



Gembloux Agro-Bio Tech
Université de Liège

CONCEPTION ET ÉVALUATION DE MÉTHODES DE DÉTECTION D'INSECTES DANS LES MATRICES ALIMENTAIRES

AMAURY GÉRARD

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2015 - 2016

PROMOTEUR: PR. FRÉDÉRIC FRANCIS

Toute reproduction du présent document par quelque procédé que ce soit ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique¹ de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur.

¹ Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par le promoteur membre du personnel enseignant de Gembloux Agro-Bio Tech



Gembloux Agro-Bio Tech
Université de Liège

CONCEPTION ET ÉVALUATION DE MÉTHODES DE DÉTECTION D'INSECTES DANS LES MATRICES ALIMENTAIRES

AMAURY GÉRARD

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2015 - 2016

PROMOTEUR: PR. FRÉDÉRIC FRANCIS

Remerciements

Je vais commencer par remercier Frédéric Debode. C'est lui en effet qui, après m'avoir supervisé durant mon stage de première année de master et au cours d'un job d'été en 2015, m'a proposé ce sujet de travail de fin d'études. Je lui suis reconnaissant pour la patience dont il a fait preuve à mon égard ainsi que pour la façon dont il m'a accompagné au cours de ces sept mois de travail, de même que pour la relecture et la correction du document final.

Je remercie aussi le professeur Frédéric Francis pour avoir accepté le rôle de promoteur de ce mémoire, pour les insectes fournis, permettant la bonne réalisation de ces recherches, et pour avoir pris en charge le volet relatif à l'analyse protéique, ainsi que pour la relecture du travail.

De même, je souhaite remercier Mrs Pierre Dardenne, chef du département Valorisation des productions, et Gilbert Berben, chef de l'unité Authentification et traçabilité, tous deux du CRA-W, qui m'ont laissé effectuer ce mémoire dans leur bâtiment.

Un grand merci également au personnel de l'U16, Céline Aerts, Julien Maljean, Eric Janssen et Olivier Fumière pour leurs conseils précieux et l'aide fournie au cours de ces recherches, avec une attention toute particulière pour Gaëlle Antoine, Cécile Ancion et Denis Roulez, les techniciens qui ont partagé leur bureau avec moi et avec qui j'ai passé la majeure partie de mon temps au cours de ce stage, mais aussi pour Aline Marien qui m'a aidé lorsque les essais effectués ne fournissaient pas les résultats escomptés ainsi que pour la rédaction du document écrit. Mes remerciements s'adressent également à Marie-Caroline Lecrenier, qui m'a accompagné dans le volet protéique de mes recherches.

Je tiens aussi à remercier mon collègue étudiant Grégoire Vanwijnsberghe, qui réalisait son mémoire en même temps que moi dans cette unité pour tous les bons moments passés ensemble de même que pour l'aide mutuelle que l'on a pu s'apporter.

Il convient de remercier ma petite amie Mathilde Van De Velde ainsi que ma famille, pour le soutien fourni au cours du mémoire ainsi que pour leur contribution à la relecture du texte.

Enfin, il m'est impossible de parler de fin d'études sans adresser de remerciements à tous mes amis qui m'ont permis de passer cinq années exceptionnelles à Gembloux Agro-Bio Tech.

Abstract

Worldwide, a lot of people eat insects for milleniums. Insects could also be an alternative source of proteins to feed breeding animals, but also as food substitute for humans; current agricultural and breeding systems being indeed unable to face population growth. As a consequence, a lot of companies have already started the production of insects, at diverse scales. Most of business models are based on the black soldier fly (*Hermetia illucens*) and the mealworm (*Tenebrio molitor*). In Europe, these novel foods are not yet fully allowed. Before an authorization in our regions, some points have to be checked concerning consumers' safety. AFSCA tolerates 10 species of insects in Belgium, but opinions vary according to European countries (AFSCA, 2016). To allow an introduction of this food on the European marlet, it's important to develop methods in order to detect and authenticate these insect-based ingredients. Regulation (CE) No 51/2013 has recognised the polymerase chain reaction as a reference method to detect animal-derived ingredients in feedingstuffs.

In this work, several targets were evaluated *in silico* and by real-time PCR. So, 12 targets have been designed, classified into 4 categories: global targets detecting a wide variety of species (18s-INS, Duplex 1 and Duplex 2), targets specific to Diptera (1 α -DIPT and 18s-DIPT) and targets specific to *T. molitor* (TM-WING, TM-COI, Cadherin-Genesig and Cadherin-CRAW) and *H. illucens* (COI-HERM, HI-MITO and HI-MITO2).

For the first category, 3 targets were designed, based on the gene of 18s RNA. In a first time, 18s-INS was evaluated, able to recognise all insects except Diptera. The determination of the limit of detection confirmed the multicopy nature of the 18s RNA gene. In order to detect more species, it was decided to simultaneously use 2 probes: the first one specific to Diptera, and the other one able to recognise all other insects. These targets were named Duplex 1 and Duplex 2. Their specificity was assessed with at least 50 species of insects and 10 insect-bases commercial products. However, aspecificities were observed with some plants like wheat or tomato. Optimisation was unsuccessfully tried.

Two targets for Diptera were also tested, based on 18s RNA gene and elongation factor 1 α gene, but none of them gave interesting results.

Concerning *T. molitor*, targeted genes were cytochrome C oxydase subunit I, *wingless* and the gene of cadherin, for which 2 PCR targets were evaluated. Cadherin-CRAW and TM-WING have shown a perfect specificity to *T. molitor*. For these 2 targets, the limit of detection was assessed to be lower than 20 copies.

Finally, in the case of *H. illucens*, cytochrome C oxydase subunits I and III genes were targeted. However, only the target HI-MITO2 showed an interesting potential, 2 aspecificities having to be eliminated.

Résumé

De par le monde, de nombreux peuples se nourrissent d'insectes depuis plusieurs millénaires. Les insectes pourraient aussi être une source alternative de protéines pour nourrir les animaux d'élevage, mais également constituer un aliment de substitution pour l'être humain; le système agricole et d'élevage actuel ne permettant pas de répondre aux besoins engendrés par la croissance démographique attendue. Ainsi, de nombreuses entreprises se sont déjà lancées dans la production d'insectes à des échelles très diverses. La plupart des plans d'affaires pour la production de farines d'insectes pour l'alimentation des animaux se basent sur la mouche soldat noire (*Hermetia illucens*) ou le ver de farine (*Tenebrio molitor*). En Europe, ces nouveaux aliments ne sont pas encore autorisés. Avant une autorisation dans nos régions, de nombreuses questions doivent en effet être clarifiées concernant la sécurité du consommateur. L'AFSCA tolère 10 espèces en Belgique, mais les opinions varient en fonction des pays européens (AFSCA, 2016). Pour permettre une introduction de ces aliments sur le marché européens, il importe de développer des méthodes permettant la détection et l'authentification de ces ingrédients à base d'insectes. La réglementation n°51/2013 de la Commission Européenne a reconnu la réaction de polymérisation en chaîne comme méthode de référence, à côté de la microscopie classique, pour déterminer la présence de constituants d'origine animale dans les aliments pour animaux.

Dans ce travail, différentes cibles ont été évaluées par bio-informatique et par PCR en temps réel. Ainsi, un total de 12 cibles ont été conçues, réparties en 4 grandes catégories : les cibles globales permettant de reconnaître une grande diversité d'espèces (18s-INS, Duplex 1 et Duplex 2), les cibles spécifiques à l'ordre des Diptères (18s-DIPT et 1 α -DIPT) et les cibles capables de reconnaître spécifiquement *T. molitor* (TM-COI, TM-WING, Cadherin-Genesig et Cadherin-CRAW) ou *H. illucens* (COI-HERM, HI-MITO et HI-MITO2).

Pour la première catégorie de cibles censées reconnaître une grande diversité d'insectes, les 3 systèmes conçus se basent sur le gène codant pour l'ARN 18s. Dans un premier temps, la cible 18s-INS a été évaluée, reconnaissant l'ensemble des insectes à l'exception des Diptères. L'étude de la limite de détection de cette cible confirme le caractère multi-copies du gène codant pour l'ARN 18s. Dans le but d'élargir le panel d'insectes reconnus, il a été envisagé d'utiliser simultanément 2 sondes : l'une reconnaissant les Diptères, et l'autre le reste des insectes. Cette expérience correspond aux systèmes Duplex 1 et 2. Leur spécificité a été évaluée avec succès sur une cinquantaine d'espèces d'insectes et sur dix produits commerciaux à base d'insectes. Cependant, des aspécificités ont été remarquées avec certains végétaux tels que le froment ou la tomate. Des tentatives d'optimisation ont été menées, mais sans succès jusqu'à aujourd'hui.

Ensuite, deux systèmes spécifiques à l'ordre des Diptères ont également été testés, basés sur l'ARN 18s et le facteur d'élongation 1 α , mais aucune de ces cibles n'a fourni de résultat d'intérêt.

Pour les cibles spécifiques à *T. molitor*, les gènes visés sont la sous-unité I du cytochrome C oxydase, le gène *wingless* et le gène codant pour la cadhérine, pour lequel deux systèmes PCR ont été évalués. Les cibles Cadherin-CRAW et TM-WING se sont montrés totalement spécifiques à *T. molitor*. La limite de détection de ces dernières a été évaluée comme étant inférieure ou égale à 20 copies.

Enfin, dans le cas de *H. illucens*, les sous-unités I et III du cytochrome C oxydase ont été ciblées. Cependant, seule la cible HI-MITO2 a montré un potentiel intéressant, 2 aspécificités restant à éliminer.

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I: Lieu de stage	4
Chapitre II: Etat de l'art	7
1. Les insectes dans le monde	8
2. Les insectes et l'homme	8
3. Le concept de l'entomophagie	10
3.1. L'entomophagie dans les pays en voie de développement.....	10
3.2. L'entomophagie dans les pays industrialisés	10
4. Pourquoi consommer des insectes ?.....	12
5. Quels sont les freins à la consommation d'insectes ?.....	14
6. Législation.....	16
7. Les études moléculaires sur les insectes.....	18
8. La PCR en temps réel.....	20
Chapitre III: Objectifs de l'étude	24
Chapitre IV: Matériel et méthodes	26
1. Précautions à prendre au cours des manipulations	27
2. Echantillons.....	27
3. Broyage des échantillons.....	33
3.1. Broyage des insectes entiers.....	33
3.2. Broyage des farines d'insectes	33
4. Pesée des échantillons	33
5. Extraction de l'ADN	34
6. Extraction protéique	35
7. Estimation de la qualité des ADN extraits	37
8. Sélection des amorces et sondes pour PCR en temps réel.....	38
8.1. Recherche de séquences cibles.....	38
8.2. Autres oligomères	41
9. Tests par PCR en temps réel	42
10. Détermination de la spécificité des cibles	44
11. Optimisation des concentrations en amorces et en sonde	44
12. Détermination de la sensibilité des cibles	44
13. Analyse protéique par spectrométrie de masse	46

Chapitre V: Résultats et discussion	48
1. Recherche d'amorces et de sondes TaqMan pour PCR en temps réel	49
1.1. Résultats observés pour les analyses bio-informatiques sur les différents gènes candidats....	49
1.2. Synthèse des différentes amorces et sondes utilisées testées	51
2. Spécificité des cibles	53
2.1. Cible spécifique à la classe Insecta excepté les Diptères	53
2.2. Cibles spécifiques à l'ordre des Diptères	56
2.3. Cibles spécifiques à <i>T. molitor</i>	58
2.4. Cibles spécifiques à <i>H. illucens</i>	63
3. Détermination des limites de détection	66
4. Extraction protéique	67
Chapitre VI: Conclusions et perspectives	68
Index bibliographique	72
Annexes.....	84
Annexe 1: Insectes rencontrés dans l'alimentation humaine (en Belgique) ou dans l'alimentation animale et illustrations de leurs applications.....	85
Annexe 2: Photos des espèces reçues de Gembloux Agro-Bio Tech et dont l'ADN a été extrait	90
Annexe 3: Protocole d'extraction de l'ADN par la méthode au CTAB.....	91
Préparation des tampons, solutions et mélanges requis	91
Extraction de l'ADN	91
Annexe 4: Protocole d'extraction et de purification des protéines.....	93
Préparation des solutions.....	93
Extraction des protéines au TCA/Acétone	93
Dosage des protéines par Pierce.....	94
Purification des extraits protéiques avec le kit 2-D Clean-Up	94
Annexe 5: Liste des espèces utilisées pour les alignements.....	96
Annexe 6: Protocole des reconstitution des différents réactifs composant le kit Primer Design spécifique à <i>Tenebrio molitor</i>	102
Annexe 7 : Arbre phylogénétique réalisé pour le gène wingless	103
Annexe 8: Arbre phylogénétique obtenu pour le gène codant pour l'ARN 18s.....	104
Annexe 9: Arbre phylogénétique obtenu pour le gène codant pour le facteur d'élongation 1 α	105
Annexe 10: Données brutes relatives à l'extraction protéique au TCA/Acétone et au dosage des extraits par le teste de Pierce	106

Table des figures

Figure 1 - Démarche globale suivie au cours du mémoire.....	3
Figure 2 - Ogramme du CRA-W.....	5
Figure 3 - Ligne du temps présentant les principales étapes de l'histoire des insectes	8
Figure 4 - Elevage de vers à soie au Vietnam	9
Figure 5 - Rouge carmin.....	11
Figure 6 - Logo de l'IPIFF.....	11
Figure 7 - Principe de la PCR classique.....	20
Figure 8 - Migration sur gel d'agarose des amplicons.....	21
Figure 9 - Principe de la PCR en temps réel au SYBR Green	21
Figure 10 - Mécanisme de la PCR en temps réel avec hydrolyse de sonde	22
Figure 11 - Courbes d'amplification par PCR en temps réel.....	22
Figure 12 - Plaque multi-puits. La première colonne correspond à la calibration.	36
Figure 13 - Exemple d'arbre phylogénétique pouvant être obtenu à l'aide de l'outil informatique Clustal Omega.....	39
Figure 14 - Alignements représentant les deux optiques d'analyse envisagées.....	40
Figure 15 - Représentation schématique de l'ionisation par électrospray	46
Figure 16 - Schéma d'une trappe ionique.....	47

Table des tableaux

Tableau 1- Liste des insectes autorisés en Belgique	17
Tableau 2 - Liste des insectes reçus de l'unité d'entomologie fonctionnelle et évolutive de Gembloux Agro-Bio Tech.....	29
Tableau 3 - Liste des ADN d'insectes issus de la banque du CRA-W	30
Tableau 4 - Liste des aliments processés pour alimentation humaine.....	31
Tableau 5 - Liste des farines d'insectes analysées.....	31
Tableau 6 - Liste des espèces animales et végétales utilisées pour les tests de spécificité	32
Tableau 7 - Liste et rôle des différents réactifs impliqués dans l'extraction au CTAB	34
Tableau 8 - Liste des échantillons pour extraction protéique.....	35
Tableau 9 - Volume des réactifs entrant en jeu dans la PCR en temps réel avec sonde Taqman	42
Tableau 10 - Volume des réactifs entrant en jeu dans la PCR effectuée avec le kit Primer Design proposé pour <i>T. molitor</i>	43
Tableau 11 - Volume des différents réactifs requis pour composer le master mix lors de l'estimation des LOD	45
Tableau 12 - C-valeur pour les différentes espèces utilisées au cours de ce travail de fin d'étude.....	45
Tableau 13 - Méthode et appareillage utilisés pour l'analyse protéomique par LC-MS/MS	47
Tableau 14 - Ensemble des oligomères de PCR conçus par voie bio-informatique et utilisés pour les essais PCR, accompagnés de leur nombres respectifs de nucléotides, leur température d'hybridation et leur pourcentage en guanine et cytosine selon le logiciel Primer Express	52
Tableau 15 - Evaluation des cibles basées sur l'ARN 18s, effectuée avec 3 répétitions par échantillon.....	54
Tableau 16 - Evaluation des cibles basées sur l'ARN 18s sur des échantillons issus de l'industrie.....	56
Tableau 17 - Evaluation des cibles 18s-DIPT et 1 α -DIPT visant les individus de l'ordre des Diptères	57
Tableau 18 - Evaluation des cibles spécifiques aux Diptères sur les échantillons issus de l'industrie...58	58
Tableau 19 - Evaluation des cibles spécifiques au ver de farine <i>T. molitor</i>	60
Tableau 20 - Evaluation de la spécificité des cibles spécifiques à <i>T. molitor</i> sur des échantillons issus de l'industrie	62
Tableau 21- Evaluation des cibles COI-HERM, HI-MITO et HI-MITO2 spécifiques à <i>Hermetia illucens</i>	64
Tableau 22 - Evaluation de la spécificité des cibles visant <i>H. illucens</i> sur des échantillons industriels	65
Tableau 23 – LOD ₆ déterminées pour les cibles TM-WING et Cadherin-TM sur l'échantillon CRL 2049.....	66
Tableau 24 - Quantités de protéines extraites des différents échantillons d'insecte par la méthode au TCA/Acétone et pourcentage totale en protéine des échantillons.....	67

Tables des abréviations, sigles et symboles

Table 1 - Table des abréviations

Abréviation	Désignation complète
%G-C	Pourcentage en guanine et cytosine
A	Adénine
A230	Absorbance à 230 nanomètres
A260	Absorbance à 260 nanomètres
A280	Absorbance à 280 nanomètres
ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique
AFNOR	Association Française de Normalisation
AFSCA	Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN	Acide ribonucléique
C	Cytosine
CEN	Comité Européen de Normalisation
CO ₂	Dioxyde de carbone
COI	Cytochrome C Oxydase subunit I
CRA-W	Centre Wallon de Recherches Agronomiques
CRL	Commission Reference Laboratory
CRM	Matériel certifié de référence
CTAB	Bromure de cetyltriméthylammonium
C _{xx}	Chaîne d'acide gras composée de xx atomes de carbone
dNTP	Désoxyribonucléotides
DLA	DIGE labelling buffer
DTT	Dithiothréitol
E120	Acide carminique
EC	Commission Européenne
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique
ESI	Ionisation par électrospray
et al	et alii (et les autres)
EURL-AP	European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feedingstuffs Laboratoire de référence de l'Union Européenne pour les protéines animales dans l'alimentation du bétail
FAM	6-carboxy-fluorescéine
G	Guanine
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IPIFF	International Platform of Insect for Food and Feed
ISO	Organisation Internationale de Normalisation
LC	Chromatographie liquide
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LOD	Limit of detection
MGB	Minor Groove Binder
MS	Spectrométrie de masse

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTC	No Template Control
OGM	Organisme Génétiquement Modifié
OIP	Organisme d'intérêt public
PA<t	Protéines animales transformées
PCR	Polymerase Chain Reaction
PUFA	Acide gras polyinsaturé
sp.	Espèce
SPF	Service Public Fédéral
T	Thymine
TAMRA	6-carboxy-tetraméthyl-rhodamine
Taq polymérase	Polymérase de <i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Acide trichloroacétique
TFE	Travail de fin d'études
T_m	Température de fusion
U16	Unité 16 (Authentification et traçabilité)
UE	Union Européenne
UFC	Unité Formant Colonie
UFC/g	Unités formant colonies par gramme
UV	Ultra-violet

Table 2 - Table des symboles et conventions

Symboles et conventions	
%	Pourcent
&	Et
€	Euro
°C	Degré Celsius
µl	Microlitre
µM	Micromolaire
g	Gramme
h	Heure
ha	Hectare
kcal	Kilocalories
kg	Kilogramme
M	Molaire ou moles par litre
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimolaire
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
pg	Picogramme
S	Svedberg
t/min	Tour par minute

Introduction

Face à la croissance démographique attendue au cours des prochaines décennies, il importe de trouver des alternatives durables aux systèmes agricoles et d'élevage actuels. Les insectes représentent une alternative communément proposée à cette fin. De part le monde, de nombreux peuples se nourrissent depuis plusieurs millénaires d'insectes prélevés dans la nature, voire même élevés. Ainsi, on répertorie environ 2000 espèces d'insectes comestibles connues. L'Europe constitue une exception notoire, cette pratique, nommée entomophagie y étant très peu répandue, en grande partie liée à un dégoût de la population vis-à-vis des insectes. Pourtant, d'autres arthropodes font partie de l'alimentation des Européens, tels les fruits de mer. Néanmoins, dans le but de faire changer les mentalités et de valoriser certains sous-produits de l'agriculture, différents produits à base d'insectes commencent à poindre dans les rayons de nos grandes surfaces. En Belgique, 10 espèces sont ainsi tolérées par l'AFSCA. A l'heure actuelle, il est également question de développer des farines à base d'insectes pour l'alimentation animale, contenant principalement la mouche *Hermetia illucens* ou le ver de farine *Tenebrio molitor*. Cependant, ce type de produit n'est pour le moment pas autorisé par les instances européennes. En effet, de nombreuses incertitudes persistent quant à la consommation d'insectes, par exemple du point de vue du risque microbiologique. En outre, il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode permettant la détection rapide des insectes dans les matrices alimentaires.

Ce travail de fin d'étude a été réalisé dans le but de répondre à cette problématique. Effectué dans un laboratoire du CRA-W spécialisé dans la traçabilité et l'authentification, le mémoire a visé à explorer deux voies de détection des insectes, c'est-à-dire l'analyse de l'ADN ou des protéines contenus dans différents échantillons. Le présent document a pour but de décrire la méthodologie suivie au cours de ces recherches, de même que le fruit de ces dernières. Il commencera par une brève présentation du lieu de stage. Cette dernière sera suivie par un état de l'art présentant les insectes et leurs effets bénéfiques ou néfastes pour la société actuelle, ainsi que l'état actuel de leur consommation dans les pays en voie de développement et les régions industrialisées. La législation relative aux insectes dans l'alimentation sera ensuite présentée. Cette partie sera suivie par un bref compte-rendu des études moléculaires réalisées à ce jour sur les insectes, de même que par une des méthodes de référence, la PCR, pour authentifier des constituants d'origine animale dans des aliments pour animaux selon la réglementation EC 51/2013.

A la suite de ces recherches bibliographiques, la méthodologie et le matériel utilisés vont être décrits (Figure 1). Deux grands axes ont été étudiés : le génome et le protéome. Dans les deux cas, le travail comprenait des analyses *in silico* (cases vertes sur le diagramme) de même que des manipulations de laboratoires (cases bleues). Au niveau du génome, différentes cibles pour analyse par PCR ont été conçues, afin de parvenir à détecter spécifiquement les deux espèces mentionnées ci-dessus, ainsi que des systèmes plus larges permettant de reconnaître une plus grande diversité d'individus. Dans le cas de la protéomique, l'ensemble des protéines de différents échantillons de farines fournis par l'industrie a été extrait et analysé par LC-MS/MS, avant analyse bio-informatique dans le but de trouver des protéines conservées chez les insectes.

Ensuite, les résultats de ces différentes expérimentations vont être présentés et discutés. Pour terminer, une conclusion dressera le bilan global de ce travail de recherche et proposera quelques perspectives.

