker, R.; Bramley, P.; Halket, J.; Patel, R., BSE Control: Detection of gelatine-derived peptides in animal feed by mass spectrometry. *The Analyst* **2004**, *129*, 111-115.
39. EFSA, Scientific Opinion on the revision of the quantitative risk assessment (QRA) of the BSE risk posed by processed animal proteins (PAPs). *The EFSA Journal* **2011**, *9*.
40. Fumière, O.; Veys, P.; Boix, A.; von Holst, C.; Baeten, V.; Berben, G., Methods of detection , species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **2009**, *13*, 59-70.

Tableau 8. Liste des peptides spécifiques à la volaille identifiés par spectrométrie de masse grâce à la base de données « AllUniprot » (ciblée sur ruminantia, suina, rodentia and aves).

Protein	UniProt accession	PM (kDa)	Biomarker peptide sequence	AA position
Myosin-11	P10587	229	DNADLANEIR LQIEVENVTSLLNEAESK EEMAEELASANSGR IAQLEEELDEEHSNIETMSDR	1238-1247 1291-1308 1717-1730 1744-1764
Desmin	O73665	52	TFGGGTSPVFPR TSAVPTLSTFR	8-19 41-51
Heat shock protein beta-1	F1P593	22	VPFTFLTSPSWEPFR LLPSESALLPAPGSPYGR	6-20 57-74
Myosin regulatory light chain 2	P02609	19	SFLEELLTTQCDR	117-129
Creatine kinase M-type	P00565	43	LSVEALNSLEGEFK	157-170
Filamin C	Q90WF0	280	LLGWVQHR AYGPGLEPQGNVVLQPAR SVPVAVESAGPGLHR FTAAEEGQLR AVVPSGGPHVGAR VLASGPGLSPSGVPASLPVEFAIDAR	161-168 276-293 1000-1014 1017-1026 1268-1280 1529-1554

1.3. Résultats complémentaires au manuscrit « Identification of proteins and peptide biomarkers for detecting banned Processed Animal Proteins (PAPs) in meat and bone meal by mass spectrometry »

1.3.1. Peptides biomarqueurs de volaille

Des farines de volaille et de plumes provenant du CRA-W et du NIFES ont été utilisées afin d'identifier des peptides marqueurs pour l'espèce *Gallus gallus*. Dans ces échantillons, on retrouve des protéines du sang (hémoglobine, albumine sérique…), des protéines musculaires (myosine, desmine…) et également beaucoup de kératine puisque cette protéine est l'un des constituants primordial des plumes. Il faut toujours bien garder à l'esprit que le but de ce travail est d'identifier les PATs prohibées, en conséquence les peptides dits marqueurs doivent révéler la présence de produits interdits. Une liste composée de 16 peptides marqueurs spécifiques à la volaille retrouvés dans ces échantillons est reprise au Tableau 8. Parmi les peptides marqueurs identifiés, on remarque qu'il y a essentiellement des protéines musculaires. En effet, la législation interdit les farines de viande de volaille tandis que les produits de sang de volaille sont autorisés à destination des non-ruminants et des poissons ainsi que la gélatine de volaille à destination de n'importe quel animal (Introduction - Tableau 3). C'est pourquoi, on ne retrouve pas de protéines du sang ni de collagènes dans ce tableau. Ces peptides marqueurs de volaille n'ont pas encore été testés pour la production d'anticorps polyclonaux.

1.3.2. Application de la méthode en routine : analyses supplémentaires en triple quadrupôle

Bien que le spectromètre de masse hybride de type Q-TOF utilisé dans la première partie de ce projet soit un appareil de haute résolution et permette une identification précise des peptides/protéines (Lin *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 1996), le temps d'analyse reste long et la répétabilité en MS/MS reste un point à améliorer à cause de la difficulté technique à réaliser des réplicats vu le temps machine nécessaire. En effet, le Q-TOF est très bien adapté à la recherche de peptides marqueurs dans un mélange complexe sans *a priori*. Toutefois, la transposition de cette approche peptidomique/protéomique 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 quadrupôle est l'un des appareils les plus appropriés. L'utilisation du mode MRM (Introduction - Figure 26 b) permet de détecter des ions spécifiques sans nécessiter une séparation complète des peptides, ce qui permet une analyse chromatographique plus rapide.

Dans le premier manuscrit, nous nous étions intéressés à une éventuelle transposition du protocole de recherche de peptides biomarqueurs avec un Q-TOF à un appareil davantage de routine comme le triple quadrupôle, qui se trouve au CER Groupe. Ce type de spectromètre de masse est donc composé de trois quadrupôles placés en série, le premier sélectionne un

Tableau 9. Liste des 3 peptides bovins et des 4 peptides porcins sélectionnés dans le manuscrit « Identification of proteins and peptide biomarkers for detecting banned Processed Animal Proteins (PAPs) in meat and bone meal by mass spectrometry » pour la production d'anticorps et les analyses de routine avec le triple quadrupôle.

Nom du peptide et espèce	Protéine	Peptides
P1 Bovin	Hemoglobin alpha	AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK
P2 Bovin	Heat shock protein beta-1	ALPAAAIEGPAYNR
P3 Bovin	Heat shock protein beta-1	SATQSAEITIPVTFQAR
P1 Porc	Desmin	TSGGAGGLGPLR
P2 Porc	Heat shock protein beta-1	PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR
P3 Porc	Carbonic anhydrase 3	GGPLTAAYR
P4 Porc	Carbonic anhydrase 3	HDPSLLPWTASYDPGSAK

Tableau 10. Présence ou absence des 3 peptides bovins et des 4 peptides porcins (sélectionnés pour la production d'anticorps et les analyses de routine avec le triple quadrupôle) dans divers échantillons analysés en triple quadrupôle. P1 bovin: AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK (hémoglobine alpha); P2 bovin: ALPAAAIEGPAYNR (Heat shock protein beta-1); P3 bovin: SATQSAEITIPVTFQAR (Heat shock protein beta-1), P1 porcin: TSGGAGGLGPLR (desmine); P2 porcin: PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR (heat shock protein beta-1); P3 porcin: GGPLTAAYR (anhydrase carbonique 3); P4 porcin: HDPSLLPWTASYDPGSAK (anhydrase carbonique 3). v: présent; x : absent; NA : non analysé.

Echantillons	P1 bovin	P2 bovin	P3 bovin	P1 porcin	P2 porcin	P3 porcin	P4 porcin
PATs de bovin (G')	v	v	v	x	x	x	x
PATs de bovin (K)	v	v	v	x	x	x	v
PATs de bovin (N020)	v	v	v	x	x	x	x
PATs de bovin (N021)	x	v	v	NA	NA	NA	NA
PATs de bovin (B CER)	x	v	v	x	x	x	x
PATs de porc (O)	x	x	x	v	v	v	v
PATs de porc (C')	x	x	x	v	v	v	v
PATs de porc (P CER)	x	x	x	v	x	v	v
PATs de mouton (B')	x	x	v	x	x	x	x
PATs de volaille (I)	x	x	x	x	x	x	x

peptide de rapport m/z défini, le second, fonctionnant comme une cellule de collision, fragmente ce peptide et le dernier sépare les fragments peptidiques obtenus selon leur rapport m/z (Introduction - Figure 26). Bien que le triple quadrupôle possède une résolution plus faible par rapport au Q-TOF, cette faible résolution peut être compensée par une sélectivité plus grande de cet appareillage. En effet, le triple quadrupôle a la capacité de détecter plusieurs transitions. Les transitions représentent les couples des rapports m/z d'un ion mère et d'un ion fille que l'expérimentateur renseigne au spectromètre de masse afin qu'il se focalise spécifiquement sur ceux-ci. En se focalisant sur quelques masses lors de son scan, le triple quadrupôle gagne alors en sélectivité. 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 (Aebersold and Mann, 2003; Chalkley, 2010). Nous obtenons donc un chromatogramme en fonction du temps de rétention et de l'intensité de signal pour les différents fragments. Les premiers tests ont montré que nous parvenions à identifier les 3 peptides bovins dans des échantillons de farines bovines complexes grâce à cet appareil. Par la suite du projet, grâce à la synthèse par Eurogentec de 4 peptides porcins dans le but de produire des anticorps polyclonaux, nous avons pu analyser si ces peptides porcins étaient également retrouvés dans des échantillons porcins complexes avec une méthode de routine. En injectant les 7 peptides standards (3 bovins et 4 porcins : Tableau 9) synthétiques et en travaillant par comparaison entre les chromatogrammes des standards et des échantillons, il est possible de détecter la présence de bovin et de porc dans les PATs.

En plus de la détection des deux espèces bovine et porcine, une indication sur la présence de mouton dans les échantillons peut être réalisée grâce au troisième peptide bovin (SATQSAEITIPVTFQAR de heat shock protein beta-1) qui est spécifique aux ruminants. En effet, sa séquence est homologue entre le bovin et l'ovin. Si un autre peptide spécifique à l'ovin était synthétisé, cela nous permettrait également de détecter du mouton en triple quadrupôle. A l'avenir, on pourrait envisager de synthétiser plusieurs peptides de mouton et de volaille afin de détecter davantage d'espèces en triple quadrupôle. Pour l'instant, nous nous sommes focalisés sur la détection de bovin et de porc. Plusieurs échantillons de diverses espèces ont été analysés grâce à cette technique. Les données sur la présence ou l'absence des peptides marqueurs sont résumées dans le Tableau 10. En ce qui concerne l'échantillon de PATs de bovin (G'), la PCR (réalisée par le CRA-W) détecte du matériel porcin (Tableau 24 des annexes). Cependant, nous ne détectons pas de peptide porcin probablement vu la faible quantité de porc dans l'échantillon de bovin. Une étude sur la limite de détection a été réalisée dans le manuscrit et fait l'objet du point suivant (Point 1.3.3.). Par contre, la présence de porc dans l'échantillon de PATs de bovin (K) est confirmée par PCR. Le Tableau 10 montre une identification correcte des espèces pour les différents échantillons. Les peptides bovins sont détectés dans les PATs de bovin, il en est de même pour le porc. En ce qui concerne l'échantillon de PATs de mouton, le P3 bovin (homologue au mouton) est en effet détecté contrairement aux deux autres peptides bovins. Pour l'échantillon de PATs de volaille, aucun

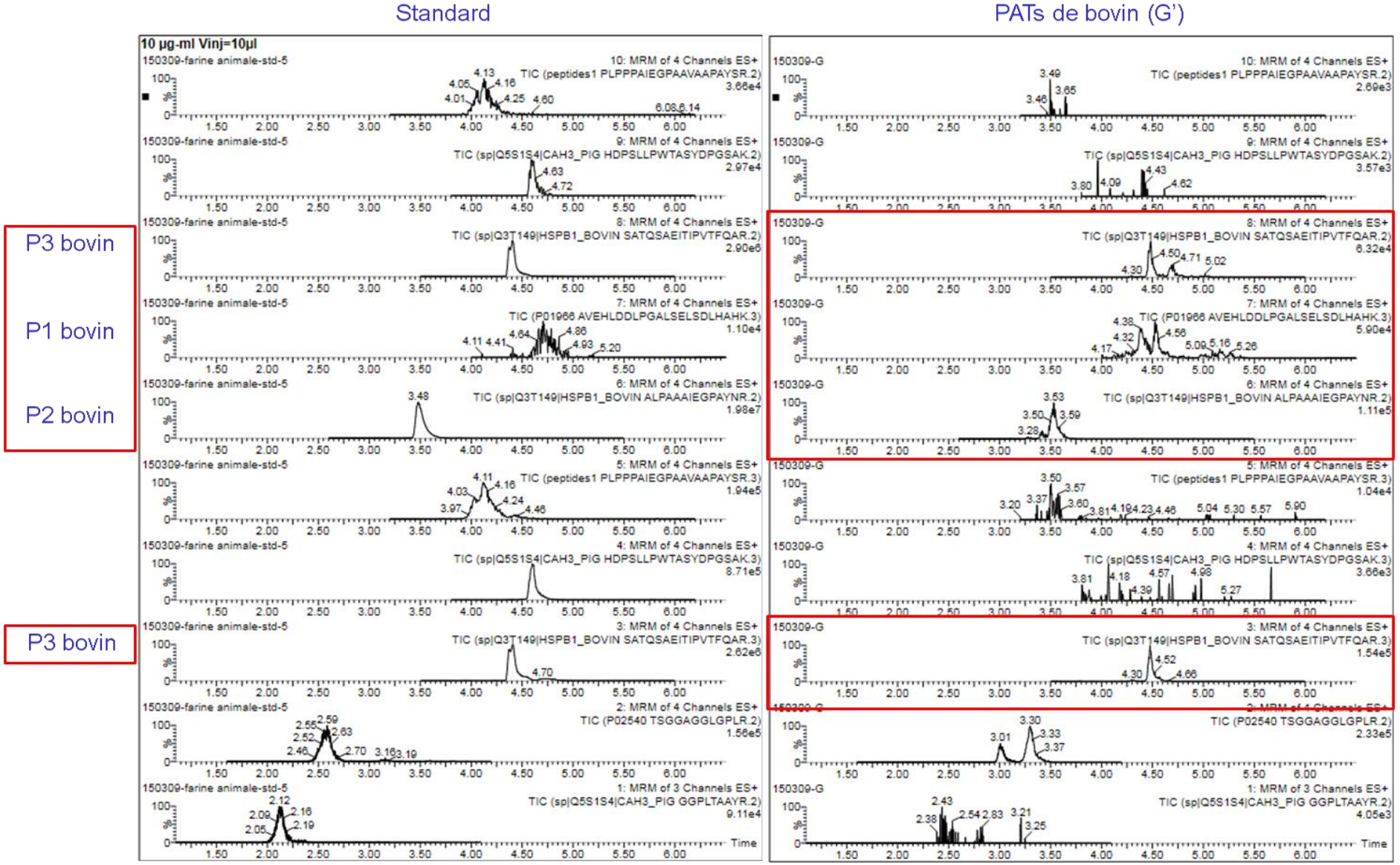


Figure 52. Exemple d'analyse au triple quadrupôle d'un échantillon de PATs de bovin. A gauche: chromatogrammes du standard composé des 7 peptides standards synthétisés par Eurogentec. A droite: chromatogrammes d'un échantillon de PATs de bovin. Les cadres rouges entourent les peptides présents.

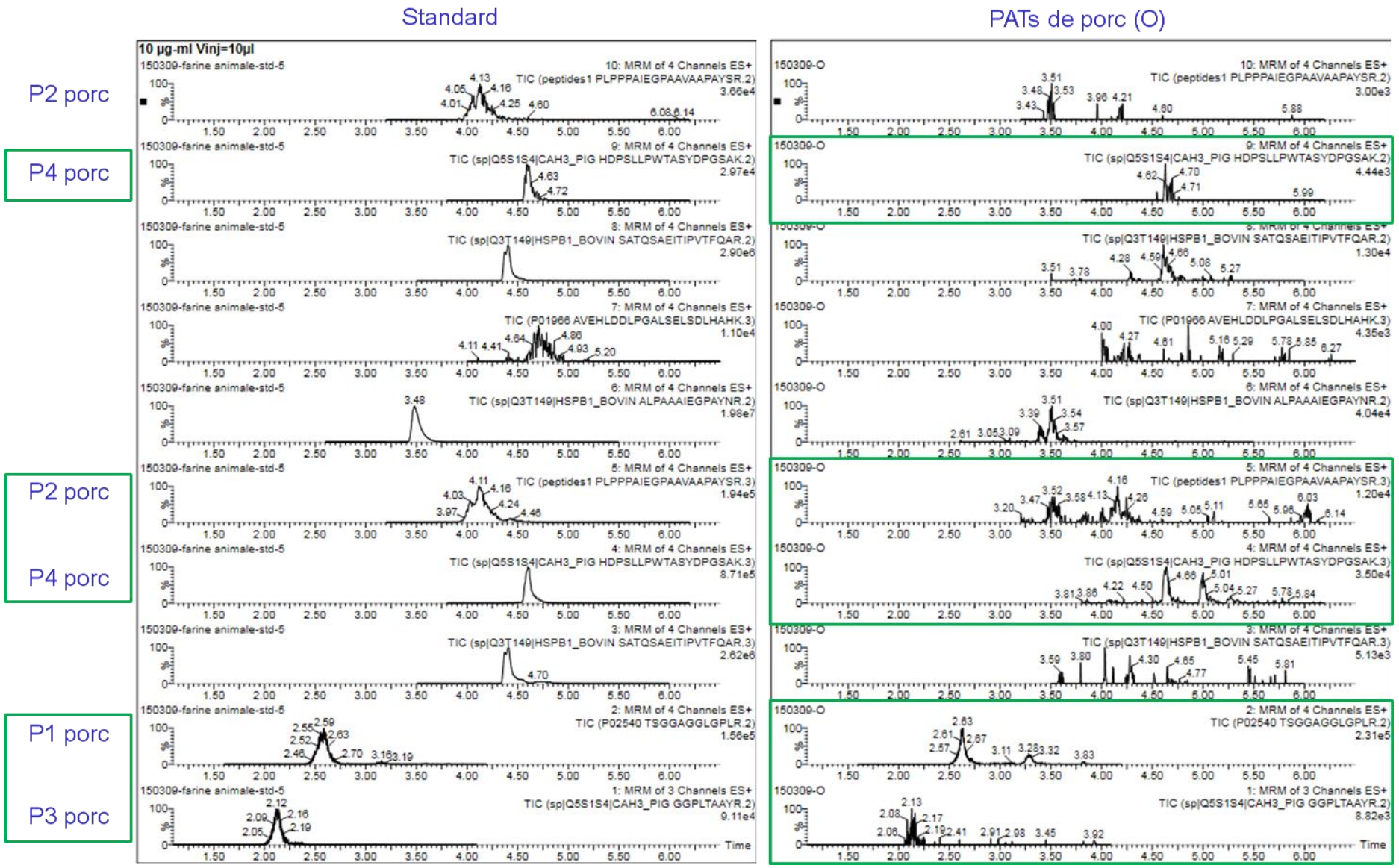


Figure 53. Exemple d'analyse au triple quadrupôle d'un échantillon de PATs de porc. A gauche: chromatogrammes du standard composé des 7 peptides standards synthétisés par Eurogentec. A droite: chromatogrammes d'un échantillon de PATs de porc. Les cadres verts entourent les peptides présents.

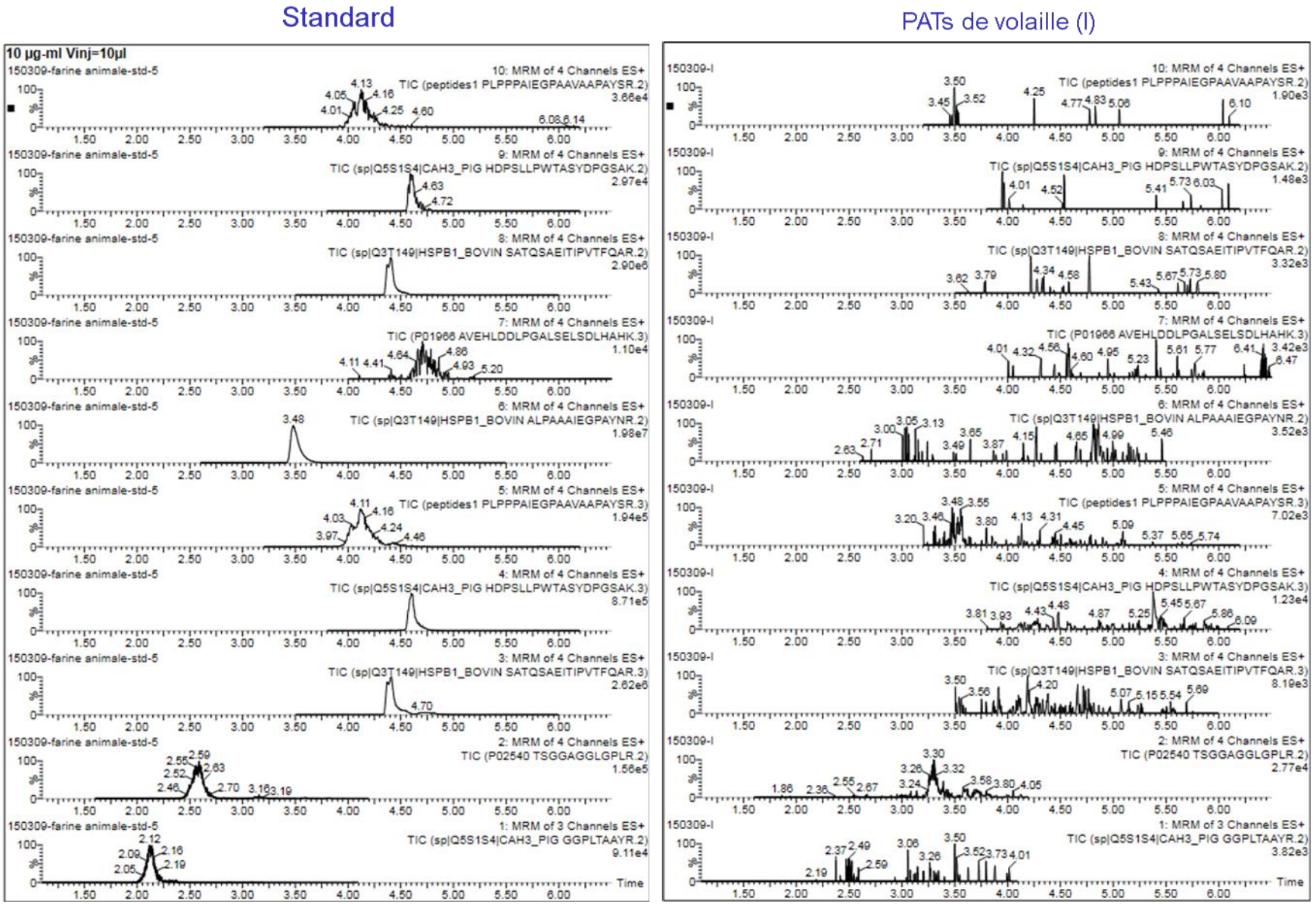


Figure 54. Exemple d'analyse au triple quadrupôle d'un échantillon de PATs de volaille. A gauche: chromatogrammes du standard composé des 7 peptides standards synthétisés par Eurogentec. A droite: chromatogrammes d'un échantillon de PATs de volaille.

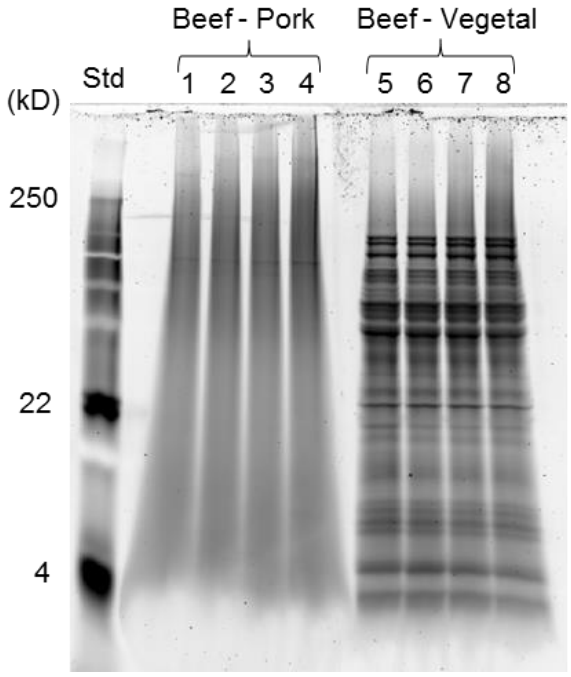


Figure 55. Gel Tris - Glycine 18 % illustrant le profil protéique de différents mélanges de PATs « bovin-porc » et « bovin-végétal » à raison de 0, 1, 5 et 10 %. Pistes 1, 2, 3, 4 : 0, 1, 5, 10 % de PATs de bœuf dans un échantillon de PATs de porc. Pistes 5, 6, 7, 8 : 0, 1, 5, 10 % de PATs de bœuf dans un aliment végétal. Les échantillons ont subi une extraction TCA - acétone suivie d'un « Clean-Up ». L'étalon protéique utilisé est le SeeBlue® Plus2 Prestained Standart kit. Le gel est coloré au krypton et scanné à 460 V par un scanner de type Typhoon 9420 (Amersham Biosciences, GE).

des 7 peptides marqueurs n'est détecté. Pour le moment, il n'est pas possible de détecter de la volaille en triple quadrupôle mais par déduction, on peut dire que cet échantillon ne contient ni du bovin, ni de l'ovin, ni du porc et est donc susceptible d'être un produit de volaille. Des exemples de chromatogrammes d'échantillons de bovin, de porc et de volaille sont représentés aux Figures 52, 53 et 54. Les chromatogrammes représentent ici la moyenne de 3 ou 4 transitions. Chaque chromatogramme de chaque transition est vérifié. Si le pic de l'échantillon correspond au pic du standard pour au moins 3 transitions sur 4, on considère que le peptide est présent. Les chromatogrammes des différentes transitions pour les 7 peptides marqueurs, avec leurs intensités, sont représentés pour un échantillon de PATs de bovin (G') en annexe (Figures 79 à 85).

Il est donc possible d'identifier les 7 peptides biomarqueurs dans des échantillons de PATs avec un appareil de routine nécessitant seulement 20 minutes d'analyse. La méthode peptidomique sans *a priori* « longue » peut donc être transposée à une méthode de routine avec *a priori* beaucoup plus rapide. 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.

1.3.3. Poursuite des expériences portant sur la limite de détection

Un des objectifs de ce travail, une fois la détection de peptides marqueurs mise au point par la méthode protéomique/peptidomique, est de pouvoir déterminer sa sensibilité et sa limite de détection. Une première étude portant sur la limite de détection a été réalisée à l'aide de différents mélanges de farines et fait l'objet d'un point des résultats du premier manuscrit. Le but général de cette expérience est de préciser à quelles concentrations relatives en PATs bovines, les peptides bovins sont effectivement détectés dans des PATs de porc ou dans un aliment végétal comme exemple d'une autre matrice. Le gel de la Figure 55 représente le profil protéique des différents mélanges de PATs « bovin-porc » et « bovin-végétal ». Puisque différentes quantités relatives de farine bovine ont été ajoutées à ces échantillons de porc et de produits végétaux, on pourrait s'attendre à une différence au niveau du profil protéique sur gel. Cependant, aucune différence ne peut être décrite suivant les concentrations relatives croissantes en matériel bovin (de 0 % à 10 %). Par contre, une différence entre échantillons (animal versus végétal) peut être observée. Il faut savoir que les farines végétales sont soumises à des traitements moins drastiques que les farines d'origine animale.

Une deuxième étude portant sur la sensibilité de détection a été réalisée avec quelques modifications par rapport à la première étude. Les modifications portent sur la préparation des échantillons, les pourcentages analysés et les échantillons avec lesquels les mélanges sont réalisés. Les premiers mélanges étaient préparés par pesée, c'est-à-dire que nous pesions 10 mg de PATs de bovin + 190 mg d'aliment végétal pour obtenir le mélange 5 % « bovin-végétal » par exemple. Les deuxièmes mélanges sont préparés par le CRA-W par dilution, c'est-à-dire que pour obtenir le mélange 5 %, on commence par faire le mélange à 10 %. 100

Tableau 11. Présence ou non des 3 peptides bovins et des 4 peptides porcins (sélectionnés pour la production d'anticorps et les analyses de routine avec le triple quadrupôle) dans des mélanges « bovin-végétal » et « bovin-porc » analysés en triple quadrupôle. P1 bovin: AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK (hémoglobine alpha); P2 bovin: ALPAAAIEGPAYNR (Heat shock protein beta-1); P3 bovin: SATQSAEITIPVTFQAR (Heat shock protein beta-1), P1 porcin: TSGGAGGLGPLR (desmine); P2 porcin: PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR (heat shock protein beta-1); P3 porcin: GGPLTAAYR (anhydrase carbonique 3); P4 porcin: HDPSLLPWTASYDPGSAK (anhydrase carbonique 3). v: présent; x : absent.

Echantillons	P1 bovin	P2 bovin	P3 bovin	P1 porcin	P2 porcin	P3 porcin	P4 porcin
0 % Bovin-végétal	x	x	x	x	x	x	x
0,1 % Bovin-végétal	x	x	x	x	x	x	x
0,5 % Bovin-végétal	traces	traces	x	x	x	x	x
1 % Bovin-végétal	x	traces	traces	x	x	x	x
2 % Bovin-végétal	v	v	x	x	x	x	x
5 % Bovin-végétal	v	v	v	x	x	x	x
10 % Bovin-végétal	v	v	v	x	x	x	x
0 % Bovin-porc	x	x	x	v	v	v	v
0,1 % Bovin-porc	x	x	x	v	v	v	v
0,5 % Bovin-porc	traces	x	x	v	v	v	v
1 % Bovin-porc	traces	traces	x	v	v	v	v
2 % Bovin-porc	v	v	x	v	v	v	v
5 % Bovin-porc	v	v	v	v	v	v	v
10 % Bovin-porc	v	v	v	v	v	v	v

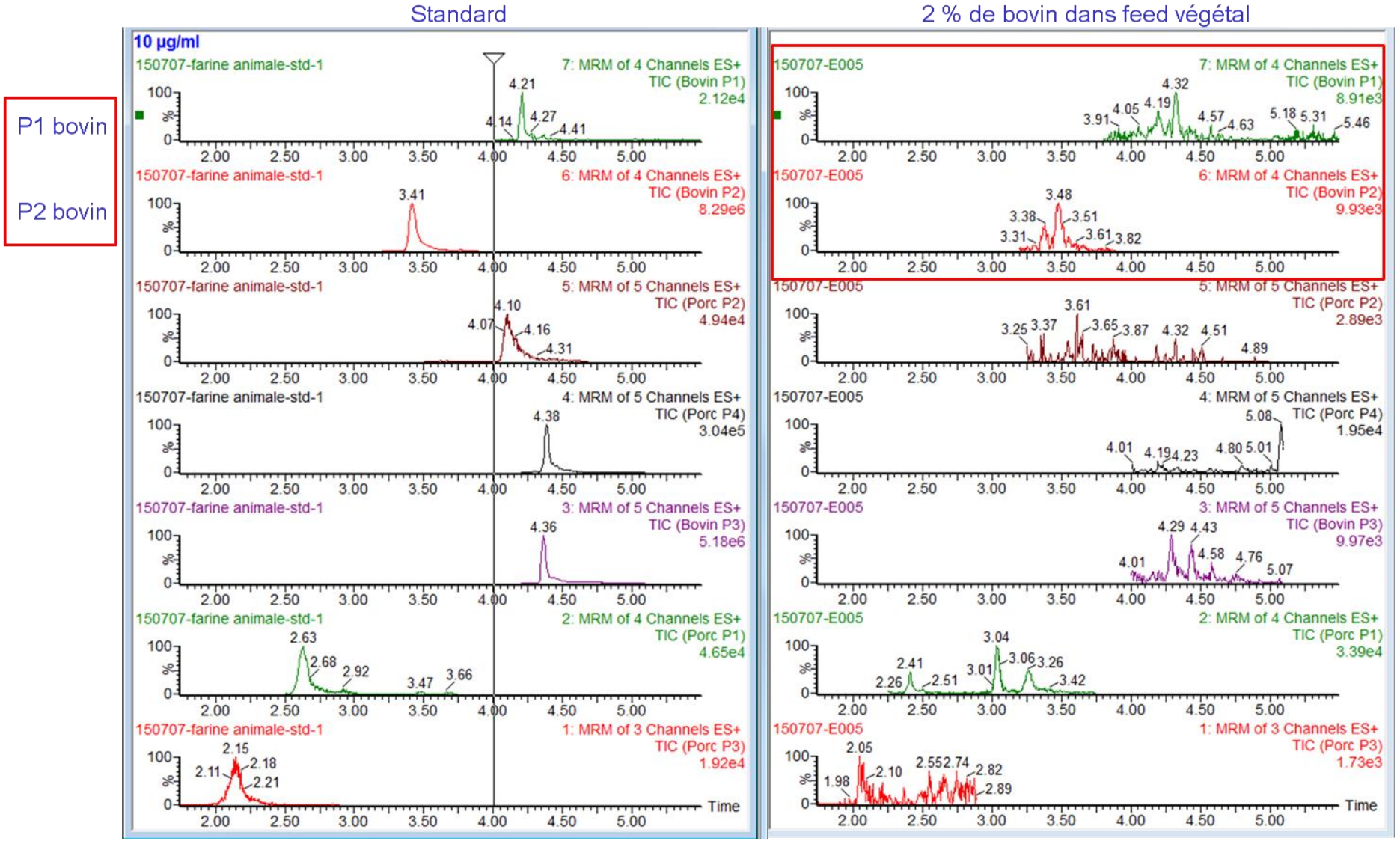


Figure 56. Analyse au triple quadrupôle du mélange 2 % de PATs de bovin dans un aliment végétal. A gauche: chromatogrammes du standard composé des 7 peptides standards synthétisés par Eurogentec. A droite: chromatogrammes de l'échantillon 2 % bovin-végétal.

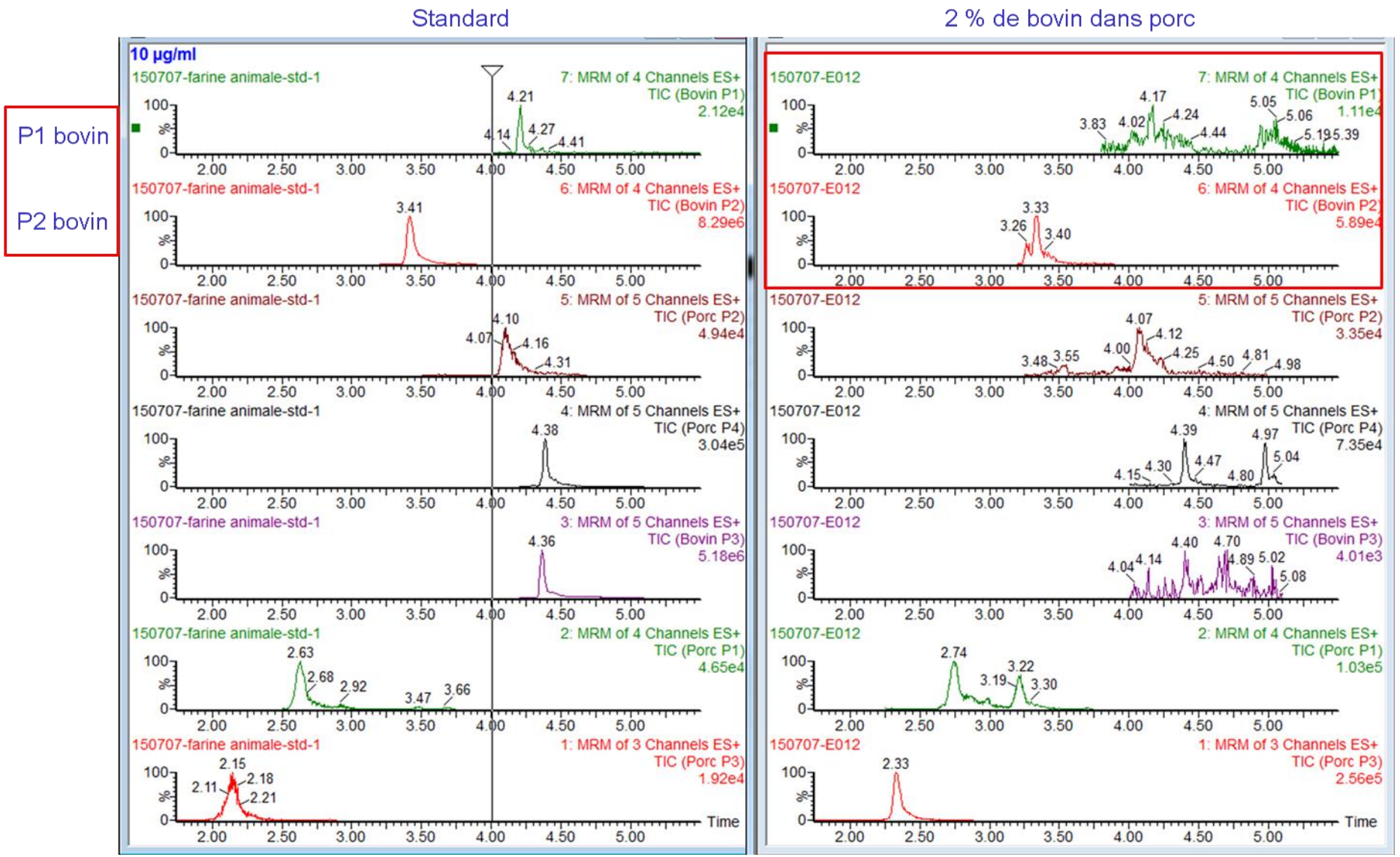


Figure 57. Analyse au triple quadrupôle du mélange 2 % de PATs de bovin dans des PATs de porc. A gauche: chromatogrammes du standard composé des 7 peptides standards synthétisés par Eurogentec. A droite: chromatogrammes de l'échantillon 2 % bovin-porc.

mg de PATs de bovin sont donc pesés et on y rajoute 900 mg d'aliment végétal. On obtient ensuite les mélanges à 5 % par dilution 2 fois en prenant une certaine quantité du mélange à 10 % et en y rajoutant la même quantité d'aliment végétal et ainsi de suite pour obtenir les autres mélanges. On prélève ensuite les 200 mg d'échantillon requis pour l'extraction. La pesée des échantillons est ainsi plus précise car elle se fait sur une quantité plus importante. De plus, nous avons travaillé avec une plus large gamme de pourcentages : 0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 % de PATs de bovin dans des PATs de porc ou dans un aliment végétal. Les mélanges « bovin-végétal » sont réalisés avec les mêmes PATs bovines que pour la première étude sur la sensibilité de détection tandis que les mélanges « bovin-porc » sont réalisés avec des échantillons de bovin et de porc différents de façon à voir si la limite de détection de 5 % est toujours valable avec d'autres sources de farines.

Pour chaque échantillon, la détection des 3 peptides bovins 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 pour quelles concentrations relatives. L'appareil le mieux indiqué pour réaliser ce type de recherche, maintenant que nous avons défini des sets de peptides biomarqueurs, est un triple quadrupôle. En effet, celui-ci va cibler uniquement les peptides d'intérêt. Le Tableau 11 montre la présence ou l'absence des 7 peptides biomarqueurs dans les 2 types de mélanges « bovin-végétal » et « bovin-porc » à raison de 0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 %. Ainsi, il apparait que les 3 peptides bovins sont identifiés sans problème dans les échantillons « bovin-végétal » et « bovin-porc » à des concentrations de 5 et 10 %. Dans les mélanges 2 % « bovin-végétal » et 2 % « bovin-porc », les peptides P1 bovin (AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK de l'hémoglobine alpha de *Bos taurus*) et P2 bovin (ALPAAAIEGPAYNR de l'heat shock protein beta-1 de *Bos taurus*) sont encore identifiés. Les Figures 56 et 57 montrent un exemple de détection de 2 % de PATs de bovin dans l'aliment végétal (Figure 56) et dans du porc (Figure 57). On remarque un certain effet de matrice du mélange « bovin-porc » par rapport au mélange « bovin-végétal ». Dans la Figure 56 (mélange « bovin-végétal »), les peptides P1 et P2 bovins sont détectés. Dans la Figure 57 (mélange « bovin-porc »), les peptides P1 et P2 bovins sont détectés ainsi que les 4 peptides de porc. En ce qui concerne les mélanges à 0,5 et 1 % de PATs bovines, le rapport signal/bruit de fond devient faible. Selon les mélanges, certains peptides bovins semblent présents à l'état de traces, mais le signal trop faible ne permet pas d'affirmer leur présence. Grâce à ce type d'appareillage, nous arrivons maintenant à détecter du bovin dans un aliment végétal ou dans du porc à raison de 2 %. Rappelons bien qu'il s'agit ici d'une quantification relative. On détecte 2 % de PATs de bovin dans un échantillon de PATs de porc. Ceci est donc mesuré en quantité de farine et non de protéines. Pour l'instant, la limite de détection de cette technique est donc de 2 %.

1.3.4. Etude de la fiabilité de la méthode : « blind samples »

Afin de s'assurer de la fiabilité de cette méthode peptidomique/protéomique, le CRA-W nous a fourni 13 échantillons en aveugle. Le but est de détecter le type de PATs présentes. Ces 13

échantillons, appelés BS 1 à 13, ont été extraits au TCA - acétone, ont subi un « clean-up », ont été digérés en digestion liquide (analyse gel-indépendante avec un ratio trypsine/protéines de 1/20 et 5 heures de digestion) et ensuite analysés en spectrométrie de masse à l'aide du Q-TOF et du triple quadrupôle. Pour les analyses en Q-TOF, la présence ou l'absence de tous les peptides marqueurs des Tableaux 3, 4 et 5 (manuscrit 1) et du Tableau 8 (Point 1.3.1.) a été vérifiée. Les Tableaux 12 et 13 présentent les données montrant la présence ou l'absence des 7 peptides biomarqueurs destinés à la production d'anticorps dans ces échantillons analysés en Q-TOF (Tableau 12) et en triple quadrupôle (Tableau 13). Les Tableaux 14 et 15 montrent la présence ou l'absence des peptides marqueurs ovins (Tableau 14) et de volaille (Tableau 15) analysés en Q-TOF. Le score de probabilité d'identification en Q-TOF est noté entre parenthèses lorsqu'il est inférieur à 95 %. Statistiquement, le peptide n'est pas validé. Toutefois, quand le score est inférieur à 95 %, mais supérieur à 60 %, le peptide est très probablement présent, mais cela reste à confirmer par des analyses supplémentaires. Il faut bien garder en mémoire que les peptides marqueurs sélectionnés font partie des produits interdits. Par conséquent, il se peut que nous ne détections pas de porc car il n'y a pas de produits de porc interdits, mais cela n'exclue pas qu'il puisse y avoir du sang de porc par exemple, car celui-ci est autorisé dans les aliments à destination des non-ruminants et poissons. Une liste des 15 protéines bovines et porcines les plus abondamment identifiées dans les PATs, sans tenir compte de leur caractère autorisé ou prohibé, est représentée au Tableau 27 des annexes. On peut constater que les protéines identifiées sont, pour la plupart, identiques quelle que soit l'espèce. Nous pouvons tirer comme conclusion générale que les échantillons **BS 1 à 10** sont assez semblables tandis que l'échantillon **BS11** semble être un échantillon de PATs de porc, l'échantillon **BS12** semble être du bovin et l'échantillon **BS13** semble être de la volaille.

En effet, pour les échantillons **BS1 à 4**, aussi bien les résultats en Q-TOF qu'en triple quadrupôle s'accordent sur le fait que ce sont des mélanges de plusieurs espèces à savoir bovin, ovin, porc et volaille. En ce qui concerne l'échantillon **BS5**, le Q-TOF détecte du bovin, de l'ovin et de la volaille de façon certaine, c'est-à-dire avec un score de probabilité d'identification égal ou supérieur à 95 %. Le triple quadrupôle confirme la détection de bovin et d'ovin grâce à la détection des 3 peptides bovins (détection de P3 bovin spécifique au bovin et à l'ovin). De plus, les peptides P3 et P4 porcins sont détectés en triple quadrupôle alors qu'en Q-TOF, ils sont également détectés mais avec un score de probabilité de 86 % et 79 % respectivement. Ces analyses nous laissent supposer que du porc serait également présent dans cet échantillon. Le triple quadrupôle détecte du bovin et du porc pour les échantillons **BS 6 à 10**. Le Q-TOF détecte également du bovin, de l'ovin, du porc et de la volaille pour les échantillons **BS 6, 7, 9 et 10**. Il y a une divergence de résultats entre les deux types de spectromètres de masse pour l'échantillon **BS8** où le Q-TOF ne détecte pas les 15 peptides marqueurs de porc, contrairement au triple quadrupôle qui détecte les P3 et P4 porcin. Le triple quadrupôle étant normalement plus sensible en recherche ciblée, la présence de porc est

Tableau 12. Présence ou non des 3 peptides bovins et des 4 peptides porcins (sélectionnés pour la production d'anticorps et les analyses de routine avec le triple quadrupôle) dans les « blind samples » analysés en Q-TOF. P1 bovin: AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK (hémoglobine alpha); P2 bovin: ALPAAAIEGPAYNR (Heat shock protein beta-1); P3 bovin: SATQSAEITIPVTFQAR (Heat shock protein beta-1) ; P1 porcin: TSGGAGGLGPLR (desmine); P2 porcin: PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR (heat shock protein beta-1); P3 porcin: GGPLTAAYR (anhydrase carbonique 3); P4 porcin: HDPSLLPWTASYDPGSAK (anhydrase carbonique 3). v: présent; x : absent. Quand le score de probabilité d'identification est inférieur à 95 %, il est noté entre parenthèses.

Echantillons	P1 bovin	P2 bovin	P3 bovin	P1 porcin	P2 porcin	P3 porcin	P4 porcin
BS1	v	x	v	v	v (72%)	x	v (79%)
BS2	v	v	v (74%)	v	v	v (77%)	x
BS3	v	v	v	v	x	v (62%)	v
BS4	v	v	v (92%)	v	x	v (92%)	v
BS5	v	x	v	x	x	v (86%)	v (79%)
BS6	v	v	v (88%)	v	x	v	x
BS7	v	v	x	v	x	v (87%)	v
BS8	v	x	x	x	x	x	x
BS9	v	v	v	v	v	v	v
BS10	v	x	v	v	v	v (76%)	x
BS11	x	x	x	v	x	v	x
BS12	v	v	v	x	x	x	x
BS13	x	x	x	x	x	x	x

Tableau 13. Présence ou non des 3 peptides bovins et des 4 peptides porcins (sélectionnés pour la production d'anticorps et les analyses de routine avec le triple quadrupôle) dans les « blind samples » analysés en triple quadrupôle. P1 bovin: AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK (hémoglobine alpha); P2 bovin: ALPAAAIEGPAYNR (Heat shock protein beta-1); P3 bovin: SATQSAEITIPVTFQAR (Heat shock protein beta-1) ; P1 porcin: TSGGAGGLGPLR (desmine); P2 porcin: PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR (heat shock protein beta-1); P3 porcin: GGPLTAAYR (anhydrase carbonique 3); P4 porcin: HDPSLLPWTASYDPGSAK (anhydrase carbonique 3). v: présent; x : absent.

Echantillons	P1 bovin	P2 bovin	P3 bovin	P1 porcin	P2 porcin	P3 porcin	P4 porcin
BS1	v	v	v	x	x	v	v
BS2	v	v	v	x	v	v	v
BS3	v	v	v	x	x	v	v
BS4	v	v	v	x	x	v	v
BS5	v	v	v	x	x	v	v
BS6	v	v	v	x	x	v	v
BS7	v	v	v	x	x	v	v
BS8	v	v	v	x	x	v	v
BS9	v	v	v	x	v	v	v
BS10	v	v	v	x	v	v	v
BS11	x	x	x	v	v	v	x
BS12	v	v	v	x	x	x	x
BS13	x	x	x	x	x	x	x

Tableau 14. Présence ou non des 5 peptides ovins dans les « blind samples » analysés en Q-TOF. P1 ovin: FFEHFGDLSNADAVMNNPK (Beta-K globin chain); P2 ovin: HHGNEFTPVLQADFQK (Beta-K globin chain); P3 ovin: HHGSEFTPVLQAEFQK (Beta-A globin chain); P4 ovin: VGGNAGAYGAEALER (Alpha globin chain); P5 ovin: LLSHTLLVTLACHLPNDFTPAVHASLDK (Alpha globin chain). v: présent; x : absent. Quand le score de probabilité d'identification est inférieur à 95 %, il est noté entre parenthèses.

Echantillons	P1 ovin	P2 ovin	P3 ovin	P4 ovin	P5 ovin
BS1	v	v	x	v	x
BS2	x	v	v	v	x
BS3	x	v	x	v (68%)	x
BS4	v	v	v (94%)	v	v (74%)
BS5	v	v	x	v	v
BS6	x	v	v	v (86%)	x
BS7	x	v	x	v	x
BS8	x	x	x	v	x
BS9	v (90%)	v	x	v	x
BS10	v	v	x	v	x
BS11	x	x	x	x	x
BS12	x	x	x	x	x
BS13	x	x	x	x	x

Tableau 15. Présence ou non des 16 peptides de volaille dans les « blind samples » analysés en Q-TOF. P1: DNADLANEIR (Myosin-11); P2: LQIEVENVTSLLNEAESK (Myosin-11); P3: EEMAEELASANSGR (Myosin-11); P4: IAQLEEELDEEHSNIETMSDR (Myosin-11); P5: TFGGGTSPVFPR (Desmin); P6: TSAVPTLSTFR (Desmin); P7: VPFTFLTSPSWEPFR (Heat shock protein beta-1); P8: LLPSESALLPAPGSPYGR (Heat shock protein beta-1); P9: SFLEELLTTQCDR (Myosin regulatory light chain 2); P10: LSVEALNSLEGEFK (Creatine kinase M-type); P11: LLGWVQHR (Filamin C); P12: AYGPGLEPQGNVVLQPAR (Filamin C); P13: SVPVAVESAGPGLHR (Filamin C); P14: FTAAEEGQLR (Filamin C); P15: AVVPSGGPHVGAR (Filamin C); P16: VLASGPGLSPSGVPASLPVEFAIDAR (Filamin C); v: présent; x : absent. Quand le score de probabilité d'identification est inférieur à 95 %, il est noté entre parenthèses.

Echan-tillons	P 1	P 2	P 3	P 4	P5	P6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12	P 13	P 14	P 15	P16
BS1	x	x	x	x	v (94%)	x	v	v	v	v	x	x	x	x	x	x
BS2	x	x	x	x	x	x	v	v	v	v	x	x	x	x	x	x
BS3	x	x	x	x	v	x	v	v	v	v	x	x	x	x	x	x
BS4	x	x	x	x	v (72%)	x	x	v	v	x	x	x	x	x	x	x
BS5	x	x	x	x	v	x	v	v	v	v	x	x	x	x	x	x
BS6	x	x	x	x	v	x	x	v	v	v	x	x	x	x	x	x
BS7	x	x	x	x	v	x	x	v	v	v	x	x	x	x	x	x
BS8	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
BS9	x	x	x	x	x	v	v	v	v	v	x	x	x	x	x	x
BS10	x	x	x	x	v (69%)	v (93%)	x	v	v	x	x	x	x	x	x	x
BS11	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
BS12	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
BS13	x	x	x	x	x	x	v	v	v	v	x	v	v	v	v	v (83%)

donc probable. De plus, il y a vraisemblablement eu un problème lors de l'analyse du **BS8** en Q-TOF car il y a moins d'identifications de peptides et de protéines par rapport aux autres échantillons. En regardant l'ensemble des protéines identifiées (et non plus les protéines dont proviennent les peptides marqueurs), nous remarquons que l'hémoglobine α ainsi que les collagènes α-1(II), α-1(III), α-3(VI) de *Sus scrofa* sont identifiés. Nous identifions également la myosine « light chain 1 », l'hémoglobine α et β, la filamine A ainsi que les collagènes α-1(I), α-2(I) de *Gallus gallus*. Cependant, ces peptides ne sont pas repris dans les peptides marqueurs car les produits de sang et la gélatine de porc et de volaille sont autorisés par la législation. Concernant la myosine de *Gallus gallus*, les peptides identifiés sont non spécifiques. Au niveau de l'échantillon **BS11**, le Q-TOF, ainsi que le triple quadrupôle, ne détecte que du porc. En ce qui concerne l'échantillon **BS12**, nous détectons seulement du bovin que ce soit avec l'un ou l'autre spectromètre de masse. Aucun des 7 peptides marqueurs n'est détecté en triple quadrupôle dans le **BS13** et le Q-TOF détecte uniquement de la volaille.

Nous avons donc des difficultés à séparer les 10 premiers échantillons qui ont l'air de contenir un mélange d'espèces à savoir du bovin, de l'ovin, du porc et de la volaille. Au contraire, l'échantillon **BS11** est vraisemblablement un échantillon de porc, le **BS12** un échantillon de bovin et le **BS13** un échantillon de volaille.

Le CRA-W a confirmé la détection de bœuf, mouton, porc et volaille par PCR (Tableau 25 des annexes) dans les 10 premiers « blind samples ». Le **BS11** est un échantillon de farine de porc traitée à 145°C. Le **BS12** est un échantillon de farine bovine traitée à 137°C et le **BS13** est un échantillon de farine de volaille traitée à 133°C. La spectrométrie de masse confirme bien les résultats obtenus en PCR au niveau des espèces. De plus, la méthode peptidomique permet de s'assurer de la présence de matériel bovin, ovin, porcin et volaille interdit dans les 10 premiers échantillons, la PCR ne parvenant pas à différencier des PATs interdites de ruminants et des produits laitiers autorisés par exemple. Une analyse en composantes principales de type PCA a également été réalisée sur ces échantillons de façon à retirer plus d'informations et fait l'objet du Point 3. des résultats.

1.3.5. Aperçu de la mise au point des tests immunologiques de type ELISA compétitif

Une fois plusieurs peptides robustes identifiés pour les espèces bovine et porcine, la production d'anticorps a pu commencer afin de mettre au point des tests ELISA sur les PATs. Le but 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 actuels sont, pour l'instant, peu fiables pour la détection de protéines dans les farines animales. Signalons que notre approche est très différente de celle décrite dans la littérature qui cible *a priori* des protéines considérées comme thermostables telles que la troponine I ou la h-caldesmone par exemple (voir Point 2.3. de l'Introduction). Dans ce travail, ce sont des peptides/protéines, dont la présence dans les PATs est détectée dans la très grande majorité des échantillons par

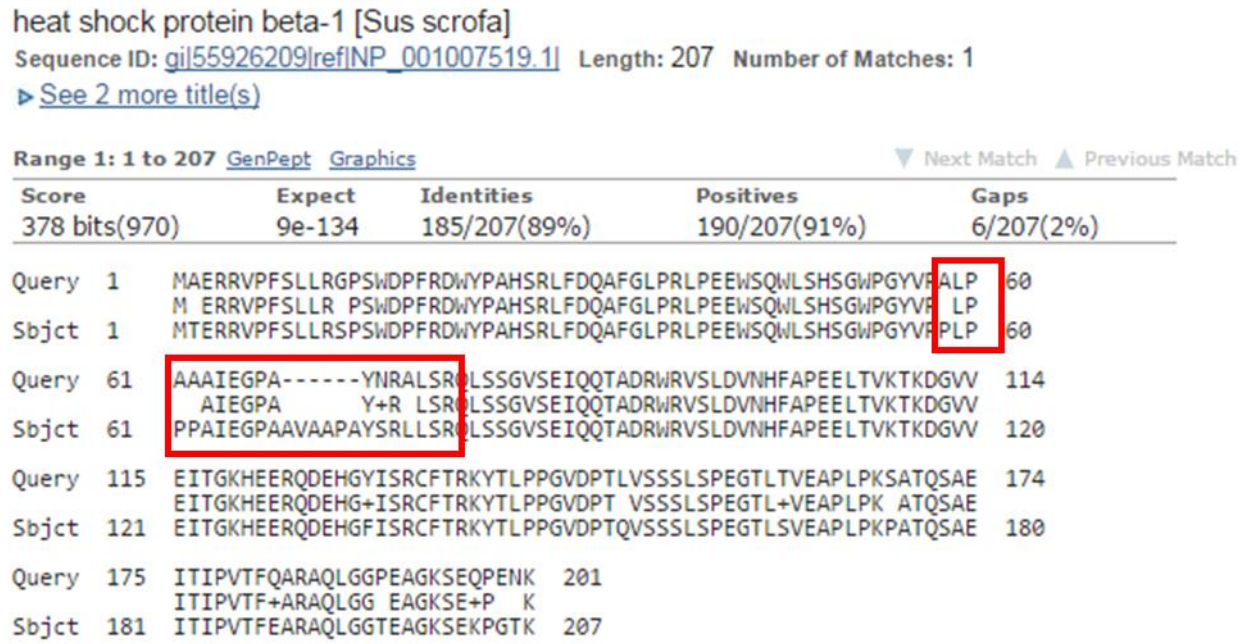


Figure 58. Comparaison de la séquence en acides aminés de la heat shock protein β1 chez le bovin (query) et le porc (sbjct), montrant la forte identité de séquence. La zone encadrée en rouge correspond au peptide bovin P2. Query : bovin. Sbjct : porc.

spectrométrie de masse, qui sont choisis comme cibles pour la production d'anticorps. Trois peptides bovins et quatre peptides porcins (voir manuscrit Point 1.2.) ont été synthétisés par Eurogentec (Liège, Belgique) afin de pouvoir être injectés aux lapins. Cette partie du travail a été réalisée par Anne-Catherine Huet du CER Groupe à Marloie. Les anticorps produits sur base des peptides sélectionnés sont des anticorps polyclonaux. Les lapins ont été inoculés avec les peptides à raison de deux à trois lapins par peptide sélectionné. Les anticorps sont d'abord récoltés par prise de sang. Après environ deux mois d'immunisation, les lapins sont sacrifiés et le sang est prélevé en vue de récolter un maximum de sérum contenant les anticorps d'intérêt. La production d'anticorps dépend donc de la réponse immunitaire. Les conditions d'immunisation sont optimisées de façon à avoir le meilleur rendement (animaux jeunes, adjuvant de Freud pour stimuler la réponse immunitaire et promouvoir la production d'anticorps…). L'utilisation d'anticorps polyclonaux présente l'avantage par rapport aux anticorps monoclonaux de ne pas se restreindre à un seul épitope. Toutefois, cette propriété augmente les risques de réactions croisées avec des protéines présentes dans l'échantillon (Reaney and Bremer, 2012). Les immunisations à l'aide des 7 peptides ont permis d'obtenir des concentrations en anticorps élevées, en s'assurant grâce à un prélèvement pré-immunisation que les lapins ne possédaient pas d'anticorps spécifiques dirigés contre les peptides testés.

Le CER a ensuite évalué la spécificité des anticorps produits par rapport aux autres peptides disponibles. Ce test a mis en évidence la reconnaissance du peptide P2 porcin (PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR de heat shock protein beta-1) par les anticorps anti-P2 bovin (ALPAAAIEGPAYNR de heat shock protein beta-1) et inversement. En effet, nous pouvons voir une forte identité de séquence entre ces 2 peptides. Celle-ci est de 6 acides aminés successifs, ce qui explique la reconnaissance des anticorps envers les peptides de l'autre espèce. Cependant, le choix de la séquence avait déjà été réalisé dans la partie de séquence la moins conservée (Figure 58). Afin de mettre au point un ELISA capable de détecter la heat shock protein beta-1 et qui soit spécifique à l'espèce, une double purification (IAC : Immuno-Affinity Chromatography) pourra être tentée. Celle-ci devrait permettre de purifier les anticorps spécifiquement dirigés contre la heat shock protein beta-1 de l'espèce (bovine par exemple) dans le mélange existant d'anticorps polyclonaux. La spécificité des autres anticorps semble meilleure et aucune autre réaction croisée n'a été détectée.

La mise au point des tests ELISA sur les farines animales s'est faite en trois étapes : les tests ont d'abord été réalisés sur les extraits protéiques non digérés, ensuite sur les extraits protéiques ayant subi une étape de « clean-up » toujours non digérés et enfin sur les extraits protéiques ayant subi une étape de « clean-up » et digérés à la trypsine.

Dans un premier temps, les ELISA ont d'abord été réalisés sur des échantillons extraits sans digestion à la trypsine. Certaines adaptations au niveau du protocole d'extraction et du

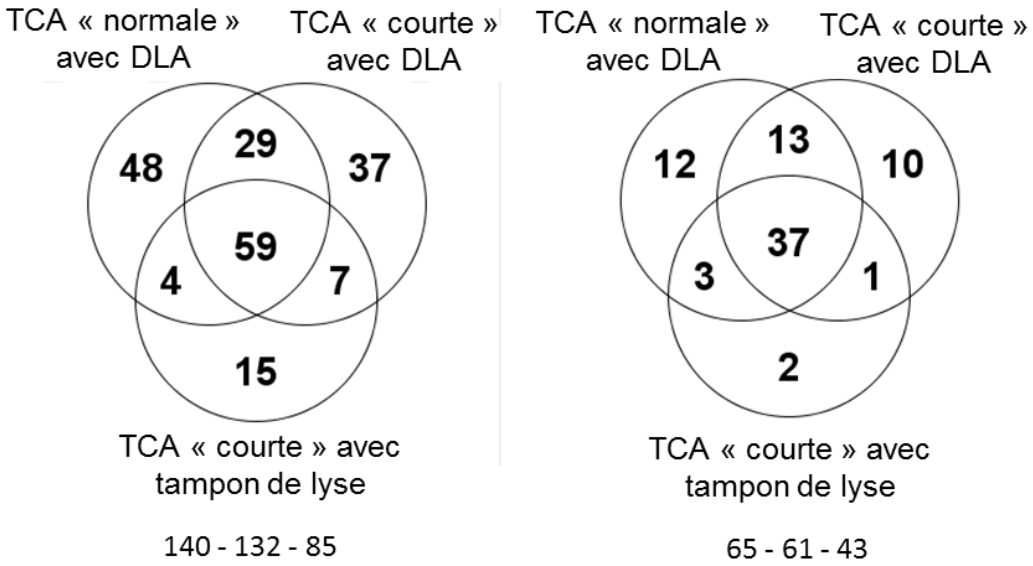


Figure 59. Diagrammes de Venn illustrant le nombre de peptides (à gauche) et le nombre de protéines (à droite) identifiés pour les différentes adaptations du protocole d'extraction protéique au TCA - acétone de façon à le rendre compatible avec les tests ELISA. Cette expérience a été réalisée sur 3 échantillons différents. Ce diagramme est un exemple de résultats représentatif pour un échantillon de bovin. La tendance est la même pour l'ensemble des échantillons.

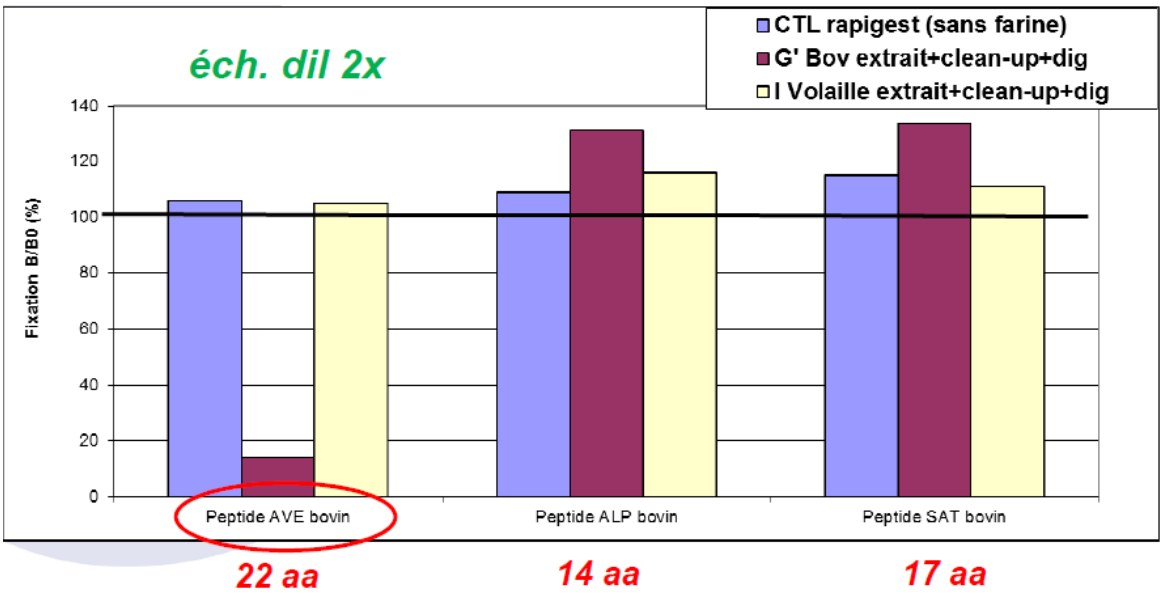


Figure 60. Pourcentage de fixation B/B0 (B correspondant à la liaison de l'anticorps en présence de l'échantillon et B0 à la liaison de l'anticorps en présence du tampon de lyse seul) des 3 peptides bovins pour un contrôle (bleu), un échantillon de PATs bovines (rose) et un échantillon de PATs de volaille (jaune). P1 bovin: AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK (hémoglobine alpha); P2 bovin: ALPAAAIEGPAYNR (Heat shock protein beta-1); P3 bovin: SATQSAEITIPVTFQAR (Heat shock protein beta-1). La discrimination entre les échantillons de PATs de bovin et de volaille est donc possible par ELISA grâce au P1 bovin.

tampon ont dû être réalisées pour pouvoir envisager des tests ELISA sur PATs. En effet, certains composés du tampon DLA utilisé habituellement pour l'extraction TCA - acétone, tels que l'urée, ne sont pas compatibles avec les tests ELISA risquant de perturber les liaisons anticorps-antigène. Un autre tampon de lyse, composé de Tris, KCl, EDTA et Triton, a été évalué. Le temps de l'extraction TCA - acétone a également été réduit, passant de 2 jours à un seul. Trois conditions ont donc été analysées : une extraction TCA - acétone « normale » avec le tampon DLA, une extraction TCA - acétone « courte » avec le tampon DLA et une extraction TCA - acétone « courte » avec le tampon de lyse composé de Tris, KCl, EDTA et Triton. Des analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées sur un échantillon bovin afin d'évaluer les conséquences des modifications de protocole et de tampon sur le nombre d'identifications de peptides/protéines. On remarque que le nombre d'identifications diminue au fur et à mesure des modifications de protocole et que le nombre d'identifications de peptides et protéines est systématiquement plus faible qu'avec le protocole d'extraction TCA - acétone habituel (Figure 59). Toutefois, nous avons recherché les trois peptides bovins sélectionnés pour la production d'anticorps dans ces différentes conditions. Les 3 peptides sont identifiés dans les extraits obtenus avec chacun des trois protocoles. Ces expériences montrent bien que le protocole d'extraction peut être adapté aux tests ELISA. Les tests immunologiques sur ces échantillons uniquement extraits montrent très peu de différence entre les espèces.

Dans un second temps, les ELISA ont été testés sur des échantillons de PATs extraits et ayant subi une étape de « clean-up ». Une diminution de l'effet matrice a été observée de façon significative grâce à l'étape de « clean-up » qui s'avère donc nécessaire aussi pour les tests ELISA. Il n'y a toutefois pas d'amélioration en ce qui concerne la reconnaissance des peptides par les anticorps.

Dans un troisième temps, le CER a testé des ELISA sur des PATs extraites avec étape de « clean up » et digérées à la trypsine. Le protocole de digestion liquide a donc également dû être modifié. L'acide trifluoroacétique (TFA) utilisé n'est pas compatible avec les tests ELISA car le pH doit être aux alentours de 7. Le TFA est utilisé à la fin de la digestion pour dégrader le Rapigest et pour arrêter la trypsinisation. Tout d'abord, un « contrôle » ne contenant pas de protéines mais tous les autres composés utilisés pour la digestion a été testé en ELISA afin de voir s'il y avait des interférences. Les résultats ont montré que le Rapigest est tout à fait compatible avec les tests ELISA. Un inhibiteur de trypsine, l'antipaïne, a donc été utilisé pour arrêter la trypsinisation. Les tests ELISA « P2 bovin » et « P3 bovin » sur des échantillons de PATs de bovin et de volaille extraites au TCA - acétone et digérées ont montré que le pourcentage de fixation B/B0 (B correspondant à la liaison de l'anticorps en présence de l'échantillon et B0 à la liaison de l'anticorps en présence du tampon de lyse seul) est légèrement plus faible chez la volaille que chez le bovin alors que nous nous attendions à l'inverse (Figure 60). Cette absence de différence entre bovin et volaille peut provenir de

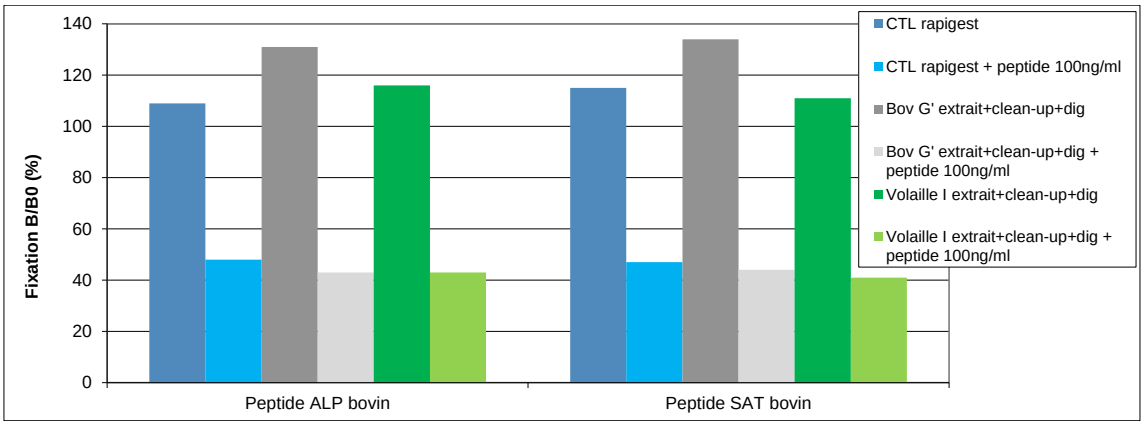


Figure 61. Pourcentage de fixation B/B0 (B correspondant à la liaison de l'anticorps en présence de l'échantillon et B0 à la liaison de l'anticorps en présence du tampon de lyse seul) des 2 peptides bovins ALPAAAIEGPAYNR et SATQSAEITIPVTFQAR, sans et avec ajout du peptide respectif avant le dépôt sur plaque coatée, pour un contrôle (bleu), un échantillon de PATs bovines (gris) et un échantillon de PATs de volaille (vert).

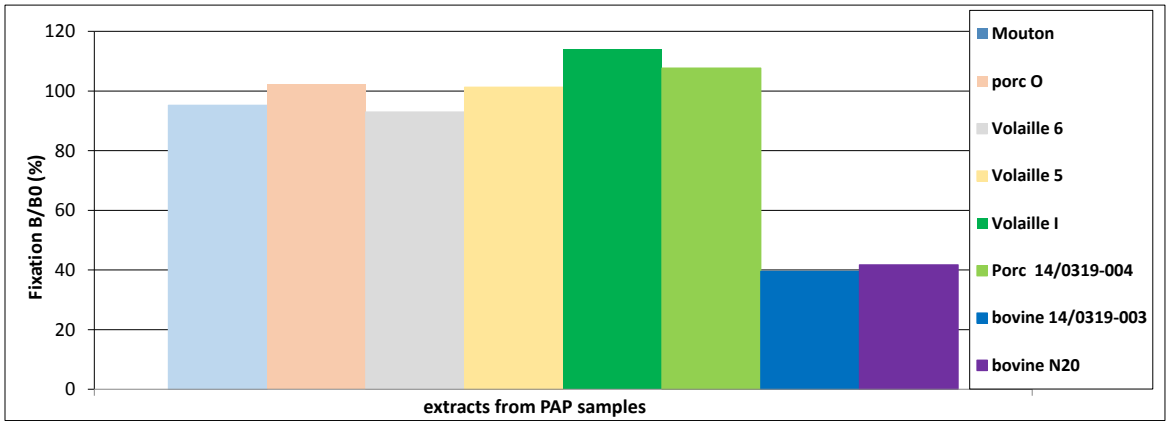


Figure 62. Pourcentage de fixation B/B0 (B correspondant à la liaison de l'anticorps en présence de l'échantillon et B0 à la liaison de l'anticorps en présence du tampon de lyse seul) du P1 bovin AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK pour divers échantillons d'espèces différentes. La discrimination entre les différentes espèces bovin, mouton, porc et volaille est donc possible par ELISA grâce au P1 bovin.

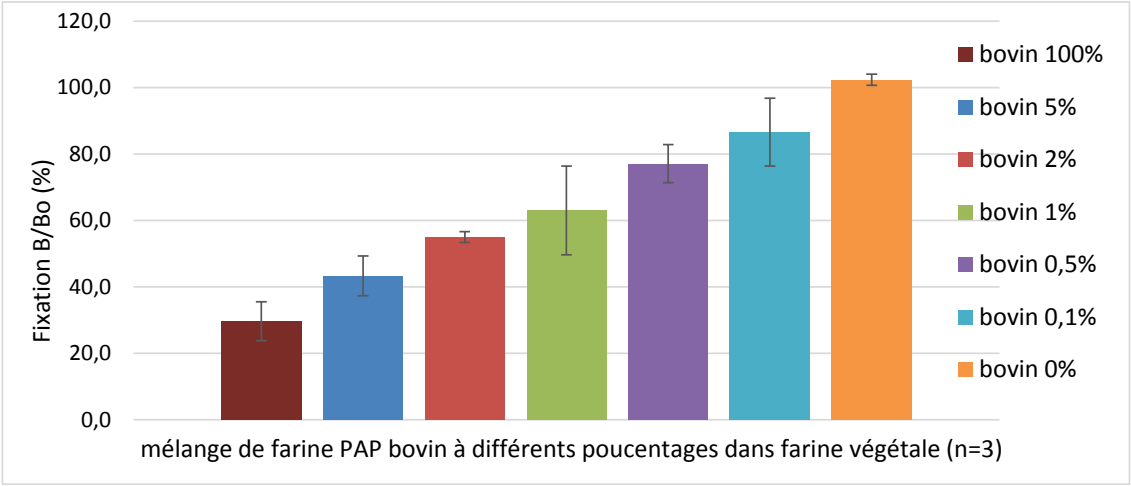


Figure 63. Pourcentage de fixation B/B0 (B correspondant à la liaison de l'anticorps en présence de l'échantillon et B0 à la liaison de l'anticorps en présence du tampon de lyse seul) du P1 bovin AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK pour des mélanges de PATs de bovin et d'aliment végétal à différents pourcentages de bovin.

liaisons non spécifiques (des anticorps primaire ou secondaire) ou bien d'effets matrices (substances interférentes ou responsables de réactions croisées). Le CER Groupe a investigué le problème afin de comprendre la cause de ces interférences. Ces dernières ne seraient pas dues aux liaisons non spécifiques. En effet, le signal est insignifiant lorsque les échantillons extraits sont déposés sur des puits « coatés » avec le peptide P2 bovin ALPAAAIEGPAYNR mais en l'absence d'anticorps anti-ALPAAAIEGPAYNR. De plus, le signal est également insignifiant lorsque les échantillons extraits sont déposés sur des puits non-« coatés » en présence de l'anti-ALPAAAIEGPAYNR et de l'anticorps secondaire. Par contre, les interférences proviendraient très probablement d'un effet matrice. Effectivement, lorsque l'on aoute le peptide cible à une concentration connue à l'extrait protéique post-digestion, le signal est inhibé que ce soit pour le P2 bovin ALPAAAIEGPAYNR ou pour le P3 bovin SATQSAEITIPVTFQAR (Figure 61). Il semble que des substances interférentes soient présentes dans l'extrait et empêchent les anticorps anti-ALPAAAIEGPAYNR/SATQSAEITIPVTFQAR de se lier aux peptides présents dans l'extrait bovin G'. Des expériences doivent être poursuivies pour améliorer la sensibilité du test et diminuer les effets matrices.

En ce qui concerne l'ELISA « P1 bovin », le pourcentage de fixation B/B0 est beaucoup plus faible chez le bovin que chez la volaille (Figure 60). La discrimination entre les échantillons de PATs de bovin et de volaille est donc possible par ELISA pour le P1 bovin, dérivé de l'hémoglobine α. Le CER a élargi cette expérience sur plusieurs échantillons : un échantillon de mouton, 2 échantillons de porc, 3 échantillons de volaille et 2 échantillons de bovin. La Figure 62 confirme que le test ELISA mis au point pour l'hémoglobine α est capable de discriminer les PATs de bovin des autres espèces telles que mouton, porc et volaille.
Afin de déterminer la limite de détection du test ELISA « P1 bovin » mis au point pour la détection de l'hémoglobine α dans les PATs, différents mélanges à raison de 0 - 0,1 - 0,5 - 1 - 2 - 5 % de PATs de bovin dans une matrice purement végétale ont été préparés par dilution. La Figure 63 montre une estimation de la limite de détection de l'ELISA « P1 bovin » dans les différents mélanges « bovin-végétal ». Il apparait que le peptide de l'hémoglobine α de *Bos taurus* est identifié clairement dans les mélanges « bovin-végétal » à des concentrations de 2 et 5 %. Pour le mélange 1 % « bovin-végétal », l'écart-type étant plus grand, la détermination de bovin à ce pourcentage est moins fiable. En effet, un échantillon est déclaré positif (présence de AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK) lorsque le pourcentage de fixation B/B0 est inférieur ou égal à 75 %. C'est pourquoi, la limite actuelle de détection est estimée à 2 % pour l'ELISA de l'hémoglobine α de *Bos taurus*, comme en spectrométrie de masse.

Maintenant que le test ELISA a prouvé son efficacité pour la détection de l'hémoglobine α de *Bos taurus* avec une limite de détection de 2 %, le CER Groupe a également analysé les 13 échantillons en aveugle afin de s'assurer de la fiabilité de ce test. Le Tableau 16 compare les résultats en spectrométrie de masse et en ELISA. L'espèce bovine est correctement détectée

Tableau 16. Présence ou absence du P1 bovin AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK (hémoglobine alpha) dans les « blind samples » analysés en spectrométrie de masse et en ELISA. v: présent; x : absent.

Echantillons	LC-MS/MS	ELISA (% B/B0)
BS1	v	v (61)
BS2	v	v (59)
BS3	v	v (58)
BS4	v	v (57)
BS5	v	v (61)
BS6	v	v (67)
BS7	v	v (67)
BS8	v	v (70)
BS9	v	v (57)
BS10	v	v (52)
BS11	x	x (78)
BS12	v	v (11)
BS13	x	x (82)

par ELISA dans les 10 premiers échantillons ainsi que dans le BS12. On remarque également que le pourcentage de fixation B/B0 est beaucoup plus faible pour le BS12 que pour les 10 premiers échantillons. Effectivement, le BS12 est une farine bovine alors que les 10 premiers sont des mélanges de différentes espèces.

Les tests ELISA avec les peptides porcins sont moins concluants. Seul le peptide HDPSLLPWTASYDPGSAK de l'anhydrase carbonique 3 permet de différencier des PATs de porc des autres espèces (bovin, mouton et volaille) avec une limite de détection de 25 %.

Il est donc possible de détecter par ELISA, à raison de 2 %, des PATs bovines dans des échantillons industriels à l'aide d'anticorps ciblant des peptides résistants au traitement de production des farines animales.

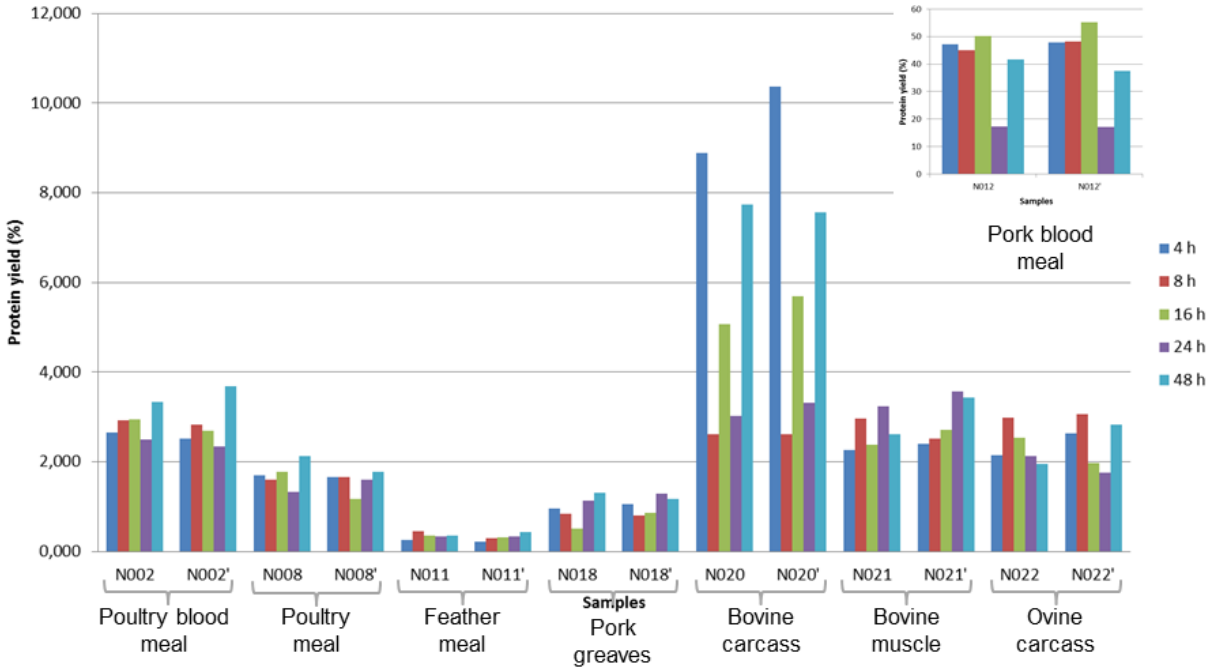


Figure 64. Comparaison du rendement d'extraction à l'HCl pour les différents temps d'incubation (4, 8, 16, 24 et 48 h) et différents types d'échantillons. Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage de protéines extraites par rapport à la quantité totale de protéines présente dans la farine initiale. Les doubles sont indépendants depuis le début du protocole.

2. Etude de différents protocoles d'extraction protéique pour la détection de protéines animales transformées en vue d'une comparaison inter-laboratoire

En cours de thèse, suite à la présentation de nos résultats lors du « Second annual meeting, NFR project Safety-PAP » à Bergen (Norvège) et grâce au réseau de collaborations internationales du CRA-W, une collaboration fructueuse a été établie avec le NIFES (National Institute of Nutrition and Seafood Research, Norvège). On s'est effectivement rendu compte que l'on travaillait de manière similaire à l'Université de Namur et au NIFES. Ce constat nous a amenés à démarrer une collaboration visant à réaliser une comparaison inter-laboratoire traitant des protocoles d'extraction, de digestion et de spectrométrie de masse sur les mêmes échantillons. Nous avons en effet travaillé avec des échantillons de différentes composition et espèces : farine de sang de volaille (N002), farine de volaille (N008), farine de plume (N011), farine de sang de porc (N012), des crétons de porc (N018), farine de carcasse bovine (N020), farine de muscle bovin (N021) et farine de carcasse de mouton (N022). Nous les avons extraits en double, digérés et analysés à l'Université de Namur et au NIFES avec chacun notre protocole d'extraction et de digestion et notre spectromètre de masse (Q-TOF à l'UNamur et orbitrap au NIFES). Les échantillons soumis aux deux protocoles ont été analysés avec les deux types de spectromètres de masse. La version du manuscrit soumis dans le « Journal of Proteomics - special issue Foodomics » est présentée en annexe. Toutefois, l'entièreté des analyses de spectrométrie de masse n'est pas exposée dans le manuscrit, les prochains points traiteront donc des analyses faites à l'Université de Namur.

2.1. Evaluation des protocoles d'extraction sur base du rendement

Différents protocoles d'extraction protéique ont été comparés afin de sélectionner un protocole optimal : TCA - acétone, SDS 2 % - Tris 1 M et HCl 0,6 M (voir Point 1.1.2).

Dans un premier temps, 5 temps d'incubation différents ont été testés pour l'extraction à l'HCl : 4, 8, 16, 24 et 48 heures. En général, de long temps d'incubation tels que 48 heures (Urist and Strates, 2009) ou 72 heures (Jiang *et al.*, 2007) sont recommandés. Toutefois, nous avons tenté de réduire ce temps. L'extraction à l'HCl a donc été réalisée sur les 8 échantillons en double avec différents temps d'incubation (4, 8, 16, 24 et 48 h). La Figure 64 montre le rendement d'extraction pour ces différents temps. Les rendements obtenus sont exprimés en pourcentage de protéines extraites par rapport à la quantité totale de protéines dans l'échantillon de farine initiale, déterminée par un dosage Kjeldahl. Les rendements varient en fonction du type d'échantillon mais sont similaires entre les réplicats. On remarque que le rendement n'est pas nécessairement plus élevé avec un long temps d'incubation. C'est pourquoi nous avons choisi de poursuivre les analyses avec 4 heures d'incubation pour le gain de temps conséquent et les rendements acceptables par rapport aux autres temps d'incubation.

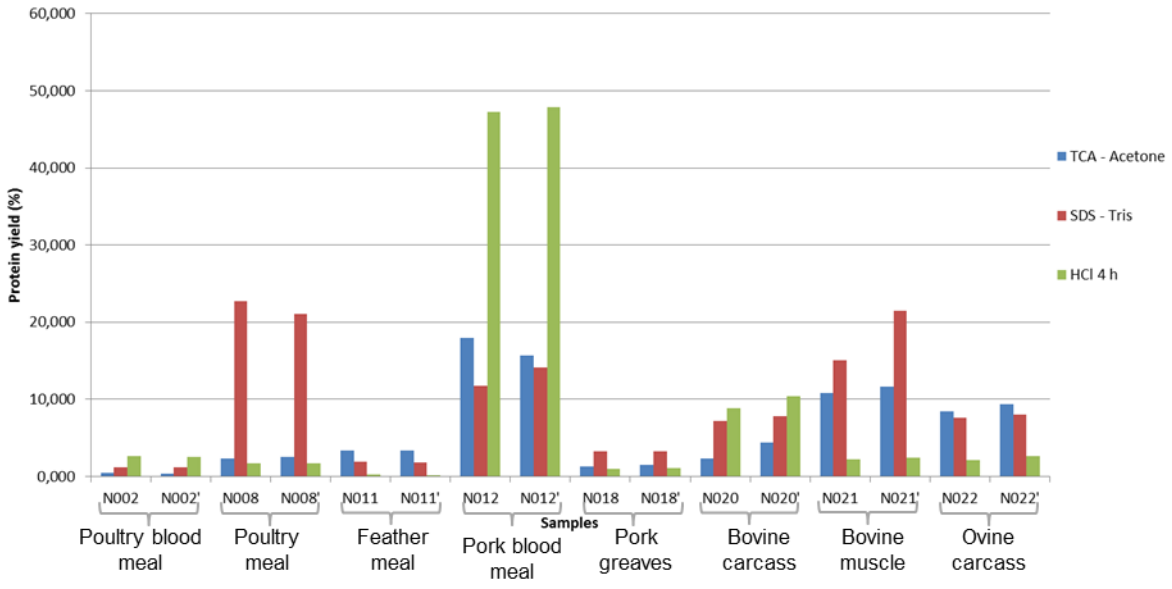


Figure 65. Comparaison de l'efficacité des protocoles d'extraction protéique (TCA - acétone, SDS - Tris et HCl 4 h). Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage de protéines extraites par rapport à la quantité totale de protéines présente dans la farine initiale. Les doubles sont indépendants depuis le début du protocole.

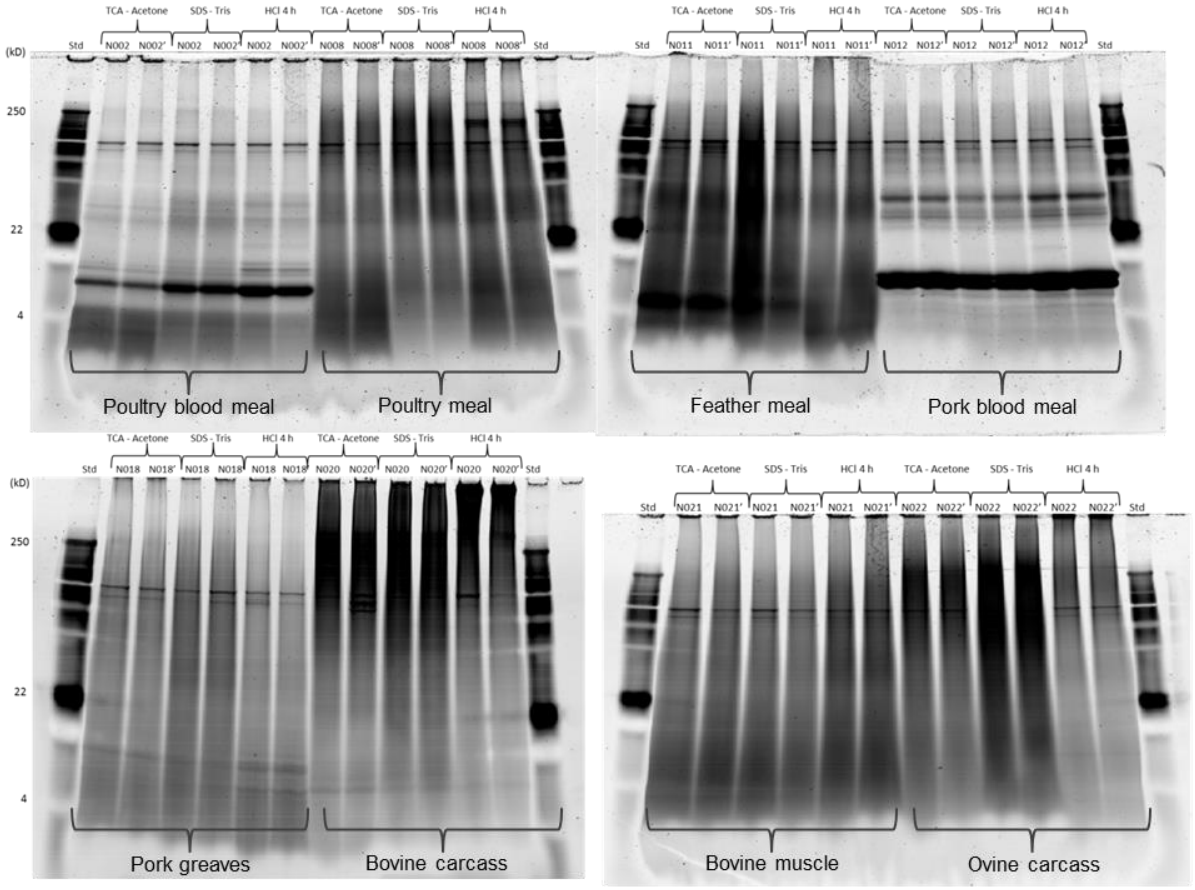


Figure 66. Gel Tris-glycine 18 % illustrant le profil protéique des 8 échantillons en duplicats après les 3 extractions protéiques: TCA - acétone, SDS - Tris et HCl 4 h. Les doubles sont indépendants depuis le début du protocole.

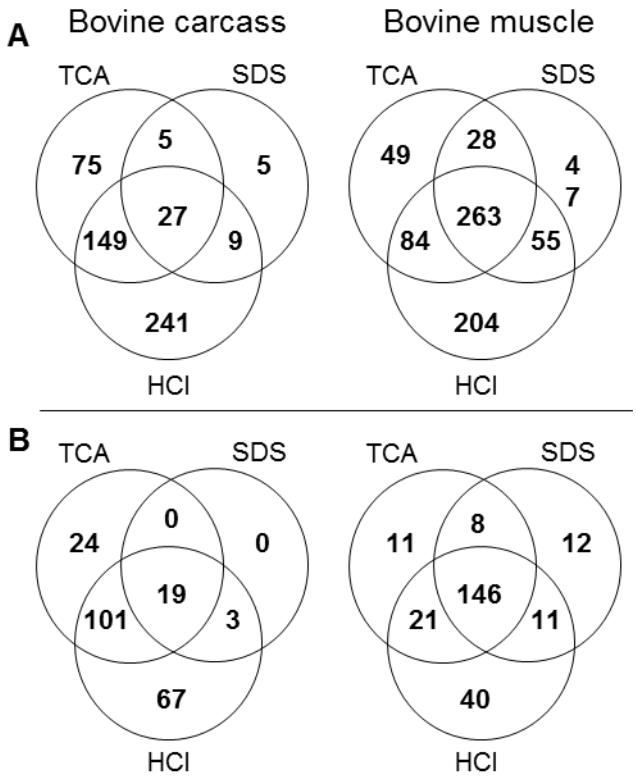


Figure 67. Diagrammes de Venn illustrant le nombre de peptides (A) et de protéines (B) identifiés avec le Q-TOF pour les 3 extractions différentes des 2 échantillons bovins. Cette expérience a été réalisée en double sur 2 échantillons bovins différents. La tendance est la même pour les doubles et pour les 2 échantillons. Ce diagramme est un exemple représentatif de résultats pour un des réplicats.

Tableau 17. Nombre de peptides et protéines identifiés avec le Q-TOF pour les 2 échantillons bovins selon les extractions protéiques.

Bovine carcass	TCA - acetone	SDS - Tris	HCl
Peptides	256	46	426
Proteins	144	22	190

Bovine muscle	TCA - acetone	SDS - Tris	HCl
Peptides	424	393	606
Proteins	186	177	218

Dans un second temps, trois protocoles d'extraction protéiques ont été testés : TCA - acétone, SDS - Tris et HCl avec 4 h d'incubation. Les rendements de ces 3 extractions sur les 8 échantillons sont représentés à la Figure 65. Il n'est pas aisé de choisir une seule extraction optimale pour l'entièreté des échantillons car l'efficacité de l'extraction est très variable d'un type d'échantillon à l'autre. En effet, sur les 8 échantillons, l'extraction au TCA - acétone fournit de meilleurs rendements pour les échantillons de farines de plumes (N011) et de carcasse ovine (N022). L'extraction au SDS - Tris fournit des rendements plus élevés pour la farine de volaille (N008), les crétons de porc (N018) ainsi que la farine de muscle bovin (N021). L'extraction à l'HCl fournit, quant à elle, de meilleurs rendements pour les farines de sang de volaille (N002), de sang de porc (N012) et de carcasse bovine (N020). Nous avons choisi l'extraction au SDS - Tris en nous basant sur le rendement en protéines et la facilité de la procédure, mais avec quelques réserves, en particulier pour la farine de sang de porc.

2.2. Evaluation des protocoles d'extraction par gel d'électrophorèse à une dimension

Puisque les rendements ne donnent qu'une vision quantitative des différentes extractions, nous avons également réalisé des gels 1 D afin d'obtenir des informations supplémentaires. Des gels Tris-glycine 18 % ont donc été effectués pour comparer les profils protéiques des 8 échantillons (Figure 66), extraits en double avec les 3 protocoles. Les échantillons de PATs n'ont jamais montré un profil avec des bandes bien distinctes sur gel mais nous pouvons tout de même remarquer des bandes caractéristiques de faibles poids moléculaires pour les farines de sang (volaille N002 et porc N012), celles-ci correspondant très certainement à l'hémoglobine. De façon générale, des « smears » sont présents sauf pour l'échantillon de farine de sang de porc (N012) où les bandes sont bien définies. Bien que des différences de profils protéiques apparaissent entre les 3 extractions du même type d'échantillon (par exemple la farine de sang de volaille N002), il est difficile de tirer des conclusions concernant l'efficacité des extractions sur base des gels. C'est pourquoi nous avons également étudié l'efficacité des extractions protéiques en termes de nombre d'identifications de peptides et de protéines en spectrométrie de masse pour les 2 échantillons bovins, car le bœuf reste l'espèce prioritaire étant donné la problématique de l'ESB.

2.3. Evaluation des protocoles d'extraction par spectrométrie de masse

Ni le rendement d'extraction, ni les gels, ne donnant d'information tranchée, les 2 échantillons bovins (carcasse bovine N020 et muscle bovin N021) extraits à l'aide des 3 protocoles ont été digérés à la trypsine et analysés en spectrométrie de masse avec le Q-TOF. La Figure 67 et le Tableau 17 illustrent le nombre de peptides (A) et de protéines (B) identifiés dans les 2 échantillons bovins extraits avec les différents protocoles (TCA - acétone, SDS - Tris et HCl). Ces résultats suggèrent que le nombre d'identifications de peptides/protéines dans les 2 échantillons est plus élevé avec l'extraction à l'HCl. En effet, l'extraction à l'HCl permet d'identifier 426 peptides pour l'échantillon de carcasse bovine et

Tableau 18. Présence ou non des 3 peptides bovins (sélectionnés pour la production d'anticorps et les analyses de routine avec le triple quadrupôle) dans les 2 échantillons bovins selon les extractions protéiques. Les différents extraits ont été analysés avec le Q-TOF. P1 bovin: AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK (hémoglobine alpha); P2 bovin: ALPAAAIEGPAYNR (Heat shock protein beta-1); P3 bovin: SATQSAEITIPVTFQAR (Heat shock protein beta-1). v: présent; x : absent.