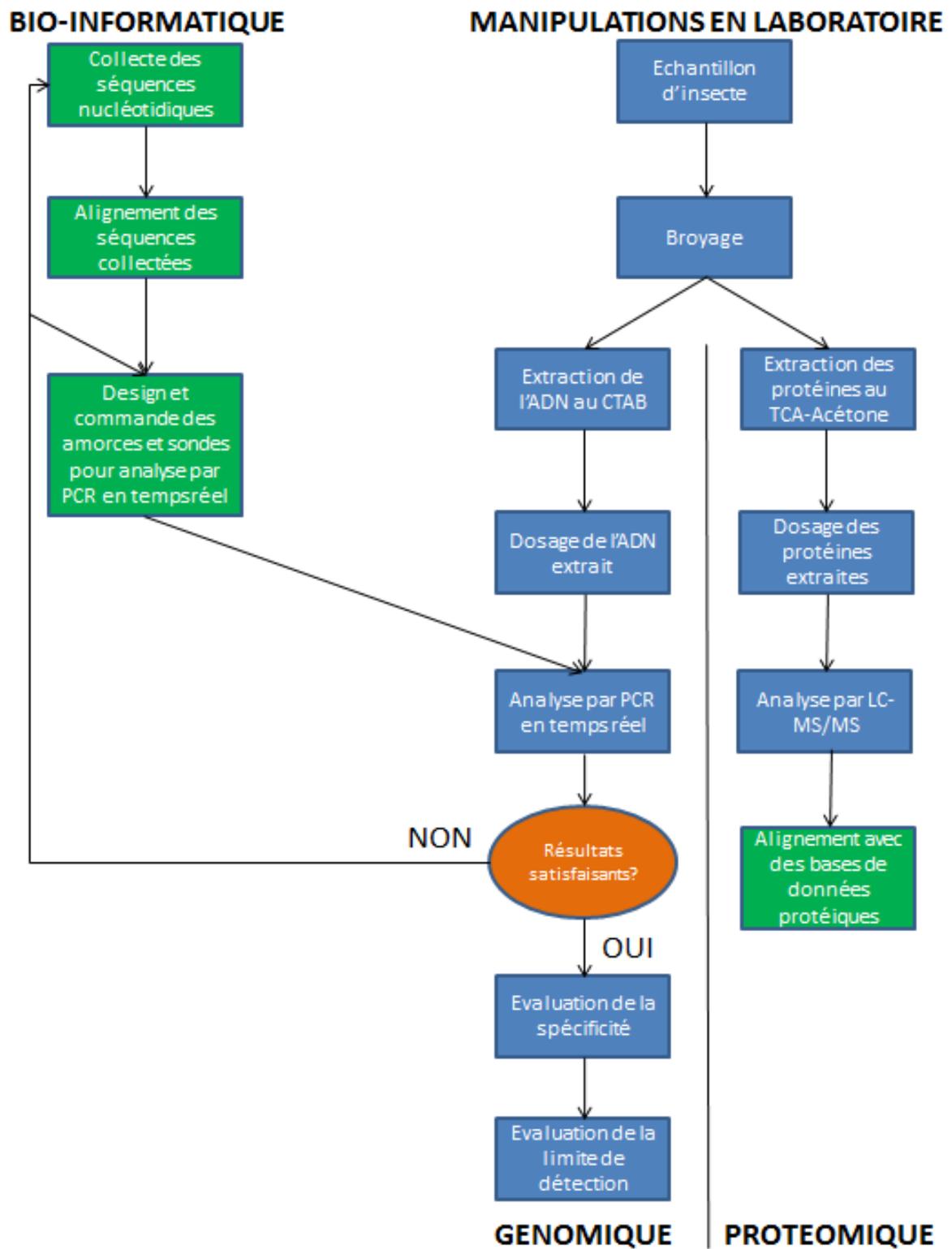


Figure 1 - Démarche globale suivie au cours du mémoire

Lieu de stage

Le Centre Wallon de Recherches Agronomiques, plus communément désigné par l'acronyme CRA-W, est un organisme d'intérêt public (OIP). Sa régionalisation date de 2002. Fondé en 1872, il est implanté dans trois communes distinctes : Gembloux, Libramont et Mussy-la-Ville. Au total, le centre s'étend sur pas moins de 300 ha de terres cultivables, de serres et de laboratoires. Il emploie 450 personnes.

La mission du CRA-W, telle que décrite sur son site internet, est de « conserver et amplifier l'excellence scientifique et l'utilité sociétale qui le légitiment en tant qu'acteur privilégié du développement durable du secteur agro-alimentaire dans sa dimension économique » (CRA-W, 2012). A cette fin, ses champs de compétences sont aussi multiples que variés, des partenariats étant entretenus avec de nombreux acteurs de la société actuelle, tels que des entreprises, des agriculteurs, des instituts de recherche, l'AFSCA ou même des particuliers. Le CRA-W se divise en quatre départements, comportant chacun 4 unités de recherches (Figure 2).

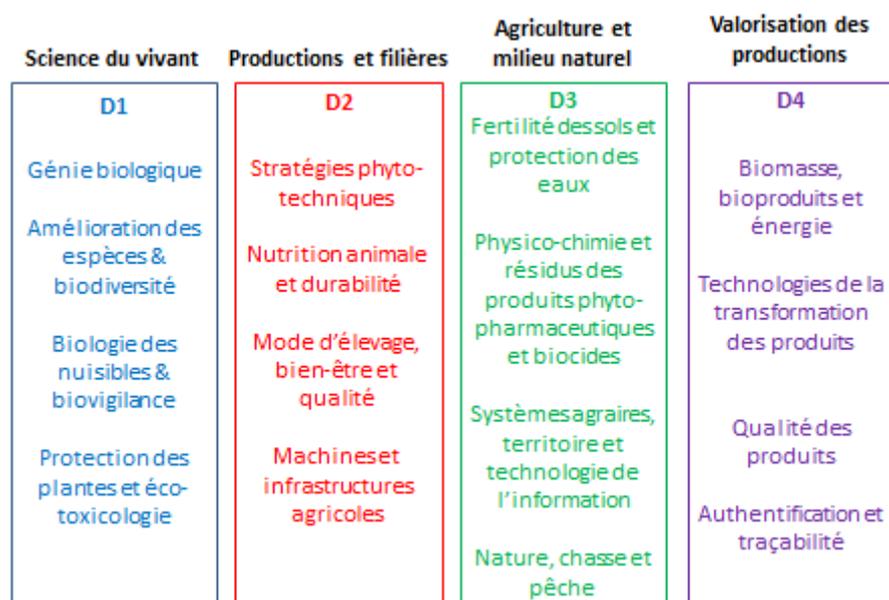


Figure 2 - Organigramme du CRA-W

L'unité au sein de laquelle a été effectué ce travail de fin d'étude est intitulée « Authentification et traçabilité » ou « Unité 16 (U16) » et fait partie du département « Valorisation des productions ». L'objectif premier de cette unité de recherche est le développement de méthodes de biologie moléculaire dans le but d'authentifier des productions agricoles, ainsi que l'accroissement des connaissances liées à la microbiologie du lait. En outre, l'unité exerce également une activité de routine relative à la détermination de la présence d'OGM dans diverses matrices destinées à l'alimentation animale ou humaine. Pour cette application, le laboratoire dispose d'une accréditation ISO 17025. En outre, l'unité 16, avec l'unité 15 (Qualité des produits), constituent le laboratoire de référence de l'Union Européenne pour les protéines animales dans les aliments pour bétail (EURL-AP) par le biais du règlement (UE) n°208/2011. Cette activité consiste entre-autres à détecter et identifier la présence de protéines animales interdites dans les aliments, et ce dans le but d'éviter la transmission de maladies telles que les encéphalopathies spongiformes.

Il paraît opportun de présenter ici le personnel employé par l'U16, les interactions avec ses différents membres ayant été essentielles au bon déroulement de ce travail de fin d'études. Ainsi, l'unité est dirigée par Gilbert Berben, en tant qu'inspecteur général scientifique. Le personnel de

recherche se compose de Frédéric Debode et Eric Janssen, qui se focalisent essentiellement sur la problématique des plantes transgéniques, Olivier Fumière et Aline Marien, travaillant sur les farines animales, et enfin Véronique Ninane, dont les activités ont trait à la microbiologie. Néanmoins, toutes ces activités ne pourraient être menées à bien sans la présence des différents techniciens, à savoir Gaëlle Antoine, Cécile Ancion, Céline Aerts, Denis Roulez et Julien Maljean.

Etat de l'art

1. Les insectes dans le monde

Le terme « Insecta » désigne une classe d'animaux appartenant à l'embranchement des arthropodes (Arthropoda) et peuplant notre planète depuis plus de 400 millions d'années (Figure 3 ; Zhang & Hewitt, 1997). Selon les estimations actuelles, il existerait sur Terre entre 5 et 10 millions d'espèces d'insectes, dont seulement 1,5 millions ont déjà été décrites et étudiées (Chapman, 2009). Ainsi, ils représenteraient à eux seuls près de 90% de toutes les espèces animales.

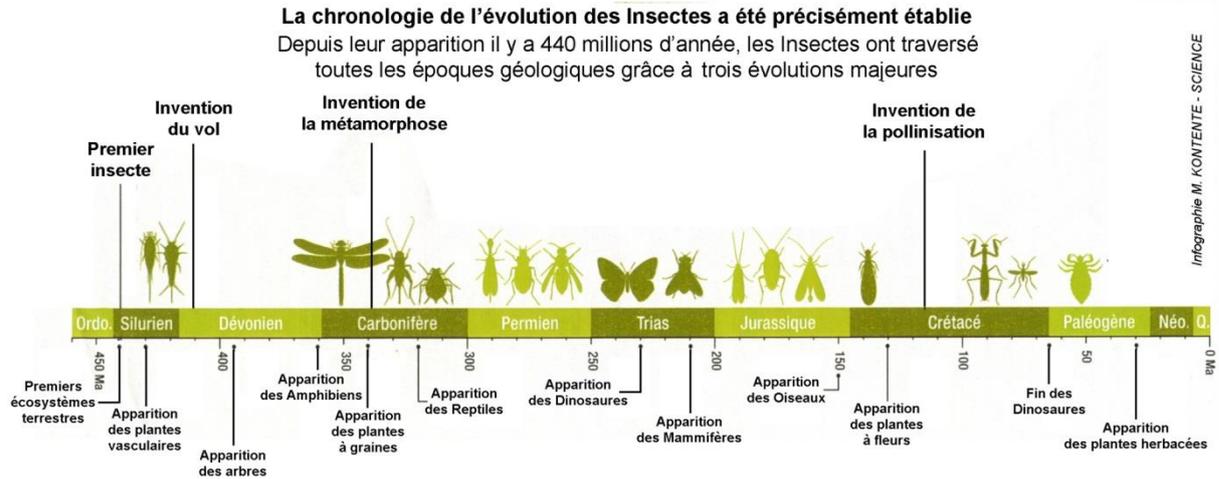


Figure 3 - Ligne du temps présentant les principales étapes de l'histoire des insectes (Delfino, 2016)

D'un point de vue taxonomique, les individus de la classe Insecta sont répartis dans deux sous-classes : les aptérygotes, relativement primitifs et dépourvus d'ailes, et les ptérygotes, plus évolués et ailés. Parmi ces derniers, on retrouve une bonne vingtaine d'ordres. Ainsi, on peut par exemple citer les Hyménoptères comme les abeilles, les Diptères comme les mouches ou les Coléoptères comme les coccinelles (NCBI Taxonomy, 2016).

2. Les insectes et l'homme

Les insectes sont connus pour exercer de nombreux rôles dans le monde actuel, aussi bien positifs que négatifs. En ce qui concerne les rôles néfastes des insectes, la première idée qui vient à l'esprit est bien sûr les dégâts occasionnés aux cultures. Ainsi, de nombreuses espèces sont impliquées dans des problèmes aux champs, comme le doryphore *Leptinotarsa decemlineata* Say 1824 (Coleoptera : Chrysomelidae) sur la pomme de terre ou les criquets migrateurs *Locusta migratoria* Linnaeus 1758 (Orthoptera : Acrididae ; Bellmann, 2010). Les dégradations des matières premières peuvent également se produire au cours du stockage, en témoignent les problèmes de conservation de la farine à cause de *T. molitor* (Chinery, 1988). De plus, certains insectes, à l'instar des termites, peuvent également causer des dégâts au niveau des habitations de par leur capacité de digestion du bois. Il convient également de mentionner les nuisances occasionnées par les Hyménoptères tels que les frelons (*Vespa* sp.) ou les guêpes (*Vespula* sp.) de par leur piqûre ou l'installation de leurs nids dans des endroits peu opportuns du point de vue de l'homme. Cependant, un des fléaux majeurs lié aux insectes est la transmission de maladies à l'homme et aux animaux. Ainsi, il est évident que les individus de l'espèce *Anopheles moucheti* Evans 1925 (Diptera : Culicidae), sont des vecteurs du protozoaire responsable de la malaria, *Plasmodium* sp. (Njan Nloga et al., 1993).

Un autre exemple notable est la transmission de diverses maladies par les moustiques, comme la dengue, le chikungunya ou le virus zika (Gatherer et Kohl, 2015). Les insectes peuvent également s'avérer vecteurs de bactéries pathogènes pour l'homme et les animaux, telle que *Campylobacter jejuni* Veron & Chatelain 1973 (Campylobacterales, Campylobacteraceae ; Jones et al., 1931), et *Salmonella* sp., transportés par exemple par *Alphitobius diaperinus* Panzer 1797 (Coleoptera : Tenebrionidae) et transmises aux poulets destinés à notre consommation (Hazeleger et al, 2008).

Plus positivement, certaines espèces sont exploitées par les êtres humains depuis de nombreuses années, tel que le ver à soie *Bombyx mori* Linnaeus 1758 (Lepidoptera : Bombycidae), qui est élevé depuis près de 5000 ans en Chine afin de produire cette fibre textile (Figure 4).



Figure 4 - Elevage de vers à soie au Vietnam (Delfino, 2016)

Un autre exemple bien connu d'élevage d'insectes concerne les abeilles pour la production de miel (Rumpold & Schlüter, 2012). Parallèlement à cela, certains insectes sont également extrêmement utiles pour les agriculteurs ou les horticulteurs. Ainsi, les coccinelles sont réputées pour leur aptitude à se nourrir de pucerons et donc à épargner les plantes vis-à-vis de ce fléau, ce qui explique leur utilisation en lutte intégrée (Cook et al., 2006). En outre, l'activité de certains insectes butineurs comme les abeilles ou les bourdons est primordiale pour la fécondation et le développement d'une grande majorité d'espèces végétales. Ils jouent également un rôle de décomposeurs de la matière organique dans et sur le sol. D'autre part, certains insectes pourraient contenir des substances d'intérêt pharmaceutique, tels que des lipides polyinsaturés à bas point de fusion (Ekpo et al., 2009), des peptides antimicrobiens (Kamysz & Turecka, 2005 ; Duclohier, 2010), de la chitine et du chitosan qui peuvent jouer un rôle pré-biotique (Mlcek et al., 2014) ou encore de l'insuline comme celle produite par le ver à soie et déjà utilisée pour la fabrication d'un vaccin conjugué avec la toxine tétanique (Gong et al., 2005). Enfin, les insectes font également partie intégrante de l'alimentation de certains êtres humains depuis plusieurs millénaires, cet aspect se trouvant traité en détail ultérieurement dans ce document.

3. Le concept de l'entomophagie

L'entomophagie désigne le fait, pour des êtres humains, de consommer des insectes ou des aliments à base d'insectes. Bien entendu des différences d'attitudes bien marquées vis-à-vis de ce concept sont observées entre les diverses régions du monde. L'objectif de cette partie du travail est de présenter ces divergences.

3.1. L'entomophagie dans les pays en voie de développement

Etant donné que la consommation d'insectes par les êtres humains est ancestrale, on observe de par le monde un grand nombre de peuples adeptes de l'entomophagie (van Huis, 2013). Ainsi, on mentionne par exemple que des insectes sont consommés en Chine depuis plus de 3000 ans, pays où près de 180 espèces font communément partie de l'alimentation, parmi lesquelles on retrouve en grande majorité des membres des ordres des Coléoptères, des Hyménoptères et des Lépidoptères (Agbidye et al., 2009 ; Chen et al., 2009 ; Van Huis, 2003). Bien entendu, ces pratiques sont également très fréquentes dans de nombreux autres pays asiatiques, mais aussi dans la plupart des pays africains et sud-américains. Au total, on dénombre dans le monde 113 pays où l'entomophagie est pratiquée traditionnellement, et près de 2000 espèces comestibles (Rumpold et Schlüter, 2012). Les insectes sont en effet essentiels pour certaines communautés vivant de la subsistance. Bien entendu, dans ces pays, les insectes consommés ne sont pas issus d'élevages mais bel et bien prélevés dans la nature, principalement en forêt, directement dans leur habitat naturel. Ils sont alors ingérés ou vendus sur des marchés locaux. Ainsi, dans les pays en voie de développement, l'entomophagie est fortement ancrée dans les mœurs. Les insectes les plus consommés dans le monde seraient les sauterelles, les termites, les larves d'Hyménoptères (guêpes, fourmis) ou de Coléoptères (Curculionidae et Cerambycidae) ainsi que les punaises d'eau (Chung, 2010 ; ANSES, 2015).

3.2. L'entomophagie dans les pays industrialisés

Dans les pays industrialisés, le constat est tout autre. En effet, l'habitude qu'avaient les premiers hommes de consommer des insectes semble avoir été oubliée (MacEvilly, 2000 ; Van Itterbeek & Van Huis, 2010). Ainsi, la majorité des humains du monde occidental présente une forte aversion vis-à-vis des insectes. Il leur apparaît donc impossible de les consommer. Pourtant, ces personnes consomment parfois d'autres organismes appartenant à l'embranchement des Arthropodes, tels que les crustacés, voire même des produits contenant des ingrédients dérivés d'insectes, tel que le rouge cochenille (E120), un colorant alimentaire rouge également nommé carmin, produit à partir de *Dactylopius coccus* Costa 1829 (Hemiptera : Dactylopiidae ; Borges, 2012 ; Figure 5). Cet additif peut par exemple être retrouvé dans les confiseries ou les yaourts. Selon Fenster (2011), le processus d'obtention du E120 est le suivant : « Les femelles repérées sont récupérées une à une. Un colorant rudimentaire est obtenu à partir des insectes pulvérisés. Pour l'obtention d'un colorant plus pur, les insectes séchés sont immergés dans l'eau bouillante, laquelle est rendue basique par l'ajout d'ammoniaque ou de carbonate de sodium. La solution est ensuite traitée avec des sels d'aluminium, ce qui produit le colorant. »



Figure 5 - Rouge carmin (sehestedter-naturfarben.de, consulté le 12 août 2016)

Au vu de ces observations, il ressort que, si la population des pays industrialisés est réticente vis à vis de la consommation d'insectes entiers, le constat est fort différent pour les insectes processés. Ainsi, en Europe, on voit poindre une quantité croissante de produits contenant de l'insecte en tant qu'ingrédient (Rumpold & Schlüter, 2012). A titre illustratif, on peut retrouver dans certaines grandes surfaces des tapenades ou des pâtes à base d'insectes.

Il convient de signaler qu'on observe en occident une consommation non intentionnelle d'insectes. En effet, 0,1% d'insectes par masse d'échantillon sont autorisés par le Codex Alimentarius. On estime ainsi à près de 1 kg la consommation annuelle involontaire des habitants des pays industrialisés, avec comme source principale les produits à base de farine ou les fruits et légumes (ANSES, 2015).

Une autre application émergente commence à apparaître en Europe : l'incorporation d'insectes broyés dans des farines destinées à l'alimentation animale. Un insecte modèle pour ce genre de produits est la mouche *Hermetia illucens* Linnaeus 1758 (Diptera : Stratiomyidae). Selon Anand et collègues (2008), d'autres insectes seraient également des candidats prometteurs : *B. mori* qui est déjà valorisé en pisciculture et en aviculture en Inde, en Chine, au Japon et au Sri Lanka, *Tenebrio molitor* Linnaeus 1758 (Coleoptera : Tenebrionidae), *Musca domestica* Linnaeus 1758 (Diptera : Muscidae), ou plusieurs espèces de sauterelles. D'après une étude réalisée par Verbeke et collègues (2015), une grande majorité d'agriculteurs, de citoyens et d'intervenants du secteur agricole seraient en faveur du développement de ce type de produits, surtout pour les élevages de poulets ou la pisciculture (Tran et al., 2015). Ceci s'explique par le fait que les insectes font partie de l'alimentation des poissons et des oiseaux dans leur environnement naturel (Henry et al., 2015). Suite aux résultats plutôt positifs de cette enquête, de nombreuses entreprises de par le monde se lancent dans la production de tels aliments. Celles-ci sont reprises au sein d'une association nommée International Platform of Insects for Food and Feed (IPIFF ; Figure 6). Parmi ces sociétés, on peut citer l'entreprise néerlandaise Protix, l'allemande Hermetia, la française Ynsect, ou encore la malaisienne Entofood.



Figure 6 - Logo de l'IPIFF (ipiff.org ; consulté le 12 août 2016)

En considérant ces nouvelles applications, l'importance du projet réalisé dans le cadre de ce travail de fin d'étude ressort clairement. En effet, pour permettre l'autorisation de ce type de produits, il va impérativement falloir développer des méthodes pour authentifier la présence d'insectes dans ceux-ci.

4. Pourquoi consommer des insectes ?

Etant donné la croissance démographique attendue dans les pays émergents, une augmentation importante de la demande en nourriture est nécessaire (Msangi & Rosegrant, 2011 ; Aiking, 2011). Un corollaire est une hausse de la demande en viande. Or, pour produire 1 kg de protéines animales, pas moins de 6 kg de protéines d'origine végétale sont requises pour nourrir le bétail (Pimentel et al., 2004 ; Smil, 2002). La consommation d'insectes, même sous forme d'ingrédients, présente des avantages multiples en comparaison à la consommation de viandes ou d'autres sources alternatives de protéines.

Tout d'abord, du point de vue de la production, les insectes vont requérir moins d'espace que les productions animales classiques (Oonincx et al., 2010). Comme mentionné auparavant, leur taux de fécondité élevé ainsi que leur rapidité pour atteindre la maturité constituent autant d'avantages intéressants. De plus, de nombreux insectes sont omnivores et peuvent se développer sur base de déchets organiques, pour lesquels on trouve donc une nouvelle voie de valorisation (Rumpold & Schlüter, 2013). La production à grande échelle d'insectes permet également d'amoindrir l'impact environnemental des productions animales traditionnelles. Il est bien connu que cette filière est responsable d'une émission conséquente de gaz à effet de serre, principalement du méthane et du protoxyde d'azote, représentant 15% des émissions globales (van Huis, 2013 ; Steinfeld & Gerber, 2012). Par exemple, sur base d'une analyse de cycle de vie, l'élevage bovin est le plus polluant, dans la mesure où 1 kg de protéines de bœuf est responsable du rejet de près de 125 kg d'équivalents CO₂ en moyenne, là où la production d'une quantité identique de protéine de *T. molitor* n'en génère que 17 kg (Fiala, 2008 ; Oonincx et al, 2010 ; Oonincx & de Boer, 2012). Une problématique similaire concerne la consommation d'eau pour les productions animales (Beckett & Oltjen, 1993). En effet, il ressort que près de la moitié des flux d'eau dans le monde seraient liés à l'irrigation des cultures et à l'abreuvement du bétail (Chapagain & Hoekstra, 2003). L'intérêt des insectes est que certaines espèces comestibles, telles que le ver de farine (*T. molitor*) ou le ver Buffalo (*A. diaperinus*) sont capables de survivre et de se développer sous des conditions de sécheresse assez poussées (Ramos-Elorduy et al., 2002).

Un autre avantage de la consommation d'insectes est la minimisation du risque de transmission de maladies à l'homme. En effet, les insectes étant beaucoup plus éloignés génétiquement de l'homme que les animaux généralement consommés, le risque qu'une maladie affectant un insecte puisse se transmettre à l'homme est fortement réduit (van Huis, 2013). Ceci permettrait d'éviter que des scandales alimentaires se reproduisent, tels que celui de la grippe aviaire (King et al., 2006). Il a également été démontré que les prions responsables des encéphalopathies spongiformes n'étaient pas capables de se répliquer au sein des insectes (Finke et al., 2015).

L'entomophagie manifeste également des avantages d'un point de vue nutritionnel. Ainsi, en plus de fournir de l'énergie à raison de 400 à 500 kcal pour 100 g, les insectes seraient une source de matière grasse, de vitamines, de minéraux et surtout de protéines (Elemo et al., 2011 ; Ramos-Elorduy et al., 1997). A titre illustratif, Agdibye et collègues (2009), rapportent que la consommation de 100 g de chenilles peut satisfaire 76% de nos besoins journaliers en protéines. Le contenu en polypeptides des insectes est d'environ 60% en moyenne (Belluco et al., 2013). A titre comparatif, dans le soja communément employé dans les tourteaux destinés à l'alimentation animale, seuls 36% de la matière sèche correspondent à des protéines (Rumpold & Schlüter, 2013). En outre, les protéines d'insectes sont hautement digestibles (71,5 à 94,3% de digestibilité), une fois la chitine enlevée (Ramos-Elorduy et al., 1997 ; Ozimek et al, 1985). Cette chitine peut par exemple trouver une valorisation dans le secteur cosmétique (Prashanth & Tharanathan, 2007). Il

convient néanmoins de signaler que les humains sont capables de digérer partiellement la chitine, grâce à au moins deux chitinases : l'AMCase et la chitotriosidase (van Aalten et al., 2001 ; Paoletti et al., 2007). Comme mentionné précédemment, cette chitine peut également avoir un rôle prébiotique, dans le sens où elle exercerait une action bénéfique sur les *Bifidobacterium* et les *Lactobacillus* sp. (Pranshanth & Tharanathan, 2007). Pour caractériser complètement ces protéines, il importe de comparer le contenu en acides aminés essentiels (phénylalanine, leucine, méthionine, lysine, isoleucine, valine, thréonine, tryptophane et histidine) avec leurs besoins journaliers respectifs. Les résultats d'analyses menées par Rumpold & Schlüter (2013), montrent que seuls les besoins en méthionine ne sont pas comblés pour certains insectes, comme *T. molitor*. Les protéines d'insectes présentent donc un intérêt majeur pour l'alimentation humaine et animale.