	P1 bovine	P2 bovine	P3 bovine
Bovine carcass TCA	v	v	v
Bovine carcass SDS	v	x	x
Bovine carcass HCl	v	v	v
Bovine muscle TCA	x	v	v
Bovine muscle SDS	x	v	v
Bovine muscle HCl	x	v	v

606 peptides pour l'échantillon de muscle bovin, par rapport à l'extraction au SDS - Tris qui permet d'identifier 46 peptides pour l'échantillon de carcasse bovine et 393 peptides pour l'échantillon de muscle bovin. Ces résultats montrent que l'extraction au SDS - Tris, choisie sur base du rendement protéique, n'est pas nécessairement l'extraction optimale lorsque l'on analyse ces extraits en spectrométrie de masse, en veillant à injecter la même quantité de protéines.

La recherche des 24 peptides marqueurs bovins, présentés dans le premier manuscrit (Partie 1 – 1.2 Manuscrit Table 3) et identifiés sur base de l'extraction au TCA - acétone, a été réalisée avec le Q-TOF dans les différents extraits de ces 2 échantillons bovins. Le Tableau 18 montre la présence ou l'absence des 3 peptides bovins sélectionnés pour la production d'anticorps et les analyses de routine avec le triple quadrupôle dans les 2 échantillons bovins extraits avec les 3 protocoles. En ce qui concerne l'échantillon de carcasse bovine, les 3 peptides sont identifiés dans les extraits au TCA - acétone et à l'HCl alors que seul le premier peptide (AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK de l'hémoglobine α) a été identifié dans l'extrait au SDS - Tris. En ce qui concerne l'échantillon de muscle bovin, le deuxième peptide (ALPAAAIEGPAYNR de l'heat shock protein beta-1) et le troisième peptide (SATQSAEITIPVTFQAR de l'heat shock protein beta-1) sont identifiés dans les 3 types d'extraits. Ceci montre encore une fois la supériorité de l'extraction à l'HCl par rapport à celle au SDS - Tris. Nos résultats confirment qu'il n'existe pas d'extraction optimale universelle pour les PATs, car l'extraction dépend fortement du type et de la composition de l'échantillon. De plus, le rendement protéique n'est pas un critère adéquat pour déterminer l'extraction qui fournit le nombre le plus élevé d'identifications. Ces données montrent également la pertinence d'avoir un set d'au moins 3 peptides marqueurs pour détecter une espèce afin de réduire le risque de faux-négatifs, et ce pour les trois protocoles, très différents, comparés dans ce travail.

Les 8 échantillons ont donc été extraits à l'HCl en double, digérés à la trypsine et analysés en spectrométrie de masse avec le Q-TOF. Nous avons ainsi pu rechercher les peptides bovins, porcins, ovins et volaille identifiés grâce à l'extraction au TCA - acétone dans ces échantillons. Le NIFES nous a également fourni les mêmes échantillons extraits et digérés à l'aide de leurs protocoles afin de les analyser en spectrométrie de masse à l'Université de Namur avec le Q-TOF et de rechercher les peptides marqueurs dans ceux-ci. L'extraction protéique au NIFES se fait sur base d'un tampon utilisé pour les gels 2-DIGE (Difference In Gel Electrophoresis) tel que décrit dans (Rasinger *et al.*, 2014), suivie d'un « clean-up » et les extraits sont digérés en utilisant le kit « In-Solution Tryptic Digestion and Guanidination » de ThermoFisher Scientific. Les extraits à l'HCl ont également été envoyés au NIFES pour les analyser en spectrométrie de masse avec leur appareil orbitrap et comparer les peptides/protéines identifiés avec les différents types de protocole d'extraction, de digestion et les différents spectromètres de masse. Ce travail fait l'objet du manuscrit en préparation.

2.4. Recherche des peptides biomarqueurs dans les échantillons extraits à l'aide des protocoles choisis

Les 8 échantillons extraits à l'HCl ont donc été digérés et analysés en spectrométrie de masse à l'aide du Q-TOF, ainsi que les mêmes échantillons extraits et digérés au NIFES avec leurs propres protocoles. Nous pouvons dès lors voir si les peptides biomarqueurs précédemment identifiés dans le premier manuscrit à l'aide de l'extraction au TCA - acétone sont présents dans tous ces extraits protéiques. Les résultats PCR des échantillons sont représentés dans le Tableau 26 des annexes.

En ce qui concerne l'identification des 3 peptides **bovins** (Tableau 19) dans l'échantillon de carcasse (N020), nous retrouvons le peptide de l'hémoglobine (P1 bovin) dans l'extrait du NIFES et le peptide de l'heat shock protein beta-1 (P3 bovin) dans l'extrait de l'UNamur. Pour l'échantillon de muscle (N021), les 2 peptides de l'heat shock protein beta-1 (P2 et P3 bovin) sont identifiés aussi bien dans les extraits de l'UNamur que du NIFES. Même si nous n'identifions pas les 3 peptides, nous pouvons voir que le set de ces 3 peptides est suffisant pour pouvoir identifier ces échantillons comme étant du bovin. Ces résultats démontrent encore une fois l'intérêt de prévoir un set de plusieurs peptides biomarqueurs, ceux-ci restant valables pour des processus d'extraction différents, ce qui confirme leur robustesse. Toutefois, la présence ou l'absence de l'ensemble des 24 peptides marqueurs bovins a été vérifiée. Pour l'échantillon de carcasse (N020), 11 peptides sur 24 ont été identifiés dans l'extrait de l'UNamur contre 8 peptides sur 24 dans l'extrait du NIFES. Pour l'échantillon de muscle (N021), 9 peptides sur 24 ont été identifiés dans l'extrait de l'UNamur contre 5 peptides sur 24 dans l'extrait du NIFES.

Le Tableau 20 montre la présence ou l'absence des 4 peptides **porcins** dans les 2 échantillons de porc. Pour l'échantillon de crétons (N018), le peptide P1 (TSGGAGGLGPLR de la desmine) est identifié dans l'extrait de l'UNamur tandis que le peptide P2 (PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR de l'heat shock protein beta-1) est identifié dans l'extrait du NIFES. La présence ou l'absence de l'ensemble des 15 peptides marqueurs porcins a été vérifiée : 6 peptides sur 15 ont été identifiés dans l'extrait de l'UNamur contre 1 seul peptide sur 15 dans l'extrait du NIFES. Par contre, nous n'identifions aucun de nos 4 peptides dans l'échantillon de farine de sang (N012). Ces résultats sont attendus, car les peptides biomarqueurs sélectionnés font partie des tissus prohibés et donc de muscle porcin. La législation est beaucoup plus complexe en ce qui concerne le sang de porc. En effet, les farines de sang sont interdites alors que les produits de sang tels que l'hémoglobine, le plasma et la poudre de sang sont autorisés. La différence se trouve au niveau des processus de production (Lecrenier et al., en préparation Point 4). Pour éviter tout type d'ambiguïté et comme le but de ce travail est de détecter ce qui est interdit, seules les protéines de muscle ont été sélectionnées pour la recherche de peptides biomarqueurs porcins. Ce qui explique que nous n'identifions pas nos 4 peptides dans la farine de sang. L'équipe de Baeten et al.

Tableau 19. Présence ou non des 3 peptides bovins (sélectionnés sur base de l'extraction TCA – acétone dans le premier manuscrit pour la production d'anticorps et les analyses de routine avec le triple quadrupôle) dans les 2 échantillons bovins NIFES extraits et digérés à l'UNamur (UN) et au NIFES (NI) selon les protocoles respectifs et analysés en Q-TOF à l'UNamur. Avec le set de ces 3 peptides, tous les échantillons bovins (n = 2) sont détectés comme étant du bœuf. P1: AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK (hémoglobine alpha); P2: ALPAAAIEGPAYNR (Heat shock protein beta-1); P3: SATQSAEITIPVTFQAR (Heat shock protein beta-1). v: présent; x : absent.

Echantillons bovins	P1 bovin		P2 bovin		P3 bovin	
	UN	NI	UN	NI	UN	NI
N020 Carcasse	x	v	x	x	v	x
N021 Muscle	x	x	v	v	v	v

Tableau 20. Présence ou non des 4 peptides porcins (sélectionnés sur base de l'extraction TCA – acétone dans le premier manuscrit pour la production d'anticorps et les analyses de routine avec le triple quadrupôle) dans les 2 échantillons porcins NIFES extraits et digérés à l'UNamur (UN) et au NIFES (NI) selon les protocoles respectifs et analysés en Q-TOF à l'UNamur. P1: TSGGAGGLGPLR (desmine); P2: PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR (heat shock protein beta-1); P3: GGPLTAAYR (anhydrase carbonique 3); P4: HDPSLLPWTASYDPGSAK (anhydrase carbonique 3). v: présent; x : absent.

Echantillons porcins	P1 porcin		P2 porcin		P3 porcin		P4 porcin	
	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI
N012 Farine de sang	x	x	x	x	x	x	x	x
N018 Greaves	v	x	x	v	x	x	x	x

Tableau 21. Présence ou non des 5 peptides ovins (sélectionnés sur base de l'extraction TCA – acétone dans le premier manuscrit) dans l'échantillon ovin NIFES extrait et digéré à l'UNamur (UN) et au NIFES (NI) selon les protocoles respectifs et analysé en Q-TOF à l'UNamur. P1: FFEHFGDLSNADAVMNNPK (beta-K globin chain); P2: HHGNEFTPVLQADFQK (beta-K globin chain); P3: HHGSEFTPVLQAEFQK (beta-A globin chain); P4: VGGNAGAYGAEALER (alpha globine); P5: LLSHTLLVTLACHLPNDFTPAVHASLDK (alpha globine). v: présent; x : absent.

Echantillons ovins	P1 ovin		P2 ovin		P3 ovin		P4 ovin		P5 ovin	
	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI
N022 Carcasse	x	x	x	x	x	x	x	v	x	x

Tableau 22. Présence ou non des 16 peptides de volaille dans les 3 échantillons de volaille NIFES extraits et digérés à l'UNamur (UN) et au NIFES (NI) selon les protocoles respectifs et analysés en Q-TOF à l'UNamur. P1: DNADLANEIR (Myosin-11); P2: LQIEVENVTSLLNEAESK (Myosin-11); P3: EEMAEELASANSGR (Myosin-11); P4: IAQLEEELDEEHSNIETMSDR (Myosin-11); P5: TFGGGTSPVFPR (Desmin); P6: TSAVPTLSTFR (Desmin); P7: VPFTFLTSPSWEPFR (Heat shock protein beta-1); P8: LLPSESALLPAPGSPYGR (Heat shock protein beta-1); P9: SFLEELLTTQCDR (Myosin regulatory light chain 2); P10: LSVEALNSLEGEFK (Creatine kinase M-type); P11: LLGWVQHR (Filamin C); P12: AYGPGLEPQGNVVLQPAR (Filamin C); P13: SVPVAVESAGPGLHR (Filamin C); P14: FTAAEEGQLR (Filamin C); P15: AVVPSGGPHVGAR (Filamin C); P16: VLASGPGLSPSGVPASLPVEFAIDAR (Filamin C); v: présent; x : absent.

Echan-tillons	P1		P2		P3		P4		P5		P6		P7		P8		P9		P10		P11		P12		P13		P14		P15		P16	
	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI	UN	NI
N002 Farine de sang	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
N008 Carcasse	v	x	v	x	x	x	v	x	v	v	v	v	v	v	v	v	v	x	v	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	v	x
N011 Plumes	x	x	x	x	x	x	x	x	v	x	v	x	x	x	x	x	v	x	v	x	x	x	x	x	x	x	v	x	x	x	x	x

(Lecrenier et al., en préparation) travaille sur ce type de produits que sont les farines de sang, tenant compte de leur législation complexe.

Pour l'échantillon de carcasse **ovine** (N022), aucun des 5 peptides ovins n'est identifié avec l'extraction à l'HCl (Tableau 21) tandis que le peptide P4 (VGGNAGAYGAEALER de l'alpha globine) est identifié dans l'extrait du NIFES. Nous identifions toutefois le peptide SATQSAEITIPVTFQAR (P3 bovin, spécifique ruminant car commun bovin et ovin) dans l'échantillon de carcasse ovine. Ce qui nous permet, malgré le fait que nous n'identifions aucun des 5 peptides ovins dans cet échantillon extrait à l'HCl, d'identifier le sous-ordre ruminants pour cet échantillon. De plus, le fait qu'on ne retrouve ni le P1 bovin ni le P2 bovin dans cet échantillon suggère qu'il s'agirait d'ovin et pas de bovin.

En ce qui concerne les échantillons de **volaille** (Tableau 22), le problème est le même que pour le porc en terme de tissus interdits. Le muscle et les farines de sang sont interdits contrairement aux produits de sang. Voilà pourquoi tous les peptides proviennent de protéines musculaires et que nous n'en identifions pas dans la farine de sang (N002). Dix peptides sur 16 sont identifiés dans l'extrait de l'UNamur pour l'échantillon de carcasse (N008) contre 4 sur 16 dans l'extrait du NIFES. Pour l'échantillon de plumes (N011), 5 peptides sur 16 ont été identifiés dans l'extrait de l'UNamur, par contre aucun peptide marqueur de la volaille n'a été identifié dans l'extrait du NIFES.

En conclusion, étant donné la grande variété de compositions des PATs en fonction des tissus et espèces dont elles proviennent, il semble difficile de choisir un protocole universel d'extraction pour tous les types d'échantillons. Faire un choix sur base du rendement ou des gels n'est pas suffisant, des analyses MS/MS sont dès lors indispensables. Les résultats ont montré que l'extraction avec le plus haut rendement n'était pas la meilleure en terme d'identifications de peptides/protéines. Nous pouvons toutefois, grâce à l'ensemble des peptides identifiés, déterminer à chaque fois l'espèce exacte de l'échantillon, sauf pour les échantillons de sang de porc et de volaille car les « blood products » de ces espèces ne sont pas interdits et nos peptides ciblent des produits (et donc protéines) interdits. De manière générale, les peptides marqueurs sélectionnés sur base de l'extraction TCA - acétone sont bien retrouvés dans les différents échantillons extraits à l'UNamur et au NIFES à l'exception des produits « ambigus » que sont les farines de sang, ce qui confirme leur robustesse.

3. Résultats non publiés : Analyse en Composantes Principales ou Principal Component Analysis (PCA)

3.1. Introduction au modèle statistique de la PCA

Dans ce travail, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la détection de quelques peptides marqueurs (approche ciblée) provenant de produits interdits par la législation européenne. Toutefois, la digestion d'un produit aussi complexe qu'une farine animale génère des milliers de peptides qu'il serait intéressant d'exploiter globalement. Il est donc légitime de se poser la question de l'importance de ces peptides et de la façon dont ceux-ci peuvent être utilisés pour fournir de l'information pertinente sur les échantillons. En outre, parmi les peptides identifiés, nous avons montré que ceux provenant des collagènes n'étaient pas considérés comme les meilleurs marqueurs qui soient à cause du nombre important de modifications post-traductionnelles et du risque d'erreur d'identification lié à celles-ci. Cependant, vu l'abondance de ces protéines dans les échantillons de farines animales, il nous a aussi semblé important de pouvoir les exploiter. L'utilisation d'une analyse statistique non supervisée de type PCA (Principal Component Analysis) sur les données provenant des analyses LC-MS de farines animales pourrait permettre de montrer les différences entre ces farines à l'aide d'une combinaison d'un ensemble de marqueurs de discrimination.

L'analyse en composantes principales ne nécessite pas, dans un premier temps, de travailler avec les spectres de séquençages. Les analyses sont réalisées en mode MS, ce qui nous permet de diminuer le temps d'analyse en chromatographie liquide. Par contre, nous avons réalisé plusieurs réplicats techniques pour chaque échantillon de farine afin d'obtenir des informations sur la répétabilité des analyses en spectrométrie de masse. Les données brutes correspondant à la masse, au temps de rétention et à l'intensité des peptides doivent être traitées avant de pouvoir réaliser la PCA. Comme l'ionisation par électrospray génère des ions multichargés, les peptides peuvent se décliner sous plusieurs formes chargées. Le rôle de la première étape du traitement des données brutes consiste en la recherche de ces différents états de charge d'un même peptide afin de les transformer en une masse monochargée dont l'intensité correspond à la somme des intensités des différents états de charge et pics isotopiques du peptide (recherche des « **Molecular Features** »). Vu la complexité des échantillons en analyse protéomique et malgré la très bonne résolution des appareils utilisés, l'algorithme « Find Molecular Features » (FMF) identifie plusieurs masses identiques ou se trouvant dans la gamme d'erreur tolérée par notre appareil (0,05 Da). C'est pourquoi, sans l'apport du séquençage, nous devons caractériser un peptide par son rapport masse/charge et par son temps de rétention. Cette étape de création du couple RT-m/z est aussi prise en charge par l'algorithme FMF. Les analyses LC-MS doivent donc être réalisées dans les mêmes conditions techniques afin d'obtenir des temps de rétention reproductibles. La seconde étape consiste en la création de la matrice des variables. Au niveau du logiciel « Profile Analysis »

(Bruker) que nous utilisons pour les analyses PCA, la matrice se nomme la table des « buckets ». Celle-ci associe chaque couple RT-m/z (« buckets ») à son intensité. Outre les paramètres utilisés pour créer la table des «buckets » (voir ci-dessous), nous avons imposé au logiciel un filtre qui limite le nombre d'entrées pour cette table. En effet, afin d'appliquer un modèle PCA à des analyses reproductibles, nous avons établi comme critère qu'un peptide devait être détecté dans au moins trois réplicats techniques sur quatre. Une fois que la table des « buckets » est créée, le **modèle statistique de la PCA** peut être réalisé.

3.1.1. Paramètres utilisés lors du processus de traitement des données avant la PCA

3.1.1.1. LC-MS

Chaque échantillon est **injecté** au minimum 4 fois (réplicats techniques) et subit une analyse LC-MS de 70 minutes avec le Q-TOF. Une erreur classique lors de la constitution des données pour une analyse PCA est l'effet de lots. Cet effet a lieu lorsque les mesures effectuées sont affectées par de nombreux facteurs techniques autres que l'effet biologique recherché (Gastinel, 2012). Etant donné qu'en fonction du nombre d'échantillons, l'entièreté de l'analyse peut prendre beaucoup de temps, nous devons minimiser ce risque d'erreur en injectant les différents réplicats techniques de manière sériée et non par lots. Nous avons aussi réalisé, pour certains échantillons, une analyse MS/MS de 70 minutes afin de pouvoir identifier les peptides marqueurs que nous espérons trouver grâce à la PCA.

3.1.1.2. « Find Molecular Features »

Les paramètres utilisés afin de détecter les « features » sont les suivants :

- « signal to noise threshold » : > 5 (intensité du signal par rapport au bruit de fond).
- « correlation coefficient threshold » : 0,7 (coefficient utilisé pour pouvoir assigner des pics de charges différentes au même peptide).
- « minimum compound length » : 20 (nombre de spectres nécessaires pour que la masse soit prise en considération).

Le logiciel procède également à un **alignement des temps de rétention** de façon à pouvoir comparer les données d'une analyse à l'autre. Les chromatogrammes des différentes injections sont alignés pour prendre en compte les variations techniques non linéaires (Podwojski *et al.*, 2009).

3.1.1.3. Création de la table des « buckets »

Les paramètres utilisés afin de **créer la table des « buckets »** sont les suivants :

- gammes : entre 10 et 40 minutes (les lavages sont exclus) et m/z entre 400 et 1600.
- « bucketing » : on crée la table des « buckets » par rapport aux paramètres d'alignement.

- normalisation : par quantiles, en appliquant une distribution d'intensité identique des peptides dans chaque analyse LC-MS (Bolstad *et al.*, 2003), ce qui permet d'atténuer les biais techniques des analyses LC-MS.
- « value count of group attribute within bucket » : un « bucket » doit se retrouver dans au moins 3 réplicats techniques sur 4.

De plus, les « buckets » nuls sont autorisés. Ce paramètre permet que des peptides soient absents de certaines analyses. Il est très important dans notre cas de cocher ce paramètre car ce sont ces peptides responsables des différences entre échantillons qui nous intéressent. Les intensités subissent une transformation logarithmique de façon à atténuer l'impact des variations d'intensités afin de faire ressortir des informations intéressantes. En effet, dans le cas d'une détection de produits prohibés, c'est la présence ou l'absence d'un peptide qui nous intéresse et dans une moindre mesure son abondance.

3.1.2. Visualisation des résultats par la PCA

L'ensemble des données contenues dans un grand nombre d'analyses est représenté en 2 graphes: le « Scoring plot » et le « Loading plot ». Le **« Scoring plot »** est la distribution d'une analyse complète. Celui-ci fournit une information globale de la diversité entre les mesures. La PC1 représente la direction de la plus grande variance entre les échantillons tandis que la PC2 représente la direction de la seconde plus grande variance observée entre les échantillons. Dans notre cas, la PC1 (abscisse) fournit une information sur la variabilité entre les échantillons alors que la PC2 (ordonnée) fournit une information sur la répétabilité de l'analyse. Le fait de travailler avec les 2, voire les 3 premières composantes principales simplifie l'interprétation des données mais réduit également le bruit de fond (Gastinel, 2012). Chaque point du **« Loading plot »** représente un « bucket » (couple RT-m/z). On peut considérer de manière simplifiée que ces points représentent des peptides. Ces deux graphes sont étroitement liés. Effectivement, les points à gauche du « Loading plot » sont en lien direct avec les échantillons présents à gauche du « Scoring plot ». Dans notre cas, par volonté de distinction des échantillons entre eux, ce sont les points extrêmes du « Loading plot » qui seront intéressants car ce sont eux qui sont responsables de la séparation des échantillons au niveau de la PC1. Les points situés au centre du graphe sont des peptides variant peu d'un échantillon à l'autre et sont dès lors moins intéressants lors de la recherche de peptides marqueurs.

Trois analyses PCA ont été réalisées : la première sur des farines de différentes espèces, la deuxième sur les mélanges de PATs et la dernière sur les « blind samples ».

3.2. PCA sur des échantillons de PATs d'espèces différentes

L'objectif de cette première analyse PCA est de comparer des échantillons d'espèces différentes mais aussi de mêmes espèces mais de provenances différentes. Deux échantillons bovins d'origine différente (CRA-W et NIFES), un échantillon de mouton, un échantillon de porc et un échantillon de volaille ont été analysés en spectrométrie de masse. Quatre analyses

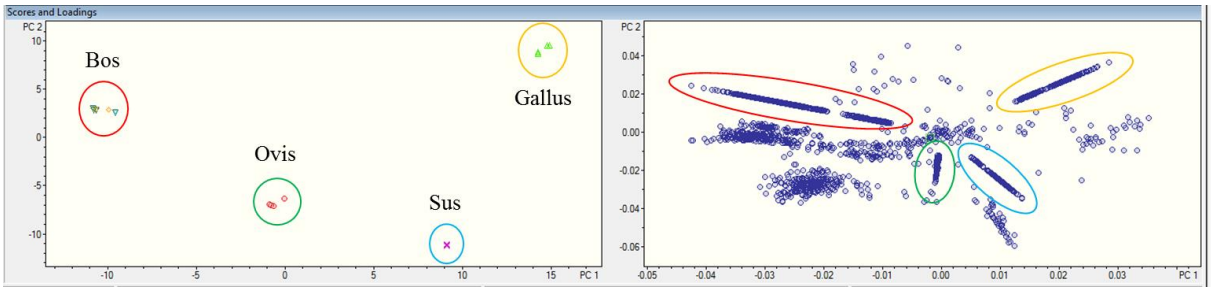


Figure 68. Analyse PCA (« Scoring plot » et « Loading plot ») de deux échantillons de bovin (*Bos*) (CRA-W et NIFES), un échantillon de mouton (*Ovis*), un échantillon de porc (*Sus*) et un échantillon de volaille (*Gallus*). PC1 en abscisse et PC2 en ordonnée. Cinq composantes principales sont nécessaires pour expliquer 90 % de la variance. La PC1 explique 45,4 % de la variance et la PC2 explique 21,9 % de la variance.

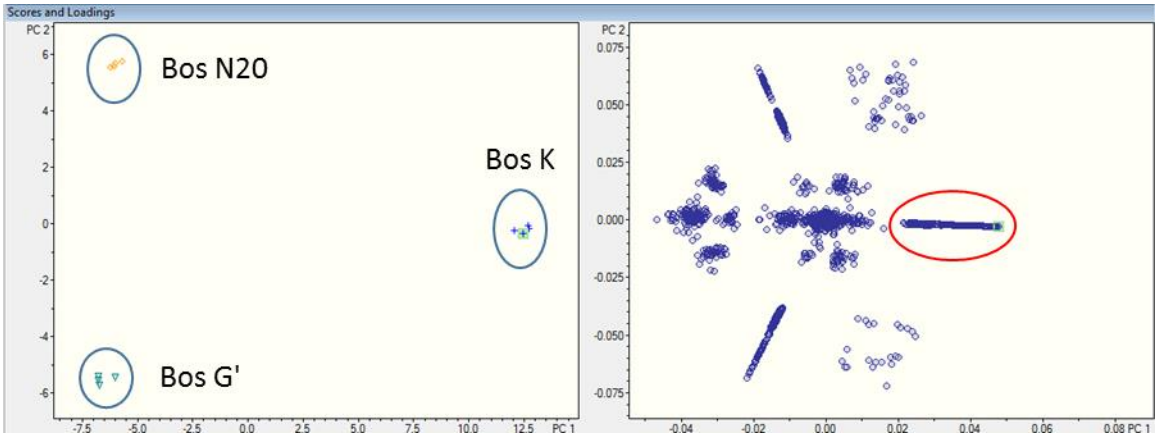


Figure 69. Exemple d'analyse PCA de 3 échantillons bovins (*Bos* N20, G' et K). L'échantillon « Bos K » est éloigné des 2 autres échantillons bovins suivant la PC1 dans le « Scoring plot » et présente effectivement une contamination porcine, confirmée grâce aux « buckets » identifiés dans le « Loading plot » (cercle rouge). PC1 en abscisse et PC2 en ordonnée. Six composantes principales sont nécessaires pour expliquer 90 % de la variance. La PC1 explique 63,2 % de la variance et la PC2 explique 16, 9% de la variance.

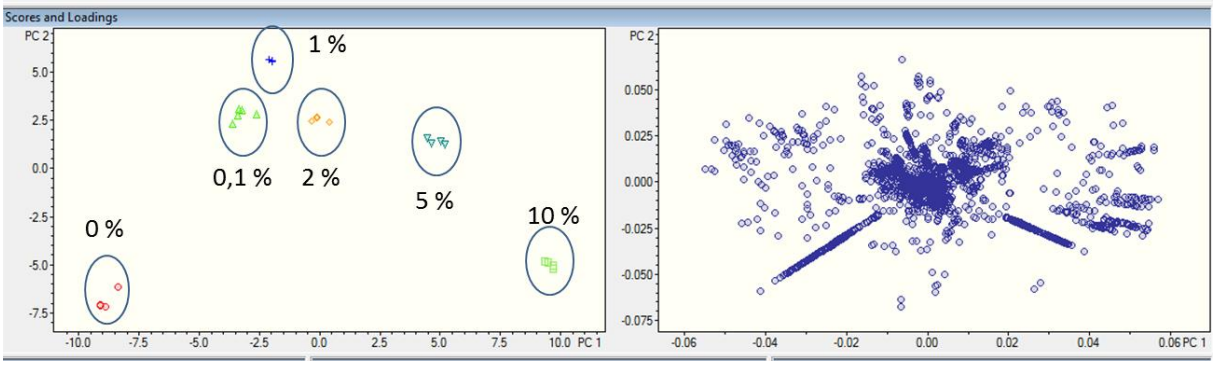


Figure 70. Analyse PCA (« Scoring plot » et « Loading plot ») de différents mélanges de PATs à raison de 0 ; 0,1 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 % de bovin dans du porc. PC1 en abscisse et PC2 en ordonnée. Dix-sept composantes principales sont nécessaires pour expliquer 90 % de la variance. La PC1 explique 28,7 % de la variance et la PC2 explique 16,4 % de la variance.

LC-MS de septante minutes ont été réalisées pour chaque échantillon. Les résultats de l'analyse PCA sont représentés à la Figure 68.

On remarque au niveau du « Scoring plot », une séparation entre les points des différents groupes d'espèces suivant l'axe de la PC1. En effet, les 2 échantillons de bovins (*Bos*) peuvent être différenciés des échantillons de mouton (*Ovis*), de porc (*Sus*) et de volaille (*Gallus*). Les échantillons bovins et ovin sont proches car ce sont des ruminants tandis que l'échantillon de volaille est plus éloigné, car il ne s'agit pas d'un mammifère, contrairement aux trois autres espèces. Il est également important de voir que les 2 échantillons bovins d'origine et de composition différentes (CRA-W et NIFES) sont regroupés au même endroit du graphe. Au premier coup d'œil, cette analyse PCA permet donc de différencier des échantillons d'espèces différentes. L'axe de la PC2 montre une bonne répétabilité de l'analyse car chaque injection présente une faible variabilité par rapport aux autres injections du même échantillon.

Au niveau du « Loading plot », les points situés à la gauche du graphe (cercle rouge) correspondent à des peptides potentiellement spécifiques du bovin car les échantillons bovins sont à la gauche du « Scoring plot ». Les « buckets » entourés en vert correspondent à des peptides identifiés dans l'échantillon de mouton, ceux entourés en bleu correspondent à des peptides identifiés dans l'échantillon de porc tandis que les points entourés en jaune correspondent à des peptides identifiés dans l'échantillon de volaille.

Si on introduit dans le modèle PCA les 2 échantillons bovins analysés précédemment (Bos G' et N20) ainsi qu'une farine bovine contaminée (Bos K), on obtient les « Scoring plot » et « Loading plot » représentés à la Figure 69. Selon l'axe de la PC1, l'échantillon bovin K est éloigné des deux autres, ce qui sous-entend une différence entre cet échantillon et les 2 autres échantillons de bovin. Les « buckets » positionnés à la droite du « Loading plot » (cercle rouge) contiennent effectivement des peptides du collagène α-$_2$(I) de porc, leurs séquences étant retrouvées dans le logiciel ProteinScape grâce à leur couple « RT-m/z » et à l'analyse MS/MS. Les résultats PCR (fournis par le CRA-W) confirment une contamination de cet échantillon avec du mouton, du porc et de la volaille.

3.3. PCA sur des mélanges de PATs

Les mélanges de PATs « bœuf - porc » à raison de 0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 % ont été analysés en PCA. Cinq analyses LC-MS de septante minutes ont été réalisées pour chaque échantillon. Les résultats de l'analyse PCA sont représentés à la Figure 70. Les deux mélanges 0,5 et 1 % se confondent, que ce soit dans cette analyse ou dans une analyse préliminaire réalisée en 2014 par un autre expérimentateur avec différentes farines aux mêmes pourcentages. Au stade actuel des analyses en PCA, nous n'avons pas d'explication. C'est pourquoi le mélange 0,5 % est enlevé de la Figure 70. Le « Scoring plot » montre, suivant l'axe de la PC1, une séparation entre les différents mélanges et cela dans l'ordre croissant du

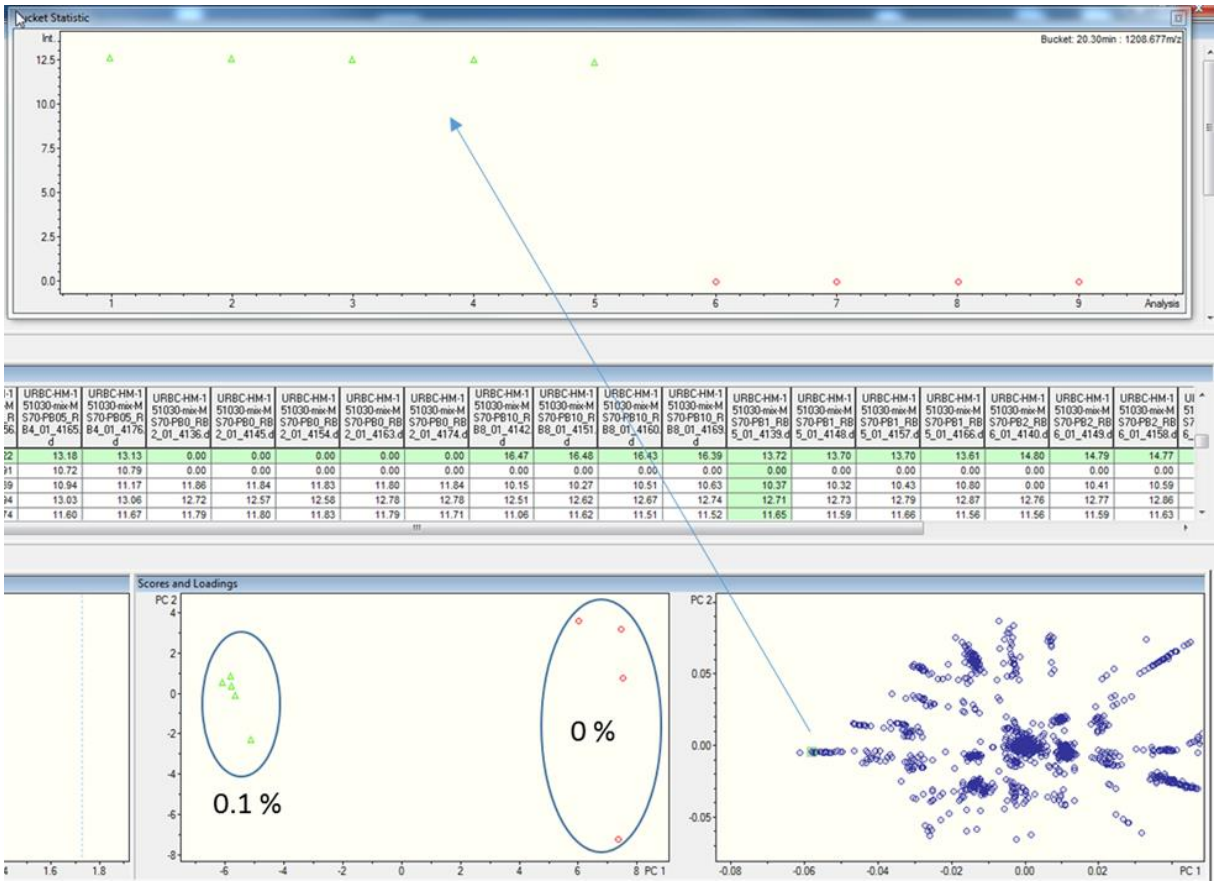


Figure 71. Exemple de recherche de peptides biomarqueurs bovins grâce à l'analyse PCA dans les mélanges 0 % et 0,1 % de « bovin-porc ». PC1 en abscisse et PC2 en ordonnée. Sept composantes principales sont nécessaires pour expliquer 90 % de la variance. La PC1 explique 47,5 % de la variance et la PC2 explique 10,6 % de la variance.

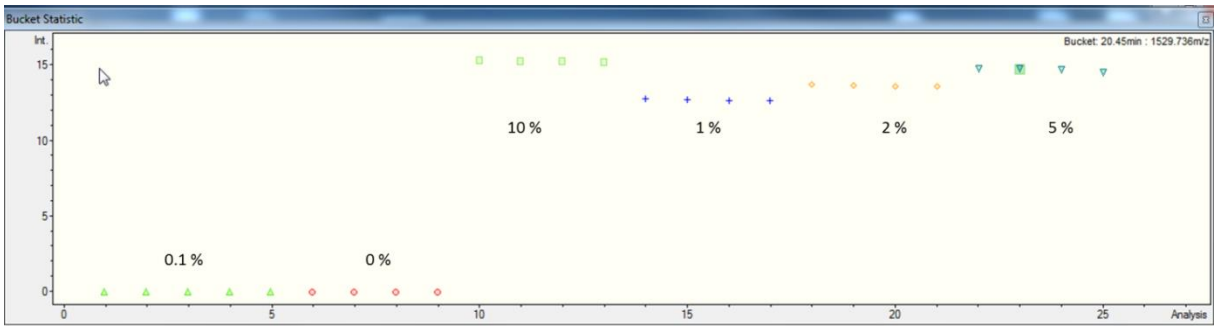


Figure 72. Intensité du peptide VGGHAAEYGAEALER (hémoglobine *α* de *Bos taurus*) dans les différents mélanges de PATs bovin-porc.

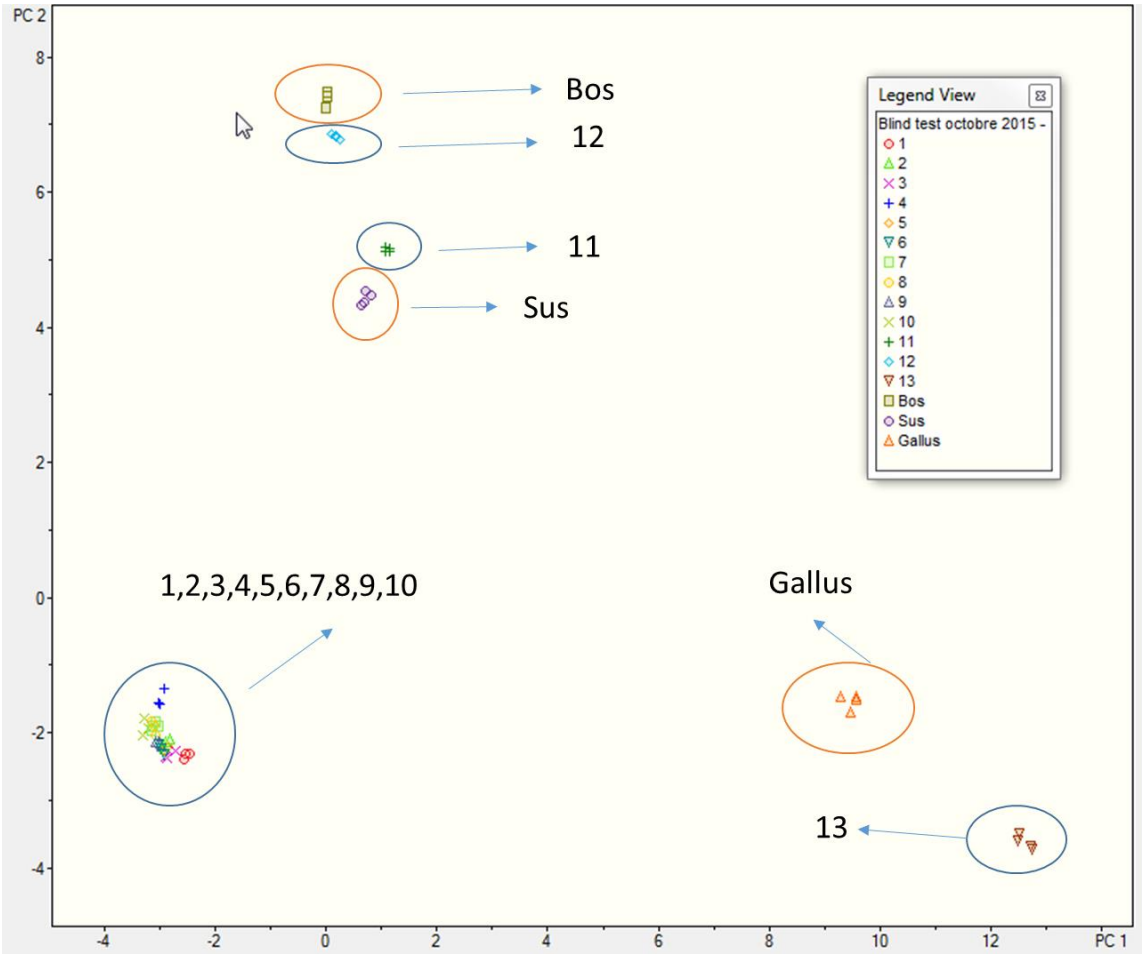


Figure 73. « Scoring plot » de l'analyse PCA des « blind samples », d'un échantillon de bovin (*Bos*), d'un échantilon de porc (*Sus*) et d'un échantillon de volaille (*Gallus*). PC1 en abscisse et PC2 en ordonnée. Dix composantes principales sont nécessaires pour expliquer 90 % de la variance. La PC1 explique 32,7 % de la variance et la PC2 explique 20,1 % de la variance.

pourcentage de bovin. La PCA arrive donc à différencier les pourcentages jusqu'à faire la différence entre 0 et 0,1 %.

Le pourcentage de variation expliqué par les deux premières PC est de moins de 50 % dans ce cas-ci, ce qui est assez faible. En effet, 17 composantes principales sont nécessaires pour expliquer 90 % de la variance. Il y a très peu de variations entre les échantillons, le seul paramètre différenciant les échantillons étant le pourcentage de farine bovine. La composante principale la plus intéressante est la PC1 car elle explique la plus grande variance entre les échantillons.

Une comparaison intéressante afin d'identifier des peptides spécifiques du bovin est d'afficher dans le « Scoring plot » uniquement les mélanges 0 et 0,1 %, la seule chose les différenciant étant un faible pourcentage de farine bovine (Figure 71). On peut ainsi essayer d'identifier des peptides spécifiques du mélange 0,1 % au niveau du « Loading plot ». Ce sont donc les points qui se situent à gauche. Parmi ceux-ci, nous en avons sélectionné un qui est présent dans l'échantillon 0,1 % et absent de l'échantillon 0 %. Son intensité est visible dans le graphe supérieur ou les triangles verts représentent les réplicats du mélange 0,1 % et les cercles roses représentent les réplicats du mélange 0 %. La séquence de ce « bucket » est retrouvée, dans le logiciel ProteinScape, grâce à l'analyse MS/MS : IGQPGAVGPAGIR spécifique du collagène α-$_2$(I) de *Bos taurus*. Celui-ci est également retrouvé dans l'échantillon 0,1 % de l'expérience de 2014 réalisée avec d'autres mélanges de farines. Une autre comparaison entre les mélanges 0 et 2 % a permis d'identifier un autre peptide spécifique du bovin : VGGHAAEYGAEALER provenant de l'hémoglobine α de *Bos taurus*. La Figure 72 montre l'intensité croissante de ce peptide dans les différents mélanges de 0 à 10 %. Ces deux peptides avaient également été identifiés grâce à l'approche sans *a priori* (Q-TOF).

Ces exemples démontrent que la PCA peut aider à la recherche de peptides biomarqueurs et ce avec une limite de détection plus faible que la technique « classique » sans *a priori* (Q-TOF) ou la technique ciblée (triple quadrupôle). Même si les 2 peptides avaient déjà été détectés par l'analyse sans *a priori*, la PCA sépare une farine de porc de la même farine altérée avec 0,1 % de bovin, ce que nous ne sommes pas parvenus à faire avec le Q-TOF en analyse LC-MS/MS ou avec le triple quadrupôle (Tableau 11).

3.4. PCA sur les « blind samples »

Une analyse PCA a été réalisée sur les 13 « blind samples ». Pour avoir un repère d'espèce connue, un échantillon de PATs de bovin, un échantillon de PATs de porc et un échantillon de PATs de volaille ont également été analysés en même temps. Chaque échantillon a été injecté 4 fois (analyse LC-MS de 70 minutes). Les résultats de l'analyse PCA sont représentés à la Figure 73, les « blind samples » étant notés 1 à 13, l'échantillon connu de bovin étant noté « *Bos* », l'échantillon connu de porc « *Sus* » et l'échantillon connu de volaille « *Gallus* ».

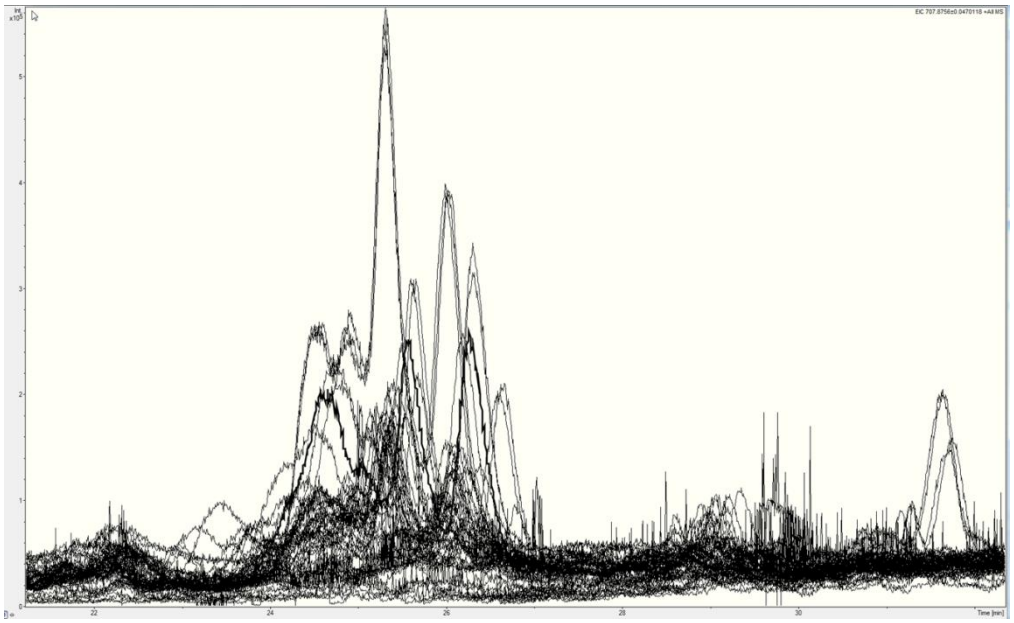


Figure 74. Extracted Ion Chromatogram (EIC) du peptide ALPAAAIEGPAYNR (P2 bovin) de heat shock protein beta-1 (*Bos taurus*). La résolution des pics est mauvaise, ce qui explique la non détection de ce peptide en PCA.

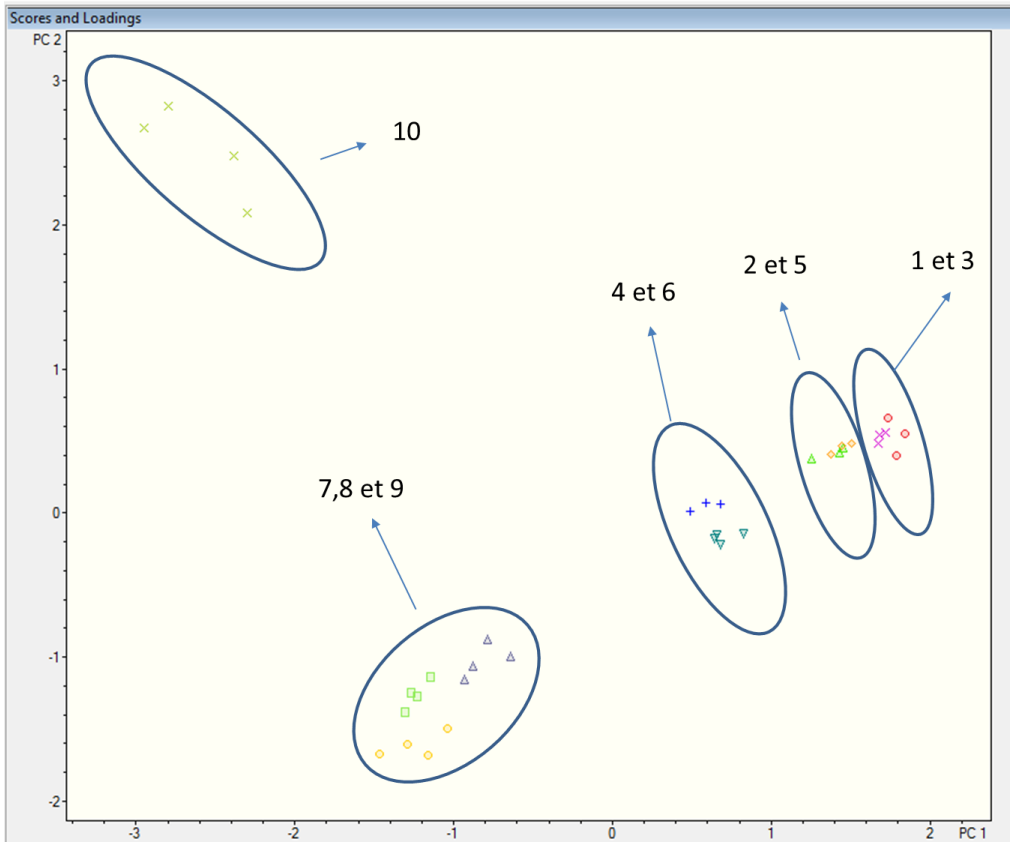


Figure 75. « Scoring plot » de l'analyse PCA des 10 premiers « blind samples ». PC1 en abscisse et PC2 en ordonnée. Vingt et une composantes principales sont nécessaires pour expliquer 90 % de la variance. La PC1 explique 21,9 % de la variance et la PC2 explique 10,7 % de la variance.

Le « Scoring plot » confirme directement les résultats précédemment obtenus grâce aux analyses LC-MS/MS sans *a priori* avec le Q-TOF et à la recherche des 7 peptides biomarqueurs avec le triple quadrupôle. Les 10 premiers « blind samples » sont de composition assez proche tandis que l'échantillon 11 est un échantillon de PATs de porc, le 12 est un échantillon de PATs de bovin et le 13 de volaille. Par la recherche de peptides spécifiques dans le « Loading plot », nous retrouvons le peptide marqueur SATQSAEITIPVTFQAR (P3 bovin) dans les échantillons 1 à 10 et 12, ainsi que dans la farine bovine connue. Cela confirme l'identification de ce peptide par les 3 méthodes (LC-MS/MS en Q-TOF, LC-MS en PCA et triple quadrupôle). On peut remarquer que ce peptide n'était pas identifié dans l'analyse MS/MS avec le Q-TOF pour les échantillons 7 et 8, ce qui montre une meilleure sensibilité de la PCA. En ce qui concerne les deux autres peptides bovins biomarqueurs (P1 et P2 bovins), ils ne sont pas détectés au niveau de l'analyse PCA à cause d'une mauvaise résolution des pics isotopiques, qui empêche la détection de la charge du peptide par l'algorithme FMF. La Figure 74 représente l'extraction du signal correspondant au rapport m/z du peptide ALPAAAIEGPAYNR (P2 bovin) du chromatogramme total. Le peptide IGQPGAVGPAGIR spécifique du collagène α-$_2$(I) de *Bos taurus* est également présent dans tous les « blind samples » sauf dans les 11 et 13 ; ce qui confirme la présence de bovin dans les échantillons 1 à 10 et 12. En enlevant les échantillons connus et les « blind samples » 11, 12 et 13, l'analyse PCA arrive à différencier les 10 premiers échantillons (Figure 75). Toutefois, la PCA seule, n'est pas d'une grande aide pour les identifier. Il serait judicieux, dans la suite de ce travail, de comparer chaque « blind samples » avec les farines d'espèce connue ou encore de comparer les « blind samples » 2 par 2 afin de déterminer les peptides extrêmes.

3.5. Conclusion

La PCA a énormément d'avantages. Ce type d'analyse permet d'obtenir une empreinte globale des échantillons. En effet, au premier coup d'œil, une comparaison des échantillons peut être effectuée grâce au « Scoring plot ». Il est aisé d'identifier les points du « Loading plot » qui représentent des peptides biomarqueurs en faisant des comparaisons de 2 ou 3 échantillons de façon à simplifier le « Loading plot ». La PCA est très sensible car l'acquisition est réalisée en mode MS, ce qui permet de caractériser un pic chromatographique par un nombre plus élevé de points. L'intensité d'un rapport m/z est plus précise et reproductible par rapport à une analyse en MS/MS.

Cependant, un certain nombre de limitations sont à prendre en compte. La première est de devoir rechercher manuellement, dans le logiciel ProteinScape, la séquence correspondant à ces points extrêmes grâce à leur couple RT-m/z et à l'analyse MS/MS réalisée. Pour l'instant, le séquençage se fait sur la totalité de l'échantillon, après une chromatographie de 70 minutes. Il est fréquent que nous ne retrouvions pas la séquence correspondant à un point du « Loading plot » car il y a moins de peptides séquencés que dans le cas d'une LC de 215 minutes. Pour contourner ce problème, nous pourrions utiliser une liste d'inclusion qui serait créée

automatiquement à partir des points extrêmes détectés. Grâce à cette liste, le spectromètre ne déclencherait le séquençage qu'au temps de rétention et rapport m/z inclus dans la liste. La seconde limitation concerne le couple RT-m/z. Actuellement nous ne pouvons pas nous départir du temps de rétention vu la complexité des analyses, ce qui signifie qu'il est impossible d'alimenter un ensemble d'analyses PCA par de nouvelles farines à tester. Il suffit de changer les solvants ou la colonne pour avoir une variation du temps de rétention.

On a pu voir, dans l'ensemble des analyses PCA réalisées, que les collagènes étaient abondamment identifiés dans les points extrêmes du « Loading plot ». Ceux-ci ne sont en effet pas considérés comme de bons peptides marqueurs en identification « classique » au moyen d'un Q-TOF ou d'un triple quadrupôle. Toutefois, la PCA permet de les différencier parmi des centaines d'autres peptides et pourrait donc permettre de reconsidérer le choix des peptides de collagènes comme biomarqueurs.

Cette méthode répond au manque de répétabilité que l'on peut avoir dans les analyses précédentes de recherche de peptides marqueurs. Avec des analyses LC-MS/MS de 215 minutes, il est techniquement difficile de réaliser des réplicats techniques étant donné le temps machine nécessaire pour chaque analyse. Dans le cas d'une analyse PCA, plusieurs réplicats techniques (actuellement de 70 minutes) ont été réalisés, ce qui permet de vérifier la répétabilité de nos analyses. A partir du moment où nous pourrions ne séquencer que les points d'intérêt identifiés dans le « Loading plot », cette technique deviendrait encore plus avantageuse. Nous pourrions également envisager de diminuer encore le temps d'analyse en dessous de 70 minutes.

Partie 2 : analyses peptidomiques des PATs présentes dans des échantillons sanguins

4. « Identification of specific bovine blood biomarkers by a non-targeted approach using HPLC ESI tandem mass spectrometry »

4.1. Introduction au manuscrit

Les résultats du Point 2.4. ont montré une limitation à notre set de peptides marqueurs concernant l'identification des farines de sang de porc. Le manuscrit présenté au Point 4.2. traite d'une identification de ce type de produits en se focalisant tout d'abord sur l'espèce bovine. Nous avons étudié dans cette dernière partie la transposition possible du protocole développé lors du premier manuscrit (Point 1) à l'analyse d'autres types d'échantillons que sont les produits sanguins, pour lesquels la traçabilité est également problématique.

En fonction de la matière première utilisée et du traitement appliqué au sang, on peut distinguer deux types d'ingrédients : les farines de sang et les produits de sang. Les premières, composées de sang complet, font partie des Protéines Animales Transformées tandis que les seconds sont composés de plasma et/ou d'hémoglobine. Le traitement appliqué à ces deux types de produits diffère. Alors que les farines de sang subissent un traitement plus drastique (minimum 80 °C à cœur), le traitement des produits de sang est peu défini. Aucune température n'est en effet fixée dans la législation, ce traitement doit juste garantir la conformité du produit sanguin par rapport à des normes microbiologiques (Commission, 2011). Le sang est traité soit par coagulation et séchage, soit par séparation des fractions de plasma et d'hémoglobine, suivie d'un séchage par pulvérisation afin de produire des poudres de plasma et d'hémoglobine (Taylor and Woodgate, 2003; Woodgate and van der Veen, 2004).

La législation de ces deux types de produits diffère également (Introduction - Tableaux 2 et 3) : les farines de sang et les produits de sang de ruminants sont interdits, les farines de sang de non-ruminants sont autorisées uniquement pour les poissons tandis que les produits de sang de non-ruminants sont autorisés pour les non-ruminants et pour les poissons.

Ce manuscrit est soumis dans le journal « Food Chemistry ».

4.2. Manuscrit « Identification of specific bovine blood biomarkers with a non-targeted approach using HPLC ESI tandem mass spectrometry »

Lecrenier M.C.[1,3,*], Marbaix H.[2], Dieu M. [2,4], Veys P. [1], Saegerman C. [3], Raes M. [2], Baeten V. [1]

The first two authors contributed equally to this work.

[1] *Food and Feed Quality Unit, Agricultural Product Valorisation Department, Walloon Agricultural Research Centre (CRA-W), Chaussée de Namur 24, 5030 Gembloux, Belgium*
[2] *Laboratory of Cellular Biochemistry and Biology (URBC-NARILIS), University of Namur, rue de Bruxelles 61, 5000 Namur, Belgium*
[3] *Research Unit of Epidemiology and Risk Analysis applied to Veterinary Science (UREAR-ULg), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Boulevard de Colonster 20 B42, 4000 Liège, Belgium*
[4] *MaSUN, Mass Spectrometry Facility, University of Namur, rue de Bruxelles 61, 5000 Namur, Belgium*

*Corresponding author (+32 81 62 03 82)

Email addresses: m.lecrenier@cra.wallonie.be (M.C. Lecrenier), helene.marbaix@unamur.be (H. Marbaix), marc.dieu@unamur.be (M. Dieu), p.veys@cra.wallonie.be (P. Veys), claude.saegerman@ulg.ac.be (C. Saegerman), martine.raes@unamur.be (M. Raes), v.baeten@cra.wallonie.be (V. Baeten).

Contributions des auteurs

Marie-Caroline Lecrenier et Hélène Marbaix ont réalisé le travail expérimental avec l'aide de Marc Dieu pour les analyses de spectrométrie de masse. Marie-Caroline Lecrenier a écrit le manuscrit dans le cadre de sa thèse de doctorat. Hélène Marbaix et Pascal Veys ont relu attentivement le manuscrit. Claude Saegerman, Martine Raes et Vincent Baeten sont les PI en charge du programme de recherche et de la supervision de la rédaction du manuscrit.

ABSTRACT

Animal by-products are valuable protein sources in animal nutrition. Among them are blood products and blood meal, which are used as high-quality material for their beneficial effects on growth and health. Within the framework of the feed ban relaxation, the development of complementary methods in order to refine the identification of processed animal proteins remains challenging. The aim of this study was to identify specific biomarkers that would allow the detection of bovine blood products and processed animal proteins using tandem mass spectrometry. Seventeen biomarkers were identified: nine peptides for bovine plasma powder; seven peptides for bovine haemoglobin powder, including six peptides for bovine blood meal; and one peptide for porcine blood. They were not detected in several commercial compound feed or feed materials, such as blood by-products of other animal origins, milk-derived products and fish meal. These biomarkers could be used for developing a species-specific and blood-specific detection method.

KEYWORDS: Processed animal proteins (PAPs), Bovine spongiform encephalopathy (BSE), Bovine, Blood, Biomarkers, Tandem mass spectrometry (MS-MS)

1. INTRODUCTION

In the mid-1980s, the emergence of several transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) was recorded in animals. The consumption by cattle of meat and bone meal (MBM) produced from carcasses of infected animals was incriminated (Bradley, 1991). In order to prevent the further spread of bovine spongiform encephalopathy (BSE), a ban on feeding farmed ruminants with mammalian MBM was introduced in 1994. The partial ban was extended in 2001 to an EU-wide suspension of the use of processed animal proteins (PAPs) in feed for any farmed animal, with a few exceptions, such as the use of fish meal for non-ruminants (Plouvier, et al., 2012). These prevention and control efforts have raised the possibility of the ban being gradually lifted. The reintroduction of non-ruminant PAPs in feed for aquaculture was authorised in 2013 (European Commission, 2013).

The prohibition of the use of animal proteins in animal feed depends on three factors: by-product type, species of origin; and final destination (pets, fur animals or other farmed animals). Regulation (EC) No. 999/2001 (European Union, 2001) describes this prohibition.

In addition to PAPs legislation, the EU banned intra-species recycling through the so-called animal by-product legislation (European Union, 2002), repealed and replaced by Regulation (EC) No.1069/2009 (European Commission, 2009b). In this regulation, animal by-products are defined as: "entire bodies or parts of animal origin or other products obtained from animals, which are not intended for human consumption, including oocytes, embryos and semen." In addition, edible animal products are defined as "products intended for human consumption" (e.g., meat, blood, offal) and edible animal co-products as "parts of animals not

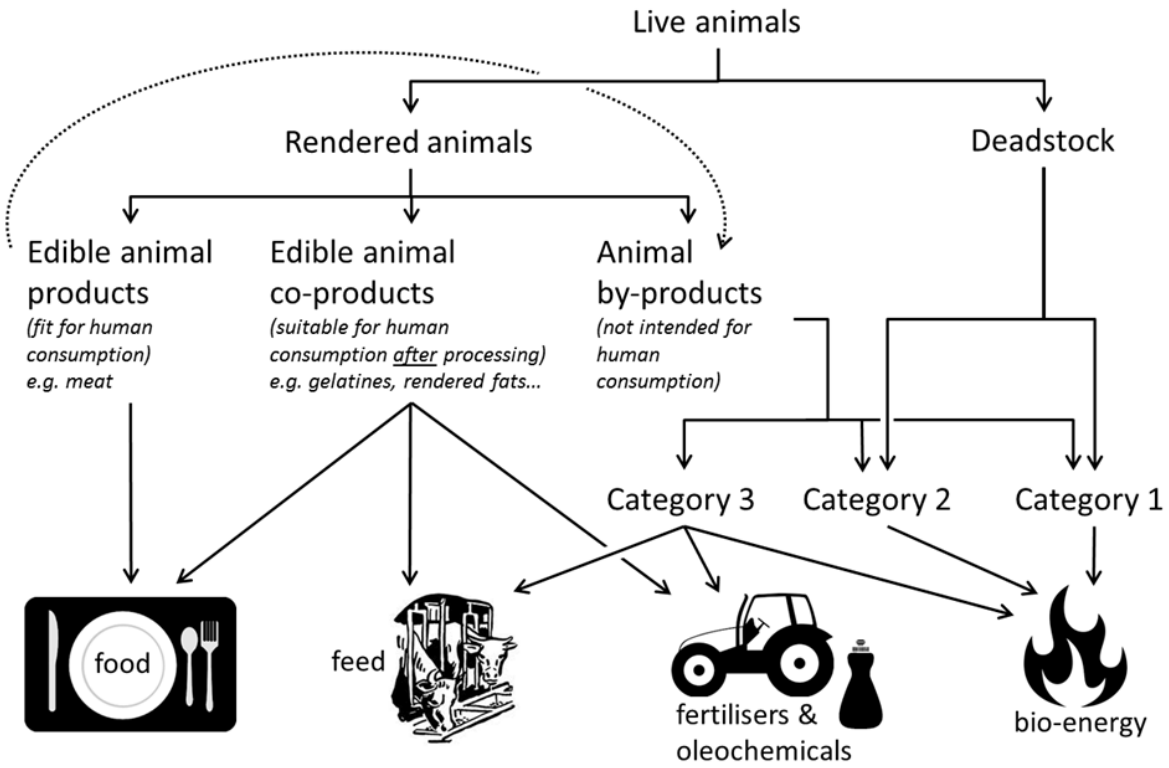


Figure 1. Production flow of animal products, co-products or by-products from farm to end use.

directly suitable for human consumption but which can be later processed for use in human food" (e.g., bones and skin for gelatine and collagen production, sheep intestines for sausage casings, raw fat tissue for edible fat and greaves) (Food Standards Agency, 2011). Regulation (EC) No. 1774/2002 (European Union, 2002) also introduced the classification of animal by-products into three categories based on their potential risk for animals, the public and the environment, and determined how each category could be used. These classifications are summarised in Figure 1.

Category 3 materials are low-risk materials. This category includes by-products derived from healthy animals fit for human consumption, but no longer intended for human consumption (e.g., for commercial reasons). Only Category 3 materials can be used in the production of feed following appropriate treatments in approved processing plants. Animal blood collected at slaughterhouses can be one of these by-products. Depending on the raw material used and the processing applied to the blood, two types of materials can be produced: blood meal or blood products. Blood meal consists of processed animal proteins derived from Category 3 materials other than those materials referred to in Article 10 (n), (o) and (p) of Regulation (EC) No. 1069/2009 (European Commission, 2009b). This material has to undergo heat treatment in accordance with Section 1 of Chapter II of Annex X of Regulation (EU) No. 142/2011 (European Commission, 2011). In contrast, in order to produce blood products, only blood referred to in Articles 10(a) and 10(b)(i) of Regulation (EC) No.1069/2009 can be used and blood products must have been treated in accordance with Section 2 of Chapter II of Annex X of Regulation (EU) No. 142/2011. Blood products include dried/frozen/liquid plasma, dried whole blood, dried/frozen/liquid haemoglobin or fractions and mixtures thereof.

Blood meal and blood products are a valuable protein source in feed. From a legislative standpoint, blood meal and blood products derived from ruminants are forbidden, regardless of their destination. With regard to blood derived from non-ruminants, blood meal is authorised only in fish feed, whereas blood products can be used in feed for non-ruminants and fish. In practice, blood meal and haemoglobin powder are used in fish feed, whereas plasma powder (also known as spray-dried plasma) is used in piglet feed and poultry diets. In addition to its nutritional value, plasma powder has positive effects on growth, feed intake and feed efficiency, and has a protective effect against gut pathogens, especially during vulnerable periods such as weaning (Kats, Nelssen, Tokach, Goodband, Hansen, & Laurin, 1994; Lallès, Bosi, Janczyk, Koopmans, & Torrallardona, 2009).

The method of analysis for determining constituents of animal origin for the official control of feed is described by Commission Regulation (EC) No. 152/2009 (European Commission, 2009a). Using light microscopy, particles such as muscle fibres, cartilage, bones, horn, hair, bristles, feathers, egg-shells and scales are identified on the basis of morphologically identifiable characteristics. This technique is very sensitive, with a limit of detection ranging up to 25 ppm, depending on the matrix and the type of PAPs (Veys, Berben, & Baeten, 2010). One of the restrictions of light microscopy, however, is that it is unable to determine the species or higher taxonomic ranks of origin. The second official method, polymerase chain

reaction (PCR), was introduced when the feed ban was lifted in 2013. This method is based on the amplification of a particular DNA sequence specific to a species or group of species. The developed method allows ruminant DNA to be detected even in highly processed materials (Fumière, Dubois, Baeten, von Holst, & Berben, 2006). It is also very sensitive and reaches the same limit of detection as light microscopy. PCR identifies the species from the DNA present in the analysed matrix, however, regardless of cellular origin (e.g., leucocyte, osteocyte or myocyte). Due to the limitations of each method, even by combining the results, it is not always possible to draw conclusions about the presence of ruminant PAPs (Veys, Berben, Dardenne, & Baeten, 2012). In compound feed for fish, for example, if animal particles of terrestrial origin are microscopically detected and if a positive reaction is obtained using the official ruminant probe by PCR, it is currently impossible to determine whether the feed contains PAPs of porcine origin and milk products (both authorised in aquaculture) or PAPs of bovine origin (prohibited in aquaculture) and porcine blood meal (authorised). In such cases, additional analyses are needed to determine both the species and source of the animal products.

Several methods have been investigated in order to address these shortcomings, including near infrared microscopy (NIRM) (Baeten, von Holst, Garrido, Vancutsem, Michotte Renier, & Dardenne, 2005; Boix, Fernández Pierna, von Holst, & Baeten, 2012; Yang, Han, Fernández Pierna, Dardenne, & Baeten, 2011), light microscopy (Liu, Han, Veys, Baeten, Jiang, & Dardenne, 2011; van Raamsdonk, et al., 2011), fluorescence in situ hybridization (Lecrenier, et al., 2014), immunological assays (van Raamsdonk, Margry, Van Kaathoven, & Bremer, 2015), a combination of microdissection and PCR (Axmann, Adler, Brandstettner, Spadinger, Weiss, & Strnad, 2015) and a combination of NIRM and PCR (Fumière, Marien, Fernández Pierna, Baeten, & Berben, 2010). For the detection of blood in particular, several studies have been conducted on developing monoclonal antibody-based immunoassays targeting bovine thermostable blood proteins (Ofori & Hsieh, 2007), but, as yet, no robust method is available.

Proteomics is another interesting area to investigate. This approach has already been used for food quality and safety purposes (Cunsolo, Muccilli, Saletti, & Foti, 2014; D'Alessandro & Zolla, 2012; Piras, Roncada, Rodrigues, Bonizzi, & Soggiu, 2015; Sentandreu & Sentandreu, 2011) and within the framework of feed safety (Buckley, Collins, Thomas-Oates, & Wilson, 2009; Fernandez Ocana, et al., 2004; Marbaix, et al., 2016; Reece, Chassaigne, Collins, Buckley, Bremer, & Grundy, 2012). Proteomics is particularly suitable for detecting constituents of animal origin because it provides information about the tissue and species of origin. Peptide sequences, as in the case of DNA, have specific polymorphisms that can be traced to their species of origin (Claydon, Grundy, Charlton, & Romero, 2015). Although the DNA content of some by-products is similar, in some cases these by-products could be distinguished based on their protein content. Although the genome remains broadly unchanged in different tissues of the same organism, cells express specific proteins in radically different ways, depending on their differentiation and function. Another important

Table 1. Sample set A: materials of animal origin.

Sample	Species of origin	Number of samples
Blood products		
Plasma powder	Bovine	2
	Porcine	8
Haemoglobin powder	Bovine	2
	Porcine	6
Blood meals		
	Bovine	*2*
	Porcine	2
	Poultry	7
Fresh plasma		
	Bovine	1
	Porcine	1
Milk products		
Whey powder	Bovine	1
Skimmed milk powder	Bovine	1
Milk powder	Bovine	1
Fish meal	Fish	2

characteristic of proteins is the relatively good resistance of their primary structure to processing. Buckley, et al. (2009) reported that protein sequences survive better than DNA in archaeological and heated samples.

The aim of this study was to identify and characterise specific bovine blood biomarkers with a non-targeted approach using high-pressure liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC ESI MS/MS). This work was conducted within the framework of the development of complementary methods for the detection of PAPs in feedingstuffs.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Samples

The compound feeds and materials of animal origin analysed were industrial samples provided by several producers, sellers, laboratories and governmental agencies. These samples were part of the EURL-AP sample bank (http://eurl.craw.eu/) and were stored at 4 °C. Parts of samples were characterised by PCR analysis (Fumière, et al., 2006).

Three sample sets were created – Set A, Set B and Set C – consisting of materials of animal origin, compound feeds and spiked feed, respectively.

A total of 36 feed materials of animal origin were selected for Set A. They were grouped into five categories: blood products (plasma and haemoglobin powder); blood meal; fresh plasma; milk products; and fish meal. The blood products and blood meal were of bovine, porcine or poultry origin. Various types of milk products were chosen: whey powder; skimmed milk powder; and milk powder. Porcine and bovine blood samples were also collected in a 4.5 ml citrate tube (BD Vacutainer 367704, BD-Plymouth, UK) using venepuncture. After centrifugation at 1,600 g for 15 min at room temperature, fresh plasma was stored at - 20 °C. The composition of Set A is summarised in Table 1.

Sample Set B included commercial compound feeds. One horse feed, three chicken feeds and one aquafeed (AQF01) were used as blank feed because they were known to be free of terrestrial animal proteins. In order to test products directly affected by the re-introduction of non-ruminant PAPs in aquafeed, four other aquafeeds (AQF02, AQF03, AQF04 and AQF05) containing animal blood protein were also analysed. According to the labelling, AQF02 contained 7 % spray-dried blood meal, AQF03 and AQF04 both 10 % haemoglobin powder and AQF05 11 % haemoglobin powder. All feeds were ground at 0.5 mm with a rotor mill (ZM200, RetschH, Haan, Germany). Between each grinding, the grinder was disassembled and all the pieces were decontaminated with DNA EraseTM.

For sample Set C, adulterated feeds were prepared by spiking. The horse feed was adulterated at two levels (1 % and 10 %) with bovine plasma powder, haemoglobin powder or blood meal. These levels correspond to the classic level range of non-ruminant blood products or blood meal used in feedingstuffs.

2.2. Protein extraction

Protocols used for protein extraction, purification, digestion and mass spectrometry (MS) analysis were based on the protocol described by Marbaix, et al. (2016) with minor changes. Extraction was performed in 2 ml micro test tubes containing test portions of 200 mg. To each micro test tube, 1.8 ml of trichloroacetic acid/acetone solution (10:90 v/v) with 0.3 % dithiotreitol (DTT) was added and the tubes were then stored at - 20 °C for 3 h. The micro tubes were then centrifuged for 10 min at 16,000 g at 4 °C (1-15PK Refrigerated Microcentrifuge, Sigma, USA) and supernatants were discarded. The remaining pellets were resuspended in 1.8 ml of pure acetone with 0.3 % DTT and stored overnight at - 20 °C. After this, the micro tubes were centrifuged for 10 min at 16,000 g at 4 °C and the supernatants were discarded. The remaining pellets were incubated twice in 1.8 ml of pure acetone with 0.3 % DTT and once in 1.8 ml of 90 % acetone with 0.3 % DTT for 1 h at - 20°C each time and centrifuged after each washing. The supernatants were discarded and the pellets were air-dried for a few minutes, and then suspended in 300 µl of DIGE labelling buffer (urea 7 M, thiourea 2 M, Tris 30 mM, CHAPS 4 %). For pure blood products, 300 additional µl were needed and all the test portions were dispersed using ultrasonication (UIS250V, Hielscher, Ultrasound Technology, Germany, cycle 0.5, amplitude 70 %) for 3 x 10 s on ice. They were then mixed for 1 h at 1,400 rpm at 12 °C in a thermomixer (Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf, Germany) and stored overnight at - 20 °C. The test portions were rewarmed at room temperature and centrifuged for 10 min at 16,000 g at 12 °C. The supernatants were transferred into a new tube and centrifuged at 16,000 g for 10 min at 10 °C using an angle rotor. They were then transferred into 1.5 ml micro tubes and stored at - 20 °C.

2.3. Protein purification

Protein purification was performed on 70 µg of proteins by using the 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare, USA). The pellets were solubilized in 23 µl of RapiGest SF Surfactant 0.2 % (Waters, USA) in ammonium bicarbonate 50 mM. Protein extracts were mixed for 40 min at 15 °C in a thermomixer and then heated at 100 °C for 5 min. The micro tubes were centrifuged at 16,000 g for 5 min at 10 °C and the supernatants were transferred into a new micro tube if a pellet was present. The purified protein extracts were stored at - 20 °C.

2.4. Protein digestion

The protein extracts were reduced by 0.2 µl of DTT 1 M and incubated at 500 rpm for 45 min at 37 °C in a thermomixer. They were then alkylated using 1.47 µl of iodoacetamide 550 mM and incubated in the dark at 500 rpm for 45 min at 37 °C. After this, 0.2 µl of CaCl2 100 mM and trypsin MS grade (Promega, USA) were added in order to obtain a final trypsin/protein ratio of 1/20 (w/w). The extracts were incubated at 300 rpm for 5 h at 37 °C. In order to degrade the RapiGest SF Surfactant and to stop trypsin digestion, trifluoroacetic acid was added (pH < 2) and the digested solutions were incubated at 300 rpm for 30 min at 37 °C.

Each micro tube was then centrifuged at 12,000 g at room temperature for 10 min and the supernatant was recovered and stored at - 20 °C prior to MS analysis.

2.5. MS analyis

The peptides were analysed by using an ESI-MS/MS maXis Impact UHR-TOF (Bruker, Germany) coupled with a nano-UPLC UltiMate 3000 (Thermo, USA). The digests were separated by reverse-phase liquid chromatography using a 75 µm x 250 mm C18 column (Acclaim PepMap 100 C18, Thermo, USA) in an Ultimate 3000 liquid chromatography system. The flow rate was 300 nl/min. Mobile phase A was 95 % water, 5 % acetonitrile and 0.1 % formic acid (Myers, Yancy, Farrell, Washington, Deaver, & Frobish, 2007). Mobile phase B was 20 % water, 80 % acetonitrile and 0.1 % formic acid. The digest was injected and the organic content of the mobile phase was increased linearly from 4 % B to 30 % B in 160 min and from 30 % B to 90 % B in 25 min, and then washed with 90 % B for 10 min. Finally, the column was reconditioned with 4 % B for 20 min, for a total of 215 min. The column effluent was connected to a Captive Spray source (Bruker). In a survey scan, MS spectra were acquired every 0.5 sec in the mass-to-charge (m/z) range between 50 and 2,200. The most intense peptides ions 2+ to 4+ were sequenced over a cycle time of 3 sec. The collision-induced dissociation (CID) energy was automatically set according to the m/z ratio and charge state of the precursor ion. Thermo and maXis systems were piloted by Compass Hystar 3.2 (Bruker).

2.6. Database searching and protein identification

Peak lists were created using DataAnalysis 4.2 (Bruker) and saved as MGF files for use with ProteinScape 3.1 (Bruker), using Mascot 2.4 as the search engine (Matrix Science). The following parameters were used: taxonomy focused on mammals; trypsin digestion; maximum of two missed cleavages; monoisotopic peptide; mass tolerance of 10.0 ppm; and MS/MS tolerance of 0.05 Da. Carbamidomethylation of cysteine, oxidation of methionine and conversion of glutamine in pyroglutamate were allowed as variable modifications. The peak lists were searched against a homemade database (616,520 entries) that contained four taxonomic groups (class Aves, order Rodentia and suborders Ruminantia and Suina) with an automatic decoy database search and a False Discovery Rate (FDR) of 1 %. Scaffold 4.3 (Proteome Software) was used to validate the MS/MS-based protein and peptide identifications. The peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 95 % probability by the Scaffold local FDR algorithm. Protein identifications were accepted if they could be established at greater than 5 % probability in order to achieve an FDR less than 1 % and contained at least two identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (Nesvizhskii, Keller, Kolker, & Aebersold, 2003).

Table 2. Selected proteins in bovine plasma powder, haemoglobin powder, blood meal and fresh plasma.

Protein or protein subunit	Uniprot accession number	Average percentage of sequence coverage (%)			
		BvPl	BvHb	Bvblm	BvFPl
Alpha-2 macroglobulin*	Q7SIH1	44	20	/	50
Apolipoprotein A1*	P15497	72	33	42	66
Fibrinogen alpha chain*	P02672	39	18	5	36
Fibrinogen beta chain*	P02676	45	19	/	49
Fibrinogen gamma chain*	P12799	58	21	/	57
Haemoglobin alpha**	P01966	56	90	97	60
Haemoglobin beta**	P02070	49	84	87	59
Serotransferrin*	Q29443	60	19	2.7	66

Legend:
BvPl, Bovine plasma powder; BvHb, Bovine haemoglobin powder; Bvblm, Bovine blood meal; BvFPl, Bovine fresh plasma; /, not detected
* Protein selected for plasma powder detection
** Protein selected for haemoglobin powder and blood meal detection

2.7. Sequence alignment

Candidate biomarkers were searched against the NCBInr database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) using the standard protein BLAST alignment research tool and blastp algorithm for species specificity.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The methodology used in this study for identifying blood biomarkers involved three steps: a selection of the proteins of interest; an initial selection of candidate biomarkers; and a final selection of the biomarkers based on their specificity. The biomarkers were then challenged by the analysis of commercial feed samples known to contain blood ingredients.

3.1. Selection of the target proteins

For this selection, MS data obtained from blood materials of bovine origin (bovine plasma powder, haemoglobin powder, blood meal and fresh plasma) was used. The proteins were not selected according to their physiologic abundance because the aim of the study was to identify biomarkers for processed blood. The resistance of the proteins to thermal treatment was therefore an important parameter and the selection was done with samples processed under industrial conditions (Fumière, Veys, Boix, von Holst, Baeten, & Berben, 2009). Thus, proteins with the highest sequence coverage were selected.

The selected proteins are presented in Table 2. Five proteins were selected: alpha-2 macroglobulin; apolipoprotein A1; fibrinogen; haemoglobin; and serotransferrin. While serum albumin, immunoglobulins and complement component 3 represented highly abundant plasma proteins, these proteins were not retained because they are also present in milk-derived products (Boehmer, Bannerman, Shefcheck, & Ward, 2008; Swaisgood, 1995).

3.2. Candidate biomarker selection

For the initial selection of biomarkers, two protein groups were created (Table 2). The first group, which included alpha-2 macroglobulin, apolipoprotein A1, fibrinogen and serotransferrin, was chosen for the selection of plasma powder biomarkers. For the second group, haemoglobin was chosen for haemoglobin powder and blood meal biomarker selection.

In order to focus the selection on the more abundant peptides, the study was limited to those peptides detected in the spiked samples (Set C). These peptides were studied in terms of their presence or absence in pure bovine plasma powder, pure bovine haemoglobin powder, pure bovine blood meal and spiked horse feed. The presence of plasma powder biomarkers was also checked in the sample of fresh bovine plasma. In order to be considered as relevant, peptides had to be sequenced in all related samples.

Another selection parameter was the presence of amino acid modifications or missed cleavages. Peptides with missed cleavages were discarded. With regard to the modifications, only methionine oxidation was allowed. A total of 11 peptides met the criteria for plasma

Table 3. Evaluation of the candidate blood biomarkers with regard to their specificity. Presence /absence in porcine blood materials, milk products, poultry blood meal, fish meal and blank feed.

Protein name or protein subunit	Peptide sequence	PcPl (8)	PcHb (6)	PcBlm (2)	PcFPl (1)	Milk products (3)	PoultryBlm (7)	Fish meal (1)	Blank feed (5)
Alpha-2-macroglobulin	**LSFVTVDSNLR**	-	-	-	-	-	-	-	-
	SLFTDVVAEK	-	-	-	-	-	-	-	-
	SNSFVYLEPLPR	-	-	-	-	-	-	-	-
Apolipoprotein A1	**LLDNWDTLASTLSK**	-	-	-	-	-	-	-	-
	LSPLAQELR	-	-	-	-	-	-	-	-
	VAPLGEEFR	-	-	-	-	-	-	-	-
	VSILAAIDEASK*	+ (8/8)	+ (4/6)	+ (2/2)	+ (1/1)	-	-	-	-
Serotransferrin	DNPQTHYYAVAVVK*	+ (7/8)	+ (3/6)	-	+ (1/1)	-	-	-	-
	HSTVFDNLPNPEDR	-	-	-	-	-	-	-	-
	TSDANINWNNLK	-	-	-	-	-	-	-	-
	TYDSYLGDDYVR	-	-	-	-	-	-	-	-
Haemoglobin alpha chain	**AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK**	-	-	-	-	-	-	-	-
	FLANVSTVLTSK*	+ (8/8)	+ (6/6)	+ (2/2)	+ (1/1)	-	-	-	-
	LLSHSLLVTLASHLPSDFTPAVHASLDK	-	-	-	-	-	-	-	-
	MFLSFPTTK**	-	-	-	-	-	-	-	-
	TYFPHFDLSHGSAQVK**	-	-	-	-	-	-	-	-
	VGGHAAEYGAEALER	-	-	-	-	-	-	-	-
Haemoglobin beta chain	**AAVTAFWGK**	-	-	-	-	-	-	-	-
	EFTPVLQADFQK	-	-	-	-	-	-	-	-
	FFESFGDLSTADAVMNNPK	-	-	-	-	-	-	-	-
	LHVDPENFK**	-	-	-	-	-	-	-	-
	LLGNVLVVVLAR*	+ (8/8)	+ (6/6)	+ (2/2)	-	-	-	-	-
	LLVVYPWTQR*	+ (4/8)	+ (6/6)	+ (2/2)	-	-	-	-	-
	VVAGVANALAHR	-	-	-	-	-	-	-	-

Legend:
PcPl, Porcine plasma powder; PcHb, Porcine Haemoglobin powder; PcBlm, Porcine blood meal; PcFPl, Porcine fresh plasma; PoultryBlm, Poultry blood meal
(#), number of samples; +, presence (ratio of positive samples); -, absence
* Non-specific peptides based on mass spectrometry results
** Non-specific peptides based on search against the NCBInr database
In bold, the final selected bovine biomarkers.

powder: three alpha-2 macroglobulin peptides (LSFVTVDSNLR, SLFTDVVAEK and SNSFVYLEPLPR); four apolipoprotein A1 peptides (LLDNWDTLASTLSK, LSPLAQELR, VAPLGEEFR and VSILAAIDEASK); and four serotransferrin peptides (DNPQTHYYAVAVVK, HSTVFDNLPNPEDR, TSDANINWNNLK and TYDSYLGDDYVR). For haemoglobin powder, 13 peptides met the criteria: six peptides of the haemoglobin alpha chain (AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK, FLANVSTVLTSK, LLSHSLLVTLASHLPSDFTPAVHASLDK, MFLSFPTTK, TYFPHFDLSHGSAQVK and VGGHAAEYGAEALER); and seven peptides of the haemoglobin beta chain (AAVTAFWGK, EFTPVLQADFQK, FFESFGDLSTADAVMNNPK, LHVDPENFK, LLGNVLVVVLAR, LLVVYPWTQR and VVAGVANALAHR). For blood meal, eight peptides met the criteria: four peptides of the haemoglobin alpha chain (AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK, FLANVSTVLTSK, MFLSFPTTK and VGGHAAEYGAEALER); and four peptides of the haemoglobin beta chain (AAVTAFWGK, EFTPVLQADFQK, FFESFGDLSTADAVMNNPK and VVAGVANALAHR). These peptides were part of those selected for haemoglobin powder. Even when the protein coverage in pure blood meal samples was high and similar to the haemoglobin powder samples, fewer peptides were identified in feed spiked with bovine blood meal. This difference with regard to haemoglobin powder could be explained by the stronger processing of blood meal. The selected candidate biomarkers are summarized in the second column of Table 3 (this Table is discussed in more detail in subsection 3.3.).

Although the focus of this study was bovine blood detection, one porcine blood biomarker was identified. This porcine blood biomarker (VLQSFSDGLK) is a peptide from the porcine haemoglobin beta chain (Uniprot accession number: P02067). It was observed in all porcine haemoglobin powders (6/6) and blood meal (2/2), as well as in 7 out of 8 porcine plasma powders. Its presence was also positively checked in the fresh porcine plasma sample.

3.3. Specificity evaluation

Species specificity of the candidate biomarkers was evaluated against feed materials of animal origin and blank matrices used in animal feed (Table 3). The presence or not of the candidate biomarkers was therefore assessed in porcine meal samples (eight plasma powders, six haemoglobin powders, two blood meal samples and one fresh plasma sample), three milk product samples, seven poultry blood meal samples, one fish meal and five blank feed samples (horse feed, three chicken feed samples and one aquafeed sample [AQF01]) in order to check their specificity. Five candidate biomarkers were sequenced in the porcine samples. VSILAAIDEASK and FLANVSTVLTSK were systematically present in all tested porcine samples. DNPQTHYYAVAVVK was present in the plasma powder, haemoglobin powder and fresh plasma samples. LLGNVLVVVLAR and LLVVYPWTQR were found in the plasma powder, haemoglobin powder and blood meal samples. These five peptides were therefore kept apart, pending a confirmation of non-specificity by sequence alignment. The

Table 4. Final list of specific biomarkers for bovine and porcine blood detection and their specificities specificities with regard to the blood of cow (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*) and pig (*Sus scrofa*) origin.

Marker	Protein name	Species (protein accession number)	Peptide sequence	Mass $[M+H]^+$	AA position	Bos taurus	Ovis aries	Capra hircus	Sus scrofa
A2M01	Alpha-2-macroglobulin	Cattle (Q7SIH1)	LSFVTVDSNLR	1250.67	350-360	■	■		
A2M02	Alpha-2-macroglobulin	Cattle (Q7SIH1)	SLFTDVVAEK	1108.59	72-81	■	■	■	
A2M03	Alpha-2-macroglobulin	Cattle (Q7SIH1)	SNSFVYLEPLPR	1421.74	455-466	■	■	■	
APO01	Apolipoprotein A1	Cattle (P15497)	LLDNWDTLASTLSK	1576.82	69-82	■	■	■	
APO02	Apolipoprotein A1	Cattle (P15497)	LSPLAQELR	1026.59	164-172	■	■	■	
APO03	Apolipoprotein A1	Cattle (P15497)	VAPLGEEFR	1017.54	142-150	■	■	■	
SER01	Serotransferrin	Cattle (Q29443)	HSTVFDNLPNPEDR	1640.77	230-243	■			
SER02	Serotransferrin	Cattle (Q29443)	TSDANINWNNLK	1389.68	457-468	■			
SER03	Serotransferrin	Cattle (Q29443)	TYDSYLGDDYVR	1466.64	671-682	■	■	■	
HBA01	Haemoglobin alpha chain	Cattle (P01966)	AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK	2367.19	70-91	■			
HBA02	Haemoglobin alpha chain	Cattle (P01966)	LLSHSLLVTLASHLPSDFTPAVHASLDK	2969.61	101-128	■	■		
HBA03	Haemoglobin alpha chain	Cattle (P01966)	VGGHAAEYGAEALER	1529.73	18-32	■	■		
HBB01	Haemoglobin beta chain	Cattle (P02070)	AAVTAFWGK	950.51	8-16	■	■	■	
HBB02	Haemoglobin beta chain	Cattle (P02070)	EFTPVLQADFQK	1422.73	120-131	■	■	■	
HBB03	Haemoglobin beta chain	Cattle (P02070)	FFESFGDLSTADAVMNNPK	2089.95	40-58	■			
HBB04	Haemoglobin beta chain	Cattle (P02070)	VVAGVANALAHR	1177.68	132-143	■			
HBB01p	Haemoglobin beta chain	Pig (P02067)	VLQSFSDGLK	1093.59	68-77				■

Legend:

AA, Amino acid

(■) denotes the presence of a peptide, and (□) the absence of a peptide.

other 19 candidate biomarkers were absent from the porcine samples. None of the candidate biomarkers were present in milk products, poultry blood meal, fish meal or blank feed.

In order to validate the results, the sequences were searched against the entire NCBInr database to establish the specificity of the identified candidate biomarkers. Even when the main materials of animal origin that are likely to give false positive results were tested, it was necessary to search the candidate biomarkers against all farmed species. As the legislation on animal protein use in feed makes a distinction between PAPs of ruminant and non-ruminant origin, peptides found to be similar in non-ruminant farmed animals (i.e., pigs, horses, rabbits, chickens, turkeys) were excluded. Three other peptides were rejected due to similarities with rabbits (LHVDPENFK), with horses (TYFPHFDLSHGSAQVK) or with too many species (MFLSFPTTK, more than 200 matching records). This search also confirmed the previous results for the porcine samples, except for the peptide LLGNVLVVVLAR, which was not assigned to any porcine protein. Another peptide, LLGNVIVVVLAR, was found to match the porcine haemoglobin beta chain. As leucine has the same monoisotopic mass as isoleucine, it is difficult using conventional MS to distinguish these two amino acids. This issue should be kept in mind when selecting biomarkers in order to avoid subsequent false positive results.

The specificity of the unique porcine blood biomarker was tested against bovine samples (plasma powders, haemoglobin powders, blood meal and fresh plasma), poultry samples, milk products, fish meal and blank feed. The porcine biomarker was not found in any of these samples, apart from one of the two bovine blood meal samples. This meal, however, was labelled as a blood meal with 80 % ruminant origin. The origin of the remaining 20 % was not given, but it probably had a porcine or poultry source because these are the main species used for this type of product. PCR analysis revealed that this blood meal gave a positive result with the ruminant probe and the porcine probe, but a negative result for the poultry probe (data not shown). The porcine blood biomarker was also compared with the NBCInr database and its specificity was confirmed.

Table 4 summarizes the final list of the 16 biomarkers selected for the detection of: bovine plasma powder (A2M01, A2M02, A2M03, APO01, APO02, APO03, SER01, SER02 and SER03); bovine haemoglobin powder (HBA01, HBA02, HBA03, HBB01, HBB02, HBB03 and HBB04); and bovine blood meal (HBA01, HBA03, HBB01, HBB02, HBB03 and HBB04). The porcine blood biomarker (HBB01p) is also described. The final list was intentionally kept quite large in order to increase the probability of a successful identification of unauthorised ingredients. With regard to specificity, the search against the NCBInr database revealed that some of the bovine biomarkers were present in sheep and goats. These biomarkers are particularly interesting because they allow other farmed ruminant blood matching regulation (EC) No. 999/2001 (European Union, 2001) to be detected. A2M02, A2M03, APO01, APO02, APO03, SER03, HBB01 and HBB02 are shared by the three species and are therefore consistent with the legal restrictions on the use of animal by-products. A2M01, HBA02 and HBA03 are common to both cows and sheep, the major

sources of ruminant blood. On the other hand, if the specific detection of bovine blood is needed, biomarkers SER01, SER02, HBA01, HBB03 and HBB04 can be used.

3.4. Prospective study on real feeds sample

In order to determine whether the selected biomarkers were fit for a purpose to analyse real commercial compound feeds known to contain blood products or blood meal, four other aquafeed samples (AQF02, AQF03, AQF04 and AQF05) were analysed. These samples were reported to contain 7 to 11 % blood meal or haemoglobin powder. The species of origin of these ingredients was not mentioned, but given the legislation in force for aquafeed, it was probably of porcine or poultry origin because only blood products or blood meal of non-ruminant origin are authorised for aquafeed. By microscopic evaluation, no particles derived from terrestrial animals were detected, but fish particles were observed. These microscopic results are in accordance with the feed declarations about fish meal and blood material, which have been shown to not always be detectable by microscopy (Veys, Berben, & Baeten, 2015). PCR analyses revealed that these feed samples gave a positive result with the porcine probe and a negative result for the poultry probe. For AQF02, AQF03 and AQF04, however, PCR analyses also gave a positive result with the ruminant probe (data not shown). The origin of this ruminant DNA is not known. The hypothesis of a milk origin was investigated using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). These assays, initially developed by the CER Groupe (http://www.cergroupe.be/fr/) for allergen detection in food, are very sensitive in the detection of casein and beta-lactoglobulin, with a limit of quantification of 0.5 ppm and 0.25 ppm, respectively (Dumont, et al., 2010). No milk proteins were detected in AQF02, AQF03 and AQF04. With regard to the MS results, all aquafeed samples gave a positive result for the presence of the porcine biomarker, but no bovine biomarkers were detected. These results are consistent with the expected results for these types of feed products, even though they cannot be linked to the PCR results with the ruminant probe. Unfortunately, it is not yet possible to explain the PCR results. Possible hypotheses are a difference in the limit of detection of both methods or a non-blood origin of the DNA targets found in the feeds. This parameter has yet to be evaluated for this protocol. Forthcoming studies will focus on this issue.

4. CONCLUSION

In this work, candidate bovine specific biomarkers for detecting the presence of blood proteins in feed were identified. Nine biomarkers were selected for the detection of bovine plasma powder and seven biomarkers for the detection of bovine haemoglobin powder, including six biomarkers for the bovine blood meal. One porcine blood biomarker was also identified. The combination of these biomarkers will give an accurate answer about the ingredients used and the species origin of the proteins.

Efforts are now being focused on developing fast and targeted diagnostic biomarker assays that can be implemented in feed control. Such protocols will have to be adapted to triple-

quadrupole MS systems. These instruments are more widely spread in routine laboratories and allow excellent analytic sensitivity for selected biomarkers. Particular attention will focus on evaluating the limit of detection and improving the extraction protocol in order to increase the sensitivity of the method with regard to the proteins of interest. An immunoaffinity column could be used for the selective purification of an extract with regard to the proteins selected in this study. In this way, their concentration in the protein extract would be increased, thus improving the limit of detection and analytic sensitivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the technical teams at the Food and Feed Quality Unit (CRA-W) and the Laboratory of Cellular Biochemistry and Biology (UNamur), as well as the technical and scientific team at the Authentication and Traceability Unit (CRA-W), for their technical assistance and valuable collaboration. They wish also sincerely thank Dr. Gilbert Berben, Dr. Olivier Fumière and Dr. Sergio Mauro for the fruitful discussions on PAPs detection and MS. The MaSUN MS platform is supported by the FNRS/FRFC 2.4.569.09F and the UNamur.

AUTHORS'CONTRIBUTIONS

Authors M.C. Lecrenier and H. Marbaix equally contributed to this work.

BIBLIOGRAPHY

Axmann, S., Adler, A., Brandstettner, A. J., Spadinger, G., Weiss, R., & Strnad, I. (2015). Species identification of processed animal proteins (PAPs) in animal feed containing feed materials from animal origin. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1-10.

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. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(1), 149-157.

Boehmer, J. L., Bannerman, D. D., Shefcheck, K., & Ward, J. L. (2008). Proteomic Analysis of Differentially Expressed Proteins in Bovine Milk During Experimentally Induced Escherichia coli Mastitis. *Journal of Dairy Science, 91*(11), 4206-4218.

Boix, A., Pierna, J. A. F., 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 Additives & Contaminants: Part A, 29*(12), 1872-1880.

Bradley, R. (1991). Bovine spongiform encephalopathy (BSE): the current situation and research. *European Journal of Epidemiology, 7*(5), 532-544.

Buckley, M., Collins, M., Thomas-Oates, J., & Wilson, J. C. (2009). Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry, 23*(23), 3843-3854.

Claydon, A. J., Grundy, H. H., Charlton, A. J., & Romero, M. R. (2015). Identification of novel peptides for horse meat speciation in highly processed foodstuffs. *Food Additives & Contaminants: Part A, 32*(10), 1718-1729.