Si l'on se focalise sur la teneur en matière grasse des insectes, de nombreuses observations ont pu démontrer qu'elle est généralement comprise entre 10 et 30% de la matière fraîche (DeFoliart, 1993). Il ressort également de plusieurs études que la teneur en lipides est supérieure chez les larves par rapport aux imagos (Chen et al, 2009). La composition en acides gras est très variable d'une espèce à l'autre, et est également fonction du régime alimentaire de l'animal. La teneur en graisse des insectes varie également en fonction du stade de développement, le stade larvaire étant le plus riche en lipides (Manzano-Agugliaro et al., 2012). Ainsi, on compte en moyenne 36% d'acides gras saturés, dont la grande majorité est représentée par les acides palmitique et stéarique ; la teneur en acides gras mono-insaturés s'étendant quant à elle de 22 à 49%, le reste correspondant à des acides gras polyinsaturés (Rumpold & Schlüter, 2013). Il est bien connu que les acides gras polyinsaturés (PUFA) présentent différentes propriétés intéressantes pour nos organismes, telle que notamment la diminution de l'occurrence des maladies cardiovasculaires (Ruxton et al., 2004). A cette fin, la consommation d'individus appartenant aux ordres Lepidoptera et Orthoptera peut s'avérer particulièrement intéressante, les PUFA représentant entre 37 et 39% de leur contenu en acides gras. En comparaison avec les différents types de viandes traditionnellement consommées, on constate que la teneur en PUFA est supérieure dans les insectes. Fontaneto et collègues (2011), rapportent que la consommation d'insectes aquatiques pourrait présenter un intérêt, dans le sens où leur profil en acides gras est différent de celui des insectes terrestres. Ainsi, d'un côté ces derniers s'avéreraient être de bonnes sources en omega 6, tandis que les insectes aquatiques seraient davantage riches en omega 3. De plus, il a été prouvé que les esters méthyliques d'acides gras de certains insectes pourraient être d'excellents substrats pour la production de bio-diesel (Ramos-Bueno et al., 2016). Cette énergie alternative se définit comme « les mono-alkyls esters d'acides gras à longue chaîne (C16-C18) dérivés de ressources renouvelables telles que les huiles végétales ou les graisses animales, et utilisables dans des moteurs à combustion » (Krawczyk, 1996). A l'heure actuelle, des recherches ont déjà été menées sur plusieurs insectes, principalement des espèces dont on souhaite valoriser le contenu protéique à des fins alimentaires, par exemple *H. illucens*, *T. molitor* et *Zophobas morio* (Leung et al, 2012 ; Zheng et al., 2012 ; Zheng et al., 2013).

En outre, il a été observé que les insectes présentent des teneurs en cholestérol variables. Cependant, au contraire des autres produits d'origine animale, à l'instar des œufs qui comportent une teneur en cholestérol de 372 mg/100 g, les valeurs observées chez les insectes sont largement inférieures. En effet, si l'on se fie à des investigations réalisées en Thaïlande et au Nigeria, la teneur en cholestérol dans les insectes est près de 3 fois inférieure à cette valeur (Ekpo et al., 2009). Néanmoins, ce taux est assez variable et est fonction de l'alimentation des insectes, dans la mesure où ils ne sont pas capables de produire du cholestérol *de novo* (Macdonald et al., 1990).

Enfin, un dernier atout nutritionnel présenté par les insectes est leur contenu en minéraux et en vitamines. En effet, si les insectes sont loin de satisfaire les besoins journaliers en calcium et en

potassium, ils présentent des teneurs appréciables en magnésium ou en cuivre par exemple (Hwangbo et al., 2009 ; Bukkens, 1997). Christensen et collègues (2006), estiment également que la consommation d'insectes, et particulièrement des Orthoptères, dans les pays en voie de développement pourrait réduire la fréquence des carences en fer et en zinc, responsables d'anémies ou de problèmes de croissance par exemple. La grande majorité des insectes comestibles fournissent également des quantités significatives de cuivre et de manganèse. A titre illustratif, en ce qui concerne les vitamines, 100 g de chenilles pourraient fournir près de 335% des besoins journaliers en minéraux (DeFoliart, 1992). Les insectes présentent généralement des teneurs significatives en riboflavine, acide pantothénique et biotine. Le choix précis de la consommation d'une espèce peut également s'avérer intéressant pour se fournir en vitamines A ou C ainsi qu'en niacine (Chen et al., 2009 ; Rumpold & Schlüter, 2013).

5. Quels sont les freins à la consommation d'insectes ?

Si la consommation d'insectes semble se révéler assez prometteuse d'un point de vue écologique et nutritionnel, elle présente toutefois quelques inconvénients notoires. Tout d'abord, force est de constater que les variations observées dans la composition des insectes représentent un désavantage, dans le sens où le consommateur pourrait se retrouver perdu et ne saurait pas quelle espèce acheter et consommer (van Huis, 2012). En outre, en fonction de l'alimentation fournie à l'insecte, sa composition en nutriments est également impactée, avec pour résultante l'ajout d'un facteur de variation supplémentaire (Ramos-Elorduy et al., 2002).

Ensuite, des questions peuvent également se poser quant à la sécurité du consommateur. En effet, les insectes peuvent engendrer des allergies ou être responsables de la transmission de micro-organismes, de parasites ou de produits chimiques (Belluco et al., 2013). Ainsi, il est bien connu que les arthropodes consommés à l'heure actuelle, en l'occurrence les crustacés, sont responsables du déclenchement de réactions allergiques plus ou moins graves (Ayuso, 2011). On relève d'ores et déjà dans la littérature des cas d'allergies à *B. mori* ainsi qu'à *T. molitor* (Ji et al., 2008 ; Siracusa et al., 2003). Dans le cas des allergies aux insectes, on peut observer une sensibilisation primaire mais aussi des cas de sensibilisation croisée (van Broekhoven et al., 2015). A l'heure actuelle, beaucoup d'attention est portée sur quelques protéines allergènes: la tropomyosine, l'arginine kinase, la protéine liant le calcium sarcoplasmique et la chaîne légère de myosine (Broekman et al., 2016 ; Liu et al., 2009 ; Reese et al, 1999). Dans le cas de la tropomyosine, des cas d'allergies ont été observés chez le personnel travaillant dans les élevages de criquets et de grillons. De rares cas d'allergie au rouge carmin ont également été observés (Acero et al, 1998 ; Lucas et al., 2000). Etant donné le processing des insectes destinés à l'alimentation humaine dans les pays occidentaux, il importe de mener des études quant aux effets de celui-ci sur l'allergénicité du produit fini. Ainsi, différentes recherches ont pu faire ressortir des résultats contrastés : un traitement thermique peut avoir un effet inactivateur sur des allergènes, mais peut aussi avoir un effet activateur sur d'autres protéines non problématiques au départ (Besler et al., 2001).

Concernant la sécurité microbiologique des insectes, bon nombre d'études ont également été menées. Giaccone & Paoletti (2005), rapportent ainsi que la charge microbienne moyenne rencontrée sur les insectes comestibles est comprise entre 10^5 et 10^6 UFC/g. La grande majorité de ces bactéries ne semblent nullement problématiques. Cependant, des études menées sur *A. diaperinus* révèlent que celui-ci peut s'avérer porteur de *Staphylococcus* sp., de *Micrococcus* sp., et parfois même de *Salmonella* sp. (Agabou & Alloui, 2010). La mouche domestique *M. domestica*

peut également être impliquée dans la transmission de *C. jejuni* aux volailles en Australie et en Nouvelle-Zélande, ce qui implique des précautions si l'on souhaite utiliser cette espèce ou d'autres diptères dans l'alimentation animale (Nelson & Haris, 2006). En outre, les mouches peuvent aussi être vectrices d'*Escherichia coli* O157:H7 (Kobayashi et al., 1999). Suivant ces considérations, il apparaît comme nécessaire de bouillir les insectes pendant quelques minutes puis de les stocker au réfrigérateur pour garantir une qualité sanitaire satisfaisante, la phase de chauffage étant insuffisante pour se débarrasser des formes sporulées (Klunder et al., 2012). Néanmoins, ces propos doivent être tempérés. En effet, différentes études ont démontré la production de composés anti-microbiens par différentes espèces d'insectes, telles que les mouches *Lucilia sericata* Meigen 1826 (Diptera : Calliphoridae) et *H. illucens*, propriété qui fait de cette dernière un candidat majeur pour l'alimentation animale (Choi & Jiang, 2014 ; Bexfield et al., 2004). Ainsi, la première des deux espèces citées permettrait l'inhibition du développement de germes tels que *Escherichia coli* Castellani et Chalmers 1919, et *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 (Bacilliales : Staphylococcaceae), via différentes sécrétions qui n'ont malheureusement pas encore pu être complètement identifiées et caractérisées.

Si l'on se focalise sur le risque de transmission de parasites par les insectes, en plus des microorganismes sus-mentionnés qui peuvent engendrer de graves problèmes de santé, une étude menée par Chai et al., 2009, en Asie du Sud-Est révèle que certaines espèces, telles que des demoiselles (Odonata) communément consommées dans ces contrées, peuvent se révéler vectrices de douves intestinales. Aux Etats-Unis et au Proche-Orient, des cas de transmission de l'espèce de nématode *Gongylonema pulchrum* Molin 1857 (Spirurida : Gongylonematidae) par des coléoptères ont aussi été observés (Chai et al., 2009 ; Molavi et al., 2006 ; Wilson et al, 2001).

Quant aux intoxications alimentaires par des insectes eux-mêmes, peu de faits sont rapportés dans la littérature. Cependant, il est clairement reconnu que les insectes peuvent être des vecteurs de molécules hautement néfastes pour l'homme, utilisées comme pesticides. Par exemple, DeFoliart (1992) rapporte un cas d'empoisonnement à grande échelle de la population lié à la mise sur le marché d'insectes récoltés dans une zone ayant au préalable été traitée par des produits chimiques. Il existe également, bien entendu, des insectes toxiques qui peuvent être répartis dans deux catégories : les insectes phanérottoxiques, qui synthétisent eux-mêmes des poisons, à l'instar des abeilles, et les insectes cryptotoxiques, dans lesquels des substances toxiques issues par exemple de leur alimentation peuvent s'accumuler. Si, dans le premier cas, les molécules toxiques sont souvent inactivées au niveau de l'estomac, il n'en est pas de même pour le second (Berendaum, 1993). A titre illustratif, on peut citer comme insectes phanérottoxiques :

- les dytiques (Dytiscidae), qui contiennent des stéroïdes pouvant générer chez l'être humain des problèmes de fertilité ou de croissance (Blum, 1994) ;
- les coléoptères des genres *Stenocentrus* et *Syllitus* contenant du toluène, composé néfaste par exemple pour le foie (Blum, 1994) ;
- les Tenebrionidae *Ulomoides dermestoides* Fairmaire 1893 (Coleoptera : Tenebrionidae) et *Tribolium confusum* Jaquelin Du Val 1868 (Coleoptera : Tenebrionidae), contenant des benzoquinones, molécules pouvant provoquer des dommages au niveau des acides nucléiques (Brown et al, 1992 ; Lis et al, 2011).

Bien que ces considérations semblent inquiétantes, il apparaît clairement que ce risque n'existera pas dans le cas de la production et de la commercialisation d'insectes à grande échelle, des études préalables allant être effectuées avant la mise sur le marché de nouvelles espèces.

Un autre inconvénient des insectes en tant qu'aliment de substitution est qu'ils contiendraient certains facteurs antinutritionnels (Belluco et al., 2013 ; Omotoso, 2006) :

- l'acide phytique qui complexe le phytate, avec pour effet une diminution de la disponibilité du phosphore pour l'organisme ;
- les oxalates qui provoquent à forte dose des perturbations du tractus digestif ;
- les tannins qui font précipiter les protéines ;
- la thiaminase qui génère une déficience en vitamine B1.

De plus, dans le cas de la consommation d'insectes directement prélevés dans la nature, on observe des risques liés à la bio-accumulation de métaux lourds, principalement du cadmium, mais aussi du plomb et du mercure (Devkota & Schmidt, 2000 ; Zhuang et al., 2009).

Dans le monde occidental, au moins deux autres inconvénients de l'entomophagie peuvent être dénombrés : la mentalité de la population, de même que le coût des insectes. Ainsi, via un simple coup d'œil sur internet, on peut apprendre que le prix des vers de farine *T. molitor* vaut approximativement 50€/kg (Europe Entomophagie, 2016). On comprend aisément que ce prix est peu compétitif face aux viandes traditionnelles, ce qui peut rebuter de nombreux consommateurs.

6. Législation

Concernant la législation relative à l'entomophagie, il n'existait jusqu'il y a peu aucune règle claire et uniforme en Europe. La réglementation communément suivie était intitulée EC 258/1997, relative aux « novel food », bien qu'il ne soit pas universellement admis que les insectes soient à classer parmi cette catégorie d'aliments. Ainsi, sont considérés comme répondant à cette dernière « des aliments n'ayant pas été utilisés pour la consommation humaine à un niveau significatif dans l'Union Européenne avant le 15 mai 1997 » (CE, 2009). Cette définition étant assez ambiguë, une résultante en est que son interprétation diverge entre états membres de l'Union Européenne, dans le sens où certains pays comme la France ont décidé de les classer intégralement parmi les *novel food*, tandis que d'autres, tels la Belgique, ont décidé d'en tolérer quelques espèces, sur base d'arguments scientifiques (SPF Santé publique, 2016). Il est en effet difficile de savoir si une consommation significative d'insectes existait en Europe avant 1997. Ainsi, en Belgique, l'interprétation de la directive EC 258/1997 a amené l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (AFSCA) à autoriser la mise sur le marché de dix espèces d'insectes entiers après une analyse de risques approfondie et avec l'accord de la Commission Européenne (AFSCA, 2016 ; Tableau 1). Des photos de ces différentes espèces ainsi que des exemples de leurs applications alimentaires sont disponibles en Annexe 1 à ce document. Néanmoins, depuis l'adoption le 25 novembre 2015 du nouveau règlement (UE) 2015/2283, l'Union Européenne a tranché : tous les insectes seront à classer dans la catégorie des « novel food » à partir du 1er janvier 2018, date d'entrée en application de ce règlement. Alors, même les 10 espèces autorisées par l'AFSCA ne pourront être admises sur le marché, à moins que les producteurs souhaitant se lancer dans la production d'un produit à base d'insectes ne déposent un dossier auprès de la Commission Européenne (SPF Santé publique, 2016). Ce dossier doit permettre de prouver que l'ingrédient ou l'aliment ne présente aucun danger pour le consommateur, ne le trompe pas, et ne présente pas un inconvénient nutritionnel pour le consommateur par rapport à l'aliment qu'il est censé remplacer.

Tableau 1- Liste des insectes autorisés en Belgique
 (<http://www.afsca.be/denreesalimentaires/insectes>; consulté le 23 juillet 2016)

Grillon domestique	<i>Acheta domesticus</i>
Criquet migrateur africain	<i>Locusta migratoria migratorioides</i>
Ver de farine géant	<i>Zophobas atratus morio</i>
Ver de farine	<i>Tenebrio molitor</i>
Ver Buffalo	<i>Alphitobius diaperinus</i>
Chenille de la fausse teigne	<i>Galleria mellonella</i>
Criquet pèlerin d'Amérique	<i>Schistocerca americana gregaria</i>
Grillon à ailes courtes	<i>Grylodes sigillatus</i>
Chenille de la petite fausse teigne	<i>Achroia grisella</i>
Chenille du bombyx	<i>Bombyx mori</i>

En ce qui concerne la commercialisation d'insectes sous forme processée, donc incorporés dans des aliments, l'ambiguïté relative à l'interprétation de la réglementation (CE) 258/1997 est levée, des insectes sous cette forme n'ayant jamais été consommés en Europe avant la date clé du 15 mai 1997. Ce type de produit se trouvera donc automatiquement placé parmi les *novel food*. Les autorisations se font donc au cas par cas après dépôt d'un dossier à la Commission (SPF Santé publique, 2016).

Il convient également de signaler que, dans un élevage d'insectes, les substrats utilisés pour assurer leur croissance sont également soumis aux règlements européens 767/2009 et 1069/2009 (SPF, 2016). Ainsi, il est par exemple interdit d'utiliser des carcasses de bétail récupérées dans des abattoirs comme substrat pour les élevages.

Pour ce qui est de l'élevage d'insectes, il n'existe pas de réglementation spécifique. Les insectes sont considérés comme « faune sauvage captive », et seul l'octroi d'un certificat de capacité d'élevage est requis pour le producteur (SPF, 2016).

Enfin, les farines d'insectes pour alimentation animale ne sont à l'heure actuelle pas autorisées en Europe. En effet, ces produits sont considérés comme des protéines animales transformées (PAT), et sont interdits selon le règlement (CE) n°163/2009, dans le but d'éradiquer les encéphalopathies spongiformes. Les produits commercialisés par les entreprises de l'IPIFF ne peuvent donc l'être que dans le reste du monde. Chez nous, on estime que de nombreuses investigations doivent être effectuées avant que la Commission Européenne n'autorise la mise sur le marché de ceux-ci, comme par exemple l'absence de composés antinutritionnels, le risque de transmission de pathogènes ou des résidus de pesticides, de métaux lourds et d'antibiotiques, de même que les problèmes d'allergénicité.

7. Les études moléculaires sur les insectes

Un insecte a majoritairement été étudié comme modèle : *Drosophila melanogaster* Meigen 1830 (Diptera : Drosophilidae), la mouche du vinaigre. Ceci peut s'expliquer par la rapidité de son cycle de vie ainsi que par la facilité à l'élever en laboratoire. Ainsi, dès 1916, c'est en étudiant les drosophiles que Morgan est parvenu à développer la théorie de l'hérédité basée sur les chromosomes. C'est également le premier insecte dont le génome a été entièrement séquencé, en 1998 (Adams et al., 2000). Depuis lors, les études moléculaires menées sur les insectes se sont multipliées dans des buts variés. Premièrement, bon nombre de recherches taxonomiques ont été effectuées. Les gènes qui ont été principalement étudiés sont repris sous le terme de marqueurs moléculaires. Ces derniers doivent être séparés en deux catégories : les marqueurs nucléaires et les marqueurs mitochondriaux (Arif & Khan, 2009 ; Dawnay et al., 2007 ; Lunt et al., 1996). Dans la première catégorie, on peut par exemple citer le facteur d'élongation α , le gène *wingless* ou certains ADN et ARN ribosomiaux, tandis que dans la seconde, on retrouve généralement des gènes codants pour des protéines, à l'instar des différentes sous-unités du cytochrome C oxydase ou de la sous-unité 5 de la NADH déshydrogénase, de même que des acides nucléiques ribosomiaux d'origine mitochondriale comme le 12S rDNA. Majoritairement, les études taxonomiques se basent sur des gènes mitochondriaux (De Mandal et al., 2014). L'ADN mitochondrial présente en effet des avantages notoires, tels qu'une transmission uniquement maternelle ou un haut taux de mutation (Brown et al., 1979). Un inconvénient majeur des marqueurs mitochondriaux est qu'ils se rencontrent en nombres très variables de copies par cellule, rendant impossible toute analyse quantitative. Dans ce travail de fin d'études, il a ainsi été volontairement décidé de concevoir des cibles mitochondriales et des cibles nucléaires, ces dernières se rencontrant en grande majorité sous la forme d'une copie unique par génome haploïde.

Tout comme certains génomes nucléaires, dont la longueur est fort variable d'une espèce à l'autre, les génomes mitochondriaux des insectes sont maintenant complètement connus. Longs d'environ 14500 à 19500 paires de bases, ils sont constitués de 37 gènes codant pour les deux sous-unités ribosomiales, 22 ARN de transfert et 13 gènes codant pour des protéines. Ils comportent également des régions non-codantes appelées éléments régulateurs dont on suppose qu'ils ont un rôle dans la transcription et la réplication (Boore, 1999 ; Cameron, 2014 ; De Mandal et al., 2014).

Depuis le début des années 90, de plus en plus de gènes d'insectes ont été séquencés. Le fruit de ces recherches est rassemblé au sein de la base de données GenBank du NCBI (Benson et al., 2012). Une recherche menée le 24 avril 2016 avec le terme « Lepidoptera » sur cette base de données fournit 2.311.942 séquences nucléotidiques, démontrant le boom observé ces dernières années dans les analyses de génome.

Depuis peu, une nouvelle méthode rapide d'identification taxonomique des insectes a vu le jour : le DNA barcoding (Jinbo et al., 2011 ; Yu et al., 2012). Elle consiste à avoir, pour chaque espèce, un « code-barres » spécifique grâce au gène COI, très peu conservé au sein de la classe Insecta mais fortement conservé pour les individus d'une même espèce (Carapelli et al., 2000 ; Deagle et al., 2014 ; Porter et al., 2014). La technique consiste à utiliser une paire d'amorce PCR spécifique afin d'amplifier une portion de ce gène longue d'environ 600 à 800 paires de bases (Arif & Khan, 2009 ; Hebert et al., 2003 ; Kambhampati & Smith, 1995). Ce système constitue une avancée majeure pour les taxonomistes, certaines espèces étant très difficiles à différencier morphologiquement. La technologie moléculaire présente, outre le fait de parvenir à faire cette distinction, l'avantage d'être rapide.

Un projet d'envergure majeure nommé i5k concernant les insectes a vu le jour en 2012: celui de rassembler les génomes séquencés de 5000 insectes dans une même base de données. A la date du 22 juin 2016, le séquençage du génome de 120 espèces d'insectes a été initié, mais seuls 58 l'ont été complètement.

En plus de la taxonomie, pas mal d'autres études moléculaires ont été effectuées sur les insectes. Ainsi, les chercheurs se sont par exemple intéressés aux molécules intervenant dans les interactions insectes-insectes ou insectes-plantes (Kanakala & Ghanim, 2015). La transmission de virus aux cultures par les insectes a également été investiguée, au niveau des mécanismes moléculaires intervenant dans le phénomène (Severson & Behura, 2012).

La biologie moléculaire ne s'arrête pas au niveau des acides nucléiques, mais s'intéresse également aux protéines. On parle alors de protéomique, nom de la science qui vise à analyser la constitution protéique d'un organisme. Ainsi, dans ce travail, il a également été décidé de ne pas se limiter à des analyses de l'ADN mais de développer aussi une approche par protéomique. Dans les cas des insectes, on se trouve dans une situation toute particulière : comme tous les arthropodes, ils possèdent un exosquelette chitineux qui complexifie l'extraction des protéines sur insectes entiers (Champion et al., 2016 ; Zhang et al., 2007). Un broyage préalable des échantillons est donc requis.

L'approche protéomique utilisée s'appelle « bottom-up ». Elle consiste à déterminer les protéines présentes dans les insectes à partir des peptides obtenus par fragmentation de ces dernières et comparaison avec des bases de données. Une étape de clivage enzymatique est donc mise en œuvre, impliquant par exemple la trypsine, capable de cliver spécifiquement entre les acides aminés lysine et arginine (Shilov et al., 2007). La méthode la plus fréquemment utilisée pour la séparation des fragments et l'identification des protéines est la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Cette instrumentation se trouve expliquée ultérieurement dans ce document, au chapitre « Matériel et méthodes ». Il est également possible de pousser plus loin ces recherches, en effectuant une analyse protéomique quantitative. Un exemple récent d'application de cette démarche est la caractérisation du protéome d'*Anopheles gambiae* Giles 1902 (Diptera : Culicidae), l'insecte vecteur de la malaria (Champion et al., 2016). L'approche en « -omique » a également été utilisée pour tenter de comprendre la réponse au froid des insectes (Purać et al., 2016). Dans le cas de ce travail, la protéomique va viser à découvrir d'éventuelles protéines très conservées au sein de la classe Insecta, permettant de développer une méthode de détection basée sur celles-ci.