Cunsolo, V., Muccilli, V., Saletti, R., & Foti, S. (2014). Mass spectrometry in food proteomics: A tutorial. *Journal of Mass Spectrometry, 49*(9), 768-784.

D'Alessandro, A., & Zolla, L. (2012). We are what we eat: food safety and proteomics. *Journal of Proteome Research, 11*(1), 26-36.

Dumont, V., Kerbach, S., Poms, R., Johnson, P., Mills, C., Popping, B., Tömösközi, S., & Delahaut, P. (2010). Development of milk and egg incurred reference materials for the validation of food allergen detection methods. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2(4), 208-215.

European Commission. (2009a). Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Official Journal of European Union, L 54*, 1-130.

European Commission. (2009b). Regulation (EC) No 1069/2009 of 21 October 2009 laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) No 1774/2002 (Animal by-products Regulation). *Official Journal of European Union, L 300*, 1-33.

European Commission. (2011). Commission Regulation (EU) No 142/2011 of 25 February 2011 implementing Regulation (EC) No 1069/2009 of the European Parliament and of the Council laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and implementing Council Directive 97/78/EC as regards certain samples and items exempt from veterinary checks at the border under that Directive Text with EEA relevance. *Official Journal of European Union, L 54*, 1-254.

European Commission. (2013). Commisson regulation (EU) 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. *Official Journal of European Union, L 21*, 3-16.

European Union. (2001). Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Official Journal of European Union, L 147*, 1-40.

European Union. (2002). Regulation (EC) No 1774/2002 of the European Parliament and of the Council of 3 October 2002 laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption. *Official Journal of European Union, L 273*, 1-95.

Fernandez Ocana, M., Neubert, H., Przyborowska, A., Parker, R., Bramley, P., Halket, J., & Patel, R. (2004). BSE control: detection of gelatine-derived peptides in animal feed by mass spectrometry. *Analyst, 129*(2), 111-115.

Food Standards Agency. *Industry guide on edible co-products and animal by products*. (2011). https://www.food.gov.uk/sites/default/files/multimedia/pdfs/ediblecoprod.pdf Access Date 15/10/2015.

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. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 385*(6), 1045-1054.

Fumière, O., Marien, A., Fernández Pierna, J. A., Baeten, V., & Berben, G. (2010). Development of a real-time PCR protocol for the species origin confirmation of isolated animal particles detected by NIRM. *Food Additives & Contaminants: Part A, 27*(8), 1118-1127.

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. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement (BASE), 13*, 59-70 (numéro spécial).

Kats, L. J., Nelssen, J. L., Tokach, M. D., Goodband, R. D., Hansen, J. A., & Laurin, J. L. (1994). The effect of spray-dried porcine plasma on growth performance in the early-weaned pig. *Journal of Animal Science, 72*(8), 2075-2081.

Lallès, J. P., Bosi, P., Janczyk, P., Koopmans, S. J., & Torrallardona, D. (2009). Impact of bioactive substances on the gastrointestinal tract and performance of weaned piglets: a review. *Animal, 3*(12), 1625-1643.

Lecrenier, M. C., Ledoux, Q., Berben, G., Fumière, O., Saegerman, C., Baeten, V., & Veys, P. (2014). Determination of the ruminant origin of bone particles using fluorescence in situ hybridization (Fishbein). *Scientific Reports, 4*.

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. *Microscopy Research and Technique, 74*(8), 735-743.

Marbaix, H., Budinger, D., Dieu, M., Fumière, O., Gillard, N., Delahaut, P., Mauro, S., & Raes, M. (2016). Identification of proteins and peptide biomarkers for detecting banned Processed Animal Proteins (PAPs) in meat and bone meal by mass spectrometry. *Manuscript submitted for publication.*

Myers, M. J., Yancy, H. F., Farrell, D. E., Washington, J. D., Deaver, C. M., & Frobish, R. A. (2007). Assessment of two enzyme-linked immunosorbent assay tests marketed for detection of ruminant proteins in finished feed. *Journal of Food Protection, 70*(3), 692-699.

Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., & Aebersold, R. (2003). A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry, 75*(17), 4646-4658.

Ofori, J. A., & Hsieh, Y. H. (2007). Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Bovine Blood in Animal Feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*(15), 5919-5924.

Piras, C., Roncada, P., Rodrigues, P. M., Bonizzi, L., & Soggiu, A. (2015). Proteomics in food: quality, safety, microbes and allergens. *Proteomics*.

Plouvier, B. M., Baeten, V., Maudoux, J. P., Vanopdenbosch, E., Berkvens, D., Degand, G., & Saegerman, C. (2012). Detection of processed animal protein: European experience and perspectives. *Revue Scientifique et Technique, 31*(3), 1011-1031.

Reece, P., Chassaigne, H., Collins, M., Buckley, M., Bremer, M., & Grundy, H. H. (2012). Proteomic analysis of meat and bone meal and animal feed. In J. S. Jorgensen & V. Baeten (Eds.), *Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs*, (pp. 113-124). Namur: Presses universitaires de Namur.

Sentandreu, M. A., & Sentandreu, E. (2011). Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity. *Meat Sci, 89*(3), 280-285.

Swaisgood, H. E. (1995). Protein and Amino Acid Composition of Bovine Milk. In R. G. Jensen (Ed.), *Handbook of Milk Composition*, (pp. 464-468). San Diego: Academic Press.

van Raamsdonk, L. W. D., Margry, R. J. C. F., Van Kaathoven, R. G. C., & Bremer, M. G. E. G. (2015). Inter-laboratory validation study of two immunochemical methods for detection of processed ruminant proteins. *Food Chemistry, 185*, 333-339.

van Raamsdonk, L. W. D., Pinotti, L., Veys, P., Bremer, M., Hekman, W., Kemmers, A., Campagnoli, A., Paltanin, C., Crespo, C. B., Vliege, J., Pinckaers, V., & Jørgensen, J. S. (2011). New developments in classical microscopy; what can be expected for the official control? *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 15*, 15-24.

Veys, P., Berben, G., & Baeten, V. *CRL-AP Proficiency Test 2009*. (2010). http://www.eurl.craw.eu/img/page/proficiency/CRL_AP_PT_2009_Final_report.pdf Access Date 24/11/2015.

Veys, P., Berben, G., & Baeten, V. *EURL-AP Proficiency Test Microscopy 2014*. (2015). http://eurl.craw.eu/img/page/proficiency/EURL-AP%20report%202014%20final.pdf Access Date 15/12/2015.

Veys, P., Berben, G., Dardenne, P., & Baeten, V. (2012). Detection and identification of animal by-products in animal feed for the control of transmissible spongiform encephalopathies. In J. Fink-Gremmels (Ed.), *Animal Feed Contamination—Effects on Livestock and Food Safety*, (pp. 104-110). Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.

Yang, Z., Han, L., Pierna, J. A. F., Dardenne, P., & Baeten, V. (2011). Review: The potential of near infrared microscopy to detect, identify and quantify processed animal by-products. *Journal of Near Infrared Spectroscopy, 19*(4), 211-231.

Conclusions générales, discussion et perspectives

Au cours de cette thèse, la faisabilité d'une approche peptidomique dans un but de détection et d'identification des composants protéiques d'origine animale dans les aliments pour animaux de rente a été étudiée. En effet, suite à la crise de la maladie de la vache folle, les farines animales utilisées dans l'alimentation du bétail ont été suspectées d'être le vecteur de cette maladie contagieuse. De nombreuses mesures législatives ont été mises en place afin de limiter l'expansion de l'ESB. La première interdiction concerne l'utilisation des PATs de mammifères dans l'alimentation des ruminants en 1994 (Introduction - Tableau 4). Suite à l'extension de l'épidémie, cette interdiction s'est étendue en 2001 à l'interdiction de toutes les PATs dans l'alimentation de tous les animaux de consommation. Etant donné la diminution progressive du nombre d'animaux infectés grâce à ces interdictions, la Commission Européenne a entamé une réflexion sur les possibilités d'assouplissements de la législation. Toutefois, l'utilisation de PATs dans l'alimentation des ruminants ainsi que le recyclage intra-spécifique resteront toujours prohibés. Pour diverses raisons économiques et écologiques, la volonté de réintroduire certaines protéines animales dans l'alimentation du bétail s'est intensifiée ces dernières années. Un premier pas a été franchi en juin 2013, avec la réintroduction des protéines de porc et de volaille dans l'alimentation des poissons d'élevage. L'étape suivante serait de réintroduire les protéines de porc dans l'alimentation des volailles et les protéines de volaille dans l'alimentation des porcs. Cette optique de réintroduction de certaines farines animales et la volonté de faire respecter la législation actuelle concernant l'utilisation de ces PATs impliquent le développement de techniques d'analyse fiables visant à mieux déterminer leur composition et à mieux les caractériser. Plusieurs techniques de détection existent à ce jour : la microscopie optique et la PCR (les deux méthodes officielles), les méthodes proches infrarouges ainsi que les méthodes immunologiques. Chacune de ces techniques présente des avantages et des inconvénients mais aucune ne permet une détermination taxonomique et tissulaire des PATs. En effet, si on détecte des particules osseuses dans un échantillon grâce à la microscopie et si des signaux positifs ruminants et porc sont obtenus en PCR, la distinction entre un échantillon contenant des PATs de porc ainsi que du lait (autorisé en aquaculture) et un échantillon contenant des PATs de bovin ainsi que du sang de porc (interdit) ne peut pas être faite. C'est dans ces types de mélanges qu'une approche peptidomique pourrait constituer un atout majeur, car elle permet de faire cette distinction. Enormément d'études utilisant la spectrométrie de masse ont été réalisées sur de la viande crue ou cuite (Flaudrops *et al.*, 2015; Montowska *et al.*, 2015; Montowska and Pospiech, 2013; Sentandreu *et al.*, 2010; Sentandreu and Sentandreu, 2011; von Bargen *et al.*, 2014; von Bargen *et al.*, 2013) mais très peu d'études sont réalisées sur les PATs ayant subi des traitements thermiques drastiques (Reece *et al.*, 2012). De plus, les quelques études publiées exploitant la spectrométrie de masse pour caractériser des PATs ciblent des protéines

ou des tissus particuliers tels que l'ostéocalcine (Balizs *et al.*, 2011) ou la gélatine (Ocaña *et al.*, 2004).

Dans ce travail, nous avons tout d'abord opté pour une approche globale de détection sans aucun *a priori* sur les protéines et les peptides présents dans les PATs, à l'aide d'un spectromètre de masse de type Q-TOF. Pour cela, deux types de protocoles ont été développés et optimisés : un protocole gel-dépendant et un protocole gel-indépendant. Les résultats ont montré que la technique gel-indépendante était davantage adaptée à l'analyse des PATs par rapport à la méthode gel-dépendante montrant des profils protéiques en « smears » plutôt qu'en bandes précises et plus longue à mettre en œuvre. Ces profils en « smears » sont vraisemblablement causés par le processus de production des PATs. La Figure 55 illustre bien l'effet du traitement des PATs par rapport à un échantillon végétal, soumis à des températures inférieures, qui montre un profil avec de nombreuses bandes mieux définies.

Vingt-quatre peptides spécifiques au bovin, 5 peptides spécifiques au mouton, 15 peptides spécifiques au porc et 16 peptides spécifiques à la volaille ont été identifiés. Ces peptides permettent d'identifier des produits interdits car ils proviennent de protéines musculaires et sanguines pour les ruminants et de protéines principalement musculaires pour le porc et la volaille. Parmi ceux-ci, 3 peptides bovins et 4 peptides porcins ont été sélectionnés pour la production d'anticorps polyclonaux de lapin et pour le développement d'une technique de spectrométrie de masse de routine de détection des PATs. L'étude de la transposition de la méthode non orientée « de recherche » à une méthode de routine orientée, s'est faite avec l'aide du CER Groupe et a montré qu'il était possible de détecter les 7 peptides marqueurs sélectionnés dans des échantillons de PATs, à l'aide d'un spectromètre de masse de type triple quadrupôle. La technique développée peut donc être utilisée dans des laboratoires de contrôle des aliments. Dans ce travail, nous nous sommes limités aux peptides marqueurs bovins et porcins pour l'approche ciblée, mais une des perspectives du travail est d'utiliser la même approche orientée pour d'autres espèces. La limite de détection, établie pour du bovin contaminant des PATs de porc ou une matrice végétale est, pour l'instant, de 2 % de contamination. Enfin, la faisabilité d'analyses en composantes principales (PCA) permettant une vue d'ensemble a été démontrée sur ce type d'échantillons.

Une étude de différents protocoles d'extraction protéique pour la détection des PATs en vue d'une comparaison inter-laboratoire a été réalisée. Celle-ci a montré qu'étant donné la grande variété de compositions des PATs en fonction des tissus et espèces dont elles proviennent, l'extraction optimale universelle est très difficile à obtenir. Nous avons cependant montré que quelques soient les conditions d'extractions testées à l'UNamur ou au NIFES, nous avons pour tous les échantillons bovins et porcins, à l'exception de l'échantillon de sang porcin, retrouvé au moins un des peptides marqueurs, ce qui confirme leur robustesse ainsi que l'intérêt de disposer d'un set de plusieurs peptides biomarqueurs d'espèces et/ou de tissus.

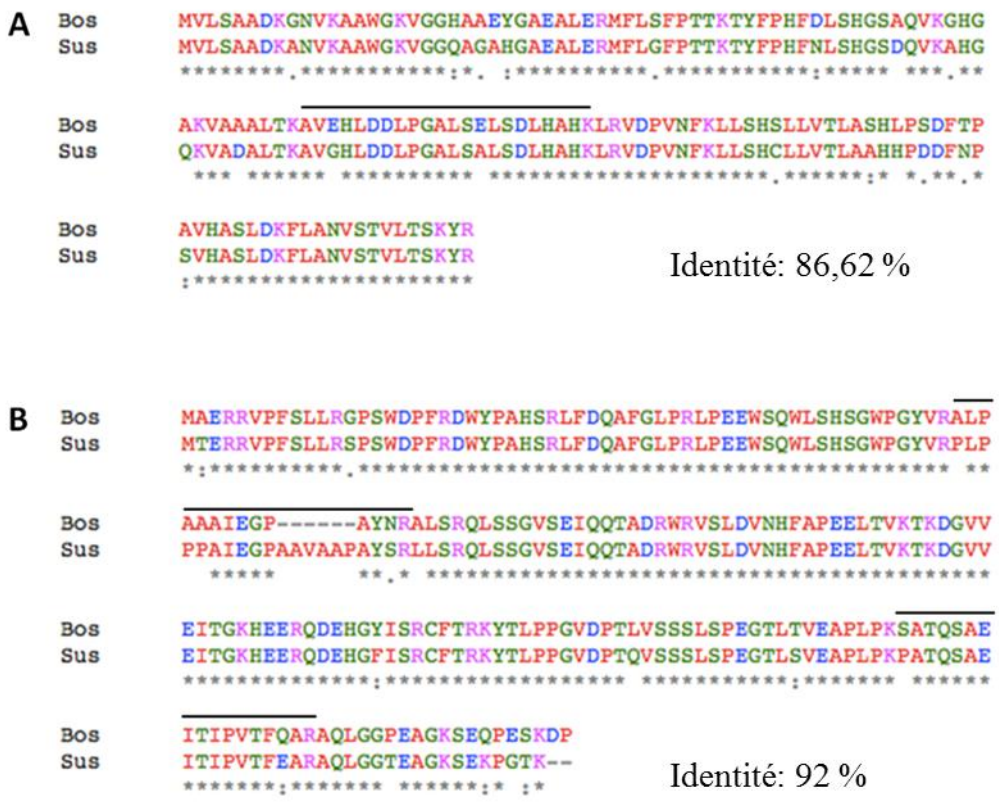


Figure 76. Identité de séquences. A) Identité de séquence de 86,62 % entre l'hémoglobine α de *Bos taurus* et *Sus scrofa*. B) Identité de séquence de 92 % entre l'heat shock protein β1 de *Bos taurus* et *Sus scrofa*. Les barres noires représentent les peptides bovins sélectionnés pour la production d'anticorps.

La méthode de détection et d'identification des PATs par la spectrométrie de masse développée dans cette thèse a également été transposée à l'analyse de produits et farines de sang et a montré son efficacité pour la détection de peptides biomarqueurs dans ces échantillons.

Complexité des échantillons de PATs

Au cours de ce travail, nous nous sommes heurtés à l'énorme complexité et hétérogénéité de ces échantillons. Les farines animales sont composées de particules d'os, de muscles, de graisse, de cartilages, de sang… et subissent des traitements thermiques drastiques. Un autre défi majeur lié à l'analyse peptidomique d'une farine animale est la forte identité de séquence observée entre protéines d'espèces différentes. La plupart des protéines identifiées ont un pourcentage d'identité de séquence proche de 90 % entre les espèces cibles, ce qui rend très complexe la recherche de peptides spécifiques. Deux exemples sont illustrés à la Figure 76. L'identité de séquence entre *Bos taurus* et *Sus scrofa* pour l'hémoglobine α est de 86,62 % (Figure 76 A) et pour l'heat shock protein β1 de 92 % (Figure 76 B). Cette forte identité de séquence explique la difficulté de sélectionner des peptides marqueurs spécifiques d'espèces. Il est donc important de prendre des précautions avant de valider un quelconque biomarqueur : vérifier le score de probabilité d'identification du peptide qui doit être de minimum 95 %, le nombre de séquençages pour chaque peptide, la couverture de séquence de la protéine identifiée et « blaster » chaque peptide d'intérêt pour certifier l'espèce à laquelle il appartient et éviter les identités de séquence entre espèces cibles ou contaminantes. Il faut être très vigilant car des milliers de molécules avec des masses extrêmement proches sont obtenues. Certaines limites en termes de précision de masse peuvent être atteintes même avec des instruments à haute résolution. Certains acides aminés ont la même masse comme la leucine (L) et l'isoleucine (I) ; la glutamine (Q) et la lysine (K); la phénylalanine (F) et le produit d'oxydation de la méthionine. Il existe en effet des paires d'acides aminés qui sont isobariques et en fonction de la qualité de la fragmentation, ces paires peuvent être confondues (Reece *et al.*, 2012). De plus, les génomes de tous les organismes ne sont pas complètement séquencés ou ont été séquencés plus récemment comme le mouton. De ce fait les bases de données protéiques ne sont pas équivalentes pour les différents organismes étudiés. C'est pourquoi, davantage de peptides bovins ou porcins ont été identifiés par rapport au mouton par exemple. Il serait intéressant de recommencer l'exercice de création des bases de données à ce jour afin d'estimer l'impact des nouvelles entrées sur l'identification de peptides marqueurs.

Cette forte identité de séquence en acides aminés au sein des différentes espèces des PATs a causé des difficultés au niveau des tests immunologiques. Ces tests sont faciles à utiliser et permettent d'analyser un grand nombre d'échantillons en un temps record. Toutefois, dans certains cas, il peut y avoir une réaction croisée entre des espèces étroitement liées (Hsieh *et al.*, 1998). En effet, vu la forte identité de séquence entre les peptides des différentes espèces cibles (bœuf et porc), des problèmes de spécificité des anticorps produits par le CER Groupe

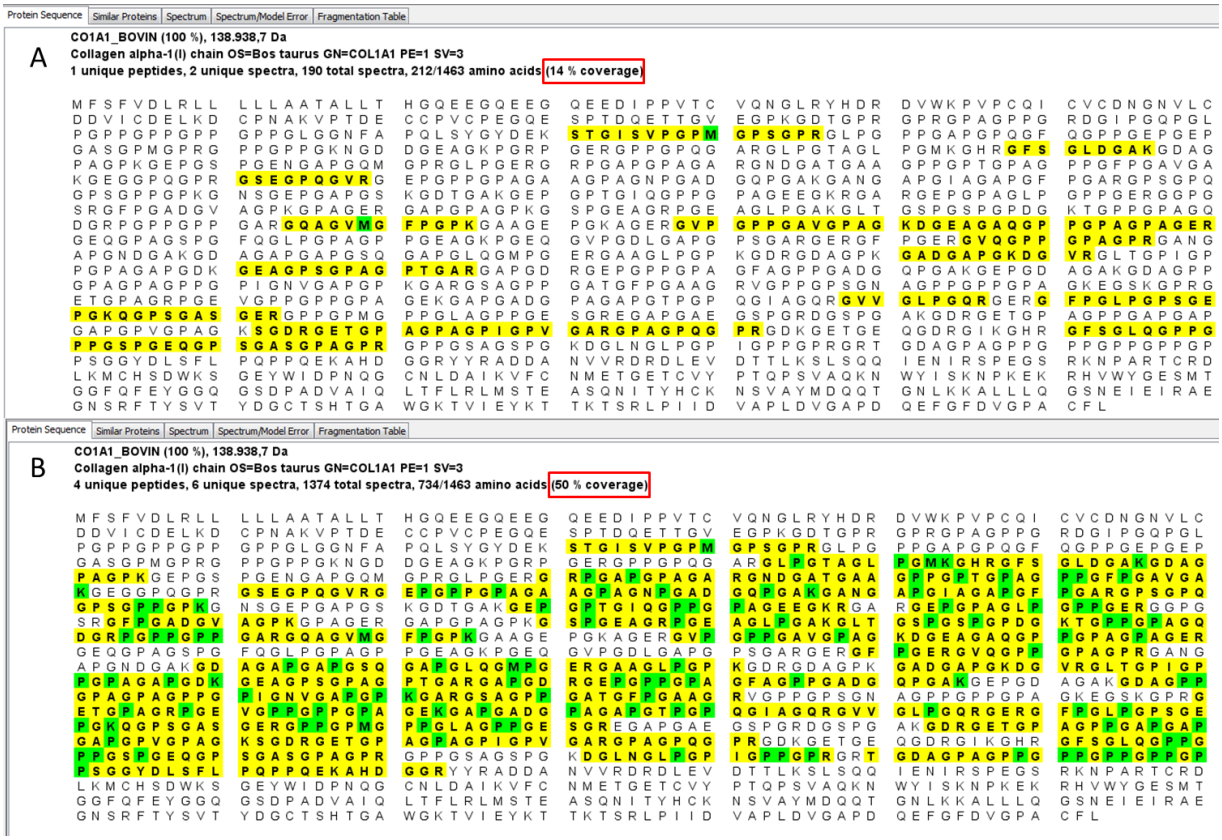


Figure 77. Exemple de l'effet de l'hydroxylation des lysines et prolines sur la couverture de séquence (en jaune) du collagène alpha-1(I) de *Bos taurus*. A) Couverture de séquence sans prise en compte de l'hydroxylation : 14 %. B) Couverture de séquence avec prise en compte de l'hydroxylation : 50 %. Les acides aminés marqués en vert représentent les sites des modifications.

sont apparus. Il existe en effet une homologie de 6 acides aminés successifs entre deux peptides choisis : ALPAAAIEGPAYNR et PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR de l'heat shock protein β-1. Une double purification sera tentée par le CER Groupe, permettant de récupérer uniquement les anticorps spécifiques de l'espèce dans le mélange existant d'anticorps polyclonaux. Cependant, la spectrométrie de masse est tout à fait capable de différencier ces 2 peptides. Il suffit d'une différence d'un acide aminé pour pouvoir distinguer deux peptides, ce qui montre la puissance de cette technique.
Les tests immunologiques peuvent également avoir une importante limitation pour l'analyse de produits transformés car le traitement peut avoir une influence négative sur la reconnaissance de la protéine cible par l'anticorps (Sentandreu *et al.*, 2010). C'est pourquoi nous avons choisi de produire des anticorps sur base des protéines et peptides que l'on identifie par spectrométrie de masse de manière expérimentale dans les échantillons de PATs transformées et non de nous baser sur les séquences peptidiques théoriques des protéines non transformées. Dans la littérature, c'est cette dernière approche qui a été privilégiée pour des protéines supposées être abondamment présentes dans les PATs et thermosensibles.

La complexité des collagènes est également un défi important de l'analyse peptidomique des PATs. Ces protéines, abondamment retrouvées dans les farines animales (surtout le type I), sont très résistantes au traitement thermique (Vitagliano *et al.*, 2001). Toutefois, les collagènes sont difficiles à analyser car ce sont des protéines complexes avec un grand nombre de modifications post-traductionnelles telle que l'hydroxylation des prolines et des lysines. La prise en compte de celle-ci dans la base de données « maison » CollagenUniprot a fortement augmenté la couverture de séquence. Par exemple, pour le collagène alpha-1(I) de *Bos taurus*, la couverture de séquence est passée de 14 % à 50 % avec la prise en compte de cette modification (Figure 77). L'hydroxylation se fait davantage sur les prolines dans le cas des PATs. Dans chaque chaîne polypeptidique alpha de collagène constituée d'environ 1000 résidus, plus de 100 prolines sont hydroxylées (Vitagliano *et al.*, 2001). L'hydroxylation des résidus proline forme la 4-hydroxyproline (4HyP) et la 3-hydroxyproline (3HyP) (Shoulders and Raines, 2009). La 4HyP se situe à la position Yaa du motif Gly-Xaa-Yaa et stabilise la triple hélice de collagène en formant des liaisons hydrogènes intramoléculaires (Berg and Prockop, 1973; Sakakibara *et al.*, 1973). La 3HyP se situe à la position Xaa du motif Gly-Xaa-Yaa, mais son rôle reste peu clair. Le motif Gly-Xaa-Yaa contenant une 3HyP en Xaa et une 4HyP en Yaa stabilise également la triple hélice. Cependant, le motif Gly-HyP-Pro la déstabilise (Song and Mechref, 2013). Colgrave *et al.* ont exploité la quantité élevée en hydroxyproline des collagènes afin de mettre au point un procédé de quantification de ces hydroxyprolines par spectrométrie de masse MRM et ont ainsi pu déduire la teneur en collagène dans des échantillons de muscle (Colgrave *et al.*, 2008).

Il est préférable d'avoir des peptides biomarqueurs ne comportant aucune modification de façon à éviter les risques d'erreur. Toutefois, les sites d'hydroxylation pourraient être utilisés

afin de différencier les espèces. Un peptide au sein duquel différents sites d'hydroxylation sont présents pourrait être identifié comme peptide marqueur, sa spécificité d'espèce étant fonction du lieu de la modification. Cependant, l'équipe de Koon *et al.* a remarqué qu'il n'y avait pas de spécificité d'hydroxylation au niveau du collagène de type I. En effet, il y a une grande similarité des motifs d'hydroxylation de divers tissus (peau, os et sein) au sein de plusieurs espèces de mammifères. Il n'existe donc pas de différences majeures au niveau du lieu des modifications du collagène en fonction de l'espèce ou du tissu (Koon *et al.*, communication personnelle).
Cependant, dans notre cas, si un peptide de collagène comporte une hydroxylation exactement au même endroit dans chaque analyse, celui-ci peut devenir un peptide biomarqueur si on est certain que la modification est fixe. Un entrainement du système avec de nombreuses farines permettrait de détecter des peptides de collagènes présents dans toutes les analyses, même modifiés, et deviendraient donc des biomarqueurs potentiels.

Il faut néanmoins pendre beaucoup de précautions avec les peptides de collagènes. Le risque d'erreurs lié à leurs nombreuses modifications et l'autorisation de la gélatine (collagène partiellement hydrolysé) de non-ruminants dans l'alimentation du bétail (Introduction - Tableaux 2 et 3) rendent ardue leur analyse. Les collagènes de non-ruminants ne sont donc pas de bons biomarqueurs pour l'identification de produits prohibés par la législation. De plus, une approche théorique telle que l'utilisation de BLAST montre qu'il y a de nouveau très peu d'endroits dans la séquence où il existe des différences entre les espèces et donc très peu de choix de peptides biomarqueurs, comme par exemple le collagène alpha-2(I) pour lequel le pourcentage d'identité de séquence entre *Bos taurus* et *Sus scrofa* est de 95 %.

La complexité de ce type d'échantillon peut également poser problème lors d'analyses en spectrométrie de masse rapides comme par exemple celles avec le triple quadrupôle où l'étape de chromatographie étant courte, les peptides sont moins bien séparés qu'avec le Q-TOF, et des erreurs d'identification dues à des masses très proches peuvent être commises. Un effet de matrice est observé lorsque l'on compare les chromatogrammes du standard composé des 7 peptides de synthèse et les chromatogrammes des échantillons. Cet effet de matrice se traduit par un léger décalage du temps de rétention des peptides marqueurs dans les échantillons. L'effet de matrice est plus important dans les mélanges porc-bovin que dans les mélanges végétal-bovin, cela confirme que la cause de cet effet est bien le type d'échantillon. Dans le futur, afin d'estimer ce décalage de temps de rétention d'un peptide dans l'échantillon par rapport au standard, un standard interne dont on connait le temps de rétention avec exactitude pourra être intégré dans l'échantillon. Le décalage de temps de rétention de ce standard interne pourra ainsi être évalué de manière précise et le décalage de temps de rétention des peptides marqueurs, dû à la matrice utilisée, pourra dès lors être estimé.

Comparaison des différentes techniques de spectrométrie de masse utilisées

Au cours de cette thèse, trois approches différentes de spectrométrie de masse ont été utilisées : une analyse MS/MS sans *a priori* à l'aide d'un Q-TOF avec une chromatographie de 215 minutes, une approche ciblée sur 7 peptides (avec *a priori*) à l'aide d'un triple quadrupôle avec une chromatographie de 20 minutes et une analyse MS sans *a priori* suivie d'une analyse statistique en composantes principales (PCA) à l'aide d'un Q-TOF avec 4 chromatographies de 70 minutes pour chaque échantillon.

Chacune de ces techniques présente des avantages et des inconvénients. Au début de ce travail, ne voulant exclure aucune protéine présente dans les farines animales, il était nécessaire de passer par une approche sans *a priori* de manière à identifier le plus de peptides et de protéines encore présents dans ce mélange complexe après le processus de production des PATs. C'est pourquoi un long temps d'analyse chromatographique (215 minutes) a été utilisé. De cette façon, une visualisation globale de ce type d'échantillon a pu être réalisée. Nous avons ainsi remarqué que certaines protéines telles que les hémoglobines alpha et beta, les collagènes, l'heat shock protein beta-1, plusieurs isoformes et sous-unités de myosine… étaient des protéines assez résistantes au traitement car fréquemment identifiées. Une fois quelques peptides marqueurs identifiés et sélectionnés, car provenant de protéines caractéristiques de tissus prohibés, un autre type de spectromètre de masse tel que le triple quadrupôle s'est imposé. Grâce à ce type d'appareil, l'utilisation du mode MRM permet de détecter des ions spécifiques sans nécessiter une séparation complète des peptides, ce qui permet une analyse chromatographique plus rapide. En effet, le temps d'analyse a pu être réduit de 215 minutes avec le Q-TOF à 20 minutes avec le triple quadrupôle. Ce spectromètre de masse de routine a une plus faible résolution, comparée au Q-TOF, mais celle-ci est compensée par le suivi de transitions spécifiques entre les ions correspondant aux peptides cibles et leurs ions de fragmentation. En se focalisant sur quelques masses lors de son scan, le triple quadrupôle gagne alors en sélectivité. 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. Ce type d'analyse avec *a priori* est plus rapide, moins coûteux et donc davantage adapté à des laboratoires de routine. Nous avons ainsi pu détecter les 3 peptides marqueurs bovins et les 4 peptides marqueurs porcins, identifiés grâce au Q-TOF, dans différents échantillons de PATs. Ce spectromètre de masse, plus sélectif, est bien mieux adapté à la recherche de peptides biomarqueurs connus dans des mélanges de PATs (« bovin-porc » ou « bovin-végétal ») que le Q-TOF.

Après l'utilisation de ces deux types d'analyse de spectrométrie de masse complémentaires, l'une plus adaptée à la recherche et à l'identification de peptides marqueurs et l'autre plus adaptée à la routine et la recherche ciblée de peptides marqueurs connus, une approche statistique plus globale a été investiguée. Vu l'abondance des données et la difficulté

d'exploiter l'entièreté de celles-ci, nous avons testé une analyse en composantes principales appliquée aux données MS du Q-TOF. Cette analyse statistique est très sensible et permet de tenir compte de la répétabilité des analyses MS. Le « Scoring plot » de la PCA fournit une empreinte globale des échantillons en visualisant les variations entre ceux-ci. Ce type d'analyse permet également de confirmer la présence des peptides biomarqueurs déjà identifiés et d'en identifier de nouveaux. En effet, nous avons remarqué que les collagènes étaient identifiés de manière récurrente dans les points extrêmes des « Loading plots ». La PCA permet donc d'exploiter les peptides des collagènes en les différenciant de plusieurs centaines d'autres peptides. Cette méthode répond également au manque de répétabilité que l'on peut avoir dans les analyses précédentes de recherche de peptides marqueurs. Avec des analyses LC-MS/MS de 215 minutes, il est techniquement difficile de réaliser des réplicats techniques étant donné le temps machine nécessaire pour chaque analyse. Dans le cas d'une analyse PCA, plusieurs réplicats techniques ont été réalisés, ce qui permet de vérifier la répétabilité de nos analyses.

Toutefois, cette méthode présente l'inconvénient majeur, pour l'instant, du manque d'automatisation. En sachant que ce sont les points extrêmes du « Loading plot » qui nous intéressent, car ce sont les points responsables de la variation entre les échantillons au sein du « Scoring plot », nous pourrions imaginer réaliser une analyse PCA dans le but de sélectionner ces points extrêmes et les inclure dans une liste afin de ne séquencer que ceux-ci sur base de leur temps de rétention et rapport m/z, permettant ainsi d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels. Une vérification de leur spécificité par BLAST resterait néanmoins nécessaire mais cela simplifierait la recherche de peptides biomarqueurs, qui se fait pour l'instant manuellement. Un autre inconvénient est la complexité des échantillons et le risque d'erreurs dû à un grand nombre de masses très proches. A cause de cela, nous sommes obligés de prendre en compte le temps de rétention de chaque peptide. Néanmoins, celui-ci peut varier si on change par exemple les solvants ou la colonne, et on ne peut donc pas comparer l'analyse MS d'un nouvel échantillon avec une analyse PCA réalisée quelques temps auparavant. Une solution serait de décomplexifier l'échantillon en séparant les collagènes des autres protéines de l'extrait. Cela pourrait se faire grâce à une colonne d'immuno-affinité qui permettrait de piéger les collagènes, ou encore par ultrafiltration (Buckley *et al.*, 2012). Une approche alternative pour réduire la complexité de l'échantillon est le fractionnement des protéines en solution sur base de leur point isoélectrique, technique connue sous le nom de fractionnement OFFGEL. L'équipe de Sentandreu a utilisé l'appareil Agilent 3100 OFFGEL (Sentandreu *et al.*, 2010). Cet appareil effectue une focalisation isoélectrique des protéines avec un gradient de pH. Cette technique diffère d'une focalisation isoélectrique classique sur gel car les protéines fractionnées ne sont pas prises au piège dans un gel mais sont récupérées dans une phase liquide, permettant ainsi un transfert plus aisé pour des analyses futures. Un autre avantage important est sa capacité de chargement de protéines élevée, contribuant à un enrichissement des protéines cibles. En utilisant cette méthode, Sentandreu *et al.* ont été

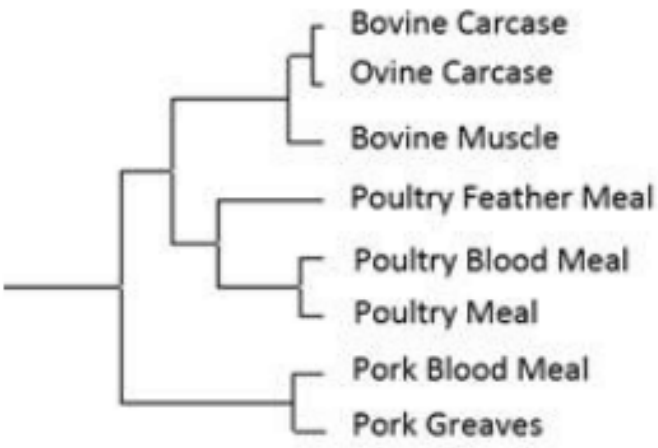


Figure 78. Test préliminaire d'arbre phylogénétique construit à partir de données de spectrométrie de masse en tandem des 8 échantillons NIFES.

capables de détecter 0,5 % de poulet dans du porc. Toutefois, cette technique prend du temps et n'est pas souvent disponible dans les laboratoires de routine. Une fois l'échantillon décomplexifié, nous pourrions alors faire une PCA sans prendre en compte le temps de rétention.

Si nous arrivions à nous désaffranchir du temps de rétention et si nous pouvions disposer d'échantillons purs pour chaque espèce cible, nous pourrions comparer par PCA une nouvelle farine inconnue avec ces échantillons de référence et voir de quel échantillon de référence la farine inconnue se rapproche le plus, en vue de déduire l'espèce (ou les espèces) dont elle provient et ses contaminations éventuelles, sans besoin de séquençage des peptides. Une autre manière d'exploiter la PCA sans nécessiter des échantillons purs serait de créer des banques de données expérimentales contenant des peptides biomarqueurs représentés sous forme de leur rapport m/z. Si nous arrivons à résoudre le problème de la dépendance au temps de rétention, une comparaison entre une nouvelle analyse PCA de plusieurs échantillons et ces banques de données pourrait alors être réalisée. Les concordances entre les rapports m/z de ces nouveaux échantillons et de ces banques de données pourraient être représentées sous forme de points colorés au niveau du « Loading plot » permettant une visualisation directe des peptides biomarqueurs dans l'ensemble des points de l'analyse.

Une approche bioinformatique telle que la comparaison à large échelle des spectres de masse en tandem pourrait être également testée sur nos échantillons. Une étude a été réalisée en 2013 sur différentes espèces de poisson (Wulff *et al.*, 2013). Tout d'abord, une bibliothèque de spectres de référence a été créée en utilisant le tissu musculaire frais de 22 espèces de poissons différentes. Les spectres de masse d'échantillons inconnus ont été comparés aux bibliothèques de référence. Le nombre de spectres correspondant entre les échantillons inconnus et les bibliothèques de référence, permet d'identifier sans ambiguïté l'origine des échantillons. Cette méthode, également valable pour l'identification d'échantillons transformés, est indépendante de bases de données génomique ou protéomique disponibles et utilise tous les spectres acquis plutôt que d'en sélectionner quelques-uns pour le séquençage et la comparaison entre les séquences expérimentales et théoriques. Aucune identification peptidique n'est donc nécessaire, ce qui rend le procédé applicable de façon égale à tous les organismes, qu'ils soient complètement ou peu séquencés. Grâce à une collaboration établie entre Josef Rasinger (NIFES) et Magnus Palmblad (Leiden University Medical Center), un premier test de cet outil bioinformatique a été réalisé sur base des données de spectrométrie de masse en tandem des 8 échantillons NIFES, qui a permis d'établir un arbre phylogénétique (Figure 78). Cet arbre montre une distinction des 8 échantillons et un regroupement de ceux-ci par rapport à l'espèce et au type de produit à partir des spectres de masse en tandem. Nous nous attendions cependant à un rapprochement plus important des échantillons de ruminants et des échantillons de porcs, car ils font partie des mammifères contrairement aux échantillons de volaille. Il s'agit toutefois d'un test préliminaire qui doit être reproduit et affiné. Cette

comparaison des spectres d'échantillons inconnus avec des bibliothèques de spectres de référence sans séquençage rejoint la piste, citée ci-dessus, de comparaison des rapports m/z de peptides d'échantillons inconnus avec des banques de données expérimentales en PCA.

On constate donc une tendance nouvelle à s'orienter vers des approches globales sans spécialement séquencer les peptides, que ce soit par PCA ou avec de nouveaux outils bioinformatiques, en comparant des données expérimentales avec des bases de données théoriques créées expérimentalement (composées de spectres, de rapports m/z…).

Apport des méthodes de spectrométrie de masse développées aux techniques existantes pour la détection et l'identification des PATs

Les méthodes officielles présentent des limitations comme l'impossibilité pour la microscopie de déterminer l'origine taxonomique d'une particule terrestre, puisqu'elle ne parvient pas à distinguer, par exemple, des particules osseuses bovines et porcines. La PCR, quant à elle, est incapable de faire la distinction entre de l'ADN d'un produit autorisé tel que le lait et de l'ADN d'un produit interdit tel qu'une farine de viande de ruminants. En utilisant la méthode peptidomique développée dans cette thèse, nous sommes en mesure de surmonter les limitations des méthodes officielles pour la détection et l'identification des produits interdits d'origine animale dans l'alimentation des animaux de rente par l'utilisation de peptides spécifiques pour le bœuf, le porc, le mouton et la volaille. Mais l'approche mise au point pourrait s'appliquer à d'autres espèces comme par exemple le cheval, dont le génome a également été séquencé (Webographie N°19). Rappelons à cet égard le scandale de la viande de cheval en 2013 en Europe (Webographie N°20).

Grâce à cette méthode peptidomique, il est maintenant possible de déterminer l'origine des particules tissulaires animales. Si on détecte des particules osseuses dans un échantillon grâce à la microscopie optique et des signaux positifs ruminants et porc en PCR, la distinction entre un échantillon autorisé (contenant des PATs de porc ainsi que du lait) et un échantillon interdit (contenant des PATs de bovin ainsi que du sang de porc) peut être faite grâce à la spectrométrie de masse. Il est peu probable d'identifier des protéines sanguines ou musculaires dans des produits laitiers mais il faudrait tout de même vérifier l'absence des peptides marqueurs que nous avons proposés dans ces échantillons. Toutefois, l'origine tissulaire reste assez difficile à déterminer de manière exacte vu l'ubiquité d'un grand nombre de protéines. En choisissant des protéines du sang comme l'hémoglobine pour le premier peptide marqueur bovin, nous pouvons dépister la présence d'un produit interdit, car les farines de sang et produits de sang des ruminants sont interdits dans l'alimentation de tous les animaux de consommation. Le choix est en effet plus large en ce qui concerne les biomarqueurs de ruminants car la législation est plus stricte, interdisant les PATs de ruminants (farines de viande, farines de sang, produits de sang, gélatine…) dans l'alimentation du bétail, alors que les produits de sang ainsi que la gélatine de non-ruminants sont autorisés (Introduction - Tableaux 2 et 3). Un grand nombre de peptides de porc ou de

volaille ont été identifiés mais ne font pas partie des tissus prohibés et ne sont donc pas pertinents pour la détection de PATs interdites.

L'avantage considérable de cette technique peptidomique est l'approche expérimentale utilisée pour la détection des peptides marqueurs. En effet, deux types d'approches auraient pu être choisis : une approche théorique ou une approche expérimentale. Dans le cas d'une étude théorique, des protéines supposées composer les farines animales sont digérées *in silico* et des peptides théoriques sont ainsi identifiés, orientant l'analyse. Toutefois, vu le traitement de production des PATs, une approche expérimentale non orientée a été choisie. En effet, les protéines présentes dans les farines animales subissent un traitement de production à hautes température et pression et sont donc, très certainement, dégradées par celui-ci (Cheftel and Culioli, 1997; Marcos and Mullen, 2014; Meltretter *et al.*, 2013). Il est difficile de trouver des informations concrètes concernant les modifications des protéines présentes dans les farines animales induites par le traitement de production des PATs. Cependant, Meltretter *et al.* ont étudié les modifications post-traductionnelles non enzymatiques de la β-lactoglobuline dans le lait transformé (Meltretter *et al.*, 2013). Cette approche expérimentale a permis de détecter des peptides marqueurs relativement thermorésistants car largement identifiés dans la plupart des échantillons. L'avantage par rapport à une approche *in silico* est la certitude que ces peptides résistent au traitement de production des PATs. Des protéines telles que l'heat shock protein beta-1, la desmine, l'anhydrase carbonique 3, la myoglobine… ont ainsi pu être identifiées alors qu'elles ne sont pas référencées dans la littérature comme présentes dans les PATs. Parmi les protéines attendues dans ces échantillons de farine animale (Introduction - Point 4.2.), nous avons effectivement identifié les collagènes, les troponines C, I et T, plusieurs isoformes de myosine ainsi que les hémoglobines alpha et beta. La troponine a été identifiée dans plusieurs échantillons mais un seul peptide s'est avéré spécifique (ELWDALYQLEIDK de troponine T, *Sus scrofa*). Ce peptide est identifié dans un échantillon de PATs composé de muscle de porc fait « maison » par le CRA-W mais pas dans les échantillons réels de PATs, c'est pourquoi il n'est pas repris dans les tableaux de peptides marqueurs. Les différences entre cet échantillon « maison » et les échantillons industriels se situent au niveau du type de matière première (viande pour consommation humaine ou déchet) et du processus de production, difficile à reproduire en laboratoire. Ce peptide spécifique au porc est donc très certainement détruit par le procédé de fabrication des farines animales commerciales. Par une approche théorique, ce peptide aurait par exemple été pris en compte. L'ostéocalcine, par contre, n'a pas été identifiée dans les échantillons analysés, peut-être à cause de sa faible présence dans ces échantillons. Rappelons également que Buckley *et al.* (2012), avait signalé que cette protéine était sensible aux traitements thermiques et plus adaptée aux études archéologiques. Enfin, signalons que les listes de peptides marqueurs que nous avons établies dans ce travail ne sont pas exhaustives et qu'elles peuvent continuer à se compléter au fur et à mesure de nouvelles analyses.

Une approche statistique telle que l'analyse en composantes principales (PCA) permettrait de compléter ces listes de peptides marqueurs. Cette approche fournit une vue d'ensemble de ce type d'échantillons, ce que les méthodes officielles ne permettent pas car elles se focalisent sur la détection de matériel précis comme des particules osseuses dans le cas de la microscopie ou certaines cibles ADN dans le cas de la PCR. L'approche en spectrométrie de masse de routine à l'aide du triple quadrupôle utilisée dans ce travail cible également la détection de quelques peptides marqueurs. Une analyse plus globale de type PCA permet la visualisation de la variabilité entre les échantillons et pourrait également être utilisée comme méthode de routine grâce à des progrès au niveau de l'automatisation.

En conclusion, actuellement, on peut difficilement envisager d'appliquer l'approche peptidomique basée sur la spectrométrie de masse à tous les échantillons de PATs vu le coût élevé de la technique, mais elle pourrait être considérée comme méthode analytique puissante de seconde ligne pour des contre-analyses lorsqu'il y a un doute sur certains échantillons. Dans le futur, on pourrait envisager d'équiper quelques laboratoires de référence avec des spectromètres de masse de type triple quadrupôle, même s'il est peu probable que cela puisse s'instaurer au sein de tous les laboratoires nationaux de référence pour les protéines animales vu le coût conséquent pour certains pays.

Perspectives

Si l'approche est puissante, plusieurs points sont encore à améliorer tels que la répétabilité et la limite de détection. Il faudra également réaliser une étude inter-laboratoire sur la méthode développée de façon à estimer la reproductibilité de ces analyses.

L'étude de la répétabilité des analyses MS/MS sans *a priori* à l'aide du Q-TOF avec une chromatographie de 215 minutes est coûteuse en temps machine. Un autre niveau de difficulté se situe au niveau de la variabilité d'un batch de farine à l'autre. En effet, trois farines bovines produites de manière indépendante auront de fortes chances d'avoir une composition différente. C'est pourquoi, il est nécessaire d'avoir un set de plusieurs peptides marqueurs pour une espèce de façon à tenir compte de cette hétérogénéité entre les échantillons.

En ce qui concerne la répétabilité du protocole d'extraction, celle-ci peut être estimée au niveau des duplicats réalisés lors de l'étude de différents protocoles d'extraction protéique pour la détection de PATs en vue d'une comparaison inter-laboratoire (Point 2 des résultats) où on remarque que les rendements d'extraction des duplicats sont pratiquement identiques. Afin d'améliorer la répétabilité, nous pourrions augmenter la prise d'essai de 200 mg à 5 ou 10 g par exemple mais il faudrait pour cela, adapter les équipements de laboratoire tels que les centrifugeuses, les thermomixeurs… ainsi que disposer de plus grandes quantités de PATs. Cette prise d'essai plus importante serait plus représentative de l'échantillon et diminuerait le risque de faux-négatifs. Pour la microscopie, il a été démontré qu'il existe une relation

positive entre la spécificité du test et la quantité d'échantillon utilisée pour la sédimentation (van Raamsdonk *et al.*, 2007).

La PCA nous informe sur la répétabilité, aussi bien entre les réplicats techniques qu'entre différents échantillons provenant de différents lots d'une même espèce, au niveau des analyses MS. La répétabilité de la spectrométrie de masse est en effet bien mieux estimée dans une analyse PCA que dans les 2 autres types d'analyses réalisées (LC-MS/MS en Q-TOF et triple quadrupôle) car au minimum 4 réplicats techniques ont été réalisés systématiquement. Les analyses de type PCA réalisées ont montré une bonne répétabilité au niveau des analyses MS. De plus, l'analyse PCA de deux échantillons bovins d'origine différente (CRA-W et NIFES) a montré que ces 2 échantillons se trouvaient au même endroit au niveau du « Scoring plot » (Figure 68) mettant en évidence une faible variabilité entre ces 2 échantillons.

La recherche de peptides marqueurs à partir d'analyses LC-MS/MS est longue et fastidieuse. De notre point de vue, l'utilisation de simples analyses LC-MS rapides et répétées afin de comparer les profils peptidiques de nombreuses farines « pures » et contaminées permettrait de pallier ce problème de répétabilité rencontré dans nos longues analyses MS/MS. Comme nous l'avons montré, l'utilisation de la PCA dans la comparaison des profils peptidiques permet de détecter rapidement et avec une grande sensibilité des couples RT-m/z (« buckets ») spécifiques d'une condition. L'information liée au temps de rétention est nécessaire pour caractériser correctement un peptide en LC-MS. Cependant, une fois les « buckets » marqueurs trouvés, nous pouvons utiliser une analyse LC-MS/MS dirigée uniquement vers ces marqueurs afin de les séquencer et donc éliminer la dimension du temps de rétention qui est dépendante de nombreux facteurs environnementaux.

Bien que l'ensemble des échantillons testés n'ont pas subi exactement le même traitement de production, la fiabilité de la méthode pourrait être estimée également en testant une série d'échantillons traités à des températures et pressions différentes pour voir dans quelle mesure le traitement influence l'identification de peptides/protéines et la détection des peptides marqueurs.

Le deuxième point à améliorer est la limite de détection. Les techniques d'identification des espèces animales, qu'elles soient basées sur l'ADN ou sur les protéines, ne fournissent en général que des résultats qualitatifs ou semi-quantitatifs. Pour avoir des méthodes quantitatives, il faudrait que la composition, le conditionnement et le traitement des produits soient parfaitement définis et ce n'est pas le cas dans l'alimentation animale (Plouvier *et al.*, 2012). De manière générale, l'aspect qualitatif a primé sur l'aspect quantitatif dans ce travail car, pour l'instant, la tolérance zéro est toujours d'application. Cela signifie que du moment où l'on retrouve un peptide marqueur, cela veut dire que la farine contient un produit interdit et doit donc être retirée du circuit de consommation. Cependant, l'EFPRA a suggéré que ce

concept de tolérance zéro est pratiquement impossible à appliquer. L'EFSA (2011) a proposé un seuil de tolérance de 2 % de PATs de ruminants dans des PATs de non-ruminants. En travaillant sur des mélanges de farines tels que cela a été fait dans cette thèse, une quantification relative a été obtenue. La limite de détection de PATs de bovin dans une farine porcine ou dans un aliment végétal est de 2 % avec le triple quadrupôle. Toutefois, nous avons pu voir qu'une analyse PCA distingue la farine porcine du mélange « bovin-porc » à raison de 0,1 % grâce, entre autres, au peptide VGGHAAEYGAEALER (hémoglobine α de *Bos taurus*). Il serait intéressant de tester ce peptide en triple quadrupôle dans les mélanges de farine.

Nous pourrions également quantifier l'abondance des 7 peptides marqueurs au moyen de standards internes avec le triple quadrupôle. La technique AQUA permet de quantifier de manière absolue des protéines ou des peptides contenus dans un échantillon biologique grâce au rapport d'intensité observé entre le signal correspondant au peptide natif et le signal correspondant au peptide AQUA présent en quantité connue (Sentandreu *et al.*, 2010). De façon à améliorer la limite de détection, une approche en MRM^3 telle que celle utilisée par l'équipe de von Bargen pourrait aussi être testée (von Bargen *et al.*, 2013). En comparaison au mode MRM, le mode MRM^3 fournit une sélectivité plus élevée en raison d'une étape de fragmentation supplémentaire. Cette approche a permis à l'équipe de von Bargen de passer d'une limite de détection de 0,55 % à 0,25 % pour le porc et le cheval. On pourrait également essayer de piéger les protéines d'intérêt par une colonne d'immuno-affinité par exemple afin d'augmenter artificiellement leur concentration dans le but de diminuer le seuil de détection.

La présence potentielle d'une activité protéolytique résiduelle devra être envisagée. La longueur des peptides identifiés est assez importante et ceux-ci sont toujours clivés au niveau des lysines et arginines, ce qui est conforme avec une protéolyse imputable à la trypsine, mais ne permet pas d'exclure la présence d'activité protéolytique résiduelle. Toutefois, un test avec et sans inhibiteur de protéases pourrait être réalisé. S'il n'y a pas ou très peu d'activité protéolytique résiduelle, les résultats devraient être peu divergents. Enfin, on pourrait aussi envisager des tests de type zymographie qui permettent de détecter une activité protéolytique ciblée dans un gel imprégné par un substrat *ad hoc*. Cette approche est classiquement décrite pour détecter des activités de type métallo-protéases, en utilisant par exemple la gélatine comme substrat.

Conclusion finale

Malgré la complexité des échantillons de PATs, ce travail a permis de développer une stratégie peptidomique afin d'analyser de manière précise la composition des PATs, fournissant l'origine des particules présentes dans une farine. En utilisant un protocole gel-indépendant (extraction TCA - acétone, « clean-up », digestion liquide de 5 heures avec un rapport trypsine/protéines de 1/20 et des analyses de spectrométrie de masse se basant sur la détection de peptides spécifiques au bœuf, au mouton, au porc et à la volaille), il est

maintenant possible de surpasser les limitations des méthodes de détection existantes. La transposition d'une méthode de détection sans *a priori* à une méthode de routine à l'aide d'un triple quadrupôle avec 3 peptides marqueurs bovins et 4 peptides marqueurs porcins a été démontrée. Des efforts sont encore à fournir afin d'améliorer la limite de détection et essayer de descendre en dessous de 2 % en gardant à l'esprit que lorsqu'il y a des fraudes volontaires, le pourcentage de contamination est souvent plus élevé. Une approche statistique non supervisée telle que la PCA a été démontrée sur ce type d'échantillons avec de nombreuses possibilités d'automatisation. Les approches proposées complètent donc l'arsenal des méthodes existantes, facilitant la détermination des espèces et des tissus dont proviennent les PATs, en se focalisant entre autres sur les tissus interdits, ce qui est particulièrement critique dans le contexte d'un assouplissement de la législation concernant les PATs et d'une éventuelle réintroduction des PATs dans l'alimentation du bétail.

Annexes

Dans les annexes suivantes, veuillez trouver les résultats PCR des échantillons utilisés, les chromatogrammes des différentes transitions des 7 peptides marqueurs dans un échantillon de PATs de bovin (G') analysé à l'aide du triple quadrupôle, une liste des 15 protéines bovines et porcines les plus abondamment identifiées dans des PATs de bovin et de porc et enfin la version soumise du manuscrit « Species and tissues specific differentiation of processed animal proteins in aquafeeds - a cross laboratory comparison of proteomics workflows ».

Tableau 23. Résultats PCR fournis par le CRA-W pour les échantillons utilisés dans le manuscrit « Identification of proteins and peptide biomarkers for detecting banned Processed Animal Proteins (PAPs) in meat and bone meal by mass spectrometry ». + : signal positif ; - : signal négatif ; NA : non analysé.

Samples	Origin	Ruminant	Beef	Sheep	Pork	Poultry
Beef 1	CRA-W	+	+	+	+	+
Beef 2	NIFES	+	+	-	-	-
Beef 3	NIFES	+	+	-	-	-
Beef 4	CRA-W	+	+	-	+	-
Beef 5	CRA-W	+	+	+	+	-
Beef 6	CRA-W	+	+	-	+	+
Pork 1	CRA-W	-	-	-	+	-
Pork 2	NIFES	-	-	-	+	-
Pork 3	CRA-W	+	+	NA	+	-
Pork 4	CRA-W	-	-	-	+	-
Pork 5	CRA-W	+	+	-	+	-
Pork 6	CRA-W	+	-	-	+	-
Pork 7	NIFES	+	-	-	+	-
Pork 8	NIFES	-	-	-	+	-
Pork 9	NIFES	-	-	-	+	-
Sheep 1	CRA-W	+	+	+	+	-
Sheep 2	CRA-W	+	-	+	-	-
Sheep 3	NIFES	+	-	+	-	-
Sheep 4	NIFES	+	-	+	-	-

Tableau 24. Résultats PCR fournis par le CRA-W pour les échantillons utilisés lors des analyses complémentaires avec le triple quadrupôle (point 1.3.2.). + : signal positif ; - : signal négatif ; NA : non analysé.

Echantillons	Ruminant	Bœuf	Mouton	Porc	Poulet	Volaille
PATs de bovin (G')	+	+	-	+	-	NA
PATs de bovin (K)	+	+	+	+	+	NA
PATs de bovin (N020)	+	+	-	-	-	-
PATs de bovin (N021)	+	+	-	-	-	-
PATs de bovin (B CER)	+	+	-	traces	traces	traces
PATs de porc (O)	-	-	-	+	-	NA
PATs de porc (C')	-	-	-	+	-	NA
PATs de porc (P CER)	traces	-	-	+	-	-
PATs de mouton (B')	+	-	+	-	-	NA
PATs de volaille (I)	-	-	-	-	+	+

Tableau 25. Résultats PCR fournis par le CRA-W pour les échantillons en aveugle utilisés lors de l'étude de la fiabilité de la méthode (point 1.3.4.). + : signal positif ; - : signal négatif ; NA : non analysé.

Echantillons	Ruminant	Bœuf	Mouton	Porc	Poulet	Volaille
BS1 PATs de porc	+	+	+	+	+	+
BS2 PATs de porc	+	+	+	+	+	+
BS3 PATs de porc	+	+	+	+	+	+
BS4 PATs de porc	+	+	+	+	+	+
BS5 PATs de porc	+	+	+	+	+	+
BS6 PATs de porc	+	+	+	+	+	+
BS7 PATs de porc	+	+	+	+	+	+
BS8 PATs de porc	+	+	+	+	+	+
BS9 PATs de porc	+	+	+	+	+	+
BS10 PATs de porc	+	+	+	+	+	+
BS11 PATs de porc traitées à 145°C	+	-	-	+	-	-
BS12 PATs de bovin traitées à 137°C	+	+	-	-	-	NA
BS13 PATs de volaille traitées à 133°C	-	-	-	+	+	NA

Tableau 26. Résultats PCR fournis par le CRA-W pour les échantillons NIFES utilisés lors de l'étude inter-laboratoire (point 2.). + : signal positif ; - : signal négatif.

Echantillons	Ruminant	Bœuf	Mouton	Porc	Poulet	Volaille
Farine de sang de volaille (N002)	-	-	-	-	+	+
Farine de volaille (N008)	-	-	-	-	+	+
Farine de plume (N011)	-	-	-	-	+	+
Farine de sang de porc (N012)	-	-	-	+	-	-
Crétons de porc (N018)	-	-	-	+	-	-
Farine de carcasse bovine (N020)	+	+	-	-	-	-
Farine de muscle bovin (N021)	+	+	-	-	-	-
Farine de carcasse ovine (N022)	+	-	+	-	-	-

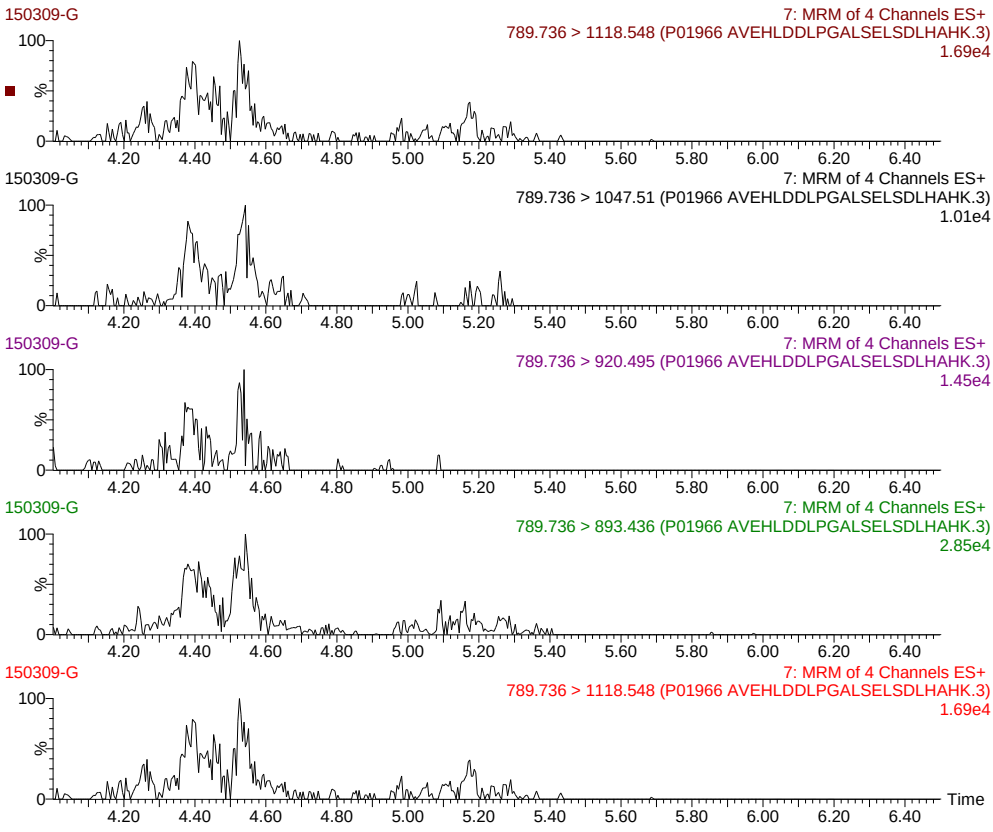


Figure 79. Chromatogrammes des différentes transitions du peptide AVEHLDDLPGALSELSDLHAHK (hemoglobin α *de Bos taurus*) dans un échantillon de PATs de bovin (G').

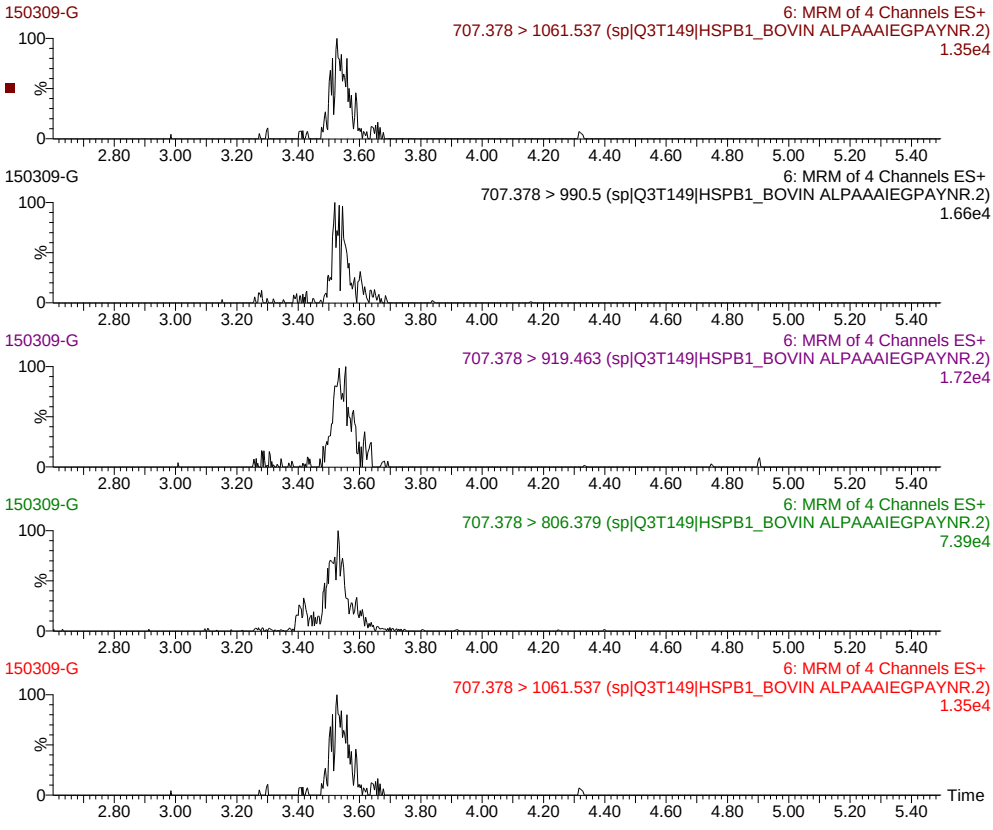


Figure 80. Chromatogrammes des différentes transitions du peptide ALPAAAIEGPAYNR (Heat shock protein beta-1 de *Bos taurus*) dans un échantillon de PATs de bovin (G').

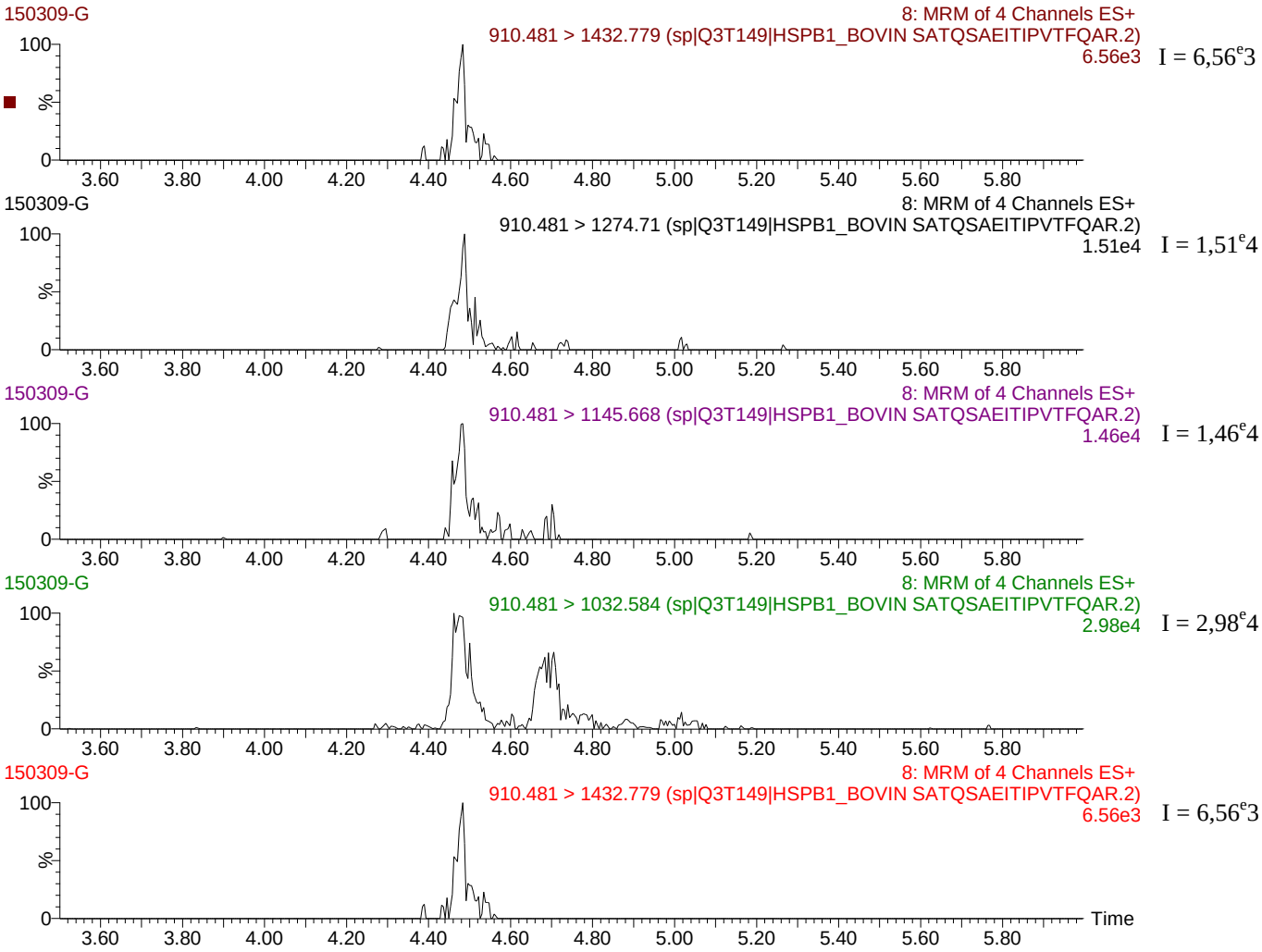


Figure 81. Chromatogrammes des différentes transitions du peptide SATQSAEITIPVTFQAR (Heat shock protein beta-1 de *Bos taurus*) dans un échantillon de PATs de bovin (G').

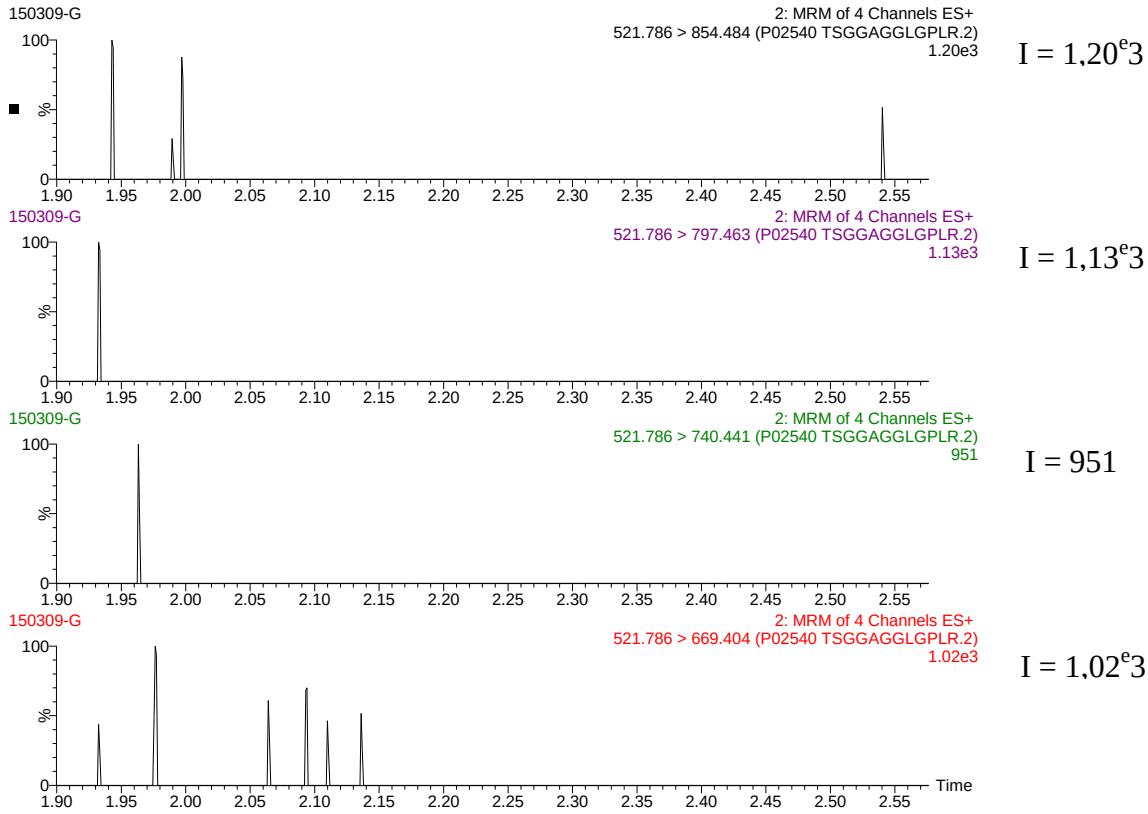


Figure 82. Chromatogrammes des différentes transitions du peptide TSGGAGGLGPLR (desmin de *Sus scrofa*) dans un échantillon de PATs de bovin (G').

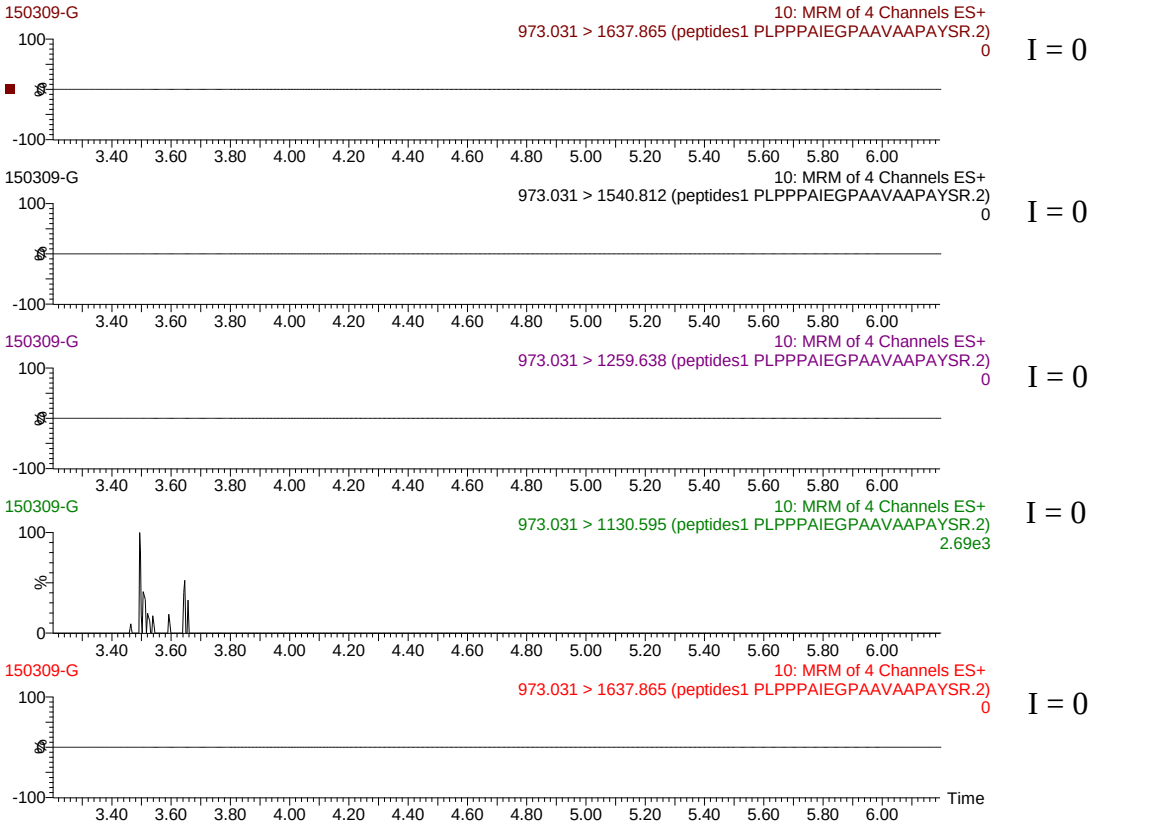


Figure 83. Chromatogrammes des différentes transitions du peptide PLPPPAIEGPAAVAAPAYSR (Heat shock protein beta-1de *Sus scrofa*) dans un échantillon de PATs de bovin (G').

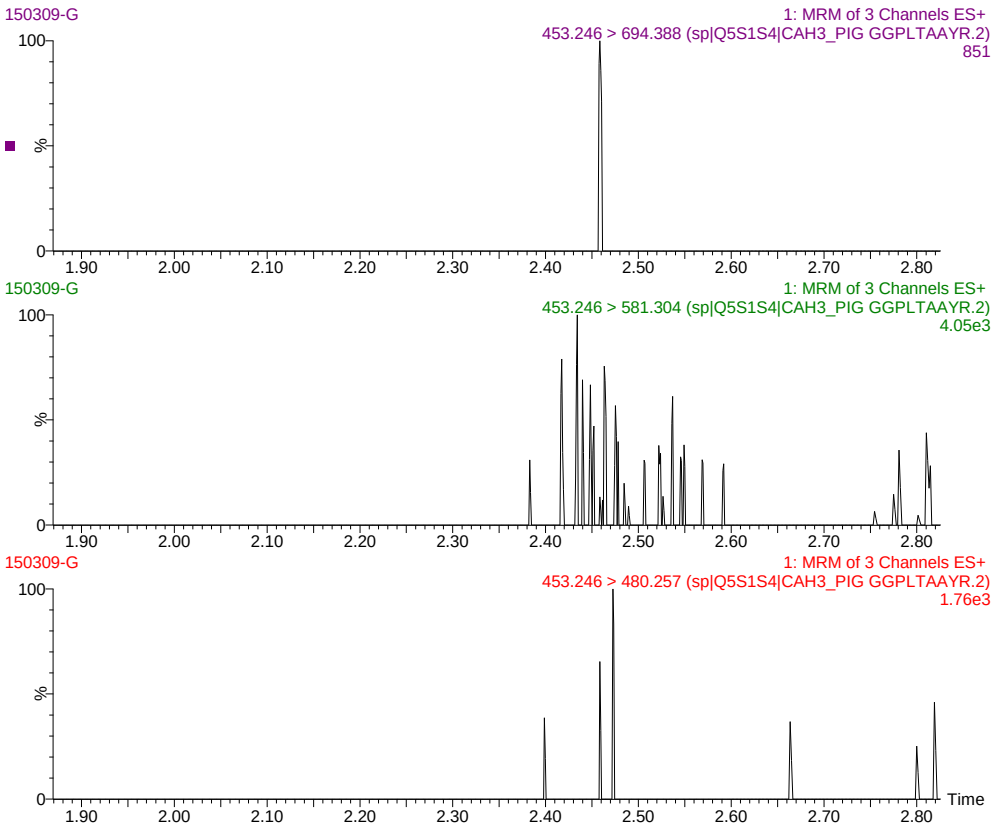


Figure 84. Chromatogrammes des différentes transitions du peptide GGPLTAAYR (Carbonic anhydrase 3 de *Sus scrofa*) dans un échantillon de PATs de bovin (G').

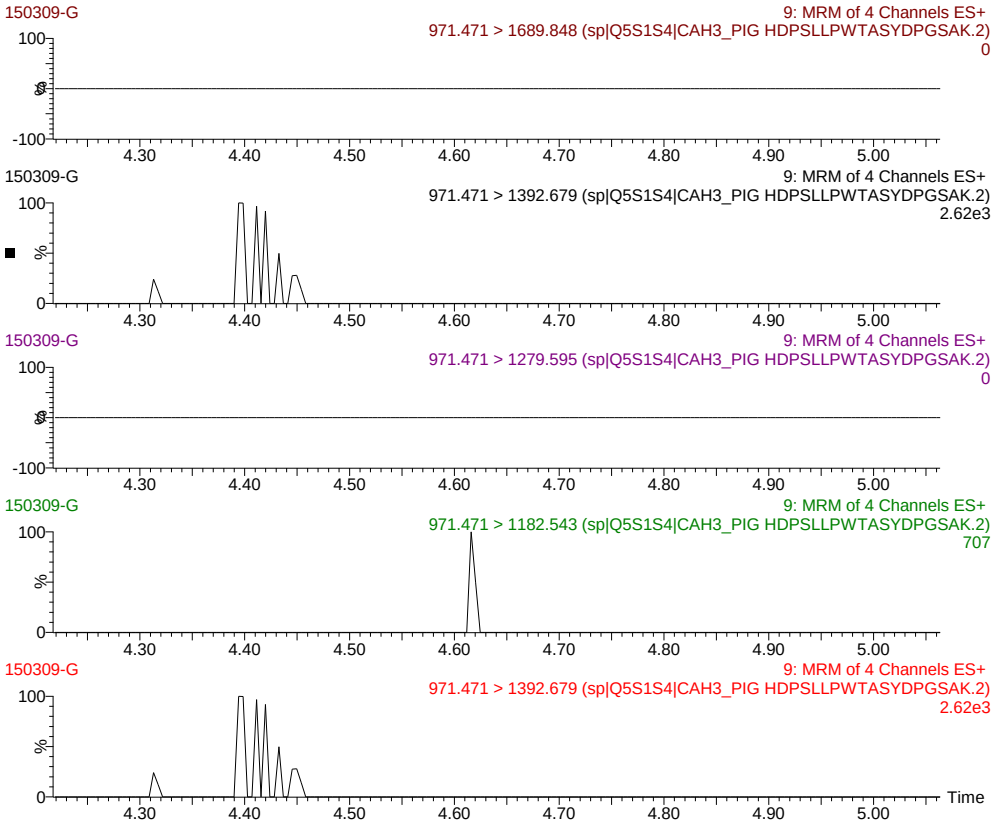


Figure 85. Chromatogrammes des différentes transitions du peptide HDPSLLPWTASYDPGSAK (Carbonic anhydrase 3 de *Sus scrofa*) dans un échantillon de PATs de bovin (G').

Tableau 27. Liste des 15 protéines bovines et porcines les plus abondamment identifiées dans des PATs de bovin et de porc, sans tenir compte de leur caractère autorisé ou prohibé.

Protéines bovines (*Bos*)	Protéines porcines (*Sus scrofa*)
Hemoglobin alpha	Hemoglobin alpha
Hemoglobin beta	Hemoglobin beta
Myosin 7 Myosin light chain 1, 2, 6B	Myosin 1, 4, 7 Myosin light chain 1
Myoglobin	Myoglobin
Heat shock protein beta-1	Heat shock protein beta-1
Carbonic anhydrase 3	Carbonic anhydrase 3
Vimentin	Vimentin
Desmin	Desmin
Apolipoprotein A-IV	Apolipoprotein A-I
Actin	Serum albumin
Alpha-2-HS-glycoprotein	Creatine kinase M-type
Prothrombin	Prophenin-2
Collagen alpha-1(I)	Collagen alpha-1(III)
Collagen alpha-1(II)	Collagen alpha-1(II)
Collagen alpha-2(I)	Collagen alpha-2(I)

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Proteomics

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Species and tissues specific differentiation of processed animal proteins in aquafeeds - a cross laboratory comparison of proteomics workflows

Article Type: SI:Foodomics

Section/Category: Original Article

Keywords: Processed animal protein; feed safety; aquafeeds; shotgun proteomics; data mining

Corresponding Author: Dr. Josef Daniel Rasinger,

Corresponding Author's Institution: NIFES

First Author: Josef Daniel Rasinger

Order of Authors: Josef Daniel Rasinger; Hélène Marbaix; Marc Dieu ; Olivier Fumière ; Sergio Mauro ; Martine Raes ; Magnus Palmblad ; Marc H Berntssen

Abstract: The rapidly growing aquaculture industry drives the search for sustainable protein sources in fish feed. In the European Union (EU) since 2013 non-ruminant processed animal proteins (PAP) are again permitted to be used in aquafeeds. To ensure that commercial fish feeds do not contain PAP from prohibited species, EU reference methods were established. However, due to the heterogeneous and complex nature of PAP complementary methods are required to guarantee the safe use of this fish feed ingredient. In addition, there is a need for tissue specific PAP detection to identify the sources (i.e. bovine carcass, blood, or meat) of illegal PAP use. In the present study, we investigated and compared different protein extraction, solubilisation and digestion protocols on different proteomics platforms for the detection and differentiation of prohibited PAP. In addition, we assessed if tissue specific PAP detection was feasible using proteomics tools. All work was performed independently in two different laboratories. We found that irrespective of sample preparation gel-based proteomics tools were inappropriate when working with PAP. Gel-free shotgun proteomics approaches in combination with direct spectral comparison were able to provide quality species and tissue specific data to complement and refine current methods of PAP detection and identification.

Suggested Reviewers:

N I F E S
NATIONAL INSTITUTE
OF NUTRITION AND
SEAFOOD RESEARCH

Our date
05.02.16
Your date

Our reference

Your reference

Inquiries to:

Att.: Editor to Journal of Proteomics; SI Foodomics.

Concerning; submission paper Rasinger et al. "Species and tissues specific differentiation of processed animal proteins in aquafeeds - a cross laboratory comparison of proteomics workflows"

Dear Editor,

Please find as attached files a manuscript for submission to **Journal of Proteomics; SI Foodomics** entitled "Species and tissues specific differentiation of processed animal proteins in aquafeeds - a cross laboratory comparison of proteomics workflows " by Rasinger et al.

In 2013, processed animal proteins (PAPs), which are by-products from poultry and porcine farming, were re-authorised for use in aquafeeds in the European Union after a risk assessment on the outbreak of transmissible spongiform encephalopathy (TSE) in the UK in the early 1990s. To guarantee the absence on ruminant PAP, which is the likely source TSE, the use of a standard DNA based methods has been implemented in EU reference laboratories. As this method does not differentiate on cell origin (tissue), the EU-PAP reference laboratories have initiated the development of a complementary protein/peptide based method for species and tissue identification. The manuscript reports on a gel free shotgun proteomics approach that, in combination with spectral library matching, is able to provide quality species and tissue specific data that can be used to complement and refine the current methods used for processed animal protein detection and identification.

The present manuscript provides new proteomic approaches for the safe use of PAPs in the food production chain of farmed fish.

Yours Sincerely,



Josef Rasinger, Ph.D.

Postal address
Box 2029 Nordnes
5817BERGEN
NORWAY

Office address
Strandgaten 229

Telephone: +47 55 90 51 00
Telefax: +47 55 90 52 99

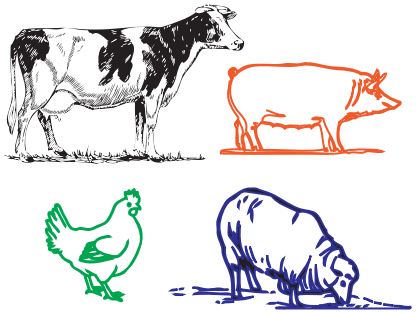
Internet: www.nifes.no
E-mail address: postmottak@nifes.no
Org.no. NO 979529783

Significance

To guarantee the safe use of processed animal protein (PAP) in aquafeeds efficient PAP detection and monitoring tools are required. The present study investigated and compared various proteomics workflows and shows that the application of shotgun proteomics in combination with direct comparison of spectral libraries provides for the desired species and tissue specific classification of this heat sterilized and pressure treated ($\geq$ 133°C, at 3 bar for 20 min) protein feed ingredient.

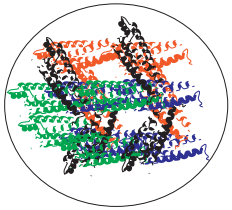
Graphical Abstract

Processed animal protein (PAP)

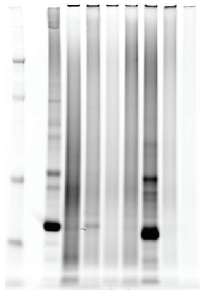


Animal by-products

Rendering and heat processing

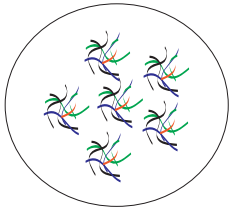


Extaction and solubilisation ✔

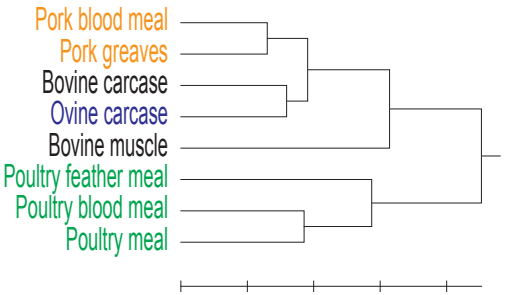


Gel based separation ✕

In solution digestion ✔

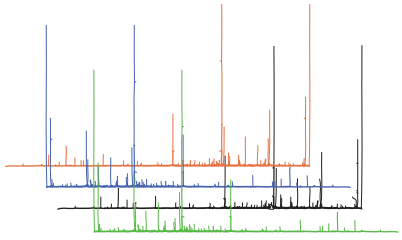


Peptides ✔



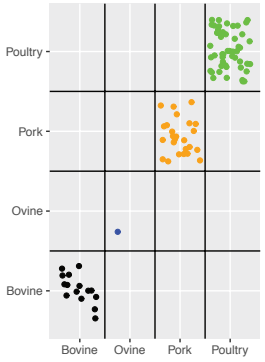
Species and tissue specific PAP authentication ✔

Spectral library matching



MS/MS spectra ✔

Peptide mass fingerprinting



Species specific PAP authentication ✔

*Manuscript
Click here to download Manuscript: Rasinger et al PAP in Aquafeeds submitted.docx Click here to view linked References

Species and tissues specific differentiation of processed animal proteins in aquafeeds - a cross laboratory comparison of proteomics workflows

Rasinger J.D.[1#*], Marbaix H.[2*], Dieu M.[2, 3], Fumière O.[4], Mauro, S.[5], Palmblad M.[6], Raes M.[2], Berntssen M.H. G[1]

[#]*Corresponding author*
[*]*Contributed equally*
[1]*National Institute of Nutrition and Seafood Research, Bergen, Norway*
[2]*URBC-NARILIS, University of Namur, Namur, Belgium*
[3]*MaSUN, Mass spectrometry facility, University of Namur, Namur, Belgium*
[4]*CRAW, Valorisation of Agricultural Products Department, Gembloux, Belgium*
[5]*CRA-W, Biotechnology Department, Gembloux, Belgium*
[6]*Center for Proteomics and Metabolomics, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands*

Rasinger Josef Daniel, National Institute of Nutrition and Seafood Research (NIFES), Bergen, Norway, PO Box 2029, Nordnes, 5817 Bergen, Norway, email: josef.rasinger@nifes.no.

Marbaix Hélène, URBC-NARILIS, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium, email: helene.marbaix@unamur.be.

Dieu Marc, URBC-NARILIS, MaSUN Mass spectrometry facility, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium, email: marc.dieu@unamur.be.

Fumière Olivier, CRAW, Valorisation of Agricultural Products Department, 24 Chaussée de Namur, 5030 Gembloux, Belgium, email: o.fumiere@cra.wallonie.be.

Mauro Sergio, CRAW, Biotechnology Department, 234 Chaussée de Charleroi, 5030 Gembloux, Belgium, email: se.mauro@cra.wallonie.be.

Raes Martine, URBC-NARILIS, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium, email: martine.raes@unamur.be.

Palmblad Magnus, Center for Proteomics and Metabolomics, Leiden University Medical Center, PO Box 9600, 2300 RC Leiden, the Netherlands, email: n.m.palmblad@lumc.nl.

Berntssen Marc H., National Institute of Nutrition and Seafood Research (NIFES), Bergen, Norway, PO Box 2029, Nordnes, 5817 Bergen, Norway, email: marc.berntssen@nifes.no,

Abstract

The rapidly growing aquaculture industry drives the search for sustainable protein sources in fish feed. In the European Union (EU) since 2013 non-ruminant processed animal proteins (PAP) are again permitted to be used in aquafeeds. To ensure that commercial fish feeds do not contain PAP from prohibited species, EU reference methods were established. However, due to the heterogeneous and complex nature of PAP complementary methods are required to guarantee the safe use of this fish feed ingredient. In addition, there is a need for tissue specific PAP detection to identify the sources (i.e. bovine carcass, blood, or meat) of illegal PAP use. In the present study, we investigated and compared different protein extraction, solubilisation and digestion protocols on different proteomics platforms for the detection and differentiation of prohibited PAP. In addition, we assessed if tissue specific PAP detection was feasible using proteomics tools. All work was performed independently in two different laboratories. We found that irrespective of sample preparation gel-based proteomics tools were inappropriate when working with PAP. Gel-free shotgun proteomics approaches in combination with direct spectral comparison were able to provide quality species and tissue specific data to complement and refine current methods of PAP detection and identification.

Significance

To guarantee the safe use of processed animal protein (PAP) in aquafeeds efficient PAP detection and monitoring tools are required. The present study investigated and compared various proteomics workflows and shows that the application of shotgun proteomics in combination with direct comparison of spectral libraries provides for the desired species and

tissue specific classification of this heat sterilized and pressure treated (≥ 133°C, at 3 bar for 20 min) protein feed ingredient.

Abbreviations

Absolute quantitation of amino acids (AQUA), annexin a1 (ANXA1), beta-enolase (ENOB), bovine carcass (BC), bovine muscle (BM), creatine kinase M-type (KCRM), cytoplasmic aspartate aminotransferase (AATC), desmin (DESM), European Fat Processors and Renderers Association (EFPRA), difference in gel electrophoresis (DIGE), European Union (EU), European Union Reference Laboratory (EURL), fibromodulin (FMOD), fluorescent in situ hybridisation (FISH), gelsolin (GELS), cytoplasmic malate dehydrogenase (MDHC), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3P), Heat shock protein beta-1 (HSPB1), Institute of Nutrition and Seafood Research (NIFES), mitochondrial aspartate aminotransferase, (AATM), ovine carcass (OC), pork blood meal (SBM), pork greaves (SG), poultry blood meal (PBM), poultry feather meal (PFM), poultry meal (PM), processed animal proteins (PAP), selected reaction monitoring (SRM), serum albumin (ALB), transmissible spongiform encephalopathy (TSE), triosephosphate isomerase (TPIS), University of Namur and the Walloon Agricultural Research Centre (UN/CRAW), validated polymerase chain reaction (PCR), Vimentin (VIME).

Keywords:

Processed animal protein, feed safety, aquafeeds, shotgun proteomics, data mining

1 Introduction

To increase sustainability of aquaculture, ingredients other than fish oil and meal derived from wild pelagic fish stocks are increasingly being used in feed of farmed carnivorous fish such as Atlantic salmon (*Salmo salar*) [1,2]. Processed animal proteins (PAP), by-products of the swine and poultry production, are one such alternative feed ingredient to salmonids [3–6]. However, in the European Union (EU), the use of all PAP in animal feeds was banned after the outbreak of transmissible spongiform encephalopathy (TSE) in the UK in the early 1990s [7,8]. Only after a recent risk assessment performed by the European Food Safety Authorities (EFSA) was the use of non-ruminant PAP re-authorized in aquafeeds [9,10].

To guarantee a safe use of PAP, standard operating procedures have been established for the control of aquafeeds. Light microscopy methods are used to detect PAP when the feed is not supposed to contain PAP or blood products [8], and an European Union Reference Laboratory (EURL) validated polymerase chain reaction (PCR) based method [11] is used for ruminant DNA-detection [12–15] when the feed is known to contain PAP or blood products, as indicated from the declaration or the labelling [16]. While high in discriminative power for species-specific DNA fragments [17], PCR based methods suffer in accuracy when food matrices are very complex or have been processed at higher temperatures [18–20]. In addition, PCR does not allow for a differentiation of cellular origin [21], and hence cannot be used for tissue specific (i.e. bone, feather etc.) identification. The outlined shortcomings of current PAP detection techniques have sparked the development of analytical methods complementary to PCR including, immunoassays [22,23] or fluorescent in situ hybridisation (FISH) [21]. As primary amino acid sequences are considerably more resistant to food processing than DNA is [17], recently also the use of proteomics was identified a promising tool for the detection and quantification of residual proteins of animal origin in a species- and tissue specific way [24].

Protein-based methods already are well established and the latest developments in the field of proteomics and proteomics bioinformatics have strongly facilitated the use of these tools also in the study of food safety [25,26]. Also proteomics studies focussing on food authenticity were already successfully performed [17,27–30]. However few were applied to PAP [24,31,32]. In most cases standard bottom-up proteomics workflows were used as means to correctly identify the samples of interest. This commonly involves gel-based or gel-free separation of proteins followed by mass spectrometric identification of proteins and peptides of interest through peptide mass fingerprinting [20]. Complementary to this, recently methods based on the direct use of spectral libraries have been suggested [33,34] that allow for unbiased species [20,35,36] and tissue specific [37] classification even of processed samples.

PAP intended for use as feed-ingredients are heat sterilized and pressure treated ($\geq$ 133°C, at 3 bar for 20 min) to comply with current legislation [12]. This high degree of processing denatures protein conformation requiring optimized extraction procedures and challenges gel based approaches. In the present study, we assessed the suitability of different protein extraction and solubilisation procedures and proteomics workflows for species and tissue specific authentication of PAP material for aquafeeds. We tested and compared different gel based and gel free proteomics approaches commonly used for food authenticity testing

followed by different proteomics bioinformatics analysis with the ultimate goal to provide a proteomics pipeline capable of species and tissue specific PAP differentiation.