8. La PCR en temps réel

Dans l'optique de la détection d'acides nucléiques, la technique la plus couramment utilisée est la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction ou PCR). De plus, le règlement 51/2013 de la Commission Européenne a reconnu la PCR comme méthode de référence pour la détection de constituants d'origine animale dans les aliments pour animaux. La première publication faisant référence à cette technique date de 1986 (Mullis, 1986). Le principe de la méthode repose sur trois grandes étapes, répétées de façon cyclique et permettant l'augmentation exponentielle du nombre d'amplicons (Figure 7) :

- La dénaturation des ADN doubles brins via l'application d'une température de 95°C pendant environ 1 minute.
- L'hybridation des amorces à une température d'environ 60°C. Ces amorces sont des oligonucléotides conçus pour être complémentaires à une séquence ciblée sur le matériel génétique analysé. Les amorces s'utilisent toujours par paire, il est en effet nécessaire d'avoir une amorce complémentaire à chacun des deux brins d'ADN dénaturé. Les amorces sont ajoutées en excès mais à une concentration suffisamment faible pour éviter les hybridations non spécifiques de même que la formation de dimères d'amorces (Poitras & Houde, 2002).
- L'élongation des brins, effectuée par une ADN polymérase thermostable à une température de 72°C. Cette phase consiste en l'ajout par l'enzyme des dNTP complémentaires aux brins modèles et de reformer ainsi un ADN double brin. L'ADN polymérase utilisée, nommée Taq polymérase a été isolée à partir de la bactérie *Thermus aquaticus* Brock et Freeze 1969 (Thermales : Thermaceae), une espèce thermophile observée dans les sources d'eau chaude (Holland et al., 1991).

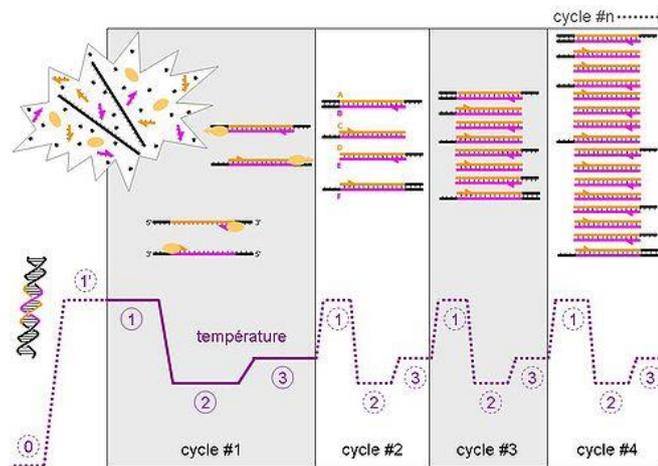


Figure 7 - Principe de la PCR classique. Les phases 1, 2 et 3 correspondent respectivement à la dénaturation des brins, l'hybridation des amorces et l'élongation des brins d'ADN (Wikipedia, 2006)

Après réalisation d'une PCR classique, l'observation des résultats s'effectue via une électrophorèse sur gel d'agarose en présence de marqueurs de poids moléculaires, avec ajout d'un agent fluorescent intercalant tel que le bromure d'éthidium et visualisation des résultats à la lumière UV. Si une bande est observable au niveau du nombre de nucléotides attendu, cela signifie que la séquence cible est présente dans l'ADN analysé (Figure 8).

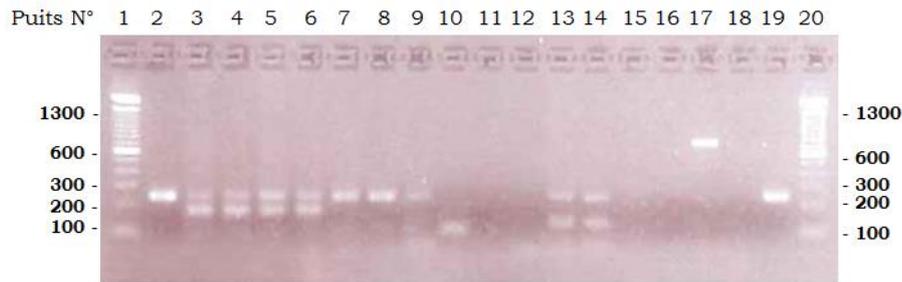


Figure 8 - Migration sur gel d'agarose des amplicons. Les puits 1 et 20 contiennent les marqueurs de poids moléculaires, les 2 et 19 des témoins positifs de PCR, et le 18 un témoin négatif, les autres numéros correspondant aux échantillons testés. Les puits 3 à 9 et 13-14 contiennent l'ADN ciblé.

Ce procédé étant relativement fastidieux, il est de moins en moins utilisé à l'heure actuelle et a laissé sa place à la PCR en temps réel. Cette amélioration permet de suivre en direct l'évolution du nombre d'amplicons au moyen de la mesure de la fluorescence émise par un fluorochrome en fin de phase d'élongation. Il existe deux méthodes principales pour la réalisation d'une PCR en temps réel : l'ajout d'un agent intercalant et l'utilisation de sondes fluorescentes.

Dans la première situation, le composé le plus couramment employé est le SYBR Green® mais d'autres options sont envisageables, dans la mesure où seules deux conditions *sine qua non* sont requises : l'agent intercalant doit avoir une fluorescence qui augmente lorsqu'il se lie à un double brin et ne doit pas exercer une action inhibitrice sur la réaction de polymérisation (Rasmussen et al., 1998). Le principe de la détection est que le fluorochrome, une fois piégé entre deux brins d'ADN, se trouve stimulé et émet une fluorescence plus importante (Figure 9). L'emploi de ce type de molécules présente plusieurs avantages, par exemple leur facilité d'utilisation ou leur plus faible coût. Cependant, des inconvénients majeurs sont à répertorier, telle qu'une spécificité ne reposant que sur les amorces PCR (Bustin, 2000).

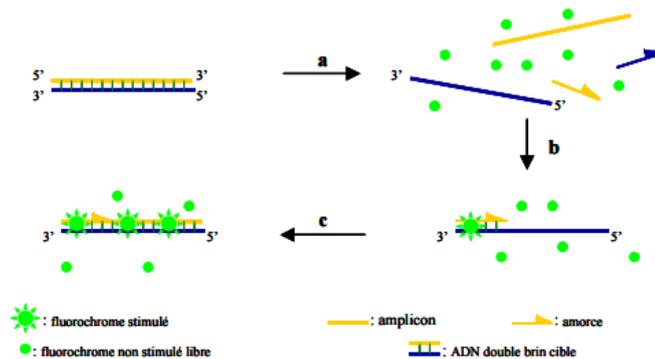


Figure 9 - Principe de la PCR en temps réel au SYBR Green (Poitras & Houde, 2002)

Dans le second cas, on utilise, en plus des deux amorces, une sonde spécifique à une séquence nucléotidique comprise entre les deux amorces. Le système doit être conçu pour que l'amplicon ait une longueur n'excédant pas 100 paires de bases. La sonde doit idéalement avoir un T_m de 70°C ou un T_m de 10°C supérieur à celui des amorces dans le cas où les températures de fusion de ces dernières seraient inférieures à 60°C. La technologie la plus fréquemment rencontrée est celle des sondes à hydrolyse, telles que les sondes de type *Taqman*. Ces dernières comportent en réalité deux

fluorochromes, l'un nommé *reporter* dont l'émission de fluorescence est inhibée par l'autre appelé *quencher*. Le couple le plus utilisé se nomme FAM-TAMRA, à savoir la 6-carboxy-fluorescéine et la 6-carboxy-tetraméthyl-rhodamine. Lorsque ces deux constituants sont en contact, l'énergie du *reporter* est transmise au *quencher* et dissipée sous forme de chaleur (Mackay, 2002). Le principe de la détection repose sur le fait que, lors de la phase d'élongation à partir des amorces, la Taq polymérase va exercer une activité 5'-exonucléasique sur la sonde et engendrer la libération du *reporter*, avec pour effet une levée de son inhibition, une émission de fluorescence pouvant alors être détectée (Figure 10). L'avantage majeur de la technologie *Taqman* consiste en un accroissement de la spécificité du test, cette dernière reposant à la fois sur les amorces et sur la sonde.

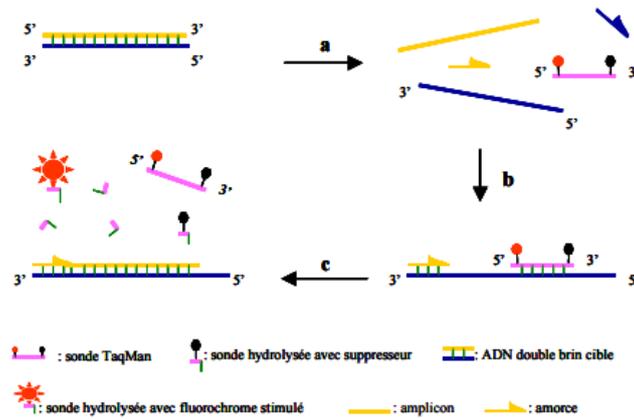


Figure 10 - Mécanisme de la PCR en temps réel avec hydrolyse de sonde (Poitras & Houde, 2002)

L'interprétation d'une analyse en temps réel peut être réalisée à partir d'un graphique représentant la fluorescence en fonction du nombre de cycles de température effectués (Figure 11).

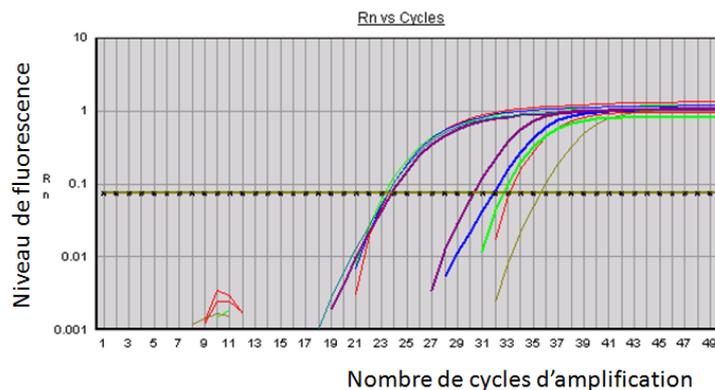


Figure 11 - Courbes d'amplification par PCR en temps réel

Sur les courbes d'amplification, trois phases principales peuvent être distinguées :

- L'amplification non observable, qui n'est pas visible sur la Figure 11. Elle correspond à une période où la réaction se déroule mais où le niveau de fluorescence émis est insuffisant pour être distingué du bruit de fond.

- L'amplification exponentielle, représentée par une droite dans le graphique semi-logarithmique de la Figure 11. La fluorescence y atteint un niveau suffisant pour être détectée et croît de manière exponentielle à chaque cycle.
- L'amplification non-exponentielle et la phase plateau. Cette étape correspond à un ralentissement de l'amplification, se traduisant par la perte de la linéarité de la courbe. Elle est liée à un épuisement progressif des réactifs impliqués dans la PCR, de même qu'à une perte d'efficacité de l'enzyme Taq-polymérase.

La droite horizontale verte est appelée *threshold* et représente une valeur de fluorescence significativement différente du bruit de fond. Elle est placée pour se trouver dans la phase exponentielle de la courbe d'amplification PCR. Tout échantillon qui présente une fluorescence supérieure à cette valeur sera considéré comme positif. Au contraire, si la fluorescence d'un échantillon au cours de l'amplification PCR ne dépasse pas ce *threshold*, il sera considéré comme négatif, signifiant que la séquence ciblée ne s'y trouve pas. Grâce à la notion de Ct, il est possible de comparer qualitativement des échantillons entre eux. Le Ct désigne le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence d'un échantillon atteigne le *threshold*. On peut ainsi voir que le Ct de l'échantillon représenté par la courbe bleue est égal à 32 cycles, alors qu'il est de 33 cycles pour l'échantillon représenté par la courbe verte. En comparant les Ct de plusieurs échantillons, il est possible d'établir des ratios entre leurs quantités respectives d'ADN cible, étant donné qu'un Ct d'un cycle de moins signifie théoriquement 2 fois plus de cibles dans l'échantillon, le nombre d'amplicons se trouvant doublé à chaque cycle.

Objectifs de l'étude

L'objectif principal de ce travail de fin d'études est de développer des méthodes de détection d'insectes dans les matrices alimentaires destinées à l'alimentation humaine et animale à l'aide de techniques de biologie moléculaire. Différents types de tests doivent être développés. Ainsi, la détection de l'ensemble des insectes avec une cible unique est requise par la Commission Européenne. Ceci permettrait de statuer sur la présence ou l'absence d'insectes dans un aliment. D'un autre côté, des méthodes permettant de reconnaître certaines espèces ou ordres en particulier sont également d'intérêt, dans le sens où seules certaines espèces sont autorisées par l'AFSCA dans l'alimentation. De même, pour la mise sur le marché de farines d'insectes pour l'alimentation animale, des méthodes d'authentification sont nécessaires pour vérifier que la composition et l'étiquetage sont bien en adéquation. Les méthodes d'authentification peuvent être couvertes par deux grands domaines des sciences moléculaires : la génomique et la protéomique. Dans chacune des ces branches, différents sous-objectifs ont été définis.

Dans le cas de la génomique :

- La recherche de gènes conservés au sein de la classe Insecta dans le but de concevoir des cibles globales ou, au contraire, de gènes à évolution divergente, permettant la détection spécifique d'espèces d'intérêt.
- La sélection de différents couples d'amorces et de sondes sur base des gènes d'intérêt pour des analyses par PCR en temps réel et une première analyse des cibles à l'aide d'outils bio-informatiques.
- L'évaluation de la spécificité des cibles
- La détermination des critères de performance pour les cibles les plus prometteuses

Dans le cas de la protéomique :

- L'extraction des protéines de farines industrielles et leur analyse par GC-MS/MS dans le but d'envisager une éventuelle authentification de ces produits sur base de leur contenu protéique
- L'étude de l'éventuel impact du processing industriel sur les protéines rencontrées dans les échantillons de farines à base d'insectes.

Matériel et méthodes

1. Précautions à prendre au cours des manipulations

Etant donné le risque conséquent de contamination des échantillons au cours des manipulations, de nombreuses mesures préventives sont à respecter. Ainsi, le port d'un tablier de laboratoire ainsi que de gants en nitrile non poudrés est requis pour tout travail pratique. De nouveaux gants doivent être portés lors de toute utilisation de matériel neuf, par exemple lorsque de nouvelles cupules sont utilisées.

Afin d'éviter tout risque de contamination par le matériel, celui-ci se verra systématiquement décontaminé à la DNA-Erase (MP Biomedicals, Solon, USA), permettant d'éliminer toute trace d'ADN sur une surface. Ainsi, le petit matériel tel que les micropipettes ou encore les balances doit être décontaminés à l'aide de papier absorbant propre imbibé de DNAErase. Toujours pour des raisons de prévention, il est évident que tous les consommables plastiques sont à usage unique (cupules, tubes à fond conique et tips). De même, il importe de se prémunir face aux contaminations par les surfaces. A cette fin, tout plan de travail doit être décontaminé à l'acide chlorhydrique 0,1M (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) avant le début d'une manipulation.

Les portoirs, après chaque utilisation, sont décontaminés dans un bain d'eau de Javel avant d'être réutilisés, et ce dans le but d'amoindrir le risque de contamination croisée. Dans la même optique, le parcours de l'échantillon dans le service doit respecter le principe de la marche en avant. Pour ce faire, les locaux ont été agencés pour que chaque étape de la méthode présentée ci-après se déroule dans une pièce différente.

2. Echantillons

Cinq types principaux d'échantillons ont été analysés au cours de ce travail de fin d'étude. La plupart commencent par l'acronyme « CRL » afin de respecter les normes d'étiquetage des échantillons en application dans l'unité « Authentification et traçabilité ». De même, le premier échantillon n'a pu être intitulé CRL-0001 en raison de la nécessité de les classer dans la continuité des échantillons déjà enregistrés par le laboratoire, pour des raisons d'encodage et de traçabilité. Les numéros d'échantillons ne se suivent pas nécessairement, d'autres matrices, non concernées par ce travail de fin d'études, ayant été réceptionnées par l'unité et enregistrées avant les farines d'insectes. Les différents types d'échantillons sont les suivants :

- Des insectes entiers fournis par l'unité d'Entomologie fonctionnelle et évolutive de Gembloux Agro-Bio et ayant dû subir une extraction d'ADN par la méthode présentée ultérieurement dans ce document. Les espèces concernées sont listées dans le Tableau 2 ci-dessous, en reprenant leur nom latin, mais également leurs appellations vernaculaires en anglais et en français lorsque celles-ci existent. Ces insectes ont été sélectionnés en fonction de la probabilité de les rencontrer dans des échantillons alimentaires. Des photos de ces espèces sont présentées en Annexe 2 à ce document.
- Du matériel génétique d'insectes issus de la banque d'ADN constituée par le CRA-W. Les espèces concernées sont reprises dans le Tableau 3 ci-après.
- Des produits dérivés d'insectes destinés à l'alimentation humaine dont l'ADN a été extrait en 2015 pour les besoins d'un autre TFE (Tableau 4).
- Des produits dérivés d'insectes destinés à l'alimentation animale. Ces échantillons ont été fournis par différentes entreprises membres de l'IPIFF. Pour des raisons de confidentialité imposées par les firmes ayant fourni ces échantillons, leurs noms ne peuvent être

mentionnés, seul un numéro d'échantillon sera donc repris dans la présentation des résultats. Les différents échantillons de ce type sont repris dans le tableau ci-dessous (Tableau 5). Ces échantillons réels constituent des farines formées à partir de *H. illucens*, *T. molitor*, *A. diaperinus*, *L. migratoria* ou encore *Grylloides sigillatus* Walker 1869 (Orthoptera : Gryllidae).

- Du matériel génétique de quelques espèces animales et végétales n'appartenant pas à la classe des insectes. Ces différents échantillons sont repris dans le Tableau 6 présenté ci-dessous. La colonne intitulée « nom latin » reprend le niveau taxonomique le plus bas ayant pu être déterminé. Dans le cas où ce n'est pas l'espèce, le niveau est indiqué entre parenthèses.

Dans tous les tableaux présentés ci-dessous, les cases non complétées correspondent à des espèces pour lesquelles les noms vernaculaires n'ont pu être trouvés.

Tableau 2 - Liste des insectes reçus de l'unité d'entomologie fonctionnelle et évolutive de Gembloux Agro-Bio Tech

N° échantillon	Nom latin	Nom français	Nom anglais	Ordre	Famille
CRL 2712	<i>Bibio marci</i>	Mouche de la Saint-Marc	St.Mark's fly	Diptères	Bibionidae
CRL 2713	<i>Calliphora vicina</i>	Mouche bleue	Blow fly	Diptères	Calliphoridae
CRL 2714	<i>Sarcophaga carnaria</i>	Mouche grise de la viande	Common fresh fly	Diptères	Sarcophagidae
CRL 2715	<i>Bobylius major</i>	Grand bombyle	Large bee-fly	Diptères	Bombyliidae
CRL 2716	<i>Melolontha melolontha</i>	Hanneton commun	Cockchafer	Coléoptères	Melolonthidae
CRL 2717	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Doryphore	Colorado potato beetle	Coléoptères	Chrysomelidae
CRL 2718	<i>Cassida viridis</i>	Casside de la menthe	Green tortoise beetle	Coléoptères	Chrysomelidae
CRL 2719	<i>Cicindela campestris</i>	Cicindèle champêtre	Green tiger beetle	Coléoptères	Cicindelidae
CRL 2720	<i>Nicrophorus humator</i>	Nécrophore ensevelisseur	Black sexton beetle	Coléoptères	Silphidae
CRL 2721	<i>Nicrophorus vespillio</i>	Nécrophore ensevelisseur	Common burying beetle	Coléoptères	Silphidae
CRL 2722	<i>Locusta migratoria</i>	Criquet migrateur	Migratory locust	Orthoptères	Tetrigidae
CRL 2723	<i>Acheta domesticus</i>	Grillon domestique	House cricket	Orthoptères	Gryllidae
CRL 2724	<i>Blatella germanica</i>	Blatte germanique	German cockroach	Blattodea	Blatellidae
CRI 2725	<i>Blatta orientalis</i>	Blatte orientale	Oriental cockroach	Blattodea	Blattidae
CRI 2726	<i>Forficula auricularia</i>	Perce-oreille	Common earwing	Dermaptères	Forficulidae

Tableau 3 - Liste des ADN d'insectes issus de la banque du CRA-W

N° échantillon	Nom latin	Nom français	Nom anglais	Ordre	Famille
GMO 043	<i>Bombyx mori</i>	Ver à soie	Silkworm	Lépidoptères	Bombycidae
GMO 044	<i>Tenebrio molitor</i>	Ver de farine	Mealworm	Coléoptères	Tenebrionidae
CRL 2044	<i>Locusta migratoria</i>	Criquet migrateur	Migratory locust	Orthoptères	Acrididae
CRL 2045	<i>Acheta domesticus</i>	Grillon domestique	House cricket	Orthoptères	Gryllidae
CRL 2046	<i>Gryllus bimaculatus</i>	Grillon provençal	Mediterranean field cricket	Orthoptères	Gryllidae
CRL 2047	<i>Gryllus assimilis</i>	Grillon des steppes	Jamaican field cricket	Orthoptères	Gryllidae
CRL 2048	<i>Pachnoda butana</i>	/	/	Coléoptères	Cetoniidae
CRL 2049	<i>Tenebrio molitor</i>	Ver de farine	Mealworm	Coléoptères	Tenebrionidae
CRL 2050	<i>Zophobas morio</i>	Ver de farine géant	Superworm	Coléoptères	Tenebrionidae
CRL 2051	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Ver buffalo	Lesser mealworm	Coléoptères	Tenebrionidae
CRL 2241	<i>Hermetia illucens</i>	Mouche soldat noir	Black soldier fly	Diptères	Stratiomyidae
CRL 2461	<i>Carabus sp.</i>	Carabe	Ground beetle	Coléoptères	Carabidae
CRL 2462	<i>Aphis sp.</i>	Puceron	Aphid	Hémiptères	Aphididae
CRL 2463	<i>Episyrphus sp.</i>	Syrphe	Hoverfly	Diptères	Syrphidae
CRL 2464	<i>Staphylinus sp.</i>	Staphylin	/	Coléoptères	Staphilinidae
CRL 2465	<i>Stomoxys calcitrans</i>	Mouche charbonneuse	Stable fly	Diptères	Anthomyiidae
CRL 2466	<i>Apis sp.</i>	Abeille	Bee	Hyménoptères	Apidae
CRL 2467	<i>Anthonomus pomorum</i>	Anthonome du pommier	Apple blossom weevil	Coléoptères	Curculionidae
CRL 2468	<i>Coccinella septempunctata</i>	Coccinelle à 7 points	Seven-spot ladybug	Coléoptères	Coccinellidae
CRL 2469	<i>Chrysoperla carnea</i>	Chrysope	Common green lacewing	Névroptères	Chrysopidae
CRL 2470	<i>Anthocoris sp.</i>	Punaise	True bug	Hémiptères	Anthocoridae
CRL 2471	<i>Bombus terrestris</i>	Bourdon terrestre	Buff-tailed bumblebee	Hyménoptères	Apidae
CRL 2472	<i>Palomena prasina</i>	Punaise des bois	Green shield bug	Hémiptères	Pentatomidae
CRL 2523	<i>Cetonia aurata</i>	Cétoine dorée	Rose chafer	Coléoptères	Cetoniidae
CRL 2524	<i>Gryllus sp.</i>	Grillon	Cricket	Coléoptères	Gryllidae
CRL 2525	<i>Comptonotus sp.</i>	Fourmi noire	Carpenter ant	Hyménoptères	Formicidae
CRL 2526	<i>Vespa sp.</i>	Frelon	Hornet	Hyménoptères	Vespidae
CRL 2527	<i>Vespula sp.</i>	Guêpe	Wasp	Hyménoptères	Vespidae
CRL 2528	<i>Phyrocorus apterus</i>	Gendarme	Firebug	Hémiptères	Pyrocoridae
CRL 2529	<i>Oxythyrea funesta</i>	Cétoine noire	/	Coléoptères	Cetoniidae
CRL 2530	<i>Tabanus sp.</i>	Taon	Horsefly	Diptères	Tabanidae
CRL 2531	<i>Biston betularia</i>	Phalène du bouleau	Peppered moth	Lépidoptères	Geometridae
CRL 2532	<i>Tineola sp.</i>	Mite	Moth	Lépidoptères	Tineidae
CRL 2533	<i>Psylla sp.</i>	Psylle	Jumping plant louse	Hémiptères	Psyllidae
CRL 2534	<i>Scarabaeus sp.</i>	Scarabée	Dung beetle	Coléoptères	Scarabidae

Tableau 4 - Liste des aliments processés pour alimentation humaine

N° échantillon	Nature de l'échantillon
CRL 2502	Chenilles de <i>Galleria mellonella</i> au paprika
CRL 2504	Hamburger d' <i>Alphitobius diaperinus</i> et de légumes
CRL 2505	Boules apéritives au <i>Tenebrio molitor</i>