2 Material and Methods

2.1 Sample Material

Commercially available PAP samples selected for this work, namely poultry blood meal (PBM), poultry meal (PM), poultry feather meal (PFM), pork blood meal (SBM), pork greaves (SG), bovine carcass (BC), bovine muscle (BM) and ovine carcass (OC) were provided by the European Fat Processors and Renderers Association (EFPRA). All PAP were produced according EU regulation EC/1774/2002 for PAP intended for use as feed-ingredients in animal feed. All non-ruminant samples were tested by the EURL-validated ruminant PCR method to ensure the absence of ruminant contamination. All PAP were category 3 products, which are fit for human consumption at the point of slaughter. All samples were studied in duplicate at the Institute of Nutrition and Seafood Research (NIFES) and the University of Namur and the Walloon Agricultural Research Centre (UN/CRAW). An overview of the workflows tested is provided in Figure 1.

2.2 Extraction and solubilization of proteins

Extraction efficiencies of different homogenisation buffers and protocols were assessed. At NIFES protein extraction was performed as described in Rasinger et al. [38] using a difference in gel electrophoresis (DIGE) lysis buffer. In short, crude PAP samples (25 mg) were weighed into test tubes of the PlusOne Sample Grinding Kit (GE Healthcare). A total of 500 µL of homogenization buffer based on the formulation by Rabilloud et al. [39] (7 M urea, 2 M thiourea, 4 % CHAPS, 1% DTT, and 2 % carrier ampholytes) were added to each test tube containing abrasive resin. Samples were ground in the tubes on ice using disposable mortars. Following centrifugation at 4°C and 16000 x g for 10 minutes supernatants were collected and subjected to protein quantification. In addition, protein extraction protocols based on SDS and Tris-HCL as described in Ericsson et al. [40] and Shi et al. [41], respectively were assessed. Supernatants from all extractions were transferred and stored at -20°C. Prior to further analysis, sample homogenates were purified using a 2D Cleanup Kit (GE Healthcare) following vendor's instructions.

At UN/CRAW, samples were crushed to 0.5 mm particle size using the ultra-centrifugal mill ZM 200 (Retsch) and stored at 4°C. Sequentially three methods of protein extraction were tested: TCA - acetone extraction, SDS - Tris extraction and HCl extraction with different incubation times. For the TCA - acetone extraction, 1.8 ml of acetone with 10 % TCA and 0.3

% DTT were added to 200 mg of PAP sample and stored at - 20 °C overnight. Each sample was centrifuged for 10 min at 16000 g at 4°C (1-15PK Refrigerated Microcentrifuge, Sigma) and the supernatant discarded. The remaining pellet was washed twice in 1.8 ml of acetone with 0,3 % DTT and once in 1.8 ml of 90 % acetone with 0.3 % DTT, with an incubation period of 30 min at - 20°C followed by a centrifugation after each washing. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 300 µl of DLA (urea 7 M, thiourea 2 M, Tris 30 mM, CHAPS 4 %). The sample was mixed for 1 h at 1 400 rpm at 12°C on a thermomixer (Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf) and centrifuged for 10 min at 16000 g. The supernatant was transferred to a new tube and stored at - 20°C. For the SDS - Tris extraction, 1.8 ml of SDS 2% - Tris 1 M pH 8,8 (previously heated to 90 °C) were added to 200 mg of PAP sample. The sample was then heated for 10 min at 90°C and mixed on a thermomixer at 1400 rpm for 1 h at 20°C. The sample was centrifuged for 10 min at 10000 g. The supernatant was transferred to a new tube and stored at 4°C. For the HCl extraction, 1 ml of HCl 0.6 M was added to 40 mg of PAP sample. The sample was incubated for 4, 8, 16, 24 or 48 h at room temperature and frequently homogenized. The sample was centrifuged for 10 min at 16000 x g (4°C) and the supernatant discarded. The remaining pellet was washed three times in 1 ml of ice cold ddH2O, with an incubation period of 15 min on ice and a centrifugation after each washing. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 100 µl of DLA. The solution was then mixed for 20 min at 1400 rpm on a thermomixer and the sample was centrifuged for 10 min at 16 000 g. The supernatant was transferred to a new tube and stored at -20°C. Prior to further analysis, samples were subjected to a protein purification step using a 2D Clean-Up kit (GE Healthcare) following vendor's instructions. Protein pellets were rehydrated in DLA for the SDS-PAGE analysis and in RapiGest SF Surfactant 0.2 % (Waters) for the gel free analysis.

2.3 Protein quantification

For all extractions, protein concentrations were determined by the Pierce 660 assay (ThermoFisher Scientific) using BSA as the protein standard (ThermoFisher Scientific). The yield of the extractions is expressed in percentage of proteins found in the extracts compared to the total quantity of proteins in the crude sample. Crude protein content was analysed by adding 5 ml H2SO4 (95-97% Merck) and two Kjeldahl tablets (Thompson and Capper LTD.) to 40 mg of freeze-dried material. This mixture was digested at 380°C for 1.5 hours, subsequently cooled to room temperature and diluted to 75 ml with Milli-Q water. The ammonium content (NH4+) in the sample solution was determined by an automated

colorimetric method as described by Crooke and Simpson [42], crude protein was estimated as Nx6.25. Casein (Sigma, C-8654) was used as reference material.

2.4 1D Gel-electrophoresis

At NIFES, 1D gel-electrophoresis was performed using the Bolt Mini gel system (Life Technologies) following the vendor's instructions. In short, protein extracts (2 µg) were mixed with 2.5 µl Bolt LDS Sample Buffer, one µl Bolt reducing agent, deionized water and after mixing heated at 70°C for 10 minutes. Samples were loaded on 10 well Bolt Mini gradient (4-12%) gels using MES SDS running buffer and run at 165 V. After migration of proteins was completed, gels were washed, stained using Imperial Protein Stain (ThermoFisher Scientific) and imaged using a G:Box gel doc system (Syngene).

At UN/CRAW, protein extracts (15 µg) were mixed with the electrophoretic buffer (Tris-aminomethane 0.25 M, glycine 1.92 M, SDS 1 %, pH 8.5-8.9) diluted 10 times to reach a total volume of 12 µl. Four µl of NuPAGE blue - LDS Sample Buffer (Novex by LifeScience, USA) and 1.6 µl of DTT 0.5 M were added to the sample. The sample was centrifuged, heated for 2 min at 85°C and loaded on the Novex 18 % Tris-Glycine gel. SeeBlue Plus2 Prestained Standard protein kit was used as the protein standard. A constant voltage of 125 V was applied. After migration, the gel was washed for 2 x 30 min in 200 ml of a fixing solution (40 % ethanol, 10 % acetic acid), for 5 min in ddH2O and stained overnight with Krypton Protein Stain 10 % (Thermo Scientific). After staining, the gel was placed for 5 min in a destaining solution (5 % acetic acid) and for 15 min twice in ddH2O. The protein profiles of PAP were visualized using the Typhoon gel scanner (Typhoon 9420, Amersham Biosciences, GE).

2.5 In-solution digestion of proteins

At NIFES protein samples were digested using a commercial Pierce In solution Tryptic Digestion and Guanidination Kit (ThermoFisher Scientific) following the vendor's instructors. In short, a total of 10 µg protein were mixed with 15 µl digestion buffer and 1.5 µl reducing buffer. Samples were heated to 95°C for 5 minutes and once cool, three µl of alkylation buffer were added. Samples were incubated in the dark at room temperature for 20 minutes. Following the addition of one µl of activated trypsin samples were incubated at 37°C for three hours. Subsequently, another µl of activated trypsin, samples were incubated overnight at 30°C. The day after 10 µl of ammonium hydroxide and 6 µl of guanidination reagent were added and samples were incubatied at 65°C for 12 minutes. Following tryptic

digestion, peptide samples were subjected to Pierce C18 Spin Column (ThermoFisher Scientific) clean-up following vendor's instructions. In short, spin columns were rinsed and equilibrated, 16 µl sample were loaded and columns were centrifuged at 1500 x g for one minute. The eluate was recovered and loaded again on the same column, which was again subjected to centrifugation (1500 x g for 1 minute). The eluate was discarded, 200 µl of wash solution were added and centrifugation step was repeated. After repeating the washing step for two more times, peptides were eluted using 20 µl of elution buffer. Following centrifugation (1500 x g for 1 minute), 20 µl more elution buffer were added and the centrifugation step repeated.

At UN/CRAW samples (20 µl) were reduced by 0.2 µl DTT (1 M) and incubated at 500 rpm for 45 min at 37°C on a thermomixer. They were then alkylated using 1.5 µl iodoacetamide (550 mM) and incubated in the dark at 500 rpm for 45 min at 37 °C. Thereafter, 0.22 µl CaCl2 (100 mM) and trypsin (Trypsin Gold 1 µg/µl, Mass Spectrometry Grade, Promega) with a trypsin/protein ratio of 1/20 were added. Samples were then incubated at 300 rpm for 5 h at 37°C. To remove RapiGest SF Surfactant and to stop the trypsin action, trifluoroacetic acid was added (pH < 2) and each sample was incubated at 300 rpm for 30 min at 37°C. It was then centrifuged and the supernatant was recovered.

Following trypsin digestions, peptide concentrations in the samples were determined by adsorption at 280 nm wavelength using a Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Peptide samples were stored at -20°C prior to mass spectrometry analysis

2.6 Mass spectrometry

All samples prepared were analysed at UN/CRAW, the peptides were analyzed using an ESI-MS/MS maXis Impact UHR-TOF (Bruker,) coupled with an UltiMate 3000 nano-UPLC system (Thermo Scientific). The digests were separated by reverse-phase liquid chromatography using a 75 µm x 250 mm reverse phase Thermo column (Acclaim PepMap 100 C18, Thermo) in an Ultimate 3000 liquid chromatography system. The flow rate was 300 nl/min. Mobile phase A was 95 % water - 5 % acetonitrile, 0,1 % formic acid. Mobile phase B was 20 % water - 80 % acetonitrile, 0,1 % FA. The digest was injected on a pre-column for a desalting step, and the organic content of the mobile phase was increased linearly from 4 % B to 30 % B in 160 min and from 30 % B to 90 % B in 25 min, and then washed with 90 % B for 10 min and with 4 % B for 20 min, for a total of 215 min. The column effluent was connected to a Captive Spray (Bruker). In survey scan, MS spectra were acquired for 0.5 sec in the mass to charge (m/z) range between 50 and 2200. The most intense peptides ions 2+ to

4+ were sequenced during a cycle time of 3 sec. The collision-induced dissociation (CID) energy was automatically set according to m/z ratio and charge state of the precursor ion. The mass spectrometer and UPLC systems are controlled by Compass Hystar 3.2 (Bruker).

2.7 Proteomics bioinformatics and data mining

Mass spectrometry data generated using the UHR-TOF (.baf files) were created using Proteowizard 4.2 (Bruker) and saved as mgf files. Standard bottom-up proteomics bioinformatics analysis was conducted using SearchGUI version 2.2.2 [43]. In short, MGF Peak lists obtained from MS/MS spectra were identified using OMSSA version 2.1.9, X!Tandem version 2013.09.01.1 (Sledgehammer), Andromeda version 1.5.3.4, MS Amanda version 1.0.0.5242, MS-GF+ version Beta (v10282), Comet version 2015.02 rev. 3, MyriMatch version 2.2.140 and Tide. The identification settings were as follows: Trypsin with a maximum of 2 missed cleavages; 10.0 ppm as MS1 and 0.05 Da as MS2 tolerances (UHR-TOF); fixed modifications: Carbamidomethylation of C (+57.021464 Da), variable modifications: Oxidation of M (+15.994915 Da), Acetylation of protein N-term (+42.010565 Da), Pyrolidone from E (-18.010565 Da), Pyrolidone from Q (-17.026549 Da) and Pyrolidone from carbamidomethylated C (-7.026549 Da), fixed modifications during refinement procedure: Carbamidomethylation of C (+57.021464 Da). The peak lists of ruminant PAP (BC, BM, OC), pork PAP (PG, PM) and poultry PAP (ABM, AM, AFM) were searched individually against UniprotKB/Swiss-Prot database (version 10.12.2015) with three different taxonomy restrictions (ruminantia [9845] , suina [35497], and aves[8782]).

Peptides and proteins were inferred from the spectrum identification results using PeptideShaker version 1.2.2 [PMID 25574629] [44]. Peptide Spectrum Matches (PSMs), peptides and proteins were validated at a 1.0% False Discovery Rate (FDR) estimated using the decoy hit distribution.

PAP proteins and peptides detected across both laboratories and analyses were imported in WEKA version 3.6.13 [45] and a NaiveBayes classifier was run with 10-fold cross validation to identify peptides, which differentiate PAP species and tissues. NaiveBayes classifier results were visualised using ggplot2 [46] in R (version 3.2.2) [47] running in RStudio (version 0.99.489) [48].

To compare the LC-MS/MS datasets directly, independently of sequence databases, we used compareMS2 [33], after extracting the tandem mass spectra corresponding to the 2,000 most abundant precursors. From the distance matrix calculated by compareMS2, “phylogenetic” trees were constructed using UPGMA in MEGA version 7 [49].

3 Results and Discussion

3.1 PAP protein extraction

Maximal and standardized protein extraction and solubilisation are key to make the whole protein complement available to downstream proteomics analysis [40]. Following total protein determination different protein extraction and solubilisation methods were tested on eight PAP samples and protein extraction efficiencies were determined. At NIFES protocols based on a DIGE lysis buffer, SDS lysis buffer and Tris lysis buffer as described in Rasinger et al. [38], Ericsson et al. [40], and Shi et al. [41], respectively were assessed. At CRA-W/UN the same eight PAP samples were subjected to extractions using customised TCA - acetone extractions, SDS - Tris extractions or HCl extractions with different incubation times. The results obtained are provided in Supplementary Table 1. NIFES extractions were on average displaying the highest quantity of extracted proteins. However, each method tested suffered from a large degree of variability across the eight different PAP and no single protocol could be singled out that performed best across all samples tested.

3.2 Gel based PAP sample fractionations

According to earlier proteomics work on species and tissues differentiation of proteic food and feed matter [17] gel based fractionations of PAP samples were attempted. Samples were separated using 1D polyacrylamide gel electrophoresis. As can be seen in Figure 2, PAP samples in general could not be resolved well and produced mostly smears. Similar findings were obtained when PAP protein extracts were electrophoretically separated at NIFES (results not shown). The poor performance of gel based fractionation of PAP samples may be due to the severe heat treatment commercial PAP undergo. According to the European regulation EC/1774/2002 PAP intended for use as feed-ingredients in animal feed are heat sterilized with steam pressure of $\geq$ 133°C, at 3 bar for 20 min [12]. This is a very aggressive procedure that denatures all proteic material to a point, which prohibits electrophoretic separation and thus rendering the earlier described gel based methods [17] for species identification of non processed animal proteins unsuitable for PAP. Therefore, for PAP authentication, in the next step the suitability of a gel free strategy was assessed.

3.3 In solution digestion and mass spectrometry data analyses

Before MS the PAP extracts were subjected to enzymatic digestion using trypsin, a commonly used standard method in proteomics [50]. Two independent tryptic in solution digestion approaches on eight PAP sample extracts were performed in technical duplicates at both laboratories. At NIFES PAP sample extracts were selected on the basis of highest average protein yield (Supplementary Table 1) and a commercially available trypsin-based protein digestion and peptide purification kits were used. At CRAW/UN, based on preliminary MS analyses of bovine PAP samples (data not shown), HCl extraction (with four hours of incubation) was selected and a customised tryptic in solution digestion was performed. Following digestion, peptide yields were determined at both laboratories. Either method yielded sufficient PAP peptides for the ESI-QTOF MS/MS analysis (Supplementary Table 1).

All MS data obtained were analysed using SearchGUI [43] and PeptideShaker [44], two freely available software tools for standard bottom up proteomics workflows. All relevant protein and peptide identification data obtained are provided in Supplementary Table 2. A summary of all proteins and peptides successfully identified in each of the eight commercial PAP samples is given Table 1. When directly comparing the number of proteins and peptides identified, the protein digestion method of CRAW/UN displayed superior performance. This implies that when developing a standard extraction procedures for regulatory use, a compromise between the highest quantity of extracted proteins and the quality of the extracted and digested proteins in terms of number of identified peptides may need to be found.

3.4 Species and tissue specific PAP identification using peptide mass fingerprinting

To mine for tissue specific PAP peptide markers, in analogy to the gel based sample fractionation approach employed by Sentandreu et al. [17], proteins successfully identified in ruminant (bovine and ovine) porcine and avian PAP samples were considered suitable targets to obtain robust and reliable species specific peptide markers. Only serum albumin (ALB) was consistently detected across all eight PAP. To detect potential species specific peptide markers in ALB, a Naive Bayes classifier was run in WEKA on peptides associated with the selected protein. Using 10-fold cross validation, on average >90% of the peptides in each of the four extractions were assigned correctly to the corresponding class of PAP species. An overview of the classifications obtained is given in Figure 3. Despite the large degree of homologies between the ALB proteins of the four species tested (see Figure 3), the Naive

Bayes machine learner derived peptide marker candidates were indeed species specific. What is more, the majority of peptide marker candidates were consistently detected in both laboratories independent of sample preparation. This means that the combination of gel free bottom up proteomics in combination with machine learning provides a workflow suitable for the determination of species specific PAP peptide markers that are not destroyed by the harsh PAP rendering and sterilization procedures. Moreover, the PAP peptide database created in the present study can in future also be mined for suitable sets of peptide markers of individual PAP for e.g. the creation of absolute quantitation of amino acids (AQUA) or selected reaction monitoring (SRM) assays. When using stable isotope-labeled peptides, Sentandreu et al. [17] successfully detected 0.5% (w/w) contaminating chicken in pork meat samples. In other words, the incorporation of these techniques in the proteomics PAP assay would render it quantitative and what is more, suitable for regulatory use as for a method to serve as legal evidence in the EU detection levels of below 1% (w/w) are required [12].

Unlike species authentication, proteomics PAP tissue differentiation did not return satisfactory results when using a standard bottom-up proteomics data analysis approach. As above, again only one protein (ALB) was identified consistently across all eight tissue specific PAP. Given the ubiquitous nature of this major blood protein, it is unlikely that tissue specificity can be achieved. A reason why so few proteins common to all samples were detected may be the limited size of the ovine UniprotKB/Swiss-Prot database (Sheep: 9940 entries). By comparison, bovine, chicken and pig have 5595, 2273, and 1416 entries, respectively. When ovine PAP were excluded from the set, in addition to ALB, the proteins annexin a1 (ANXA1), fibromodulin (FMOD), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3P), cytoplasmic aspartate aminotransferase (AATC), mitochondrial aspartate aminotransferase, (AATM), gelsolin (GELS), cytoplasmic malate dehydrogenase (MDHC), triosephosphate isomerase (TPIS), creatine kinase M-type (KCRM), desmin (DESM), beta-enolase (ENOB), heat shock protein beta-1 (HSPB1), vimentin (VIME) were consistently detected. The latter five proteins (KCRM, DESM, ENOB, HSPB1, VIME) were alongside ALB consistently identified irrespective of protein extraction and digestion procedure and represent additional potentially suitable candidates for tissue specific peptide markers mining; albeit not for the detection of PAP material of ovine origin. Given these limitations, the suitability of an alternative proteomics bioinformatics analysis approach was assessed, which does not require prior genomic information of any species and is unlike the analysis approach presented here not limited by any lack of annotation.

3.5 Species and tissue specific PAP identification by direct spectral comparison

Recently methods based on the direct use of spectral libraries have been suggested [33,34] that allow for unbiased species [20,35,36] and tissue specific [37] classification even of processed samples. Using direct comparisons of tandem mass spectra as implemented in compareMS2, an approach first described by Palmblad and Deelder [33], it was possible to successfully differentiate all PAP samples according to the species they originated from (see Figure 4). As can also be seen in Figure 4, making use of the bulk of high quality tandem mass spectra spectra rather than choosing a selected few, as done in the peptide mass fingerprinting approach described earlier, also the tissue origin of the PAP samples investigated was determined successfully. This clearly shows that similarly to the differentiation of raw or processed fish [20,35] and meat [36] samples, respectively a method based on the direct comparison of mass spectra also correctly classifies heavily processed PAP. What is more, data analysis is done in one single search. By comparison, the classic bottom up proteomics analysis approach employed above required a series of time consuming data analysis steps and eventually, permitted data mining only in a fraction of the MS data obtained. As spectral library based methods also are completely independent of any genomic or protein sequence database [20], they are equally applicable to all PAP organisms and tissues allowing for the creation of extensive PAP reference libraries including less well annotated species. To these libraries unknown PAP mixtures in fish feed can be matched to for identification and even quantification, as recently described in Ohana et al. [36]. In analogy to the peptide database created by peptide mass fingerprinting, the spectral libraries generated also can be mined to extract suitable signature peptides for the generation of SRM assays for the absolute quantification of illegal PAP of ruminant origin in aquafeed mixtures and identify the source (e.g. muscle, carcass, or blood meal) of the detected PAP contamination.

4 Conclusions and future work

We have demonstrated that irrespective of sample preparation gel based tools are inappropriate when working with heat sterilized and pressure treated PAP samples. Gel free shotgun proteomics approaches on the other hand are able to provide quality data that can successfully be mined for species specific peptide markers using peptide mass fingerprinting and machine learning. Yet, this approach still fell short when tissue specificity was the goal.

Satisfying results in terms of both PAP species and tissue specificity were achieved only when gel-free shotgun proteomics in combination with spectral library based data analysis methods were used. Future work will focus on the standardisation of the protein extraction and digestion procedures for regulatory use and the creation of an extensive freely available PAP spectral library reference collection. In parallel, PAP tissue peptide marker discovery will continue to design tissue specific AQUA and SRM assays will be developed for the absolute quantitation of PAP in commercial feed mixes.

Conflict of interest

The authors have declared that no competing interest exist.

Acknowledgements:

Norwegian Research Council project "Food safety and the use of terrestrial animal by-products in Atlantic salmon production- SAFE-PAP 22738/E40". Hélène Marbaix was supported by a fellowship of the Belgian Federal Public Service of Health, Food Chain Safety and Environment (contract RF 11/6243 PEPTIDO-GENOMIQUE) and by the UNamur (FSR fellowship). The MaSUN MS platform is supported by the FNRS/FRFC 2.4.569.09F and the UNamur. The authors would like to thank Eva Mykkeltvedt for her technical assistance.

Figure legends

Figure 1: Overview of the proteomics workflows tested. A depicts gel based workflows and B the gel-free approaches. All work was performed in parallel at the National Institute of Nutrition and Seafood Research (NIFES) and University of Namur and the Walloon Agricultural Research Centre (UN/CRAW). All samples were provided by European Fat Processors and Renderers Association (EFPRA). All liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS2) analyses were run at UN/CRAW.

Figure 2: 18 % Tris-Glycine 1D gels illustrating the protein profile for the 8 samples in duplicates after the three protein extraction : TCA – Acetone, SDS – Tris and HCl 4 h. The SeeBlue® Plus2 Prestained Standard protein kit was used as protein standard. The gel was stained with krypton and scanned at 500 V. N002 and N002', N008 and N008', N011 and N011' are technical duplicates of the poultry PAP (poultry blood meal , poultry meal, poultry feather meal), N012 and N012' N018 and N018' technical duplicates of the porcine PAP (pork blood meal and pork greaves), N020 and N020', N021 and N021' technical duplicates

of the bovine PAP (bovine carcase and bovine muscle) and N022 and N022' are technical duplicates of the ovine PAP (ovine carcase).

Figure 3: Qualitative view of peptide candidates for species specific PAP differentiation. A depicts the classification matrix of the marker peptides found for serum albumin (ALB) and shows the degree of sequence homology between the four distinct ALB proteins P02769, P14639, P08835 and P19121. B shows the tentative marker peptides according to their species specificity (black: ruminant, blue: ovine, orange: pork, and green: poultry).

Figure 4: Species and tissues specific PAP differentiation. Direct comparison of spectra obtained by tandem mass spectrometry using a previously described method for phylogenetic analysis [33]. A1 and A2 depict technical parallels. Irrespective of the extraction method, PAP cluster according to the species and tissue origins of PAP.

References

[1] Torstensen, B.E., Espe, M., Sanden, M., Stubhaug, I., et al., Novel production of Atlantic salmon (Salmo salar) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture* 2008, 285, 193–200.

[2] Ytrestøyl, T., Aas, T.S., Åsgård, T., Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (Salmo salar) in Norway. *Aquaculture* 2015, 448, 365–374.

[3] Bransden, M.P., Carter, C.G., Nowak, B.N., Effects of dietary protein source on growth, immune function, blood chemistry and disease resistance of Atlantic salmon (Salmo salar L.) parr. *Anim. Sci.* 2001, 73, 105–113.

[4] Hatlen, B., Jakobsen, J.-V., Crampton, V., Alm, M., et al., Growth, feed utilization and endocrine responses in Atlantic salmon (Salmo salar) fed diets added poultry by-product meal and blood meal in combination with poultry oil. *Aquacult. Nutr.* 2014.

[5] Liland, N.S., Hatlen, B., Takle, H., Venegas, C., et al., Including processed poultry and porcine by-products in diets high in plant ingredients reduced liver TAG in Atlantic salmon, Salmo salar L. *Aquacult. Nutr.* 2015, 21, 655–669.

[6] Rossi, W., Jr., Davis, D.A., Replacement of fishmeal with poultry by-product meal in the diet of Florida pompano Trachinotus carolinus L. *Aquaculture* 2012, 338–341, 160–166.

[7] EC, Commission regulation (EC) no 999/2001 of the european parliament and of the council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Official Journal of the European Union* 2001, L 147.

[8] EC, Commission regulation (EC) No 1234/2003 of 10 July 2003 amending Annexes I, IV and XI to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 1326/2001 as regards transmissible spongiform encephalopathies and animal feeding. *Official Journal of the European Union* 2003, 6–13.

[9] EC, Commission regulation (EU) 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. *Official Journal of the European Union* 2013, 3–16.
[10] EFSA, European Food Safety Authority Panel on Biological Hazards. Scientific Opinion on the revision of the quantitative risk assessment (QRA) of the BSE risk posed by processed animal proteins (PAPs). *EFSA Journal* 2011, 9.
[11] Fumière, O., Dubois, M., Baeten, V., von Holst, C., Berben, G., Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 385, 1045–1054.
[12] Berben, G., Baeten, V., Fumière, O., Veys, P., Boix, A., Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Baseline* 2009.
[13] Fumière, O., Marien, A., Fernández Pierna, J.A., Baeten, V., Berben, G., Development of a real-time PCR protocol for the species origin confirmation of isolated animal particles detected by NIRM. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 2010, 27, 1118–1127.
[14] Prado, M., Fumière, O., Boix, A., Marien, A., et al., Novel approach for interlaboratory transfer of real-time PCR methods: detecting bovine meat and bone meal in feed. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 394, 1423–1431.
[15] Prado, M., Berben, G., Fumière, O., van Duijn, G., et al., Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real-time polymerase chain reaction: result of an interlaboratory study. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 7495–7501.
[16] EURL-AP, 2014, Expert meeting on complementary methods for processed animal proteins (PAP). October 14th – 15th 2014, Gembloux, Belgium.
[17] Sentandreu, M.A., Fraser, P.D., Halket, J., Patel, R., Bramley, P.M., A proteomic-based approach for detection of chicken in meat mixes. *J. Proteome Res.* 2010, 9, 3374–3383.
[18] Ebbehøj, K.F., Thomsen, P.D., Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. *Meat Sci.* 1991, 30, 221–234.
[19] Woolfe, M., Primrose, S., Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends Biotechnol.* 2004, 22, 222–226.
[20] Wulff, T., Nielsen, M.E., Deelder, A.M., Jessen, F., Palmblad, M., Authentication of fish products by large-scale comparison of tandem mass spectra. *J. Proteome Res.* 2013, 12, 5253–5259.
[21] Lecrenier, M.C., Ledoux, Q., Berben, G., Fumière, O., et al., Determination of the ruminant origin of bone particles using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Sci. Rep.* 2014, 4, 5730.
[22] Bremer, M.G., Margry, R.J., Vaessen, J.C.H., Van Doremalen, A.M.H., et al., Evaluation of a commercial ELISA for Detection of Ruminant processed animal proteins in non-Ruminant processed animal proteins. *J. AOAC Int.* 2013, 96, 552–559.
[23] van Raamsdonk, L.W.D., Margry, R.J.C.F., van Kaathoven, R.G.C., Bremer, M.G.E.G., Inter-laboratory validation study of two immunochemical methods for detection of processed ruminant proteins. *Food Chem.* 2015, 185, 333–339.
[24] Claydon, A.J., Grundy, H.H., Charlton, A.J., Romero, M.R., Identification of novel peptides for horse meat speciation in highly processed foodstuffs. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 2015, 32, 1718–1729.
[25] D'Alessandro, A., Zolla, L., We are what we eat: food safety and proteomics. *J. Proteome Res.* 2012, 11, 26–36.
[26] Piras, C., Roncada, P., Rodrigues, P.M., Bonizzi, L., Soggiu, A., Proteomics in food: quality, safety, microbes and allergens. *Proteomics* 2015.
[27] Bouley, J., Chambon, C., Picard, B., Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2004, 4, 1811–1824.

[28] Grundy, H.H., Reece, P., Sykes, M.D., Clough, J.A., et al., Screening method for the addition of bovine blood-based binding agents to food using liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, 21, 2919–2925.
[29] Mazzeo, M.F., Giulio, B.D., Guerriero, G., Ciarcia, G., et al., Fish authentication by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 11071–11076.
[30] Montowska, M., Rao, W., Alexander, M.R., Tucker, G.A., Barrett, D.A., Tryptic digestion coupled with ambient desorption electrospray ionization and liquid extraction surface analysis mass spectrometry enabling identification of skeletal muscle proteins in mixtures and distinguishing between beef, pork, horse, chicken, and turkey meat. *Anal. Chem.* 2014, 86, 4479–4487.
[31] Balizs, G., Weise, C., Rozycki, C., Opialla, T., et al., Determination of osteocalcin in meat and bone meal of bovine and porcine origin using matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry and high-resolution hybrid mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2011, 693, 89–99.
[32] Buckley, M., Collins, M., Thomas-Oates, J., Wilson, J.C., Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009, 23, 3843–3854.
[33] Palmblad, M., Deelder, A.M., Molecular phylogenetics by direct comparison of tandem mass spectra. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2012, 26, 728–732.
[34] Lam, H., Deutsch, E.W., Eddes, J.S., Eng, J.K., et al., Building consensus spectral libraries for peptide identification in proteomics. *Nat. Methods* 2008, 5, 873–875.
[35] Wulff, T., Jessen, F., Palmblad, M., Nielsen, M.E., in:, *Farm animal proteomics 2013*, Wageningen Academic Publishers, 2013, pp. 71–74.
[36] Ohana, D., Dalebout, H., Marissen, R.J., Wulff, T., et al., Identification of meat products by shotgun spectral matching. *Food Chem.* In press.
[37] van der Plas-Duivesteijn, S.J., Mohammed, Y., Dalebout, H., Meijer, A., et al., Identifying proteins in zebrafish embryos using spectral libraries generated from dissected adult organs and tissues. *J. Proteome Res.* 2014, 13, 1537–1544.
[38] Rasinger, J.D., Carroll, T.S., Lundebye, A.K., Hogstrand, C., Cross-omics gene and protein expression profiling in juvenile female mice highlights disruption of calcium and zinc signalling in the brain following dietary exposure to CB-153, BDE-47, HBCD or TCDD. *Toxicology* 2014, 321, 1–12.
[39] Rabilloud, T., Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 1998, 19, 758–760.
[40] Ericsson, C., Peredo, I., Nistér, M., Optimized protein extraction from cryopreserved brain tissue samples. *Acta Oncol.* 2007, 46, 10–20.
[41] Shi, S.-R., Liu, C., Balgley, B.M., Lee, C., Taylor, C.R., Protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections: quality evaluation by mass spectrometry. *J. Histochem. Cytochem.* 2006, 54, 739–743.
[42] Crooke, W.M., Simpson, W.E., Determination of ammonium in Kjeldahl digests of crops by an automated procedure. *J. Sci. Food Agric.* 1971, 22, 9–10.
[43] Vaudel, M., Barsnes, H., Berven, F.S., Sickmann, A., Martens, L., SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches. *Proteomics* 2011, 11, 996–999.
[44] Vaudel, M., Burkhart, J.M., Zahedi, R.P., Oveland, E., et al., PeptideShaker enables reanalysis of MS-derived proteomics data sets. *Nat. Biotechnol.* 2015, 33, 22–24.
[45] Witten, I.H., Frank, E., *Data Mining: Practical machine learning tools and techniques*, Morgan Kaufmann, 2005.
[46] Wickham, H., ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis 2009.

[47] R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing 2013.
[48] RStudio Team, RStudio: Integrated Development Environment for R 2015.
[49] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., et al., MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011, 28, 2731–2739.
[50] Switzar, L., Giera, M., Niessen, W.M.A., Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments. *J. Proteome Res.* 2013, 12, 1067–1077.

Table 1

Click here to download Table: Table 1.docx

Table 1: Total numbers of successfully identified proteins and peptides in eight different commercial processed animal protein (PAP) samples of different species and tissue origin. A1 and A2, and B1 and B2 are technical parallels of distinct sample preparation methods performed independently at two different laboratories

PAP		A1		A2		B1		B2	
Species	Tissue	Proteins	Peptides	Proteins	Peptides	Proteins	Peptides	Proteins	Peptides
Bovine	Carcase	39	878	35	809	119	1300	113	1261
	Muscle	34	904	40	921	120	1386	125	1344
Ovine	Carcase	35	909	39	887	143	1385	157	1434
Pork	Blood meal	15	253	15	270	44	518	48	415
	Greaves	69	931	87	997	216	1472	196	1451
Poultry	Blood Meal	25	342	29	384	54	639	67	751
	Feather meal	30	636	31	593	172	1957	174	1932
	Meal	117	1784	118	1681	276	2597	317	2741

Figure 1

Click here to download high resolution image

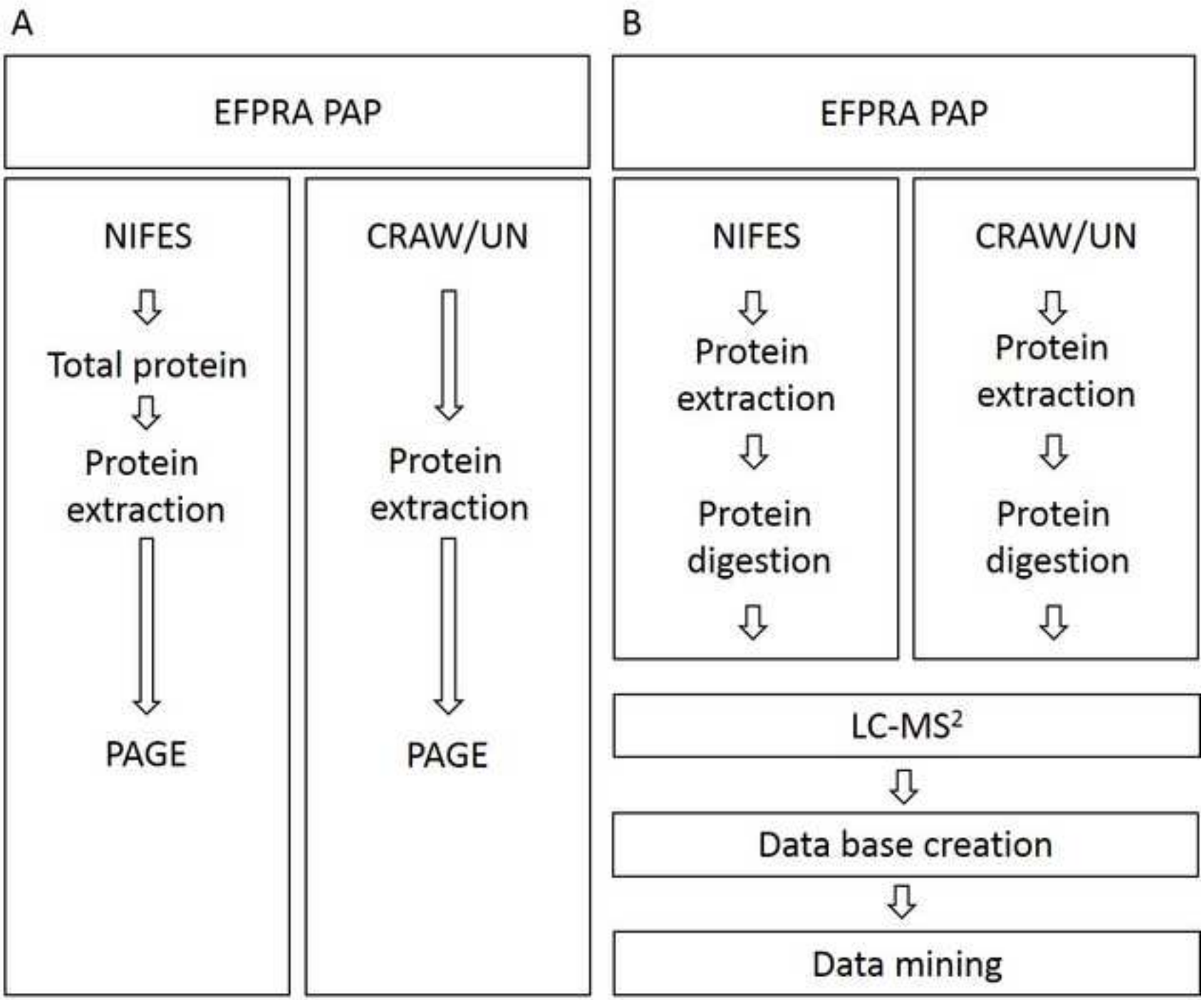


Figure 2

Click here to download high resolution image

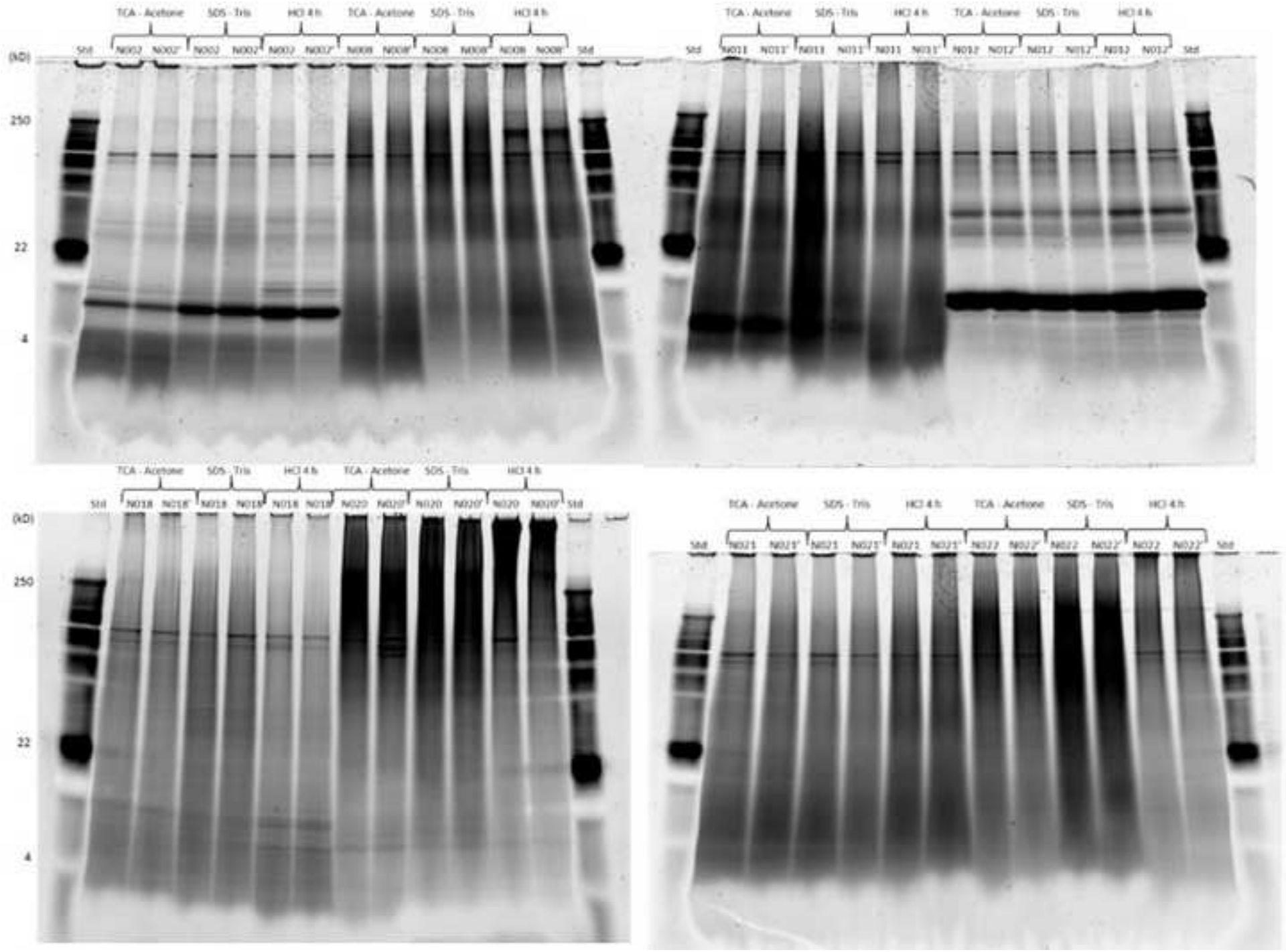
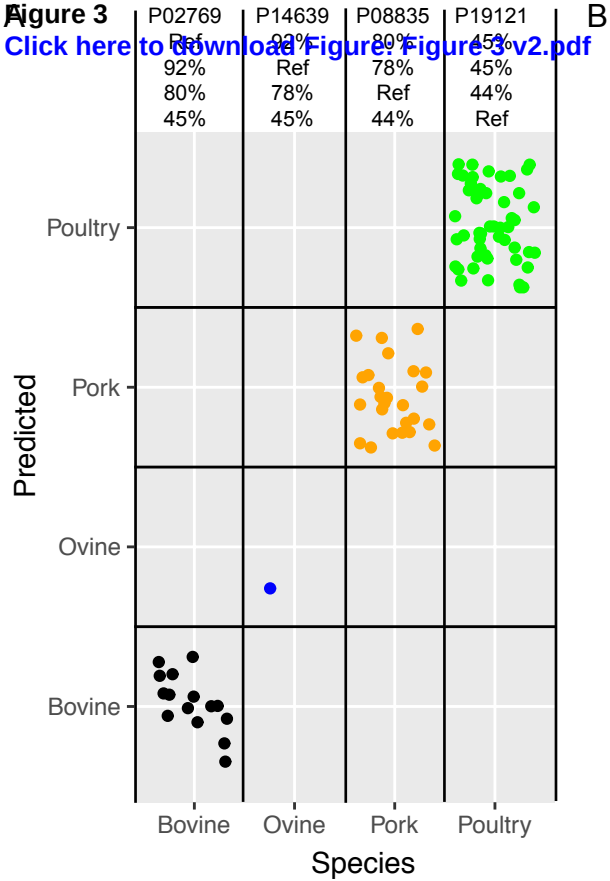


Figure 3

Click here to download Figure: Figure 3 v2.pdf

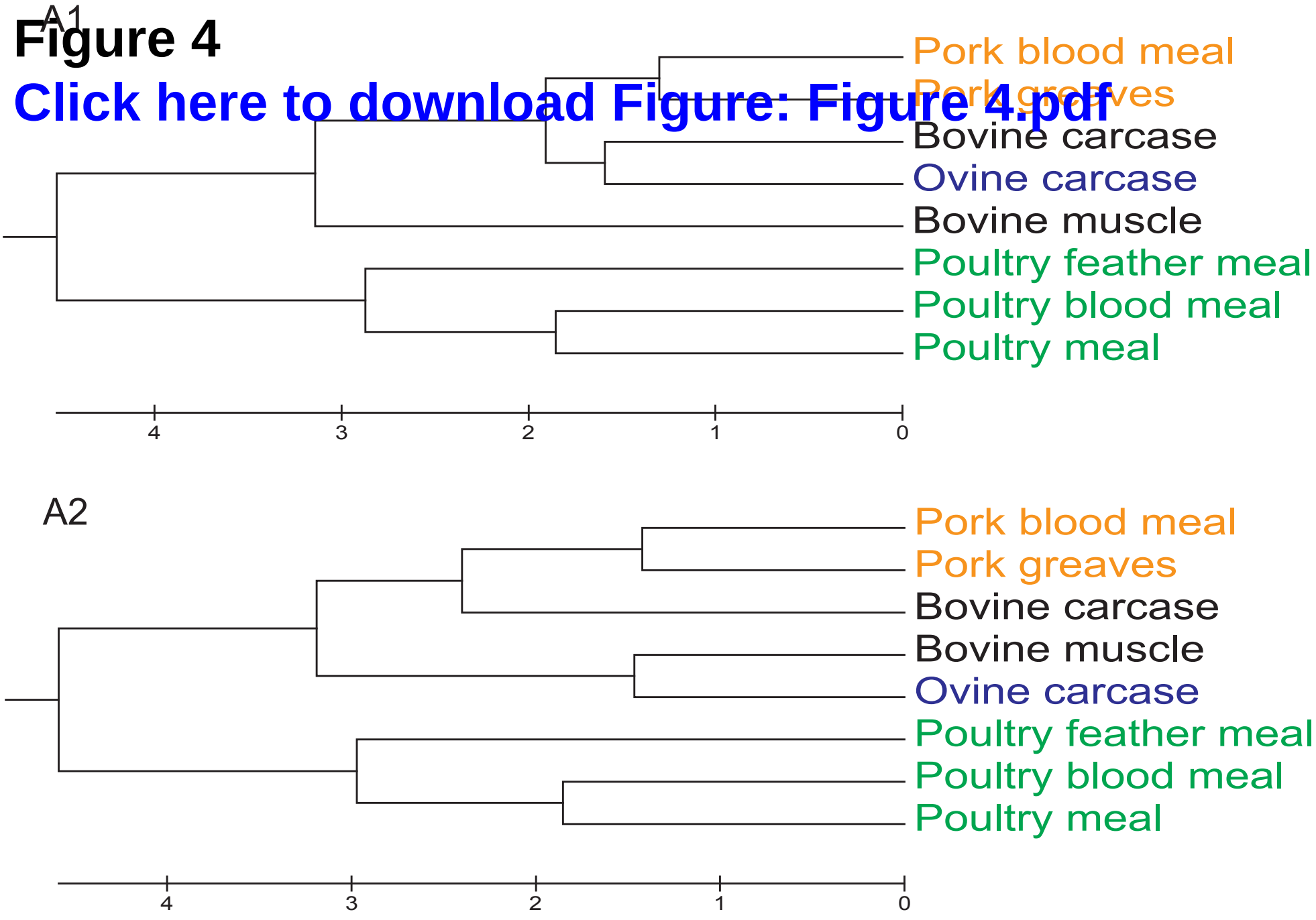


B

- ADFTEISK
- ADFTEISKIVTDLAK
- ADPERNECFLSFK
- AEFVEVTK
- AFLGSFLYEYSR
- AMITFAQYLQR
- APFSEVSK
- APQVSTPTLVEISR
- AVAMITFAQYLQR
- AVDFEHALQSCCK
- CCAAPDHEACFAVEGPK
- CCTESLVNR
- CSYEGLSK
- CVANEDAPECSK
- DAFLGSFLYEYSR
- DAIPENLPPLTADFAEDK
- DAIPENLPPLTADFAEDKDVCK
- DCCEKPIVER
- DLKEETFK
- MPQVPTDLLLETGKK
- NECFLSFK
- PASDVICQEYQDNR
- PLPSIILDEICQVEK
- QLIYLSQK
- QNCELFEK
- QQYFCGILK
- QRPASDVICQEYQDNR
- QSDINTCFGEEGANLIVQSR
- RHPDYSVSLLLR
- RHPEFSIQLIMR
- RHPFLYAPAILSFAVDFEHALQSCCK
- DVFSECCQAADK
- DVVDLAQK
- EEPERNECFLQHK
- EFDEKPADLPSLVEK
- EKPADLPSLVEK
- EKSLHTLFGDELCK
- ESDVGACLDTK
- EYEATLEECCAK
- FGEEGANLIVQSR
- FKDLGEEHFK
- FQPLVDEPK
- FVHDSIGVHK
- GLVLIAFSQHLQ
- GLVLIAFSQHLQQCPYEEHVK
- GYESLLEK
- HPEYAVSVLLR
- HPFLYAPAILSFAVDFEHALQSCCK
- IKDCCEKPIVER
- INTCFGEEGANLIVQSR
- RKPQMTEEQIK
- RPCFTAMGVDTK
- SFEAGHDAFMAEFVYEYSR
- SIHTLFGDK
- SIHTLFGDKLCAIPSLR
- SKPLPSIILDEICQVEK
- TCFGEEGANLIVQSR
- TCVADESAENCDK
- TDNPAECYANAQEQLNQHIK
- TIADGFTAMVDK
- TNCDLLHDHGEADFLK
- KEETFKAVAMITFAQYLQR
- KFQPLVDEPK
- KLCAIPSLR
- KLGLVGSR
- KMPQVPTDLLLETGK
- KMPQVPTDLLLETGKK
- KPQMTEEQIK
- KVPQVSTPTLVEVAR
- KVPQVSTPTLVEVSR
- LCAIPSLR
- LCSAPAEER
- LFTFHADICTLPDTEK
- LKPDPNTLCDEFK
- LSCAEDYLSLVLNR
- LVKDVVDLAQK
- LVNELTEFAK
- LVVSTQTALA
- MMSNLCSQQDVFSGK
- MPQVPTDLLLETGK
- TVLGNFAAFVQK
- VAMITFAQYLQR
- VFLGTFLYEYSR
- VPQVSTPTLVEVAR
- VPQVSTPTLVEVSR
- VSFLGHFIYSVAR
- VSQPDFVQPYQR
- VSQPDFVQPYQRPASDVICQ
- VSTPTLVEVAR
- YNDLKEETFK
- YSVSLLLR
- YVPPPFNPDMFSFDEK

Figure 4

Click here to download Figure: Figure 4.pdf



Références

Aarts, H. J. M., Van Hoef, A. M. A., De Jong, J., Buntjer, J. B. and Lenstra, J. A. (1998). Optimisation and validation of a ruminant-specific PCR test for use in meat-and-bone meal and feedingstuffs containing meat-and-bone meal. *RIKILT-Report* **98**: 505.