Tableau 5 - Liste des farines d'insectes analysées

Numéro d'échantillon	Espèce d'insecte concernée
CRL 2697	<i>Hermetia illucens</i> n°1
CRL 2698	<i>Hermetia illucens</i> n°2
CRL 2699	<i>Tenebrio molitor</i> n°1
CRL 2700	<i>Alphitobius diaperinus</i>
CRL 2703	<i>Locusta migratoria</i>
CRL 2704	<i>Hermetia illucens</i> n°3
CRL 2705	<i>Hermetia illucens</i> n°4
CRL 2707	<i>Grylodes sigillatus</i> n°1
CRL 2708	<i>Tenebrio molitor</i> n°2
CRL 2709	<i>Tenebrio molitor</i> n°3
CRL 2710	<i>Grylodes sigillatus</i> n°2

Tableau 6 - Liste des espèces animales et végétales utilisées pour les tests de spécificité

	Nom latin	Nom français	Nom anglais	Nom latin	Nom français	Nom anglais
Mammifères terrestres	<i>Bos taurus</i>	Bœuf	Beef	<i>Equus caballus</i>	Cheval	Horse
	<i>Ovis aries</i>	Mouton	Sheep	<i>Equus asinus</i>	Ane	Donkey
	<i>Capra hircus</i>	Chèvre	Goat	<i>Lepus sp.</i>	Lièvre	Hare
	<i>Cervus elaphus</i>	Cerf	Deer	Leporidae (famille)	Lapin	Rabbit
	<i>Capreolus capreolus</i>	Chevreuil	Roe deer	<i>Homo sapiens</i>	Humain	Human
	<i>Sus scrofa domesticus</i>	Porc	Pork	Muridae (famille)	Rat	Rat
	<i>Sus scrofa scrofa</i>	Sanglier	Wild board			
Mammifères marins	<i>Grampus griseus</i>	Dauphin de Risso	Risso's dolphin	<i>Ziphius cavirostris</i>	Baleine de Cuvier	Cuvier's beaked whale
	Phocidae	Phoque	Earless seal	Phocoenidae (famille)	Marsouin	Porpoise
Oiseaux	<i>Gallus gallus</i>	Poulet	Chicken	<i>Phasianus colchicus</i>	Faisan	Pheasant
	<i>Meleagris gallopavo</i>	Dinde	Turkey	<i>Coturnix japonica</i>	Caille	Quail
	<i>Anser sp.</i>	Oie	Goose	<i>Colombus livia</i>	Pigeon	Pigeon
	<i>Numida meleagris</i>	Pintade	Guinea fowl	<i>Struthio camelus</i>	Autruche	Ostrich
	<i>Cairina moschata</i>	Canard de barbarie	Duck			
Poissons et crustacés	<i>Salmo salar</i>	Saumon	Salmon	<i>Micromesistius poutassou</i>	Merlan bleu	Blue whiting
	<i>Pollachius virens</i>	Lieu noir	Saithe	<i>Sebastes sp.</i>	Sébaste	Rockfish
	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Aiglefin	Haddock	<i>Mallotus villosus</i>	Capelan	Capelin
	<i>Merlangius merlangus</i>	Merlan	Whiting	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau	Mackerel
	<i>Gadus morhua</i>	Cabillaud	Cod	<i>Clupea harengus</i>	Hareng	Atlantic herring
	<i>Lastes niloticus</i>	Perche du nil	Nile perch	<i>Merluccius merluccius</i>	Merlu	European hake
	Batoidea (super-ordre)	Raie	Ray	Moronidae (famille)	Bar	Bass
	<i>Sprattus sprattus</i>	Sprat européen	European sprat	Heterosomata (ordre)	Plie	Plaice
	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine	Sardine	Mullidae (famille)	Rouget	Red mullet
	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Anchois	Anchovy	Pangasiidae (famille)	Pangasus	Pangasius
	<i>Trisopterus luscus</i>	Tacaud	Bib	<i>Limanda sp.</i>	Limande	Dab
	<i>Lophius piscatorius</i>	Lotte	Angler	<i>Theragra chalcogramma</i>	Colin d'Alaska	Alaska pollock
	Hippoglossinae (sous-famille)	Flétan	Halibut	Heterosomata (ordre)	Sole	Flounder
	<i>Glyptocephalus synoglossus</i>	Plie cynoglosse	Witch	<i>Thunnus albacares</i>	Thon jaune	Yellowfin tuna
	<i>Hyperoplus sp.</i>	Sand eel	Sand eel	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	Crabe	Crab
	<i>Tilapia sp.</i>	Tilapia	Tilapia	<i>Gammarus sp.</i>	Gammare (crustacé)	/
	/	Plancton alimentaire	/	<i>Osmerus eperlanus</i>	Eperlan d'Europe	European smelt
	Cyclops (genre)	Cyclops	Cyclops	<i>Penaeus vannamei</i>	Crevette blanche du Pacifique	Whiteleg shrimp
	Daphnia (genre)	Daphnies	Daphnia	Nephropinae (sous-famille)	Langoustines	Scampi
	<i>Artemia salina</i>	Artemie	Artemia	<i>Homarus sp.</i>	Homard	Lobster
	<i>Euphausia pacifica</i>	Krill pacifica	North pacific krill	/	Crevette jumbo	/
	Teuthida (ordre)	Calamar	Squid	<i>Euphasia superba</i>	Krill antarctique	Antarctic krill
<i>Calanus finmarchius</i>	Plancton rouge	Red planctin				
Végétaux	<i>Glycine max</i>	Soja	Soybean	<i>Triticum aestivum</i>	Froment	Wheat
	<i>Brassica napus napus</i>	Colza	Canola	<i>Oryza sativa</i>	Riz	Rice
	<i>Beta vulgaris</i>	Betterave	Sugar beet	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate	Tomato

3. Broyage des échantillons

3.1. Broyage des insectes entiers

Afin d'assurer une extraction la plus optimale possible de l'ADN des différents échantillons, il est requis de procéder à un broyage de ceux-ci. Dans le cas des insectes entiers fournis par Gembloux Agro-Bio Tech, le broyage est effectué à l'aide du broyeur à bol réutilisable Ika Tube Mill (Ika, Staufen, Germany). L'opération est réalisée à une vitesse de 15000 t/min et pendant 2 minutes. L'ensemble des broyats est récupéré dans des cupules de 2 ml (Eppendorf, Hamburg, Germany) ou stocké directement dans les bols. Entre les différents échantillons, le bol doit être consciencieusement lavé au détergent, rincé à l'eau claire et décontaminé à la DNA Erase. De même, l'appareil et le plan de travail sont décontaminés entre chaque broyage.

3.2. Broyage des farines d'insectes

En ce qui concerne les farines d'insectes fournies par l'industrie, le volume des échantillons était beaucoup plus important. Une étape préalable d'homogénéisation de l'échantillon complet fut donc requise, effectuée via le culbuteur Heidolph REAX 20 (Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach, Germany) pendant 1h à raison de 16 tours par minute.

Ensuite, la matrice a été broyée via le Retsch ZM200 (Retsch GmbH, Haan, Germany), sur une première grille, assurant une granulométrie de 2 mm, suivi d'un broyage réduisant la taille des particules à 0,5 mm, tout en veillant à avoir décontaminé de façon adéquate tous les éléments de l'appareil et le plan de travail, comme présenté précédemment.

Cette méthode correspond à ce qui se fait traditionnellement dans l'U16 et est basée sur l'ancienne norme AFNOR XP V 03-020-1 (2000). Néanmoins, pour certaines farines particulièrement grasses, comme celles comprenant du criquet, un colmatage de la grille à 0,5 mm a été observé, se traduisant par une surchauffe du broyeur. Dans cette situation, il a été décidé de se contenter d'un broyage grossier à 2 mm afin de ne pas causer de dommages à l'appareil.

4. Pesée des échantillons

La totalité du broyat ne va pas être soumise au processus d'extraction de l'ADN et des protéines. Afin de prélever une quantité répétable de chacun des échantillons pour l'extraction et les analyses ultérieures, des prises d'essai sont requises. Ainsi, entre 198 et 210 mg de chacun des échantillons broyés sont pesés dans des cupules de 2 ml, en duplicat. A des fins préventives, il est essentiel de procéder à la décontamination complète de la balance et du plan de travail entre les pesées relatives à deux échantillons différents.

5. Extraction de l'ADN

La méthode employée pour extraire les ADN au cours de ce travail de recherche est la méthode au bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB). Cette procédure, couramment utilisée pour les analyses de routine dans l'U16, est un protocole proposé par la norme ISO 21571:2005 et est visible en Annexe 3 à ce document (CEN, 2005). Bien qu'il existe des méthodes beaucoup plus rapides et faciles à effectuer, à l'instar de l'extraction d'ADN par des billes magnétiques, l'extraction au CTAB se caractérise par de meilleurs rendements d'extraction en ADN et par une bonne pureté des extraits, fait extrêmement important afin de s'affranchir de la présence d'inhibiteurs de PCR. Parmi ces derniers, on peut citer les composés phénoliques ou les acides humiques par exemple (Wilson, 1997). Un autre avantage est que les réactifs impliqués (Tableau 7) sont beaucoup moins coûteux que ceux requis pour les extractions automatisées. Les rôles de ceux-ci sont également repris dans le Tableau 7 ci-dessous. En outre, un travail de fin d'études réalisé l'an dernier et comparant l'efficacité de différentes méthodes d'extraction sur des insectes a permis de mettre en lumière de meilleurs résultats pour l'extraction au CTAB (Marsical-Diaz, 2015). Néanmoins, comme on peut le constater au regard des différents réactifs impliqués dans cette méthode, un de ses inconvénients majeurs est l'utilisation de chloroforme, dont les effets néfastes pour la santé et l'environnement ne sont plus à démontrer (Winslow & Gerstner, 1978). Afin de se préserver de ces risques, il importe de procéder à ces étapes sous hotte chimique. Un autre inconvénient est le nombre élevé de manipulations des cupules requis pour mener à bien l'extraction, ce qui augmente de façon considérable le risque de contamination des extraits.

Tableau 7 - Liste et rôle des différents réactifs impliqués dans l'extraction au CTAB

Réactif	Description du/des rôle(s)
CTAB I	La combinaison de haute température (60°C) et la présence du tampon CTAB I vont permettre de provoquer la lyse des cellules, étape indispensable à la collecte du matériel génétique contenu dans celles-ci. La présence d'EDTA permet d'inhiber l'activité des nucléases présentes dans l'extrait en chélatant les éléments métalliques nécessaires à l'activité de ces enzymes.
CTAB II	Le CTAB II joue le rôle de tampon de précipitation de l'ADN grâce au sel qu'il contient, qui permet de favoriser le maintien de l'ADN sous forme de doubles brins, par augmentation de la force ionique et neutralisation des charges.
CTAB III	Le CTAB III joue le rôle de tampon d'éluion. Il contient également du sel permettant la précipitation de l'ADN.
Protéinase K	Dégradation des protéines, et donc des nucléases éventuelles.
RNase A	Dégradation des ARN.
Chloroforme	Extraction liquide-liquide permettant d'éliminer les protéines et les éventuelles matières grasses présentes à l'interface.
Isopropanol	Précipitation de l'ADN.
Ethanol 70%	Lavage de l'ADN extrait.
Eau milli-Q	Re-suspension de l'ADN en fin d'extraction + témoin d'extraction.

Signalons que les différentes étapes de centrifugation ont été effectuées avec la centrifugeuse Eppendorf Centrifuge 5424 (Eppendorf, Hamburg, Germany) et que la dernière étape du protocole, à savoir l'évaporation de l'éthanol 70% se fait via le concentrateur-évaporateur Eppendorf Concentrator Plus (Eppendorf, Hamburg, Germany). De plus, parallèlement aux échantillons, un témoin d'extraction subit l'ensemble du protocole, ce dernier devant, *in fine*, être exempt de toute trace d'ADN.

6. Extraction protéique

Une méthode alternative de détection des insectes dans des matrices alimentaires pourrait être la recherche de protéines spécifiques à ceux-ci. L'objectif principal de l'analyse protéique effectuée au cours de ce travail est de déterminer l'impact éventuel du processing industriel sur le contenu en protéines des insectes. En effet, un traitement thermique pourrait par exemple s'avérer responsable de la dénaturation de certaines protéines caractéristiques des insectes, ce qui s'avérerait être un inconvénient pour leur détection si les protéines caractéristiques retenues sont concernées par ces phénomènes. De plus, cette analyse a été effectuée dans le but de déterminer les possibilités d'authentification d'insectes dans les aliments sur base de leur contenu en protéine.

La liste des échantillons utilisés pour cette analyse est reprise dans le Tableau 8 présenté ci-dessous. La démarche se base sur l'analyse de broyats d'insectes entiers ainsi que de farines produites en industrie à partir de ces mêmes espèces. Pour chacun des échantillons, 3 pesées de 200 mg chacune ont été effectuées, représentant 3 réplicats.

Tableau 8 - Liste des échantillons pour extraction protéique

N°	Espèce	Type d'échantillon	Origine	N° CRL
Insecte n°1				
1.1	<i>Hermetia illucens</i>	insectes broyés au labo	CRA-W	2241
1.2	<i>Hermetia illucens</i>	farine commerciale	Firme 1	2697
1.3	<i>Hermetia illucens</i>	farine commerciale	Firme 2	2705
1.4	<i>Hermetia illucens</i>	farine commerciale	Firme 2	2704
1.6	<i>Hermetia illucens</i>	farine protéine + chitine	Firme 1	2274
1.7	<i>Hermetia illucens</i>	farine protéines hydrolysées	Firme 1	2275
1.8	<i>Hermetia illucens</i>	farine commerciale	Firme 1	2276
Insecte n°2				
2.1	<i>Alphitobius diaperinus</i>	insectes broyés au labo	CRA-W	2050
2.2	<i>Alphitobius diaperinus</i>	farine commerciale	Firme 4	2700
Insecte n°3				
3.1	<i>Gryllus assimilis</i>	insectes broyés au labo	CRA-W	2047
3.2	<i>Gryllus assimilis</i>	farine commerciale	Firme 5	2703
Insecte n°4				
4.1	<i>Tenebrio Molitor</i>	insectes broyés au labo	CRA-W	2049
4.2	<i>Tenebrio Molitor</i>	farine commerciale	Firme 6	2699
4.3	<i>Tenebrio Molitor</i>	farine commerciale	Firme 7	2709

L'extraction protéique a été effectuée au TCA/acétone, suivie d'une précipitation et d'une purification des protéines au moyen du kit 2-D Clean-Up de GE Healthcare (Lecrenier et al., 2016).

La première étape de la méthode consiste à éliminer les impuretés des différents échantillons. Ainsi, les graisses, molécules apolaires, vont être éliminées via ajout d'acétone (Merck, Darmstadt, Germany), solvant lui-même apolaire. Au cours de cette phase, les différentes solutions employées contiennent également du DTT (Merck, Darmstadt, Germany), qui a pour rôle d'ouvrir les ponts

disulfures contenus dans les protéines, de même que du TCA, qui assure la précipitation de ces dernières. Après élimination des impuretés, les protéines extraites dans du DLA.

Avant de débiter la purification et la précipitation des protéines avec le kit 2D-Clean Up (GE Healthcare Life Sciences Europe, Diegem, Belgium), il est requis d'effectuer le test colorimétrique de Pierce® (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) dans le but de doser les protéines extraites. Pour ce faire, 10 µl des différentes solutions d'étalonnage contenant entre 0 et 20 µg/µl de protéines vont être placés dans la première colonne d'une plaque multi-puits, permettant ainsi la constitution d'une droite de calibration (Figure 12). Le coefficient de régression R^2 doit être supérieur à 0,99 pour assurer une interprétation précise des résultats.

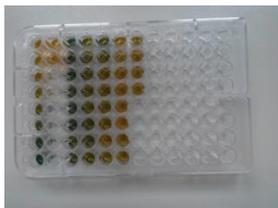


Figure 12 - Plaque multi-puits. La première colonne correspond à la calibration.

Dans la deuxième colonne de la plaque, on va placer 9 µl d'eau et 1 µl de DLA, en 2 répétitions, représentant le *blanco*. Le reste de la plaque est dédié aux différents extraits protéiques à analyser. Pour chaque extrait, 1 µl va être placé en deux répétitions dans 9 µl d'eau. Ensuite, 150 µl du réactif de Pierce vont être ajoutés rapidement dans les puits utilisés. La plaque est alors placée à l'obscurité pendant 5 minutes. La lecture de l'absorbance à 655 nm est alors effectuée via le iMark Microplate Reader (BioRad, Hercules, USA). Grâce à la droite d'étalonnage, l'appareil fournit directement les concentrations en protéines des différents échantillons. Par calcul, il est alors possible de déterminer le volume d'échantillon devant être utilisé pour la purification, entre 1 et 100 µg de protéines seulement pouvant être pris en charge par le kit 2D Clean-Up. Pour la précision des calculs, il convient de retrancher la valeur de concentration en protéines dans le DLA aux valeurs obtenues pour les échantillons.

Le principe du 2-D Clean-Up est de permettre la précipitation sélective des protéines extraites, à l'aide de tampons de précipitation et de co-précipitation, les impuretés et substances interférentes telles que les détergents, sels, lipides, acides nucléiques et composés phénoliques restant en solution. Après élimination du surnageant et nettoyage du culot à l'aide d'un tampon de lavage, les protéines sont remises en suspension dans un solvant compatible avec l'analyse par MS. Les protocoles d'extraction et de purification complets sont visibles en Annexe 4 à ce document.

7. Estimation de la qualité des ADN extraits

Une fois l'ADN extraits des différents échantillons, il importe de doser celui-ci, ainsi que de déterminer sa pureté, dans le sens où des ARN, des protéines ou des composés phénoliques peuvent être co-extraits. Ainsi, une méthode simple et rapide peut être utilisée, à savoir la spectrophotométrie UV. Dans ce cas, l'analyse a été effectuée via le NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop products, Wilmington, USA). Pour effectuer le dosage, exprimé en ng d'ADN par μl de solution, il suffit de déposer 2 μl de la solution d'ADN sur le socle optique de l'appareil, de refermer le couvercle et de lancer l'analyse. Le volume déposé est donc extrêmement restreint par rapport à la quantité totale de solution disponible, ce qui constitue un avantage important de cette technique. De plus, le spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 présente une large gamme de linéarité, ce qui permet d'analyser les extraits sans devoir les diluer.

Le principe de l'analyse est de doser la quantité de lumière UV absorbée à 260 nm, longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de l'ADN.

Pour déterminer la pureté des extraits, il suffit de comparer les ratios d'absorbance à 260 et 280 nm (A_{260}/A_{280}) ainsi qu'à 260 et 230 nm (A_{260}/A_{230}). En effet, sachant que les cycles aromatiques de certains acides aminés, à savoir la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, absorbent dans l'UV à une longueur d'onde de 280 nm, il est possible, via le ratio A_{260}/A_{280} d'observer la présence d'éventuelles protéines dans l'extrait.

De même, étant donné que les composés aromatiques et phénoliques ont un maximum d'absorption à 230 nm, l'étude du ratio A_{260}/A_{230} permet de détecter leur présence dans les extraits. Les valeurs de références souhaitées pour ces deux ratios sont respectivement comprises en 1,8 et 2,0 pour le ratio A_{260}/A_{280} et de 2,0 et 2,2 pour le ratio A_{260}/A_{230} . Néanmoins, lorsque ces valeurs indicatives n'ont pas été observées, il a tout de même été décidé de procéder à une analyse PCR sur les extraits, étant donné la lourdeur de l'extraction d'ADN au CTAB et le manque de disponibilité des matières premières.

L'inconvénient majeur de la spectrophotométrie est qu'elle va doser simultanément tous les acides nucléiques, c'est-à-dire les ADN simples et doubles brins et les ARN. En conséquence, l'analyse ne fournit qu'une appréciation non-absolue de la quantité d'ADN présent.

8. Sélection des amorces et sondes pour PCR en temps réel

8.1. Recherche de séquences cibles

Choix des cibles candidates potentielles

Pour commencer, le premier gène qui a été investigué code pour la sous-unité 1 de l'enzyme cytochrome C oxydase, intervenant dans la chaîne respiratoire au niveau de la membrane mitochondriale. Ce gène a été fortement utilisé à des fins taxonomiques pour permettre la classification des insectes et le développement du DNA barcoding. Étant donné ce paramètre, les séquences de ce gène ont surtout été étudiées dans le but de concevoir des cibles spécifiques à certaines espèces.

Le second gène concerné par ces recherches se nomme *wingless*. Il s'agit d'un gène nucléaire qui exerce un rôle dans le développement des ailes et du système digestif des insectes (Werner et al., 2010). Ce gène a été utilisé en taxonomie au sein de l'ordre des Lépidoptères, et plus précisément pour les individus de la famille des Nymphalidae (Brower & Desalle, 1998).

Il a ensuite été décidé de s'intéresser aux gènes codant pour les ARN ribosomiques. Des recherches ayant déjà été menées sur l'ARN 28s, composant la plus grande sous-unité des ribosomes eucaryotes, et n'ayant fournis aucun résultat probant (Mariscal-Diaz, 2015). Il a été décidé de se tourner vers l'ARN 18s, composant la petite sous-unité de ces mêmes ribosomes. L'intérêt de cet ARN est qu'il présente des portions extrêmement conservées au sein du règne animal, mais aussi d'autres régions qui ont subi une évolution divergente (Hillis et al., 2008).

Les séquences codant pour le facteur d'élongation 1α ont également été choisies. Ce type de protéine est impliqué au niveau des ribosomes dans le processus de traduction des ARN messagers en protéines. Le facteur d'élongation 1α présente une évolution lente et a été utilisé à des fins phylogéniques, notamment au sein de l'ordre des Lépidoptères (Kim et al., 2010 ; Roger et al., 2009 ; Simon et al., 2010).

Le facteur d'élongation α semble également être un bon candidat pour le développement de cibles PCR spécifiques. Selon Maroni et al., 1993 : « il s'agit d'un gène impliqué dans la liaison GTP-dépendante des ARN de transferts au site accepteur du ribosome au cours de la traduction ». Ce gène nucléaire a été utilisé à des fins taxonomiques car il présente une séquence bien conservée, permettent d'établir des relations à des niveaux supérieurs à l'espèce, tel que l'ordre (Cho et al., 1995). Il est important de mentionner que le facteur d'élongation α , bien qu'étant nucléaire, est rencontré en doubles copies chez certains insectes, ces deux copies présentant des séquences nucléotidiques différentes (Danforth & Ji, 1998 ; Djernaes & Damgaard, 2006).

Une autre stratégie de recherche des gènes candidats a aussi été envisagée. Elle consiste à collecter le génome d'un insecte d'intérêt sur le NCBI et à lancer une recherche de séquences hautement similaires au sein de la base de données à l'aide de l'outil NCBI Blast. Les résultats obtenus ont permis de repérer trois gènes candidats supplémentaires, codant pour la lectine de type C, la 6-phosphogluconate déshydrogénase et la sous-unité 1 du facteur d'épissage 3B.

Constitution d'une base de données de séquences pour chacune des cibles candidates

Pour chacun des gènes candidats sélectionnés sur base de la littérature, la base de données NCBI Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) a été consultée afin de collecter les séquences nucléotidiques pour un nombre représentatif d'espèces d'insectes.

Une liste de base d'insectes de nos régions a été constituée à cette fin à partir de deux ouvrages de référence, « Insectes de France et d'Europe occidentale » de Michaël Chinery et « Insectes d'Europe » de Heiko Bellmann (Annexe 5). Une attention toute particulière a été portée sur l'intégration dans cette liste d'espèces susceptibles de se retrouver dans des échantillons alimentaires, même de façon accidentelle. Les dix insectes autorisés par l'AFSCA pour la consommation humaine y sont donc repris.

Pour chacun des insectes de cette liste, la séquence du gène considéré a été collectée et reprise dans un fichier texte sous le format FASTA, c'est-à-dire en précédant chacune des séquences du symbole « > » et d'un intitulé, à savoir le nom de l'espèce généralement. Signalons que, lorsque plusieurs résultats étaient disponibles, comme c'était par exemple le cas pour *H. illucens*, la séquence comportant le plus grand nombre de nucléotides a été retenue.

Néanmoins, il est rapidement apparu que cette liste ne pourrait pas être suivie pour tous les gènes investigués, les séquences pour tous les insectes choisis n'étant pas toujours disponibles. Il a donc été décidé de s'en éloigner en fonction des séquences disponibles pour chacun des gènes étudiés, tout en veillant à sélectionner des espèces représentant une diversité satisfaisante.