Aebersold, R. and Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**(6928): 198-207.

Alomar, D., Gallo, C., Castaneda, M. and Fuchslocher, R. (2003). Chemical and discriminant analysis of bovine meat by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Meat Sci* **63**(4): 441-450.

Ansfield, M. (1994). Production of a sensitive immunoassay for the detection of ruminant proteins in rendered animal material heated to > 130°C. *Food and Agricultural Immunology* **6**: 419-433.

Ansfield, M., Reaney, S. D. and Jackman, R. (2000a). Performance assessment and validation of a sensitive immunoassay for detection of ruminant and porcine heat stable proteins in compound animal feedstuffs. *Food and Agricultural Immunology* **12**: 285-297.

Ansfield, M., Reaney, S. D. and Jackman, R. (2000b). Production of a sensitive immunoassay for detection of ruminant and porcine proteins, heated to > 130°C at 2.7 bar, in compound animal feedstuffs. *Food and Agricultural Immunology* **12**: 273-284.

Ausoni, S., Campione, M., Picard, A., Moretti, P., Vitadello, M., De Nardi, C. and Schiaffino, S. (1994). Structure and regulation of the mouse cardiac troponin I gene. *J Biol Chem* **269**(1): 339-346.

Ayaz, Y., Ayaz, N. D. and Erol, I. (2006). Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Muscle Foods* **17**: 214-220.

Baeten, V., von Holst, C., Garrido, A., Vancutsem, J., Michotte Renier, A. and 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**(1): 149-157.

Balizs, G., Weise, C., Rozycki, C., Opialla, T., Sawada, S., Zagon, J. and Lampen, A. (2011). Determination of osteocalcin in meat and bone meal of bovine and porcine origin using matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry and high-resolution hybrid mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta* **693**(1-2): 89-99.

Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Sci* **86**(3): 577-587.

Barbarini, N. and Magni, P. (2010). Accurate peak list extraction from proteomic mass spectra for identification and profiling studies. *BMC Bioinformatics* **11**: 518.

Bell, M. P., Nwff, T. B., Polarek, J. W. and Seeley, T. W. (2001). Animal Collagen and gelatines World Patent PCT/O34647.

Berg, R. A. and Prockop, D. J. (1973). The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. *Biochemical Biophysical Research Communications* **52**(1): 115-120.

Bodine, P. V. and Komm, B. S. (1999). Evidence that conditionally immortalized human osteoblasts express an osteocalcin receptor. *Bone* **25**(5): 535-543.

Boix, A., Fernandez Pierna, J. A., von Holst, C. and Baeten, V. (2012). Validation of a near infrared microscopy method for the detection of animal products in feedingstuffs: results of a collaborative study. *Food Additives & Contaminants: Part A* **29**(12): 1872-1880.

Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M. and Speed, T. P. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**(2): 185-193.

Références

Booth, S. L., Centi, A., Smith, S. R. and Gundberg, C. (2013). The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator? *Nature Reviews Endocrinology* **9**(1): 43-55.

Bosque, P. J., Ryou, C., Telling, G., Peretz, D., Legname, G., DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B. (2002). Prions in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**(6): 3812-3817.

Bremer, M., Fumière, O., Hekman, W., Marien, A., Kemmers-Vonken, A., Fernandez Pierna, J. A., Vliege, J., Baeten, V., Van Raamsdonk, L. W. and Berben, G. (2012). Combination methods for PAPs detection and species determination of animal particles. Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. J. S. Jørgensen, Baeten, V.**:** 140-149.

Bruins, A. P. (1998). Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A.* **794**: 345-357.

Buckley, M., Collins, M. and Thomas-Oates, J. (2008). A method of isolating the collagen (I) alpha2 chain carboxytelopeptide for species identification in bone fragments. *Anal Biochem* **374**(2): 325-334.

Buckley, M., Collins, M., Thomas-Oates, J. and Wilson, J. C. (2009). Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* **23**(23): 3843-3854.

Buckley, M., Penkman, K. E., Wess, T. J., Reaney, S. and Collins, M. J. (2012). Protein and mineral characterisation of rendered meat and bone meal. *Food Chem* **134**(3): 1267-1278.

Buckley, M., Whitcher Kansa, S., Howard, S., Campbell, S., Thomas-Oates, J. and Collins, M. (2010). Distinguishing between archaeological sheep and goat bones using a single collagen peptide. *Journal of Archaeological Science* **37**: 13-20.

Burkhart, J. M., Schumbrutzki, C., Wortelkamp, S., Sickmann, A. and 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**(4): 1454-1462.

Calvo, M. S., Eyre, D. R. and Gundberg, C. M. (1996). Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* **17**(4): 333-368.

Campagnoli, A., Pinotto, L., Tognon, G., Cheli, F., Baldi, A. and Dell'Orto, V. (2004). Potential application of electronic nose in processed animal proteins (PAP) detection in feeding stuffs. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **8**(4): 253-255.

Chalkley, R. (2010). Instrumentation for LC-MS/MS in proteomics. *Methods Mol Biol* **658**: 47-60.

Cheftel, J. C. and Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Sci* **46**(3): 211-236.

Chen, F. C., Hsieh, Y. H. and Bridgman, R. C. (2002). Monoclonal antibodies against troponin I for the detection of rendered muscle tissues in animal feedstuffs. *Meat Sci* **62**(4): 405-412.

Chen, Y. T., Chen, H. W., Domanski, D., Smith, D. S., Liang, K. H., Wu, C. C., Chen, C. L., Chung, T., Chen, M. C., Chang, Y. S., Parker, C. E., Borchers, C. H. and Yu, J. S. (2012). Multiplexed quantification of 63 proteins in human urine by multiple reaction monitoring-based mass spectrometry for discovery of potential bladder cancer biomarkers. *J Proteomics* **75**(12): 3529-3545.

Chenu, C., Colucci, S., Grano, M., Zigrino, P., Barattolo, R., Zambonin, G., Baldini, N., Vergnaud, P., Delmas, P. D. and Zallone, A. Z. (1994). Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol* **127**(4): 1149-1158.

Références

Chiappini, B., Brambilla, G., Agrimi, U., Vaccari, G., Aarts, H. J., Berben, G., Frezza, D. and 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. *J AOAC Int* **88**(5): 1399-1403.

Colgrave, M. L., Allingham, P. G. and Jones, A. (2008). Hydroxyproline quantification for the estimation of collagen in tissue using multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1212**(1-2): 150-153.

Commission (1994). Commission Decision 94/381/EC of 27 june 1994 concerning certain protection measures with regard to bovine spongiform encephalopathy and the feeding of mammalian derived protein. *Official Journal of the European Communities*. **L172:** 23-24.

Commission (1996). Commission Decision 96/449/EC of 18 july 1996 on the approval of alternative heat treatment systems for processing animal waste with a view to the inactivation of spongiform encephalopathy agents. *Official Journal of the European Communities*. **L184:** 43-46.

Commission (1998). Commission Directive 98/88/EC of 13 November 1998 establishing guidelines for the microscopic identification and estimation of constituents of animal origin for the official control of feedingstuffs *Official Journal of the European Communities*. **L318:** 45-50.

Commission (2003). Commission Directive 2003/126/EC of 23 December 2003 on the analytical method for the determination of constituents of animal origin for the official control of feedingstuffs. *Official Journal of the European Union*. **L 339:** 78-84.

Commission (2005). Communication from the Commission to the European Parliament and the Council. The TSE Road map.

Commission (2007a). Commission Decision of 29 June 2007 establishing the BSE status of Member States or third countries or regions thereof according to their BSE risk. *Official Journal of the European Union*. **L172:** 84-86.

Commission (2007b). Commission Regulation (EC) N° 722/2007 of 25 June 2007 amending Annexes II, V, VI, VIII, IX and XI to Regulation (EC) N° 999/2001 of the European Parliament and of the Council laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Official Journal of the European Union*. **L164:** 7-23.

Commission (2007c). Commission Regulation (EC) N° 1432/2007 of 5 December 2007 amending Annexes I, II and VI to Regulation (EC) N° 1774/2002 of the European Parliament and of the Council as regards the marking and transport of animal by-products. *Official Journal of the European Union*. **L320:** 13-17.

Commission (2008). Commission Regulation (EC) N° 956/2008 of 29 September 2008 amending Annex IV to Regulation (EC) N° 999/2001 of the European Parliament and of the Council laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Official Journal of the European Union*. **L260:** 8-11.

Commission (2009). Commission Regulation (EC) N° 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Official Journal of European Union*. **L54:** 1-130.

Commission (2010). Communication from the Commission to the European Parliament and the Council. The TSE Road map 2, A Strategy paper on Transmissible Spongiform Encephalopathies for 2010-2015.

Commission (2011). Commission Regulation (EU) N° 142/2011 of 25 February 2011 implementing Regulation (EC) N° 1069/2009 of the European Parliament and of the

Council laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and implementing Council Directive 97/78/EC as regards certain samples and items exempt from veterinary checks at the border under that Directive. *Official Journal of the European Union*. **L54:** 1-254.

Commission (2013a). Commission Regulation (EU) N° 51/2013 of 16 January 2013 amending Regulation (EC) N° 152/2009 as regards the methods of analysis for the determination of constituents of animal origin for the official control of feed. *Official Journal of the European Union*. **L20:** 33-43.

Commission (2013b). Commission Regulation (EU) N° 56/2013 of 16 January 2013 amending Annexes I and IV to Regulation (EC) N° 999/2001 of the European Parliament and of the Council laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Official Journal of the European Union*. **L21:** 3-16.

Commission (2015). Commission Implementing Decision (EU) 2015/1356 of 4 August 2015 amending Decision 2007/453/EC as regards the BSE status of Cyprus, the Czech Republic, France, Liechtenstein and Switzerland. *Official Journal of the European Union*. **L209:** 5-8.

Contado, C. (2015). Nanomaterials in consumer products: a challenging analytical problem. *Front Chem* **3**: 48.

Cordeiro, F., Baer, I., Robouch, P., Emteborg, H., Can, S. Z., Krata, A., Zampella, M., Quetel, C. R., Hearn, R. and De la Calle, B. (2013). Setting maximum limits for trace elements in baby food in European legislation: the outcome of International Measurement Evaluation Programme(R)-33. *Food Additives & Contaminants: Part A* **30**(4): 678-686.

Cotter, R. J. (1989). Time-of-flight mass spectrometry: an increasing role in the life sciences. *Biomed Environ Mass Spectrom* **18**(8): 513-532.

D'Alessandro, A. and Zolla, L. (2012). We are what we eat: food safety and proteomics. *J Proteome Res* **11**(1): 26-36.

D'Amato, M., Forte, G. and Caroli, S. (2004). Identification and quantification of major species of arsenic in rice. *J AOAC Int* **87**(1): 238-243.

Dallas, D. C., Guerrero, A., Parker, E. A., Robinson, R. C., Gan, J., German, J. B., Barile, D. and Lebrilla, C. B. (2015). Current peptidomics: applications, purification, identification, quantification, and functional analysis. *Proteomics* **15**(5-6): 1026-1038.

Dardenne, P., Michotte Renier, A. and Baeten, V. (2002). Analysis of feedingstuffs by NIR microscopy (NIRM) and Nir camera detection and quantification of meat and bone meals (MBM). *Lecture in: 11th International Diffuse Reflectance Conference (IDRC), USA.*

De la Haba, M. J., Fernandez Pierna, J. A., Fumière, O., Garrido Varo, A., Guerrero, J., Perez-Marin, D. C., Dardenne, P. and Baeten, V. (2007a). Discrimination of fish bones from other animal bones in the sedimented fraction of compound feeds by near infrared microscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **15**: 81-88.

De la Haba, M. J., Garrido Varo, A., Perez-Marin, D. C. and Guerrero, J. E. (2007b). Near infrared analysis as a first-line screening technique for identifying animal species in rendered animal by-product meals. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **15**(4): 237-245.

De la Haba, M. J., Garrido Varo, A., Perez-Marin, D. C. and Guerrero, J. E. (2009). Near infrared spectroscopy calibrations for quantifying the animal species in processed animal proteins. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **17**(3): 109-118.

Références

Denton, J. H., Coon, C. N., Pettigrew, J. E. and Parsons, C. M. (2005). Historical and scientific perspectives of same species feeding of animal by-products. *The Journal of Applied Poultry Research* **14**: 352-361.

EFSA (2007). Certain aspects related to the feeding of animal proteins to farm animals. Scientific opinion of the panel on biological hazards (Question N° Q-2007-084). *The EFSA Journal* **576**: 1-41.

EFSA (2011). Scientific Opinion on the revision of the quantitative risk assessment (QRA) of the BSE risk posed by processed animal proteins (PAPs). *The EFSA Journal* **9**.

European Commission. (2015a). Food and feed safety: horse meat. Retrieved 05/10/15, from http://ec.europa.eu/food/food/horsemeat/index_en.htm.

European Commission. (2015b). Food and feed safety: TSE/BSE. Retrieved 07/10/15, from http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse_bse/index_en.htm.

Eyre, D. R. and Muir, H. (1975). The distribution of different molecular species of collagen in fibrous, elastic and hyaline cartilages of the pig. *Biochemical Journal* **151**(3): 595-602.

Fernandez Ocana, M., Jarvis, J., Parker, R., Bramley, P. M., Halket, J. M., Patel, R. K. and Neubert, H. (2005). C-terminal sequencing by mass spectrometry: application to gelatine-derived proline-rich peptides. *Proteomics* **5**(5): 1209-1216.

Fernandez Pierna, J. A., Baeten, V., Boix, A., Von Holst, C., Perez-Marin, D. and Garrido Varo, A. (2012). Near infrared microscopy (NIRM). Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. J. S. Jørgensen, Baeten, V., Les presses Universitaires de Namur**:** 82-91.

Fernandez Pierna, J. A., Baeten, V., Michotte Renier, A., Cogdill, R. P. and 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. *Journal of Chemometrics* **18**: 341-349.

Fishbein, L. (1998). Transmissible spongiform encephalopathies, hypotheses and food safety: an overview. *Sci Total Environ* **217**(1-2): 71-82.

Flaudrops, C., Armstrong, N., Raoult, D. and Chabrière, E. (2015). Determination of the animal origin of meat and gelatin by MALDI-TOF-MS. *Journal of Food Composition and Analysis* **41**: 104-112.

Fumière, O., Close, R., Karanam, M. and Berben, G. (2012). DNA based approaches for the species-specific identification of animal material. Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. J. S. Jørgensen, Baeten, V., Les presses Universitaires de Namur**:** 94-102.

Fumière, O., Dubois, M., Baeten, V., von Holst, C. and Berben, G. (2006). Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Anal Bioanal Chem* **385**(6): 1045-1054.

Fumiere, O., Marien, A., Fernandez Pierna, J. A., Baeten, V. and Berben, G. (2010). Development of a real-time PCR protocol for the species origin confirmation of isolated animal particles detected by NIRM. *Food Additives & Contaminants: Part A* **27**(8): 1118-1127.

Fumière, O., Veys, P., Boix, A., von Holst, C., Baeten, V. and Berben, G. (2009). Methods of detection , species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **13**: 59-70.

Garrido-Varo, A. and Fernandez, V. (1998). NIRS technology for the quantitative prediction of the percentage of meat and bone meal added to a feed compound. A feasibility study. Report of the workshop identification of animal ingredients in compound feeds, CEMA-DG VI-SMT Program. J. S. Jorgensen.

Garrido-Varo, A., Perez-Marin, D., Guerrero, J., Gomez-Cabrera, A., De la Haba, M. J., Bautista, J., Soldado, A., Vicente, F., Martinez, A., de la Roza-Delgado, B. and Termes, S. (2005). Near infrared spectroscopy for enforcement of European legislation concerning the use of animal by-products in animal feeds. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **9**(1): 3-9.

Gastinel, L. N. (2012). Principal Component Analysis in the Era of "Omics" Data. Principal Component Analysis - Multidisciplinary Applications. P. Sanguansat, InTech**:** 21-42.

Gavier-Widén, D., Stack, M. J., Baron, T., Balachandran, A. and Simmons, M. (2005). Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **17**: 509-527.

Gelse, K., Poschl, E. and Aigner, T. (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* **55**(12): 1531-1546.

Giles, K., Glidden, D. V., Beckwith, R., Seoanes, R., Peretz, D., DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B. (2008). Resistance of bovine spongiform encephalopathy (BSE) prions to inactivation. *PLoS Pathog* **4**(11): e1000206.

Gillette, M. A. and Carr, S. A. (2013). Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. *Nat Methods* **10**(1): 28-34.

Gizzi, G., Baeten, V., Berben, G., Van Raamsdonk, L. W. and von Holst, C. (2004). Intercomparison study for the determination of processed animal proteins including meat and bone meal in animal feed. *J AOAC Int* **87**(6): 1334-1341.

Gizzi, G., van Raamsdonk, L. W., Baeten, V., Murray, I., Berben, G., Brambilla, G. and von Holst, C. (2003). An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform encephalopathy. *Scientific and Technical Review* **22**(1): 311-331.

Glish, G. L. and Vachet, R. W. (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery* **2**(2): 140-150.

Graves, P. R. and Haystead, T. A. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**(1): 39-63; table of contents.

Greaser, M. L. and Gergely, J. (1973). Purification and properties of the components from troponin. *J Biol Chem* **248**(6): 2125-2133.

Grobben, A. H., Steele, P. J., Somerville, R. A. and Taylor, D. M. (2004). Inactivation of the bovine-spongiform-encephalopathy (BSE) agent by the acid and alkaline processes used in the manufacture of bone gelatine. *Biotechnol Appl Biochem* **39**(Pt 3): 329-338.

Gundry, R. L., White, M. Y., Murray, C. I., Kane, L. A., Fu, Q., Stanley, B. A. and Van Eyk, J. E. (2009). Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Current Protocols in Molecular Biology* **Chapter 10**: Unit10 25.

Han, X., Jin, M., Breuker, K. and McLafferty, F. W. (2006). Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons. *Science* **314**(5796): 109-112.

Hardison, R. C. (1996). A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**(12): 5675-5679.

Hauschka, P. V. and Carr, S. A. (1982). Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. *Biochemistry* **21**(10): 2538-2547.

Hedlin, P., Taschuk, R., Potter, A., Griebel, P. and Napper, S. (2012). Detection and control of prion diseases in food animals. *ISRN Vet Sci* **2012**: 254739.

Hill, R. J., Konigsberg, W., Guidotti, G. and Craig, L. C. (1962). The structure of human hemoglobin. *J Biol Chem* **237**(5): 1549-1554.

Hird, H., Chisholm, J., Sanchez, A., Hernandez, M., Goodier, R., Schneede, K., Boltz, C. and Popping, B. (2006). Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and

implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Additives & Contaminants* **23**(7): 645-650.

Hirsch, J., Hansen, K. C., Burlingame, A. L. and Matthay, M. A. (2004). Proteomics: current techniques and potential applications to lung disease. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**(1): L1-23.

Ho, C. S., Lam, C. W., Chan, M. H., Cheung, R. C., Law, L. K., Lit, L. C., Ng, K. F., Suen, M. W. and Tai, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews* **24**(1): 3-12.

Hsieh, Y. H., Sheu, S. C. and Bridgman, R. C. (1998). Development of a monoclonal antibody specific to cooked mammalian meats. *J Food Prot* **61**(4): 476-481.

Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. and Graham Cooks, R. (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* **40**(4): 430-443.

Hulmes, D. J. (1992). The collagen superfamily--diverse structures and assemblies. *Essays Biochem* **27**: 49-67.

Hulmes, D. J. (2008). Chapter 2: Collagen Diversity, Synthesis and Assembly. Collagen: Structure and Mechanics. P. Fratzl, Springer**:** 15-47.

Huq, N. L., Teh, L. C., Christie, D. L. and Chapman, G. E. (1984). The amino acid sequences of goat, pig and wallaby osteocalcins. *Biochem Int* **8**(4): 521-527.

Imamura, T. (1996). [Human hemoglobin structure and respiratory transport]. *Nihon Rinsho* **54**(9): 2320-2325.

Jain, S., Kaur, H., Pandav, G., Dewan, A. and Saxena, D. (2014). Collagen: Basis of Life. *Universal Research Journal of Dentistry* **4**: 1-9.

Jiang, X., Ye, M., Jiang, X., Liu, G., Feng, S., Cui, L. and Zou, H. (2007). Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis. *J Proteome Res* **6**(6): 2287-2294.

John, H. A., Birnstiel, M. L. and Jones, K. W. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* **223**(5206): 582-587.

Kim, M. S. and Pandey, A. (2012). Electron transfer dissociation mass spectrometry in proteomics. *Proteomics* **12**(4-5): 530-542.

Kim, S. H., Huang, T. S., Seymour, T. A., Wei, C. I., Kempf, S. C., Bridgman, C. R., Clemens, R. A. and An, H. (2004a). Identification of a biomarker for the detection of prohibited meat and bone meal residues in animal feed. *Journal of Food Science* **69**(9): 739-745.

Kim, S. H., Huang, T. S., Seymour, T. A., Wei, C. I., Kempf, S. C., Bridgman, C. R., Clemens, R. A. and An, H. (2004b). Production of monoclonal antibody for the detection of meat and bone meal in animal feed. *J Agric Food Chem* **52**(25): 7580-7585.

Koon, H. E. C., Collins, M. J., Sutton, C. W., Wadsley, M., Welker, F., Kiley, P. J., Elliott, J. A. and Wilson, J. C. (communication personnelle). Novel Proline Hydroxylation Patterns in Mammalian Type I Collagen Revealed by Extensive MS/MS Mapping.

Kreuz, G., Zagon, J., Broll, H., Bernhardt, C., Linke, B. and Lampen, A. (2012). Immunological detection of osteocalcin in meat and bone meal: a novel heat stable marker for the investigation of illegal feed adulteration. *Food Additives & Contaminants: Part A* **29**(5): 716-726.

Lahiff, S., Glennon, M., O'Brien, L., Lyng, J., Smith, T., Maher, M. and Shilton, N. (2001). Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meta and bone meal (MBM). *Mol Cell Probes* **15**(1): 27-35.

Lahrichi, S. L., Affolter, M., Zolezzi, I. S. and Panchaud, A. (2013). Food peptidomics: large scale analysis of small bioactive peptides--a pilot study. *J Proteomics* **88**: 83-91.

Lecrenier, M. C., Ledoux, Q., Berben, G., Fumiere, O., Saegerman, C., Baeten, V. and Veys, P. (2014). Determination of the ruminant origin of bone particles using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Sci Rep* **4**: 5730.

Leitinger, B. (2011). Transmembrane collagen receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**: 265-290.

Lin, D., Tabb, D. L. and Yates, J. R., 3rd (2003). Large-scale protein identification using mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* **1646**(1-2): 1-10.

Ling, X. B., Lau, K., Deshpande, C., Park, J. L., Milojevic, D., Macaubas, C., Xiao, C., Lopez-Avila, V., Kanegaye, J., Burns, J. C., Cohen, H., Schilling, J. and Mellins, E. D. (2010). Urine Peptidomic and Targeted Plasma Protein Analyses in the Diagnosis and Monitoring of Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *Clin Proteomics* **6**(4): 175-193.

Liu, X., Han, L., Veys, P., Baeten, V., Jiang, X. and Dardenne, P. (2011). An overview of the legislation and light microscopy for detection of processed animal proteins in feeds. *Microsc Res Tech* **74**(8): 735-743.

Lopez-Ferrer, D., Capelo, J. L. and Vazquez, J. (2005). Ultra fast trypsin digestion of proteins by high intensity focused ultrasound. *J Proteome Res* **4**(5): 1569-1574.

Mamone, G., Picariello, G., Caira, S., Addeo, F. and Ferranti, P. (2009). Analysis of food proteins and peptides by mass spectrometry-based techniques. *Journal of Chromatography A* **1216**(43): 7130-7142.

Marcos, B. and Mullen, A. M. (2014). High pressure induced changes in beef muscle proteome: correlation with quality parameters. *Meat Sci* **97**(1): 11-20.

Marengo-Rowe, A. J. (2006). Structure-function relations of human hemoglobins. *Baylor University Medical Center Proceedings* **19**(3): 239-245.

Margry, R. and de Jong, J. (2012). Feed chain: Processed animal proteins and their use in animal feed. Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. J. S. Jørgensen, Baeten, V., Les presses Universitaires de Namur**:** 9-16.

Mariod, A. A. and Adam, H. F. (2013). Review: Gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria* **12**(2): 135-147.

Marshall, A. G., Hendrickson, C. L. and Jackson, G. S. (1998). Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom Rev* **17**(1): 1-35.

Massart, D. L. and Vander Heyden, Y. (2004). From tables to visuals: Principal Component Analysis, Part 1. *LC-GC Europe* **17**(11): 586-591.

McLafferty, F. W., Breuker, K., Jin, M., Han, X., Infusini, G., Jiang, H., Kong, X. and Begley, T. P. (2007). Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomics. *FEBS J* **274**(24): 6256-6268.

McNulty, T., Calkins, A., Ostrom, P., Gandhi, H., Gottfried, M., Martin, L. and Gage, D. (2002). Stable Isotope Values of Bone Organic Matter: Artificial Diagenesis Experiments and Paleoecology of Natural Trap Cave, Wyoming. *Palaios* **17**: 36-49.

Méchin, V., Damerval, C. and Zivy, M. (2007). Total protein extraction with TCA-acetone. *Methods Mol Biol* **355**: 1-8.

Medzihradszky, K. F., Campbell, J. M., Baldwin, M. A., Falick, A. M., Juhasz, P., Vestal, M. L. and Burlingame, A. L. (2000). The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem* **72**(3): 552-558.

Meeker, D. L. and Hamilton, C. R. (2006). An overview of the rendering industry, National Renderers Association.

Meltretter, J., Wust, J. and Pischetsrieder, M. (2013). Comprehensive analysis of nonenzymatic post-translational beta-lactoglobulin modifications in processed milk by

ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **61**(28): 6971-6981.

Molto, G., Samar, M. M., Resnik, S., Martinez, E. J. and Pacin, A. (2000). Occurrence of trichothecenes in Argentinean beer: a preliminary exposure assessment. *Food Addit Contam* **17**(9): 809-813.

Montowska, M., Alexander, M. R., Tucker, G. A. and Barrett, D. A. (2014a). Rapid detection of peptide markers for authentication purposes in raw and cooked meat using ambient liquid extraction surface analysis mass spectrometry. *Anal Chem* **86**(20): 10257-10265.

Montowska, M., Alexander, M. R., Tucker, G. A. and Barrett, D. A. (2015). Authentication of processed meat products by peptidomic analysis using rapid ambient mass spectrometry. *Food Chem* **187**: 297-304.

Montowska, M. and Pospiech, E. (2013). Species-specific expression of various proteins in meat tissue: proteomic analysis of raw and cooked meat and meat products made from beef, pork and selected poultry species. *Food Chem* **136**(3-4): 1461-1469.

Montowska, M., Rao, W., Alexander, M. R., Tucker, G. A. and Barrett, D. A. (2014b). Tryptic digestion coupled with ambient desorption electrospray ionization and liquid extraction surface analysis mass spectrometry enabling identification of skeletal muscle proteins in mixtures and distinguishing between beef, pork, horse, chicken, and turkey meat. *Anal Chem* **86**(9): 4479-4487.

Moreno-Gonzalez, I. and Soto, C. (2011). Misfolded protein aggregates: Mechanisms, structures and potential for disease transmission. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22**: 482-487.

Morris, H. R., Paxton, T., Dell, A., Langhorne, J., Berg, M., Bordoli, R. S., Hoyes, J. and Bateman, R. H. (1996). High sensitivity collisionally-activated decomposition tandem mass spectrometry on a novel quadrupole/orthogonal-acceleration time-of-flight mass spectrometer. *Rapid communications in mass spectrometry* **10**(8): 889-896.

Murray, I., Aucott, L. S. and Pike, I. H. (2001). Use of discriminant analysis on visible and near infrared reflectance spectra to detect adulteration of fishmeal with meat and bone meal. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **9**(5): 297-311.

Nanni, P., Levander, F., Roda, G., Caponi, A., James, P. and Roda, A. (2009). A label-free nano-liquid chromatography-mass spectrometry approach for quantitative serum peptidomics in Crohn's disease patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**(27): 3127-3136.

Nielsen-Marsh, C. M., Richards, M. P., Hauschka, P. V., Thomas-Oates, J. E., Trinkaus, E., Pettitt, P. B., Karavanic, I., Poinar, H. and Collins, M. J. (2005). Osteocalcin protein sequences of Neanderthals and modern primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**(12): 4409-4413.

Nishimoto, S. K., Waite, J. H., Nishimoto, M. and Kriwacki, R. W. (2003). Structure, activity, and distribution of fish osteocalcin. *J Biol Chem* **278**(14): 11843-11848.

O'Mahony, P. J. (2013). Finding horse meat in beef products--a global problem. *QJM* **106**(6): 595-597.

Ocaña, M. F., Neubert, H., Przyborowska, A., Parker, R., Bramley, P., Halket, J. and Patel, R. (2004). BSE Control: Detection of gelatine-derived peptides in animal feed by mass spectrometry. *The Analyst* **129**: 111-115.

Ouvry-Patat, S. A., Torres, M. P., Gelfand, C. A., Quek, H. H., Easterling, M., Speir, J. P. and Borchers, C. H. (2009). Top-down proteomics on a high-field Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Methods Mol Biol* **492**: 215-231.

Pardue, M. L. and Gall, J. G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **64**(2): 600-604.

Parliament, E. and Council (2001). Regulation (EC) N° 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Official Journal of the European Communities*. **L147:** 1-40.

Parliament, E. and Council (2002a). Regulation (EC) N° 1774/2002 of the European Parliament and of the Council of 3 October 2002 laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities* **L273:** 1-95.

Parliament, E. and Council (2002b). Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of the European Communities*. **L31**.

Parliament, E. and Council (2006). Regulation (EC) N° 1923/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 amending Regulation (EC) No 999/2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. *Official Journal of the European Union*. **L404:** 1-8.

Parliament, E. and Council (2009). Regulation (CE) N°1069/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and repealing Regulation (EC) N° 1774/2002 (Animal by-products Regulation). *Official Journal of European Union*. **L300:** 1-33.

Perez-Marin, D., Garrido Varo, A., de la Haba, J. and Guerrero, J. (2012). Near infrared spectroscopy (NIRS). Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. J. S. Jørgensen, Baeten, V., Les presses Universitaires de Namur**:** 126-138.

Periasamy, V. S., Athinarayanan, J., Al-Hadi, A. M., Juhaimi, F. A., Mahmoud, M. H. and Alshatwi, A. A. (2015). Identification of titanium dioxide nanoparticles in food products: induce intracellular oxidative stress mediated by TNF and CYP1A genes in human lung fibroblast cells. *Environ Toxicol Pharmacol* **39**(1): 176-186.

Perry, S. V., Cole, H. A., Head, J. F. and Wilson, F. J. (1973). Localization and Mode of Action of the Inhibitory Protein Component of the Troponin Complex. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantative Biology* **37**: 251-262.

Piras, C., Roncada, P., Rodrigues, P. M., Bonizzi, L. and Soggiu, A. (2015). Proteomics in food: quality, safety, microbes and allergens. *J Proteomics*.

Piraux, F. and Dardenne, P. (1999). Feed authentication by near infrared microscopy. Proceedings of the 9th international conference on near infrared microscopy. A. M. C. Davies and R. Giangiacomo.

Plouvier, B. M., Baeten, V., Maudoux, J. P., Vanopdenbosch, E., Berkvens, D., Degand, G. and Saegerman, C. (2012). Detection of processed animal protein: European experience and perspectives. *Rev Sci Tech* **31**(3): 1011-1031.

Podwojski, K., Fritsch, A., Chamrad, D. C., Paul, W., Sitek, B., Stuhler, K., Mutzel, P., Stephan, C., Meyer, H. E., Urfer, W., Ickstadt, K. and Rahnenfuhrer, J. (2009). Retention time alignment algorithms for LC/MS data must consider non-linear shifts. *Bioinformatics* **25**(6): 758-764.

Prado, M., Berben, G., Fumiere, O., van Duijn, G., Mensinga-Kruize, J., Reaney, S., Boix, A. and von Holst, C. (2007). Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real-time polymerase chain reaction: result of an interlaboratory study. *J Agric Food Chem* **55**(18): 7495-7501.

Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**(23): 13363-13383.

Rasinger, J. D., Carroll, T. S., Lundebye, A. K. and Hogstrand, C. (2014). Cross-omics gene and protein expression profiling in juvenile female mice highlights disruption of calcium and zinc signalling in the brain following dietary exposure to CB-153, BDE-47, HBCD or TCDD. *Toxicology* **321**: 1-12.

Reaney, S. and Bremer, M. (2012). Immunological appraoches for processed animal protein detection in animal feeds. Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. J. S. Jørgensen, Baeten, V., Les presses Universitaires de Namur**:** 104-112.

Reaney, S. and Jørgensen, J. S. (2012). BSE-PAP: the story of a feed safety issue. Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. J. S. Jørgensen, Baeten, V., Les presses Universitaires de Namur**:** 17-21.

Reece, P., Chassaigne, H., Collins, M., Buckley, M., Bremer, M. and Grundy, H. (2012). Proteomic analysis of meat and bone meal and animal feed. Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. J. S. Jørgensen, Baeten, V., Les presses Universitaires de Namur**:** 113-124.

Rial-Otero, R., Carreira, R. J., Cordeiro, F. M., Moro, A. J., Santos, H. M., Vale, G., Moura, I. and 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. *Journal of Chromatography A* **1166**(1-2): 101-107.

Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(1): a004978.

Ringner, M. (2008). What is principal component analysis? *Nat Biotechnol* **26**(3): 303-304.

Sakakibara, S., Inouye, K., Shudo, K., Kishida, Y., Kobayashi, Y. and Prockop, D. J. (1973). Synthesis of (Pro-Hyp-Gly) n of defined molecular weights. Evidence for the stabilization of collagen triple helix by hydroxypyroline. *Biochimica Biophysica Acta* **303**(1): 198-202.

Sano, S., Tagami, S., Hashimoto, Y., Yoshizawa-Kumagaye, K., Tsunemi, M., Okochi, M. and Tomonaga, T. (2014). Absolute quantitation of low abundance plasma APL1beta peptides at sub-fmol/mL Level by SRM/MRM without immunoaffinity enrichment. *J Proteome Res* **13**(2): 1012-1020.

Schonherr, J. (2002). Analysis of products of animal origin in feeds by determination of carnosine and related dipeptides by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* **50**(7): 1945-1950.

Schreuder, B. E., Geertsma, R. E., van Keulen, L. J., van Asten, J. A., Enthoven, P., Oberthur, R. C., de Koeijer, A. A. and Osterhaus, A. D. (1998). Studies on the efficacy of hyperbaric rendering procedures in inactivating bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents. *Vet Rec* **142**(18): 474-480.

Scigelova, M., Hornshaw, M., Giannakopulos, A. and Makarov, A. (2011). Fourier transform mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* **10**(7): M111 009431.

Seddon, A. M., Curnow, P. and Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta* **1666**(1-2): 105-117.

Sentandreu, M. A., Fraser, P. D., Halket, J., Patel, R. and Bramley, P. M. (2010). A proteomic-based approach for detection of chicken in meat mixes. *J Proteome Res* **9**(7): 3374-3383.

Sentandreu, M. A. and Sentandreu, E. (2011). Peptide biomarkers as a way to determine meat authenticity. *Meat Sci* **89**(3): 280-285.

Shave, R., Baggish, A., George, K., Wood, M., Scharhag, J., Whyte, G., Gaze, D. and Thompson, P. D. (2010). Exercise-induced cardiac troponin elevation: evidence, mechanisms, and implications. *J Am Coll Cardiol* **56**(3): 169-176.

Shoulders, M. D. and Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem* **78**: 929-958.

Smith, P. G. (2003). The epidemics of bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: current status and future prospects. *Bull World Health Organ* **81**(2): 123-130.

Smith, P. G. and Bradley, R. (2003). Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and its epidemiology. *Br Med Bull* **66**: 185-198.

Song, E. and Mechref, Y. (2013). LC-MS/MS identification of the O-glycosylation and hydroxylation of amino acid residues of collagen alpha-1 (II) chain from bovine cartilage. *J Proteome Res* **12**(8): 3599-3609.

Switzar, L., Giera, M. and Niessen, W. M. (2013). Protein digestion: an overview of the available techniques and recent developments. *J Proteome Res* **12**(3): 1067-1077.

Syska, H., Wilkinson, J. M., Grand, R. J. and Perry, S. V. (1976). The relationship between biological activity and primary structure of troponin I from white skeletal muscle of the rabbit. *Biochemical Journal* **153**(2): 375-387.

Tajima, K., Enishi, O., Amari, M., Mitsumori, M., Kajikawa, H., Kurihara, M., Yanai, S., Matsui, H., Yasue, H., Mitsuhashi, T., Kawashima, T. and Matsumoto, M. (2002). PCR detection of DNAs of animal origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**(10): 2247-2250.

Tamura, M., Uyama, A. and Mochizuki, N. (2011). Development of a multi-mycotoxin analysis in beer-based drinks by a modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical Sciences* **27**(6): 629-635.

Tartaglia, M., Saulle, E., Pestalozza, S., Morelli, L., Antonucci, G. and Battaglia, P. A. (1998). Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials. *J Food Prot* **61**(5): 513-518.

Taylor, A. J., Linforth, R., Weir, O., Hutton, T. and Green, B. (1993). Potential of electrospray mass spectrometry for meat pigment identification. *Meat Sci* **33**(1): 75-83.

Taylor, D. M. and Woodgate, S. L. (2003). Rendering practices and inactivation of transmissible spongiform encephalopathy agents. *Scientific and Technical Review* **22**(1): 297-310.

Tena, N., Pierna, J. A. F., Boix, A., Baeten, V. and Von Holst, C. (2014). Differentiation of meat and bone meal from fishmeal by near-infrared spectroscopy: Extension of scope to defatted samples. *Food control* **43**: 155-162.

Thiede, B., Hohenwarter, W., Krah, A., Mattow, J., Schmid, M., Schmidt, F. and Jungblut, P. R. (2005). Peptide mass fingerprinting. *Methods* **35**(3): 237-247.

Ulrich, M. M., Perizonius, W. R., Spoor, C. F., Sandberg, P. and Vermeer, C. (1987). Extraction of osteocalcin from fossil bones and teeth. *Biochem Biophys Res Commun* **149**(2): 712-719.

Urist, M. R. and Strates, B. S. (2009). The classic: Bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res* **467**(12): 3051-3062.

Van Raamsdonk, L. W., Pinotti, L., Veys, P., Campagnoli, A., Paltanin, C., Belincho Crespo, C. and Jørgensen, J. (2012). Markers for microscopic detection. Detection,

identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. J. S. Jørgensen, Baeten, V., Les presses Universitaires de Namur**:** 60-69.

van Raamsdonk, L. W. D. (2005). Microscopic detection of animal by-products in feed. *EUR 21124 Strategies and methods to detect and quantify mammalian tissues in feedingstuffs.* **156**.

van Raamsdonk, L. W. D., von Holst, C. B., V., Berben, G., Boix, A. and de Jong, J. (2007). New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feeds. *Animal Feed Science and Technology* **133**: 63-83.

Vermeulen, P., Von Holst, C., Boix, A. and Baeten, V. (2012). Processed animal proteins in feed: legislative aspects and analytical consequences. Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. J. S. Jørgensen, Baeten, V., Les presses Universitaires de Namur**:** 24-34.

Veys, P. and Baeten, V. (2007). CRL-AP Interlaboratory study 2006 final report. *CRA-W, http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/resources/ interlaboratory2006_en.pdf.*

Veys, P. and Baeten, V. (2010). New approach for the quantification of processed animal proteins in feed using light microscopy. *Food Additives & Contaminants: Part A* **27**(7): 926-934.

Veys, P., Vancutsem, J. and Jørgensen, J. S. (2012). Quantification of PAPs in feed by light microscopy: challenge or illusion? Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. J. S. Jørgensen, Baeten, V., Les presses Universitaires de Namur**:** 72-80.

Vitagliano, L., Berisio, R., Mazzarella, L. and Zagari, A. (2001). Structural bases of collagen stabilization induced by proline hydroxylation. *Biopolymers* **58**(5): 459-464.

Volkin, D. B. and Klibanov, A. M. (1987). Thermal destruction processes in proteins involving cystine residues. *J Biol Chem* **262**(7): 2945-2950.

von Bargen, C., Brockmeyer, J. and Humpf, H. U. (2014). Meat authentication: a new HPLC-MS/MS based method for the fast and sensitive detection of horse and pork in highly processed food. *J Agric Food Chem* **62**(39): 9428-9435.

von Bargen, C., Dojahn, J., Waidelich, D., Humpf, H. U. and 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**(49): 11986-11994.

von Holst, C., Boix, A., Baeten, V., Vancutsem, J. and Berben, G. (2006). Determination of processed animal proteins in feed: The performance characteristics of classical microscopy and immunoassay methods. *Food Addit Contam* **23**(3): 252-264.

von Holst, C., Boix, A., Bellorini, S., Serano, F., Androni, S., Verkuylen, B. and Margry, R. (2009). Use of glyceroltriheptanoate as marker for processed animal by-products: development and validation of an analytical method. *Food Additives & Contaminants: Part A* **26**(4): 466-474.

Vuorio, E. and de Crombrugghe, B. (1990). The family of collagen genes. *Annual Reviews of Biochemistry* **59**: 837-872.

Wang, R. F., Myers, M. J., Campbell, W., Cao, W. W., Paine, D. and Cerniglia, C. E. (2000). A rapid method for PCR detection of bovine materials in animal feedstuffs. *Mol Cell Probes* **14**(1): 1-5.

Warrick, H. M. and Spudich, J. A. (1987). Myosin structure and function in cell motility. *Annu Rev Cell Biol* **3**: 379-421.

Wilkinson, J. M. and Grand, R. J. (1978). Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles. *Nature* **271**(5640): 31-35.

Woodgate, S. and van der Veen, J. (2004). The role of fat processing and rendering in the European Union animal production industry. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **8**(4): 283-294.

Wu, S. L., Huhmer, A. F., Hao, Z. and 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**(11): 4230-4244.

Wulff, T., Nielsen, M. E., Deelder, A. M., Jessen, F. and Palmblad, M. (2013). Authentication of fish products by large-scale comparison of tandem mass spectra. *J Proteome Res* **12**(11): 5253-5259.

Yang, Z., Han, L., Fernandez Pierna, J. A., Dardenne, P. and Baeten, V. (2011). The potential of near infrared microscopy to detect, identify and quantify processed animal by-products. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **19**: 211-231.

Yang, Z., Han, L., Li, Q. and Fan, X. (2007). Use of discriminant analysis on NIRS to detect meat and bone meal content in ruminant concentrates. *Journal of Animal and Feed Sciences* **16**(2): 442-447.

Yang, Z., Han, L., Liu, X. and Li, Q. (2008). Detecting and quantifying meat meal or meat and bone meal contamination in fishmeal by visible and near infrared reflectance spectra. *Animal Feed Science and Technology* **147**(4): 357-367.

Yong-feng, C., Zhen, Y., Bao-hua, Z., Lu-wei, X. and Pei-jian, T. (2011). Application of trichloroacetic acid-acetone precipitation method for protein extraction in bone tissue. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* **33**(2): 210-213.

Zhang, G., Liu, T., Wang, Q., Chen, L., Lei, J., Luo, J., Ma, G. and Su, Z. (2009). Mass spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin : A new method to differentiate between bovine and porcine gelatin. *Food Hydrocolloids* **23**: 2001-2007.

Zvereva, E. A., Kovalev, L. I., Ivanov, A. V., Kovaleva, M. A., Zherdev, A. V., Shishkin, S. S., Lisitsyn, A. B., Chernukha, I. M. and Dzantiev, B. B. (2015). Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products. *Meat Sci* **105**: 46-52.

Webographie

1. U.S. Food and Drug Administration, consulté le 09 octobre 2015
http://www.fda.gov/animalveterinary/resourcesforyou/animalhealthliteracy/ucm136222.htm

2. Organisation Mondiale de la Santé, consulté le 09 octobre 2015
http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs180/fr/

3. Consulté le 09 octobre 2015
http://ffiproject.wordpress.com/ffi/

4. Organisation mondiale de la santé animale, consulté le 24 février 2016
http://www.oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/donnees-specifiques-sur-lesb/

5. Consulté le 1 décembre 2015
chemwiki.ucdavis.edu/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_With_a_Biological_Emphasis/Chapter_04%3A_Structure_Determination_I/Section_4.4%3A_Mass_Spectrometry

6. Consulté le 11 décembre 2015
http://www.hindawi.com/journals/ijac/2012/282574/fig6/

7. University of Bristol, consulté le 30 octobre 2015
http://www.chm.bris.ac.uk/ms/maldi-ionisation.xhtml

8. Consulté le 30 octobre 2015
http://www.chemicool.com/definition/quadrupole_mass_spectrometry.html

9. Chemical & engineering news, consulté le 30 octobre 2015
http://cen.acs.org/articles/86/i37/Ion-Mobility-Mass-Spec-Combo.html

10. Consulté le 30 octobre 2015
http://www.technobio.fr/article-la-spectrometrie-de-masse-51092779.html

11. Biologie intégrative, consulté le 11 décembre 2015
http://www.ifr83.idf.inserm.fr/fr/lesplateformestechniques/spectrometriedemasseetproteomique/equipement/spectrometrie_de_masse_et_proteomique_orbitrap.html

12. Consulté le 30 octobre 2015
http://people.whitman.edu/~dunnivfm/C_MS_Ebook/CH5/5_5_6.html

13. Consulté le 14 décembre 2015
http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/9ModulGenFoncVeg/6Proteomique/1Proteomiq.htm

Webographie

14. Matrix Science, consulté le 29 février 2016
http://www.matrixscience.com/

15. « Applications biologiques de la spectrométrie de masse » par Matias Moller, consulté le 14 décembre 2015
http://images.slideplayer.es/2/1034774/slides/slide_28.jpg

16. Consulté le 15 décembre 2015
chromatographyonline.com/quantitation-and-confirmation-pesticide-malathion-fruit-samples-using-multiple-reactionmonitoring-an

17. Consulté le 15 décembre 2015
http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch07s06.html

18. Consulté le 16 novembre 2015
http://www.voyagesaucoeurdelascience.fr/la-couleur-du-sang/

19. Consulté le 29 décembre 2015
https://www.uky.edu/Ag/Horsemap/abthgp.html

20. Consulté le 29 décembre 2015
http://ec.europa.eu/food/food/horsemeat/