Alignement et choix des amorces et sondes

Une fois qu'un nombre satisfaisant de séquences a été collecté pour un gène candidat donné, un alignement multiple a été réalisé à l'aide de l'outil informatique Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Tout d'abord, un ensemble de séquences représentant une grande diversité d'ordres d'insectes ont été alignées. Avant de débiter l'analyse et l'interprétation des alignements, il a été décidé d'utiliser une autre fonction de cet outil, à savoir la capacité à produire des arbres phylogénétiques, dont un exemple réduit figure ci-dessous (Figure 13).

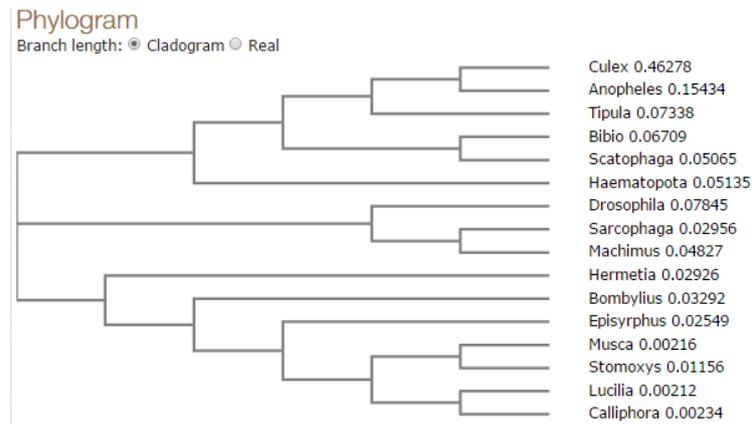


Figure 13 - Exemple d'arbre phylogénétique pouvant être obtenu à l'aide de l'outil informatique Clustal Omega

Grâce à l'observation de ces arbres, différentes pistes peuvent être envisagées. Ainsi, si des espèces appartenant à un même ordre sont rassemblées dans une même branche de l'arbre, ceci peut être le signe d'une bonne conservation du gène étudié au sein de l'ordre.

Une fois cette étude informative réalisée, les différentes séquences ont été analysées. Deux optiques ont été envisagées (Figure 14):

- La recherche de zones conservées, susceptibles de permettre la sélection d’amorces et de sondes permettant la détection de niveaux taxonomiques supérieurs à l’espèce ;
- La recherche de zones divergentes, susceptibles de permettre le choix d’amorces et de sondes permettant la détection spécifique d’espèces d’intérêt.

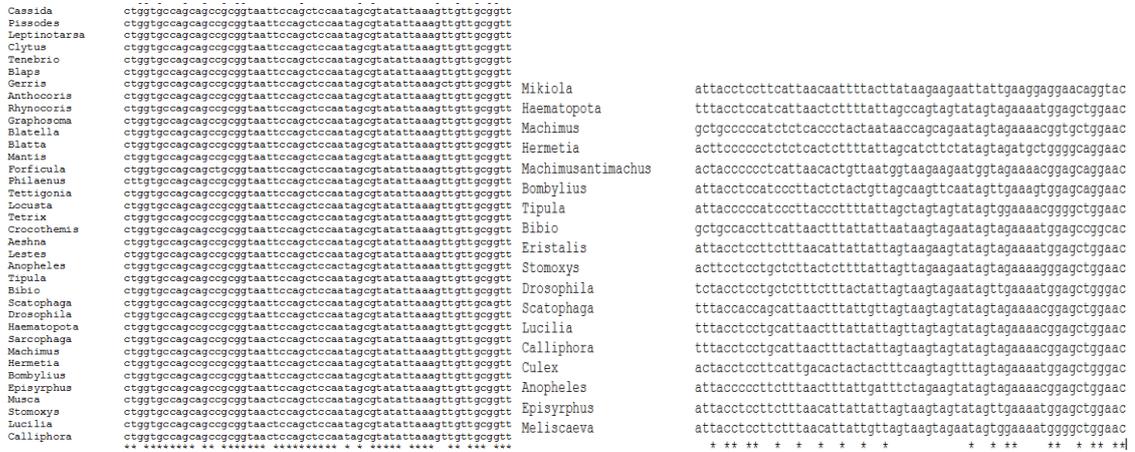


Figure 14 - Alignements représentant les deux optiques d'analyse envisagées. L'alignement de gauche montre une région extrêmement conservée, tandis que celui de droite illustre la présence de zones bien plus divergentes. La présence du symbole « * » en bas de l'alignement signifie que le nucléotide est conservé chez toutes les espèces alignées

Les alignements ont été analysés à l’aide d’un code couleur conservé tout au long de la recherche, facilitant la perception de zones d’intérêt. Une fois les zones d’intérêt repérées, des oligonucléotides pour la PCR ont pu être sélectionnés, tout en respectant ces règles de bases :

- Les amorces doivent idéalement avoir une longueur comprise entre 20 et 25 nucléotides, une température de fusion (T_m) d’environ 60°C ainsi qu’un contenu en guanine et en cytosine (%_{G-C}) entre 40 et 60%.
- Les sondes doivent idéalement avoir une longueur comprise entre 25 et 35 nucléotides, un T_m de 68-70°C (ou supérieur de 10°C au T_m des amorces) et un %_{G-C} entre 40 et 60%. En outre, la sonde ne doit pas avoir une guanine à son extrémité 5’, ce nucléotide exerçant une action suppressive sur la fluorescence du *reporter*.

Pour tous les oligomères, il faut également veiller à éviter la succession de plus de 4 bases identiques, de même que la possibilité de formation de structures secondaires.

La longueur de l’amplicon ne doit pas non plus être trop importante. En effet, un amplicon de plus petite taille, si possible de moins de 100 à 120 paires de bases, facilitera l’obtention d’un résultat positif lors de l’analyse de produits fortement transformés.

Afin d’évaluer ces facteurs primordiaux, le programme informatique Primer Express (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) a été utilisé, ce dernier permettant non seulement d’obtenir les valeurs théoriques de ces différents paramètres (T_m , %_{G-C}, structures secondaires).

Après optimisation de ces différents paramètres, il faut encore vérifier quel brin est le plus adapté pour le positionnement de la sonde afin qu’elle contienne moins de G que de C et que l’amorce forward se trouve à proximité pour permettre à l’activité exonucléasique de la polymérase d’exercer au plus vite son action sur la sonde une fois le processus d’élongation entamé. La

conversion de la séquence en son inverse complémentaire a été réalisée à l'aide du programme Primer Express.

Une fois les séquences définies, les amorces et sondes ont été commandées auprès de la firme Eurogentec (Liège, Belgium). Les oligomères sont envoyés par la firme sous forme lyophilisée et sont conservés au réfrigérateur. Avant utilisation, ils doivent être resuspendus dans un volume d'eau de qualité PCR pour les amener à une concentration de 100 μ M, puis dilués pour arriver à la concentration de travail adéquate pour l'analyse par PCR en temps réel, à savoir 5 μ M pour les amorces et 9 μ M pour les sondes dans un premier temps.

8.2. Autres oligomères

Tout d'abord, la société Primer Design, qui se targue de pouvoir concevoir des kits spécifiques sur demande, a été sollicitée. Ainsi, il lui a été demandé de concevoir un set d'amorces et une sonde spécifique à *T. molitor* dont les performances ont été comparées avec celles des oligomères conçus au cours de ce travail. Primer Design a fourni les informations suivantes sur son test de détection :

- Le système cible le gène CDH1, responsable de la synthèse de la cadhérine 1, une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion entre cellules (NCBI, 2016). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=999>, consulté le 4/05/16)
- Les séquences des amorces et de la sonde ainsi que les Tm et les contenus en bases G et C

En raison du coût important du kit, il a dans un premier temps été décidé de recommander les amorces et sondes et de les utiliser dans les conditions standards, c'est-à-dire avec l'universal master mix Diagenode (Liège, Belgium) et les concentrations présentées auparavant, constituant une cible nommé Cadherin-Genesig2. Ensuite, dans un objectif de gain de sensibilité, d'autres amorces et sondes ont été conçues sur le même gène, constituant la cible Cadherin-CRAW.

Enfin, deux systèmes spécifiques à la mouche soldat noire *H. illucens* ont été conçus par Aline Marien de l'U16, nommés HI-MITO1 et HI-MITO2. Ces dernières ont été créées, comme leur nom l'indique, à partir de la séquence complète de l'ADN mitochondrial d'*H. illucens*. Après analyse de l'amplicon sur NCBI, il apparaît que le gène ciblé code pour la sous-unité III de l'enzyme cytochrome C oxydase, également appelé COIII.

9. Tests par PCR en temps réel

Les différents tests par PCR en temps réel effectués au cours de ce travail de fin d'études ont tous été réalisés sur le même appareil, à savoir le thermocycleur Applied Biosystems 7500 Fast Real Time System (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA).

Les plaques PCR à 96 puits (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) ont tout d'abord été préparées en suivant un modèle de plaque informatisé disponible sur les serveurs de l'U16 permettant de calculer le volume de chacun des réactifs à adjoindre en fonction du nombre de réactions à effectuer.

Pour les PCR en temps réel avec sonde Taqman, les volumes de chacun des réactifs employés sont repris dans le Tableau 9 ci-dessous, pour un volume total de 22,5 µl de mix par puit.

Tableau 9 - Volume des réactifs entrant en jeu dans la PCR en temps réel avec sonde Taqman

Réactif	Volume (µl)
Eau MilliQ (ou de qualité équivalente)	6,8
Amorces <i>forward</i> et <i>reverse</i> à 5 µM	1,7
Sonde TaqMan 9 µM	1,5
Master Mix Diagenode® + référence passive	12,5

En cas de PCR « multiplex », chacune des sondes est ajoutée à raison de 1,5 µl par puits, le volume d'eau MilliQ s'en trouve donc réduit à 3,6 µl.

La référence passive (aussi connue sous le nom de ROX) ajoutée au Master Mix Diagenode® (Diagenode, Seraing, Belgium) à raison de 2,8 µl/ml dans le cas du thermocycleur Applied Biosystems 7500. Ce constituant va avoir pour but de normaliser la variabilité intrinsèque à chaque puit. Cette variabilité peut être due à une illumination inégale, de légères variations optiques ou encore à l'apparition de condensation (Thermo Fisher Scientific, 2012). Cette normalisation est basée sur l'utilisation de la formule suivante :

$$S = \frac{FAM_x}{ROX_x} - \frac{FAM_{BL}}{ROX_{BL}}$$

Avec :

- FAM_x la fluorescence émise par le reporter FAM (ou un autre reporter) après x cycles
- ROX_x la fluorescence émise par la référence passive ROX après x cycles
- FAM_{BL} la fluorescence émise par le reporter FAM (ou un autre reporter) pendant la ligne de base
- ROX_{BL} la fluorescence émise par la référence passive ROX pendant la ligne de base

Le mélange comprenant ces différents éléments porte le nom de mix PCR et va être placé dans chacun des puits à raison de 22,5 µl, en ayant auparavant déposé dans chacun desdits puits un volume de 2,5 µl de la solution d'ADN à analyser ayant été au préalable vortexée, correspondant à une quantité située entre 10 et 100 ng d'ADN. Les réactions PCR ont été réalisées en 3 répétitions pour l'extrait brut et l'extrait dilué. Pour ce faire, chacune des dilutions a dû être effectuée au cas par cas, en fonction de la concentration en ng/µl obtenue par spectrophotométrie, afin de se trouver dans la gamme recommandée. Le volume final de mélange réactionnel dans chaque puits est donc de 25 µl.

Dans le cas du kit Primer Design spécifique à *T. molitor* (Genesig, Chandler's Ford, UK), les différents composants, à savoir les amorces et sondes et les divers témoins doivent être mis en suspension dans des volumes adéquats d'eau ou de tampon (Annexe 6). Pour effectuer la PCR, chaque puits doit être rempli comme présenté dans le Tableau 10 avec un volume final de 20 µl par puits. Le protocole pour la PCR varie donc légèrement. Il faut en outre utiliser un master mix produit par la firme, intitulé oasig™ lyophilised 2X qPCR Mastermix (Genesig, Chandler's Ford, UK), qui doit être reconstitué par ajout de 525 µl de tampon de re-suspension ainsi que par 10 µl de ROX.

Tableau 10 - Volume des réactifs entrant en jeu dans la PCR effectuée avec le kit Primer Design proposé pour *T. molitor*

Réactif	Volume (µl)
Oasig 2x qPCR Mastermix	10
Mix avec sonde et amorces <i>T.molitor</i>	1
Contrôle interne sonde et amorces	1
Eau exempte de RNase/DNase	3
ADN à analyser	5

En plus des extraits à analyser, dans les deux cas, il est essentiel d'ajouter à chacune des plaques PCR, et pour chacune des cibles testées, différents témoins. Bien entendu, les témoins d'extraction, mentionnés précédemment, doivent se trouver sur la plaque. De même, un témoin négatif ou NTC (No Template Control), dans lequel l'ADN est remplacé par de l'eau de qualité PCR, doit être repris dans l'analyse, permettant de s'assurer qu'aucune contamination ayant pour origine le mix PCR ne se manifeste. Le témoin positif permet quant à lui de vérifier que le mix PCR est bel et bien fonctionnel quand aucun des échantillons ne fournit de résultat positif. Les différents témoins positifs utilisés aux cours de ce TFE sont :

- De l'ADN de *Tenebrio molitor* à 2 ng/µl pour les cibles spécifiques à cet insecte et la cible générale à la classe *Insecta* (CRL 2049) ;
- De l'ADN d'*Hermetia illucens* 2 ng/µl pour la cible spécifique à cette espèce (CRL 2241) ;
- De l'ADN de *Calliphora vicina* 17 ng/µl pour les cibles spécifiques aux Diptères (CRL 2713), *H. illucens* ne répondant étonnement pas avec ces cibles.

Après avoir ajouté les deux composants dans chacun des 96 puits, la plaque est recouverte par un film transparent qui va permettre la lecture optique de la fluorescence émise lors de la réaction d'amplification. Il est primordial de veiller à ce qu'aucun pli ne se forme dans ce film, afin de ne pas perturber la détection. On procède à 2 minutes de centrifugation à l'aide de la centrifugeuse Eppendorf Centrifuge 5810 (Eppendorf, Hamburg, Germany). Après cette phase, et après avoir vérifié l'absence de bulles d'air dans le fond des puits, la plaque peut être insérée dans le thermocycleur Applied Biosystems 7500.

Pour toutes les cibles, le programme PCR utilisé est le suivant :

- Phase 1 : 1 fois 2 minutes à 50°C pour inactiver l'enzyme uracil-DNA-glycosylase, permettant d'éviter les contaminations entre analyses successives (Longo et al., 1990)
- Phase 2 : 1 fois 10 minutes à 95°C pour activer la Taq-polymérase et réaliser une dénaturation initiale de l'ADN

- Phase 3 : 45 fois la répétition d'une étape de 15 secondes à 95°C permettant la dénaturation et d'une étape d'une minute à 60°C permettant l'hybridation des oligomères et l'élongation des brins. La fluorescence émise par chacun des puits est mesurée à la fin de chacune de ces répétitions.

Lorsque le programme a été paramétré, il est nécessaire d'attribuer à chacun des puits un intitulé afin de faciliter l'interprétation ultérieure des résultats ainsi que le nom du détecteur à utiliser. La majorité des sondes utilisées au cours de ce travail présentant un système de type FAM-TAMRA, le détecteur sélectionné doit être capable d'interpréter ce signal. Cependant, d'autres fluorochromes ont également été utilisés, tel le VIC. Un détecteur adéquat doit donc être choisi. Dans le cas du thermocycleur utilisé, la détection est effectuée par une caméra CCD située au-dessus des puits mais réalisant la mesure de la fluorescence dans le fond des puits.

10. Détermination de la spécificité des cibles

Grâce à la collection d'échantillons d'ADN présentée au point 2 de ce chapitre, la spécificité des différentes cibles a pu être évaluée. Additionnellement, 69 ADN d'animaux non insectes et de plantes ont également été testés sur les cibles les plus prometteuses. Selon la directive CAC/GL 74-2010 de la FAO, un minimum de 10 échantillons contenant la séquence cible doivent être testés, de même qu'au moins 10 échantillons ne la contenant pas. Pour les cibles les plus globales, ces contraintes ont pu être satisfaites aisément. Cependant, pour les cibles spécifiques à une espèce déterminée, il n'a pas été possible de se procurer 10 échantillons représentatifs auprès des firmes.

11. Optimisation des concentrations en amorces et en sonde

Lors de toutes les analyses, des concentrations de travail en amorces et en sondes ont été choisies par défaut, respectivement 5 et 9 μM . Pour une des cibles qui s'avérait relativement prometteuse, à savoir la cible 18s, il a été décidé d'élaborer une stratégie d'optimisation de celle-ci, afin d'améliorer les signaux et d'augmenter la précocité du Ct. En effet, ce gain en cycles peut s'avérer intéressant lorsque l'on veut doser des échantillons contenant la cible en faible quantité, par exemple des farines à 0,1%. Pour ce faire, différentes combinaisons de concentrations en amorces et en sondes ont été testées, dans une fourchette de 50% au-dessus et 50% en-dessous des concentrations par défaut. Les concentrations de travail sélectionnées sont 5,7 μM pour les sondes et 7,9 μM pour les amorces.

12. Détermination de la sensibilité des cibles

Pour les cibles PCR nucléaires fournissant des résultats intéressants, une estimation de la sensibilité du test a été effectuée via la méthode de la LOD_6 . Cette dernière consiste à effectuer une série de dilutions d'un échantillon positif contenant un nombre connu de copies. Dans le cas de ce travail, les nombres de copies sélectionnés sont les suivants : 20000, 5000, 1000, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1 et 0,1. Pour les trois premières valeurs, la dilution est effectuée au moyen d'eau de qualité PCR. En revanche, les dilutions contenant un nombre plus faible de copies doivent être faites dans un ADN non compétiteur, tel que de l'ADN de sperme de saumon à 5 ng/ μl . Cette mesure est prise afin d'éviter que des interférences soient amenées par l'eau utilisée pour effectuer les dilutions. La dilution à 0,1 copies est un moyen de vérifier que la série de dilutions a été bien effectuée et que le nombre de copies introduit dans la réaction PCR n'a pas été sous-estimé (AFNOR, 2008). Chacune de ces dilutions doit être analysée en 6 répétitions. La LOD_6 sera considérée comme étant la dilution la plus importante pour laquelle les 6 réplicats fournissent un signal de fluorescence positif

(AFNOR, 2008). Pour la dilution à 0,1 copies, un maximum de 1 réponse positive est accepté. Lors de la détermination de la LOD₆, en raison du volume plus élevé d'ADN utilisé, le volume d'eau impliquée dans la réaction varie par rapport aux analyses effectuées précédemment (Tableau 11).

Tableau 11 - Volume des différents réactifs requis pour composer le master mix lors de l'estimation des LOD

Réactif	Volume (µl)
Eau MilliQ (ou de qualité équivalente)	4,3
Amorces <i>forward</i> et <i>reverse</i> à 5 µM	1,7
Sonde TaqMan 9 µM	1,5
Master Mix Diagenode® + référence passive	12,5

Afin de pouvoir réaliser les dilutions souhaitées, il est requis de connaître la correspondance entre un nombre de copies et la quantité d'ADN à introduire dans la réaction PCR. Pour ce faire, la base de donnée Animal Genome Size a été utilisée (<http://www.genomesize.com/>). Lorsque l'espèce recherchée est disponible dans la base de données, la C-value a été collectée (Tableau 12). Ce paramètre désigne la masse en pg d'une copie d'ADN chez une espèce donnée. A partir des concentrations en ADN mesurées dans les différents extraits et des valeurs des C-values, il est possible de constituer la gamme de dilution requise. Lors de ce type de recherches, il arrive que, pour une espèce donnée, plusieurs résultats soient proposés par Animal Genome Size. Dans ce cas, la C-value reprise dans le Tableau 12 correspond à la moyenne des C-value, avec n le nombre de résultats.

Tableau 12 - C-value pour les différentes espèces utilisées au cours de ce travail de fin d'étude

Espèce	C-value	n
<i>Bombyx mori</i>	0,525	2
<i>Tenebrio molitor</i>	0,52	1
<i>Alphitobius diaperinus</i>	0,28	1
<i>Gammarus sp.</i>	2,17	1
Carabidae	0,23	1
Aphididae	0,57	4
<i>Bombus terrestris</i>	0,53	2
<i>Galleria mellonella</i>	0,5	1
<i>Gryllus sp.</i>	2,25	3
<i>Vespula sp.</i>	0,2	4
Scarabaeidae	1,06	2
Apidae	0,235	6

Espèce	C-value	n
Curculionidae	0,67	6
<i>Calliphora sp.</i>	0,65	1
<i>Sarcophaga sp.</i>	0,71	2
<i>Cassida viridis</i>	0,89	1
<i>Acheta domesticus</i>	2,08	5
<i>Blatta orientalis</i>	3,03	1
<i>Blatella sp.</i>	2,31	1
<i>Locusta migratoria</i>	5,89	5
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	0,46	1
<i>Coccinella sp.</i>	0,43	4
Anthomyiidae	0,73	1

13. Analyse protéique par spectrométrie de masse

Les extraits protéiques obtenus par la méthode au TCA/acétone à partir des différents échantillons sélectionnés ont été remis au professeur Frédéric Francis et expédiés au laboratoire de spectrométrie de masse du Center for Analytical Research and Technology à Liège pour être soumis à une analyse de leur contenu en protéines. L'appareillage utilisé comprend différents éléments, repris dans le Tableau 13 présenté ci-dessous. Pour commencer, les extraits subissent une digestion enzymatique, avec pour résultante le clivage des protéines en peptides de plus petite taille. Ensuite, la séparation des molécules est effectuée par nano HPLC. Cette technologie se caractérise par des colonnes de diamètre (75 μm) et des débits de phase mobile (300 nl/min) très faibles, caractéristiques intéressantes lorsque l'on ne dispose que d'échantillons de très faible volume. A la sortie de la colonne, les protéines vont atteindre le spectromètre de masse. En bref, la spectrométrie de masse consiste à ioniser un composé et à séparer les ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Un spectre est alors produit, représentant le nombre d'ions pour chaque m/z . Elles vont tout d'abord être ionisées par électrospray, un mode d'ionisation à pression atmosphérique (Figure 15). Au cours de cette étape, le liquide va être nébulisé, c'est-à-dire dispersé sous forme de très fines gouttelettes ionisées, constituant ainsi un aérosol. Le système permet également d'évaporer le solvant, grâce à l'effet combiné d'un courant d'air chaud, la concentration en ions s'en trouvant progressivement augmentée. Les différentes molécules entrent également en collision, ce qui complète leur désolvatation. Les ions désolvatés sont orientés vers l'analyseur par un capillaire échantillonneur (Silverstein et al., 2007).

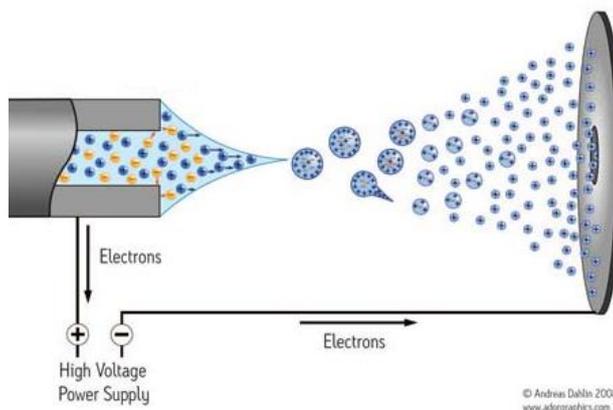


Figure 15 - Représentation schématique de l'ionisation par électrospray

Dans le cas présent, l'analyseur employé est une trappe ionique (Figure 16). Ce système se compose généralement de trois électrodes qui vont permettre, via l'application de potentiels adéquats, de piéger les ions d'intérêt puis de les libérer vers un détecteur permettant de produire le spectre. Cependant, étant donné que l'on travaille en spectrométrie de masse en tandem, une autre propriété de la trappe à ions a été utilisée : l'application de champs oscillants sur l'ensemble des électrodes, permettant d'accroître l'énergie cinétique d'un ion donné. De cette augmentation résultent des collisions entre ions et donc une nouvelle fragmentation (Silverstein et al., 2007).

Matériel et méthode

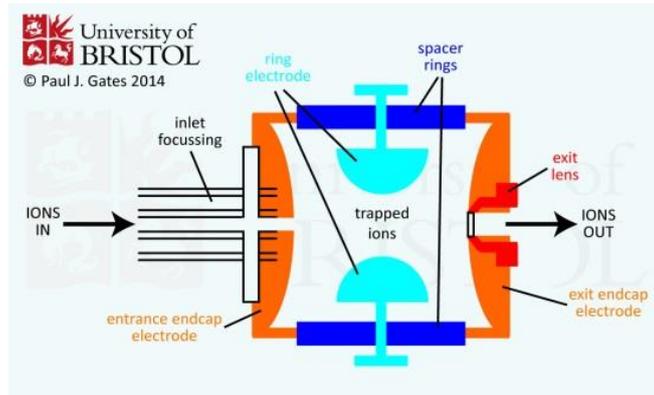


Figure 16 - Schéma d'une trappe ionique (Gates, 2014)

Tableau 13 - Méthode et appareillage utilisés pour l'analyse protéomique par LC-MS/MS

Etape	Méthode	Appareillage
Séparation	HPLC	Dionex nano Ultimate 3000
Ionisation	ESI	/
Sélection des ions	Trappe ionique	Bruker Amazon Speed ETD

Une fois ces étapes terminées, les données ont été traitées avec les logiciels Bruker Data analysis vs 4.0, Mascot et Protein Scape.

Résultats et discussion

1. Recherche d'amorces et de sondes TaqMan pour PCR en temps réel

1.1. Résultats observés pour les analyses bio-informatiques sur les différents gènes candidats

1) Sous-unité 1 de l'enzyme cytochrome oxydase

L'arbre phylogénétique constitué à partir des séquences collectées pour le gène codant pour la sous-unité 1 de l'enzyme cytochrome oxydase ou COI indique que ce gène est relativement bien conservé au sein des ordres des Diptères, des Hyménoptères, des Coléoptères et des Lépidoptères, étant donné que les différentes espèces de ces groupes taxonomiques sont réunies dans les mêmes portions de l'arbre (cet arbre faisant plusieurs pages, il n'est pas disponible en annexe, sa lecture aurait été impossible). Cependant, après avoir procédé à un alignement reprenant l'ensemble des espèces collectées pour le COI, et donc des membres issus de multiples ordres, des divergences importantes dans les séquences ont rapidement été mises en lumière. Après que des alignements inter-ordres aient été réalisés, le même constat a pu être fait. Ainsi, la seule option intéressante qui a pu être prise est de concevoir des oligomères spécifiques au ver de farine *T. molitor*. Ceux-ci ont été intitulés TM-COI-F, TM-COI-R et TM-COI-P respectivement pour les amorces *forward* et *reverse* et la sonde (*probe*).

2) Gène wingless

La réalisation d'un arbre phylogénétique basé sur les séquences collectées sur le NCBI pour le gène *wingless* a montré un potentiel intéressant pour les ordres des Hyménoptères, des Lépidoptères et des Diptères (Annexe 7). Cependant, d'un point de vue alimentaire, les Hyménoptères sont moins intéressants et les Lépidoptères, qui, bien que comportant certaines espèces autorisées, sont relativement marginaux à l'heure actuelle. En ce qui concerne l'ordre des Diptères, il semble que peu d'individus aient déjà subi un séquençage pour ce gène. L'analyse pour le gène *wingless* s'est donc orientée vers un simple alignement reprenant des Coléoptères. L'observation de ces séquences a conduit à la conception d'un jeu d'amorces et d'une sonde spécifique à l'espèce *T. molitor*, nommées TM-WING-F, TM-WING-R et TM-WING-P.

3) Gène codant pour l'ARN ribosomal 18s

De tous les alignements réalisés au cours de ce travail, le gène codant pour l'ARN ribosomal 18s a offert les résultats les plus intéressants en termes de séquences. Si l'arbre phylogénétique réalisé ne semblait pas plus prometteur que les autres, l'observation des séquences a permis la sélection de 2 cibles (Annexe 8):

- Une cible spécifique aux individus de l'ordre des Diptères, dont les oligonucléotides ont été intitulés 18s-DIPT-F, 18s-DIPT-R et 18s-DIPT-P.
- Une cible spécifique à tous les ordres d'insectes excepté celui des Diptères, qui a pu être conçu sur une autre portion du gène de l'ARN 18s, et dont les oligonucléotides ont été intitulés 18s-INS-F, 18s-INS-R et 18s-INS-P.

Après évaluation de ces premières cibles, les alignements ont été réétudiés. Il fut alors décidé d'envisager la réalisation d'une PCR en duplex, mettant en jeu des amorces communes à tous les

insectes, mais deux sondes : la première, 18s-INS pouvant mettre en évidence différents ordres sauf les Diptères, et la seconde, conçue sur la même zone et spécifique aux Diptères. Les deux sondes sont munies de fluorochromes différents, respectivement FAM et VIC, permettant de distinguer l'origine du signal fluorescent lors de l'analyse PCR. Cependant, le niveau de fluorescence étant fortement différent pour les deux sondes, l'interprétation ne pouvait être effectuée avec un *threshold* identique, ce qui complexifiait l'analyse des résultats. Il a donc été décidé d'utiliser deux sondes ayant le fluorochrome FAM afin de gagner en sensibilité, mais en perdant alors la possibilité de distinction entre les Diptères et les autres insectes. En raison de phénomènes d'aspécificité observés avec certaines espèces végétales, il a été décidé, après avoir procédé à de nouvelles analyses bio-informatiques, de tenter d'utiliser des sondes plus courtes, de type MGB, mais toujours munies du fluorochrome FAM. L'avantage des sondes MGB réside dans la possession d'un ligand permettant d'améliorer l'affinité de la sonde à l'ADN, ce qui engendre une hausse importante du T_m par rapport à une sonde traditionnelle et permet de réduire sa taille.

4) Gène codant pour la lectine de type C

Une analyse effectuée sur le NCBI Blast laissait transparaître une certaine conservation du gène codant pour la lectine de type C chez les insectes issus de différents ordres, dont principalement les Diptères et les Lépidoptères. Cependant, deux inconvénients ont engendré l'impossibilité de concevoir quoi que ce soit :

- Les divergences observées entre séquences ;
- L'absence des séquences du gène pour les espèces d'intérêt majeur que sont *T. molitor* et *H. illucens*.

5) Gène codant pour l'enzyme 6-phosphogluconate déshydrogénase

Les séquences disponibles pour ce gène étaient restreintes à l'ordre des Diptères. Etant donné le manque de conservation entre les différentes espèces et l'absence de la séquence pour *H. illucens*, il a été impossible de concevoir des oligomères pour PCR pour le gène codant pour la 6-phosphogluconate déshydrogénase.

6) Gène codant pour la sous-unité 1 du facteur d'épissage 3B

Pour les mêmes raisons que dans le cas de la 6-phosphogluconate déshydrogénase, aucune possibilité de design d'amorces et de sondes PCR n'a été envisageable pour le gène de la sous-unité 1 du facteur d'épissage 3B.

7) Gène codant pour le facteur d'élongation 1 α

Au regard de l'arbre phylogénétique conçu pour les séquences relatives au facteur d'élongation 1α , on aurait pu penser que l'intérêt du gène serait limité, étant donné que seuls les individus appartenant aux ordres des Hyménoptères et des Lépidoptères sont rassemblés dans l'arbre (Annexe 9). Cependant, la réalisation d'un alignement de séquences d'espèces de Diptères a permis de mettre au point *in silico* un jeu d'amorces et une sonde permettant la détection de cet ordre. Ces dernières ont été intitulées 1α -DIPT-F, 1α -DIPT-R et 1α -DIPT-P.

1.2. Synthèse des différentes amorces et sondes utilisées testées

Le Tableau 14 présenté ci-dessous reprend les séquences des différentes sondes et amorces utilisées au cours de ce travail de fin d'étude, aussi bien celles conçues par voie bio-informatique que celles déjà disponibles au CRA-W.

Tableau 14 - Ensemble des oligomères de PCR conçus par voie bio-informatique et utilisés pour les essais PCR

Nom de l'oligomère	Gène ciblé	Ordre/Espèce visé(e)	Nombre de nucléotides	Tm (°C)	%G-C
18s-INS-F	ARN robosomal 18s	Insectes sauf Diptères	21	54,6	43
18s-INS-R			20	59,5	60
18s-INS-P			30	68,7	50
18s-INS-2F	ARN robosomal 18s	Insectes	21	58,3	48
18s-INS-R			20	59,8	60
18s-INS-P-FAM			27	65,7	52
18s-INS-DIP-VIC			35	68,9	43
18s-INS-2F	ARN robosomal 18s	Insectes	21	58,3	48
18s-INS-R			20	59,8	60
18s-INS-MBG2			17	68,0	59
18s-DIPT-MGB2			19	66,0	42
1α-DIPT-F	Facteur d'élongation 1α	Diptères	20	58,9	55
1α-DIPT-R			18	53,8	58
1α-DIPT-P			25	69,4	56
18s-DIPT-F	ARN robosomal 18s	Diptères	26	58,8	38
18s-DIPT-R			27	57,3	37
18s-DIPT-P			29	69,4	48
Cadherin-Genesig-F	Cadhérine	<i>T. molitor</i>	21	57	48
Cadherin-Genesig-R			20	57,1	50
Cadherin-Genesig-P			23	69,3	61
Cadherin-CRAW-2F	Cadhérine	<i>T. molitor</i>	24	58,2	42
Cadherin-CRAW-2R			29	58	34
Cadherin-CRAW-2P			23	69,3	61
TM-WING-F	Gène wingless	<i>T. molitor</i>	23	58,2	43
TM-WING-R			20	58,5	55
TM-WING-P			28	69,7	54
COI-HERM-F	Sous-unité 1 du cytochrome C oxydase	<i>H. illucens</i>	24	59,9	42
COI-HERM-R			24	59,9	42
COI-HERM-P			30	68,4	43
HI-MITO-F	Sous-unité 2 du cytochrome C oxydase	<i>H. illucens</i>	19	49,9	42
HI-MITO-R			19	49,8	47
HI-MITO-P			23	58,5	43
HI-MITO-2F	Sous-unité 2 du cytochrome C oxydase	<i>H. illucens</i>	20	51,1	40
HI-MITO-2R			16	47,1	56
HI-MITO-2P			23	58,5	43

2. Spécificité des cibles

Cette section présente les résultats obtenus pour l'évaluation de la spécificité des différentes cibles testées au cours de ce travail. Ces dernières sont rassemblées en fonction de l'espèce ou du groupe taxonomique visé. Pour chacun des échantillons repris dans ces tableaux, l'analyse se base sur 3 répétitions pour un même échantillon. Pour chaque cible, les échantillons sont divisés en deux tableaux : le premier reprenant les extraits d'ADN issus d'insectes entiers, et le second listant les extraits d'ADN d'échantillons transformés issus de l'industrie. Dans tous les tableaux présentés dans cette partie, une case verte contenant un symbole « + » désigne un résultat positif, et donc une fluorescence supérieure au seuil de fluorescence fixé. A l'inverse, une case contenant le symbole « - » illustre un résultat négatif, signifiant que la séquence ciblée n'a pu être mise en évidence dans l'échantillon. Quant aux cases rouges, elles témoignent de la présence d'un résultat ne correspondant pas aux attentes, qu'il soit positif ou négatif. De plus, dans le cas de certains résultats positifs, le symbole « ! » est utilisé dans le but de mettre en évidence un Ct tardif, c'est-à-dire supérieur à 40 cycles. Les Ct tardifs peuvent avoir différentes origines : un manque de sensibilité de la cible PCR si ce type de cas se présente pour les échantillons que l'on souhaite détecter, une quantité trop faible d'ADN mise en jeu dans la réaction de polymérisation, , une hybridation non optimale car les séquences ne sont pas complémentaires à 100%, une faible contamination,... Enfin, lorsqu'une case comprend les lettres « Nt », cela signifie que l'échantillon n'a pu être testé avec la cible correspondante, la quantité d'ADN étant épuisée. Dans le cas particulier de la cible Duplex 1 utilisant simultanément 2 sondes, un code couleur supplémentaire est employé. Ainsi, les cases jaunes correspondent aux répondant à la sonde 18s-INS-FAM, tandis que les bleues correspondent à des espèces répondant à la sonde 18s-INS-DIP-VIC. Les cases orange représentent quant à elles les échantillons pour lesquels les deux sondes ont fourni un signal positif.

2.1. Cible spécifique à la classe Insecta excepté les Diptères

Les Tableaux 15 et 16 ci-dessous reprennent les résultats obtenus lors des différentes PCR effectuées pour évaluer la cible 18s-INS, qui pour rappel est basée sur la séquence codant pour l'ARN ribosomique 18s et est censée permettre la détection de tous les insectes sauf les Diptères. En plus du code couleur décrit précédemment, les cases bleues représentent les insectes appartenant à l'ordre des Diptères, qui doivent, selon l'analyse bio-informatique, ne fournir aucun signal positif.

Globalement, le premier élément qui ressort de l'analyse du Tableau 15 est que, comme attendu, les Diptères ne sont pas reconnus par la cible 18s-INS. On constate que, pour 2 espèces, un résultat négatif est observé alors que le contraire était prévu. Ainsi, pour les CRL 2716 et 2721, aucune cause ne peut être trouvée, si ce n'est une variation plus importante de la séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARN 18s au niveau de la cible visée. Cette hypothèse n'a pu être vérifiée, les séquences pour ces deux espèces n'étant pas disponible dans la base de données du NCBI pour ce gène. La cible 18s-INS est également applicable sur des échantillons réels, seuls 2 résultats inattendus étant observés (Tableau 16). Dans le cas du CRL 2705, ceci peut s'expliquer par une probable contamination de l'échantillon d'*H. illucens* par *T. molitor*.

Dans le but de reconnaître un plus large panel d'insectes, il a été décidé d'envisager une PCR en duplex avec une première sonde spécifique aux Diptères et une seconde reconnaissant les autres insectes. Dans le premier cas, repris sous le nom de « Duplex 1 », les sondes étaient munies de fluorochromes différents, permettant de distinguer les Diptères des autres individus. Comme on peut le constater, tous les échantillons d'insectes fournissent un signal positif, à l'exception du CRL 2716, *Melolontha melolontha*. De même, ce Duplex donne les résultats attendus sur les échantillons issus de l'industrie.

La colonne intitulée « Duplex2 » présente les résultats pour l'utilisation en duplex des deux sondes munies du même fluorochrome FAM. Dans ce cas, le code couleur habituel est appliqué. Signalons que certains échantillons n'ont pu être testés avec toutes les cibles, la quantité d'ADN disponible n'étant pas toujours suffisante. L'inconvénient de ce système est qu'il ne permet plus de distinguer les Diptères des autres ordres.

Tableau 15 - Evaluation des cibles basées sur l'ARN 18s, effectuée avec 3 répétitions par échantillon

Ordre	N° échantillon	Nature	Nom français	18s-INS	Duplex 1	Duplex 2
Diptères	CRL 2241	<i>Hermetia illucens</i>	Mouche soldat noire	-	+	+
	CRL 2463	Syrphidae	Syrphe	-	Nt	Nt
	CRL 2465	<i>Stomoxys calcitrans</i>	Mouche charbonneuse	-	Nt	Nt
	CRL 2530	<i>Tabanus sp.</i>	Taon	-	+	+
	CRL 2712	<i>Bibio marci</i>	Bibion	-	+	+
	CRL 2713	<i>Calliphora vicina</i>	Mouche bleue	-	+	+
	CRL 2714	<i>Sarcophaga carnaria</i>	Mouche à damier	-	+	+
	CRL 2715	<i>Bombylius major</i>	Grand bombyle	-	+	+
	GMO 046	<i>Chironomus sp.</i>	Ver de vase rouge	-	+	+
Orthoptères	CRL 2044	<i>Locusta migratoria</i>	Criquet migrateur	+	+	+
	CRL 2045	<i>Acheta domesticus</i>	Grillon domestique	+	+	+
	CRL 2046	<i>Gryllus bimaculatus</i>	Grillon provençal	+	+	+
	CRL 2047	<i>Gryllus assimilis</i>	Grillon des steppes	+	+	+
	CRL 2524	<i>Gryllus sp.</i>	Grillon de provence	!+	+	+
	CRL 2722	<i>Locusta migratoria</i>	Criquet migrateur	+	+	+
	CRL 2723	<i>Acheta domesticus</i>	Grillon domestique	+	+	+
Coléoptères	CRL 2048	<i>Pachnoda butana</i>	Larve de cétoine	+	+	+
	CRL 2049	<i>Tenebrio molitor</i>	Ver de farine	+	+	+
	CRL 2050	<i>Zophobas morio</i>	Ver de farine géant	+	+	+
	CRL 2051	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Ver buffalo	+	+	+
	CRL 2461	<i>Carabus sp.</i>	Carabe	+	Nt	Nt
	CRL 2464	Staphylinidae	Staphylin	+	Nt	Nt
	CRL 2467	Curculionidae	Charançon	+	Nt	Nt
	CRL 2468	Coccinellidae	Coccinelle	+	Nt	Nt
	CRL 2529	<i>Oxythryea funesta</i>	Cétoine noire	+	+	+
	CRL 2534	Scarabidae	Scarabée	+	+	+
	CRL 2716	<i>Melolontha melolontha</i>	Hanneton	-	-	+
	CRL 2717	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Doryphore	+	+	+
	CRL 2718	<i>Cassida viridis</i>	Casside verte	+	+	+

Résultats et discussion

Ordre	N° échantillon	Nature	Nom français	18s-INS	Duplex 1	Duplex 2
Coléoptères	CRL 2719	<i>Cicindela campestris</i>	Cicindèle champêtre	+	+	+
	CRL 2720	<i>Nicrophorus humator</i>	Nécrophore	+	+	+
	CRL 2721	<i>Nicrophorus vespillio</i>	Nécrophore	-	+	+
	CRL 2523	<i>Cetonia aurata</i>	Cétoine dorée	+	+	+
	GMO 044	<i>Tenebrio molitor</i>	Ver de farine	+	+	+
Hémiptères	CRL 2462	Aphididae	Puceron	+	Nt	Nt
	CRL 2470	Anthocoridae	Punaise	+	Nt	Nt
	CRL 2472	<i>Palomena prasina</i>	Punaise des bois	+	Nt	Nt
	CRL 2528	<i>Phyrrocorus apterus</i>	Gendarme	+	+	+
	CRL 2533	<i>Psyllus sp.</i>	Psylle	+	+	+
Hyménoptères	CRL 2466	Apidae	Abeille	+	Nt	Nt
	CRL 2471	<i>Bombus terrestris</i>	Bourdon	+	Nt	Nt
	CRL 2525	<i>Componotus sp.</i>	Fourmis noires	+	+	+
	CRL 2526	<i>Vespa sp.</i>	Frelon	+	+	+
	CRL 2527	<i>Vespula sp.</i>	Guêpe	+	+	+
Névroptères	CRL 2469	<i>Chrysoperla carnea</i>	Chrysope	+	Nt	Nt
Lépidoptères	CRL 2531	<i>Biston betularia</i>	Phalène du bouleau	+	+	+
	CRL 2532	<i>Tineola sp.</i>	Mite	+	Nt	Nt
	GMO 043	<i>Bombyx mori</i>	Ver à soie	+	+	+
Blattodea	CRL 2725	<i>Blatta orientalis</i>	Blatte d'orient	+	+	+
Dermaptères	CRL 2726	<i>Forficula auricularia</i>	Perce-oreilles	+	+	+
Non insectes	Témoin poulet	<i>Gallus gallus</i>	Poulet	-	-	-
	Témoin bœuf	<i>Bos taurus</i>	Bœuf	-	-	-
	Témoin porc	<i>Sus scrofa</i>	Porc	-	-	-
	GMO 045	<i>Gammarus sp.</i>	Gammare	-	!+	!+

Tableau 16 - Evaluation des cibles basées sur l'ARN 18s sur des échantillons issus de l'industrie

N° échantillon	Nature	Nom français	18s-INS	Duplex 1	Duplex 2
CRL 2697	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°1	Mouche soldat noire	-	Nt	Nt
CRL 2698	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°2	Mouche soldat noire	-	+	+
CRL 2704	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°3	Mouche soldat noire	-	+	+
CRL 2705	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°4	Mouche soldat noire	+	+	+
CRL 2707	Farine de <i>Grylloides sigillatus</i>	Grillon domestique	+	+	+
CRL 2710	Farine de <i>Grylloides sigillatus</i> n°2	Grillon domestique	+	+	+
CRL 2504	Hamburger aut <i>Ipshitobius diaperinus</i>	Ver buffalo	+	Nt	Nt
CRL 2505	Boule d'apéros aux <i>Tenebrio molitor</i>	Ver de farine	+	Nt	Nt
CRL 2699	Farine de <i>Tenebrio molitor</i> n°1	Ver de farine	+	+	+
CRL 2700	Farine d' <i>Alphitobius diaperinus</i>	Ver buffalo	+	+	+
CRL 2709	Farine de <i>Tenebrio molitor</i> n°3	Ver de farine	+	+	+
CRL 2502	<i>Galleria mellonella</i> au paprika	Fausse teigne	+	+	+

Le système en duplex avec les deux sondes munies du même fluorochrome FAM (Duplex 2) se montrant assez prometteur, sa spécificité a également été mise à l'épreuve avec 69 autres espèces, animales et végétales. Une seule espèce animale a répondu positivement : les crevettes *Gammarus sp.* Cependant, des problèmes ont été rencontrés avec certaines espèces végétales, telles que la tomate, le froment ou la betterave. Des investigations sur NCBI ont ainsi montré une forte homologie de la séquence choisie du gène de l'ARN 18s entre les insectes et certains végétaux. En outre, un test effectué avec chacune des deux sondes prises séparément a démontré que l'aspécificité provenait de chacune d'entre-elles. Comme mentionné dans la partie « Matériel et méthode », il a donc fallu procéder à une nouvelle analyse bio-informatique afin de concevoir des sondes MGB, plus courtes et permettant théoriquement de supprimer l'aspécificité. Cependant, une fois ces sondes testées, le même problème a été rencontré, couplé à une aspécificité supplémentaire avec certains crustacés.

2.2. Cibles spécifiques à l'ordre des Diptères

Deux cibles spécifiques à l'ordre des Diptères ont été conçues et testées : 18s-DIPT et 1 α -DIPT, respectivement basées sur les gènes codant pour l'ARN 18s et le facteur d'élongation 1 α . Dans les Tableaux 17 et 18 présentés ci-après, les Diptères ont été colorés en bleu pour faciliter la lecture.

Globalement, une simple lecture du Tableau 17 laisse transparaître des résultats décevants. En effet, pour la cible 18s-DIPT, beaucoup d'autres espèces que les Diptères fournissent une réponse positive. A l'inverse, la cible 1 α -DIPT ne reconnaît que 2 espèces parmi tous les échantillons testés. Les résultats du Tableau 18 confirment ces observations. Il ressort donc que la détection spécifique des Diptères ne sera possible avec aucune de ces 2 cibles.

Tableau 17 - Evaluation des cibles 18s-DIPT et 1α-DIPT visant les individus de l'ordre des Diptères

Ordre	N° échantillon	Nature	Nom français	18s-DIPT	1α-DIPT
Diptères	CRL 2241	<i>Hermetia illucens</i>	Mouche soldat noire	+	-
	CRL 2463	Syrphidae	Syrphe	+	-
	CRL 2465	<i>Stomoxys calcitrans</i>	Mouche charbonneuse	+	+
	CRL 2530	<i>Tabanus sp.</i>	Taon	+	-
	CRL 2712	<i>Bibio marci</i>	Bibion	+	-
	CRL 2713	<i>Calliphora vicina</i>	Mouche bleue	+	+
	CRL 2714	<i>Sarcophaga carnaria</i>	Mouche à damier	+	-
	CRL 2715	<i>Bombylius major</i>	Grand bombyle	+	-
	GMO 046	<i>Chironomus sp.</i>	Ver de vase rouge	+	-
Orthoptères	CRL 2044	<i>Locusta migratoria</i>	Criquet migrateur	+	-
	CRL 2045	<i>Acheta domesticus</i>	Grillon domestique	+	-
	CRL 2046	<i>Gryllus bimaculatus</i>	Grillon provençal	+	-
	CRL 2047	<i>Gryllus assimilis</i>	Grillon des steppes	+	-
	CRL 2524	<i>Gryllus sp.</i>	Grillon de provence	+	-
	CRL 2722	<i>Locusta migratoria</i>	Criquet migrateur	+	-
	CRL 2723	<i>Acheta domesticus</i>	Grillon domestique	-	-
Coléoptères	CRL 2048	<i>Pachnoda butana</i>	Larve de cétoine	-	-
	CRL 2050	<i>Zophobas morio</i>	Ver de farine géant	-	-
	CRL 2051	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Ver buffalo	-	-
	CRL 2461	<i>Carabus sp.</i>	Carabe	+	-
	CRL 2464	Staphylinidae	Staphylin	+	-
	CRL 2467	Curculionidae	Charançon	+	-
	CRL 2468	Coccinellidae	Coccinelle	+	-
	CRL 2529	<i>Oxythyrea funesta</i>	Cétoine noire	+	-
	CRL 2534	Scarabidae	Scarabée	+	-
	CRL 2716	<i>Melolontha melolontha</i>	Hanneton	-	-
	CRL 2717	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Doryphore	+	-
	CRL 2718	<i>Cassida viridis</i>	Casside verte	+	-
	CRL 2719	<i>Cicindela campestris</i>	Cicindèle champêtre	+	-
	CRL 2720	<i>Nicrophorus humator</i>	Nécrophore	+	-
	CRL 2721	<i>Nicrophorus vespillio</i>	Nécrophore	+	-
CRL 2523	<i>Cetonia aurata</i>	Cétoine dorée	-	-	
GMO 044	<i>Tenebrio molitor</i>	Ver de farine	-	-	
Hémiptères	CRL 2462	Aphididae	Puceron	+	-
	CRL 2470	Anthocoridae	Punaise	+	-
	CRL 2472	<i>Palomena prasina</i>	Punaise des bois	+	-
	CRL 2528	<i>Phyrracorus apterus</i>	Gendarme	+	-
	CRL 2533	<i>Psyllus sp.</i>	Psylle	+	-
Hyménoptères	CRL 2466	Apidae	Abeille	+	-
	CRL 2471	<i>Bombus terrestris</i>	Bourdon	+	-
	CRL 2525	<i>Componotus sp.</i>	Fourmis noires	+	-
	CRL 2526	<i>Vespa sp.</i>	Frelon	+	-

Ordre	N° échantillon	Nature	Nom français	18s-DIPT	1α-DIPT
Hyménoptères	CRL 2527	<i>Vespula sp.</i>	Guêpe	+	-
Névroptères	CRL 2469	<i>Chrysoperla carnea</i>	Chrysope	+	-
Lépidoptères	CRL 2531	<i>Biston betularia</i>	Phalène du bouleau	+	-
	CRL 2532	<i>Tineola sp.</i>	Mite	+	-
	GMO 043	<i>Bombyx mori</i>	Ver à soie	+	-
Blattodea	CRL 2725	<i>Blatta orientalis</i>	Blatte d'orient	+	-
Dermaptères	CRL 2726	<i>Forficula auricularia</i>	Perce-oreilles	-	-
Non insectes	Témoin poulet	<i>Gallus gallus</i>	Poulet	-	-
	Témoin bœuf	<i>Bos taurus</i>	Bœuf	-	-
	Témoin porc	<i>Sus scrofa</i>	Porc	-	-
	GMO 045	<i>Gammarus sp.</i>	Gammare	+	-

Tableau 18 - Evaluation des cibles spécifiques aux Diptères sur les échantillons issus de l'industrie

N° échantillon	Nature	Nom français	18s-DIPT	1α-DIPT
CRL 2697	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°1	Mouche soldat noire	+	-
CRL 2698	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°2	Mouche soldat noire	+	-
CRL 2704	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°3	Mouche soldat noire	+	-
CRL 2705	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°4	Mouche soldat noire	-	-
CRL 2707	Farine de <i>Gryllobates sigillatus</i>	Grillon domestique	-	-
CRL 2710	Farine de <i>Gryllobates sigillatus</i> n°2	Grillon domestique	-	-
CRL 2504	Hamburger aux <i>Alphitobius diaperinus</i>	Ver buffalo	+	-
CRL 2505	Boule d'apéros aux <i>Tenebrio molitor</i>	Ver de farine	+	-
CRL 2699	Farine de <i>Tenebrio molitor</i> n°1	Ver de farine	!+	-
CRL 2700	Farine d' <i>Alphitobius diaperinus</i>	Ver buffalo	+	-
CRL 2709	Farine de <i>Tenebrio molitor</i> n°3	Ver de farine	-	-
CRL 2502	<i>Galleria mellonella</i> au paprika	Fausse teigne	+	-

2.3. Cibles spécifiques à *T. molitor*

Cinq cibles spécifiques au ver de farine *T. molitor* ont été évaluées au cours de ce travail (Tableaux 19 et 20). Les deux premières cibles reprises dans ces tableaux ont été conçues au CRA-W et sont basées sur les gènes codant pour la sous-unité 1 de l'enzyme cytochrome oxydase (cible TM-COI) et le gène *wingless* (Cible TM-WING). La troisième cible testée a été élaborée par la firme Primer Design à notre demande. Cette dernière se base sur le gène codant pour la cadhérine. La colonne des Tableaux 19 et 20 intitulée « Cadherin-Genesig2 » ne constitue pas réellement une cible à part entière. Elle correspond en réalité aux oligonucléotides de la cible Cadherin-Genesig utilisés dans les conditions standards d'analyse, et non via le kit, c'est-à-dire avec des concentrations de travail en amorces de 5µM et en sonde de 9 µM, pour un volume réactionnel total de 25 µl, tout en utilisant l'Universal Master mix Diagenode. La quatrième cible testée, intitulée Cadherin-CRAW, a

été redessinée sur le gène codant pour la cadherine, mais sur une zone du gène totalement différente de celle utilisée pour les cible Cadherin-Genesig et Cadherin-Genesig2.

La cible TM-COI ne fonctionne absolument pas, aucun échantillon n'étant détecté (Tableau 19). Ce problème peut avoir de multiples origines. Ainsi, on peut penser qu'une erreur pourrait s'être glissée au moment de la fabrication des amorces ou de la sonde. Par contre, la cible TM-WING a fourni des résultats beaucoup plus intéressants. On constate en effet une spécificité totale à *T. molitor*. Cependant, seul un des deux échantillons de *T. molitor* a fourni un résultat positif, le GMO 044 n'ayant pas fourni de signal. Le Tableau 20 reprenant les échantillons transformés issus de l'industrie permet néanmoins de confirmer le potentiel de cette cible : tous les produits renfermant du ver de farine ont répondu positivement. Deux farines d'*H. illucens* et une farine d'*A. diaperinus* ont également fourni un signal dépassant le seuil de fluorescence. Or, il est probable que ces échantillons soient contaminés par de l'ADN de *T. molitor*, surtout si les entreprises les ayant fournis traitent simultanément plusieurs espèces sur la même ligne de production.

La cible TM-Genesig et sa transposition aux conditions standards d'analyse, Cadherin-Genesig2, fournissent des résultats semblables pour les tous les extraits bruts, seul le ver de farine étant reconnu (Tableau 19). Il est donc avantageux d'utiliser la cible Cadherin-Genesig2 plutôt que le kit Genesig pour détecter *T. molitor*, le coût global de ce dernier étant très élevé par rapport aux réactifs couramment utilisés au sein du laboratoire. L'analyse des farines industrielles confirme les conclusions tirées pour les extraits bruts ; l'ensemble des farines produites à partir de vers de farine ont fourni un signal positif. Une différence se manifeste néanmoins entre les deux cibles au niveau de ces échantillons processés : la cible Cadherin-Genesig2 reconnaît deux échantillons de plus que la cible Cadherin-Genesig : une farine d'*H. illucens* et une d'*A. diaperinus*. Néanmoins, la remarque proposée pour la cible TM-WING s'applique également dans ce cas.

Enfin, la cible Caherin-CRAW reconnaît parfaitement les deux extraits de ver de farine, mais des aspécificités sont observées avec 3 espèces : *Z. morio*, *B. mori* et le crustacé *Gammarus sp.* Néanmoins, les deux dernières citées ne fournissent que des signaux tardifs, et la reconnaissance de *Z. morio* n'est pas problématique, dans le sens où cette espèce est tolérée par l'AFSCA et pourrait donc se retrouver dans des échantillons alimentaires. Sa reconnaissance peut s'expliquer par sa proximité génétique avec *T. molitor*, les deux espèces faisant partie de la famille des Tenebrionidae et pouvant être confondues. Cette hypothèse n'a pu être vérifiée, le gène de la cadherine n'ayant pas été séquencé pour un grand nombre d'espèces. Dans le cas des échantillons processés, aucune surprise n'est à signaler, les produits à base de ver de farine étant parfaitement reconnus. Pour la suite des investigations, la cible Cadherin-CRAW a eu la préséance sur la cible Cadherin-Genesig2 en raison d'une précocité plus importante des signaux fournis.

Tableau 19 - Evaluation des cibles spécifiques au ver de farine *T. molitor*

Ordre	N° échantillon	Nature	Nom français	TM-COI	TM-WING	Cadherin-Genesig	Cadherin-Genesig2	Cadherin-CRAW
Diptères	CRL 2241	<i>Hermetia illucens</i>	Mouche soldat noire	-	-	-	-	-
	CRL 2463	Syrphidae	Syrphe	-	-	-	-	Nt
	CRL 2465	<i>Stomoxys calcitrans</i>	Mouche charbonneuse	-	-	-	-	Nt
	CRL 2530	<i>Tabanus sp.</i>	Taon	-	-	-	-	-
	CRL 2712	<i>Bibio marci</i>	Bibion	-	-	-	-	-
	CRL 2713	<i>Calliphora vicina</i>	Mouche bleue	-	-	-	-	-
	CRL 2714	<i>Sarcophaga carnaria</i>	Mouche à damier	-	-	-	-	-
	CRL 2715	<i>Bombylius major</i>	Grand bombyle	-	-	-	-	-
	GMO 046	<i>Chironomus sp.</i>	Ver de vase rouge	-	-	-	-	-
Orthoptères	CRL 2044	<i>Locusta migratoria</i>	Criquet migrateur	-	-	-	-	-
	CRL 2045	<i>Acheta domesticus</i>	Grillon domestique	-	-	-	-	-
	CRL 2046	<i>Gryllus bimaculatus</i>	Grillon provençal	-	-	-	-	-
	CRL 2047	<i>Gryllus assimilis</i>	Grillon des steppes	-	-	-	-	-
	CRL 2524	<i>Gryllus sp.</i>	Grillon de provence	-	-	-	-	-
	CRL 2722	<i>Locusta migratoria</i>	Criquet migrateur	-	-	-	-	-
	CRL 2723	<i>Acheta domesticus</i>	Grillon domestique	-	-	-	-	-
Coléoptères	CRL 2048	<i>Pachnoda butana</i>	Larve de cétoine	-	-	-	-	-
	CRL 2049	<i>Tenebrio molitor</i>	Ver de farine	-	+	+	+	+
	CRL 2050	<i>Zophobas morio</i>	Ver de farine géant	-	-	-	-	+
	CRL 2051	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Ver buffalo	-	-	-	-	-
	CRL 2461	<i>Carabus sp.</i>	Carabe	-	-	-	-	Nt
	CRL 2464	Staphylinidae	Staphylin	-	-	-	-	Nt
	CRL 2467	Curculionidae	Charançon	-	-	-	-	Nt
	CRL 2468	Coccinellidae	Coccinelle	-	-	-	-	Nt
	CRL 2529	<i>Oxythryea funesta</i>	Cétoine noire	-	-	-	-	-
CRL 2534	Scarabidae	Scarabée	-	-	-	-	-	

Résultats et discussion

Ordre	N° échantillon	Nature	Nom français	TM-COI	TM-WING	Cadherin- Genesig	Cadherin- Genesig2	Cadherin- CRAW
Coléoptères	CRL 2716	<i>Melolontha melolontha</i>	Hanneton	-	-	-	-	-
	CRL 2717	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Doryphore	-	-	-	-	-
	CRL 2718	<i>Cassida viridis</i>	Casside verte	-	-	-	-	-
	CRL 2719	<i>Cicindela campestris</i>	Cicindèle champêtre	-	-	-	-	-
	CRL 2720	<i>Nicrophorus humator</i>	Nécrophore	-	-	-	-	-
	CRL 2721	<i>Nicrophorus vespillio</i>	Nécrophore	-	-	-	-	-
	CRL 2523	<i>Cetonia aurata</i>	Cétoine dorée	-	-	-	-	-
	GMO 044	<i>Tenebrio molitor</i>	Ver de farine	-	-	+	+	+
Hémiptères	CRL 2462	Aphididae	Puceron	-	-	-	-	Nt
	CRL 2470	Anthocoridae	Punaise	-	-	-	-	Nt
	CRL 2472	<i>Palomena prasina</i>	Punaise des bois	-	-	-	-	Nt
	CRL 2528	<i>Phyrrocorus apterus</i>	Gendarme	-	-	-	-	-
	CRL 2533	<i>Psyllus sp.</i>	Psylle	-	-	-	-	-
Hyménoptères	CRL 2466	Apidae	Abeille	-	-	-	-	Nt
	CRL 2471	<i>Bombus terrestris</i>	Bourdon	-	-	-	-	Nt
	CRL 2525	<i>Componotus sp.</i>	Fourmis noires	-	-	-	-	-
	CRL 2526	<i>Vespa sp.</i>	Frelon	-	-	-	-	-
	CRL 2527	<i>Vespula sp.</i>	Guêpe	-	-	-	-	-
Névroptères	CRL 2469	<i>Chrysoperla carnea</i>	Chrysope	-	-	-	-	Nt
Lépidoptères	CRL 2531	<i>Biston betularia</i>	Phalène du bouleau	-	-	-	-	-
	CRL 2532	<i>Tineola sp.</i>	Mite	-	-	-	-	-
	GMO 043	<i>Bombyx mori</i>	Ver à soie	-	-	-	-	!+
Blattodea	CRL 2725	<i>Blatta orientalis</i>	Blatte d'orient	-	-	-	-	-
Dermaptères	CRL 2726	<i>Forficula auricularia</i>	Perce-oreilles	-	-	-	-	-
Non insectes	Témoin poulet	<i>Gallus gallus</i>	Poulet	-	-	-	-	-
	Témoin bœuf	<i>Bos taurus</i>	Bœuf	-	-	-	-	-
	Témoin porc	<i>Sus scrofa</i>	Porc	-	-	-	-	-

Résultats et discussion

Ordre	N° échantillon	Nature	Nom français	TM-COI	TM-WING	Cadherin-Genesig	Cadherin-Genesig2	Cadherin-CRAW
Non insectes	GMO 045	<i>Gammarus sp.</i>	Gammare	-	-	-	-	!+

Tableau 20 - Evaluation de la spécificité des cibles spécifiques à *T. molitor* sur des échantillons issus de l'industrie

N° échantillon	Nature	Nom français	TM-COI	TM-WING	TM-Genesig	Cadherin-Genesig2	Cadherin-CRAW
CRL 2697	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°1	Mouche soldat noire	-	-	-	-	-
CRL 2698	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°2	Mouche soldat noire	-	+	-	+	-
CRL 2704	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°3	Mouche soldat noire	-	-	-	-	-
CRL 2705	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°4	Mouche soldat noire	-	+	+	+	+
CRL 2707	Farine de <i>Grylodes sigillatus</i>	Grillon domestique	-	-	-	-	Nt
CRL 2710	Farine de <i>Grylodes sigillatus</i> n°2	Grillon domestique	-	-	-	-	-
CRL 2504	Hamburger aux <i>Alphitobius diaperinus</i>	Ver buffalo	-	-	-	-	Nt
CRL 2505	Boule d'apéros aux <i>Tenebrio molitor</i>	Ver de farine	-	+	+	+	Nt
CRL 2699	Farine de <i>Tenebrio molitor</i> n°1	Ver de farine	-	+	+	!+	+
CRL 2709	Farine de <i>Tenebrio molitor</i> n°3	Ver de farine	-	+	+	+	+
CRL 2700	Farine d' <i>Alphitobius</i>	Ver buffalo	-	+	-	!+	+
CRL 2502	<i>Galleria mellonella</i> au paprika	Fausse teigne	-	-	-	-	Nt

2.4. Cibles spécifiques à *H. illucens*

Les Tableaux 21 et 22 qui suivent reprennent les résultats de l'évaluation des cibles conçues pour la détection de la mouche soldat noire *H. illucens*, nommées COI-HERM, HI-MITO1 et HI-MITO2. La première de celles-ci se base sur le gène mitochondrial codant pour la sous-unité 1 du cytochrome C oxydase. Les deux autres ont quant à elles été créées sur base des séquences du gène de la sous-unité 3 du cytochrome C oxydase. Pour faciliter la lecture du tableau, les échantillons contenant de l'*Hermetia* ont été colorés en bleu.

Tous les échantillons d'*H. illucens* (insectes entiers ou farines industrielles) répondent positivement pour les trois cibles (Tableaux 21 et 22). Cependant, des degrés plus ou moins importants d'aspécificité sont remarqués. Les cibles COI-HERM et HI-MITO sont fortement aspécifiques, reconnaissant respectivement 8 et 6 extraits non désirés. Parmi les espèces reconnues figure le criquet migrateur, *L. migratoria*, qui peut se retrouver dans les aliments car autorisé par l'AFSCA et pour lequel il existe déjà des élevages. Ces cibles ne pourront donc pas être utilisées pour la détection spécifique de la mouche soldat noire dans les matrices alimentaires. La cible HI-MITO2 présente une aspécificité beaucoup moins marquée, seules 3 espèces (en plus d'*H. illucens*) étant reconnues. Ces dernières ne font pas partie des espèces qui pourraient être rencontrées dans des produits alimentaires. Au niveau des farines industrielles, les 4 échantillons dérivés de *H. illucens* sont parfaitement reconnus par la cible HI-MITO2.

Tableau 21- Evaluation des cibles COI-HERM, HI-MITO et HI-MITO2 spécifiques à *Hermetia illucens*

Ordre	N° échantillon	Nature	Nom français	COI-HERM	HI-MITO	HI-MITO2
Diptères	CRL 2241	<i>Hermetia illucens</i>	Mouche soldat noire	+	+	+
	CRL 2463	Syrphidae	Syrphe	-	!+	-
	CRL 2465	<i>Stomoxys calcitrans</i>	Mouche charbonneuse	-	-	-
	CRL 2530	<i>Tabanus sp.</i>	Taon	-	-	-
	CRL 2712	<i>Bibio marci</i>	Bibion	-	-	-
	CRL 2713	<i>Calliphora vicina</i>	Mouche bleue	!+	!+	!+
	CRL 2714	<i>Sarcophaga carnaria</i>	Mouche à damier	!+	!+	-
	CRL 2715	<i>Bombylius major</i>	Grand bombyle	!+	!+	-
	GMO 046	<i>Chironomus sp.</i>	Ver de vase rouge	+	-	-
Orthoptères	CRL 2044	<i>Locusta migratoria</i>	Criquet migrateur	-	-	-
	CRL 2045	<i>Acheta domesticus</i>	Grillon domestique	-	-	-
	CRL 2046	<i>Gryllus bimaculatus</i>	Grillon provençal	-	-	-
	CRL 2047	<i>Gryllus assimilis</i>	Grillon des steppes	-	-	-
	CRL 2524	<i>Gryllus sp.</i>	Grillon de provence	-	-	-
	CRL 2722	<i>Locusta migratoria</i>	Criquet migrateur	+	!+	-
	CRL 2723	<i>Acheta domesticus</i>	Grillon domestique	-	-	-
Coléoptères	CRL 2048	<i>Pachnoda butana</i>	Larve de cétoine	-	-	-
	CRL 2049	<i>Tenebrio molitor</i>	Ver de farine	-	-	-
	CRL 2050	<i>Zophobas morio</i>	Ver de farine géant	-	-	-
	CRL 2051	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Ver buffalo	-	-	-
	CRL 2461	<i>Carabus sp.</i>	Carabe	-	-	-
	CRL 2464	Staphylinidae	Staphylin	-	-	-
	CRL 2467	Curculionidae/Scotyliidae	Charançon	-	-	-
	CRL 2468	Coccinellidae	Coccinelle	-	-	-
	CRL 2529	<i>Oxythryea funesta</i>	Cétoine noire	-	-	-
	CRL 2534	Scarabidae	Scarabée	-	-	-
	CRL 2716	<i>Melolontha melolontha</i>	Hanneton	-	-	-
	CRL 2717	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Doryphore	-	-	-
	CRL 2718	<i>Cassida viridis</i>	Casside verte	!+	!+	!+
	CRL 2719	<i>Cicindela campestris</i>	Cicindèle champêtre	!+	-	!+
	CRL 2720	<i>Nicrophorus humator</i>	Nécrophore	!+	-	-
	CRL 2721	<i>Nicrophorus vespillo</i>	Nécrophore	-	-	-
CRL 2523	<i>Cetonia aurata</i>	Cétoine dorée	-	-	-	
GMO 044	<i>Tenebrio molitor</i>	Ver de farine	-	-	-	
Hémiptères	CRL 2462	Aphididae	Puceron	-	-	-
	CRL 2470	Anthocoridae	Punaise	-	-	-
	CRL 2472	<i>Palomena prasina</i>	Punaise des bois	-	-	-
	CRL 2528	<i>Phyrrocorus apterus</i>	Gendarme	-	-	-
	CRL 2533	Psyllidae	Psylle	-	-	-
Hyménoptères	CRL 2466	Apidae	Abeille	-	-	-

Résultats et discussion

Ordre	N° échantillon	Nature	Nom français	COI-HERM	HI-MITO	HI-MITO2
Hyménoptères	CRL 2471	<i>Bombus terrestris</i>	Bourdon	-	-	-
	CRL 2525	<i>Componotus sp.</i>	Fourmis noires	-	-	-
	CRL 2526	<i>Vespa sp.</i>	Frelon	-	-	-
	CRL 2527	<i>Vespula sp.</i>	Guêpe	-	-	-
Névroptères	CRL 2469	<i>Chrysoperla carnea</i>	Chrysope	-	-	-
Lépidoptères	CRL 2531	<i>Biston betularia</i>	Phalène du bouleau	-	-	-
	CRL 2532	<i>Tineola sp.</i>	Mite	-	-	-
	GMO 043	<i>Bombyx mori</i>	Ver à soie	-	-	-
Blattodea	CRL 2725	<i>Blatta orientalis</i>	Blatte d'orient	-	-	-
Dermaptères	CRL 2726	<i>Forficula auricularia</i>	Perce-oreilles	-	-	-
Non insectes	CRL 1253	<i>Gallus gallus</i>	Poulet	-	-	-
	CRL 1857	<i>Bos taurus</i>	Bœuf	-	-	-
	CRL 297	<i>Sus scrofa</i>	Porc	-	-	-
	GMO 045	<i>Gammarus sp.</i>	Gammaré	-	-	-

Tableau 22 - Evaluation de la spécificité des cibles visant *H. illucens* sur des échantillons industriels

N° échantillon	Nature	Nom français	COI-HERM	HI-MITO	HI-MITO2
CRL 2697	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°1	Mouche soldat noire	+	+	+
CRL 2698	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°2	Mouche soldat noire	+	+	+
CRL 2704	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°3	Mouche soldat noire	+	+	+
CRL 2705	Farine d' <i>Hermetia illucens</i> n°4	Mouche soldat noire	!+	-	+
CRL 2707	Farine de <i>Grylloides sigillatus</i>	Grillon domestique	-	-	-
CRL 2710	Farine de <i>Grylloides sigillatus</i> n°2	Grillon domestique	-	-	-
CRL 2504	Hamburger aux <i>Alphitobius diaperinus</i>	Ver buffalo	-	-	-
CRL 2505	Boule d'apéros aux <i>Tenebrio molitor</i>	Ver de farine	-	-	-
CRL 2699	Farine de <i>Tenebrio molitor</i> n°1	Ver de farine	+	-	!+
CRL 2700	Farine d' <i>Alphitobius diaperinus</i>	Ver buffalo	+	-	-
CRL 2709	Farine de <i>Tenebrio molitor</i> n°3	Ver de farine	-	-	-

3. Détermination des limites de détection

Les limites de détection n'ont été estimées que pour les cibles qui fournissaient des résultats potentiellement intéressants, c'est-à-dire TM-WING, Cadherin-CRAW et 18s-INS. Le Tableau 23 ci-dessous présente les LOD obtenues pour les cibles TM-WING et Cadherin-CRAW.

Tableau 23 – LOD₆ déterminées pour les cibles TM-WING et Cadherin-CRAW sur l'échantillon CRL 2049

Nom de la cible	LOD ₆ en nombre de copies
TM-WING	20 c
Cadherin-CRAW	10 c

Le critère minimum d'acceptation pour la LOD d'une méthode permettant la détection d'acides nucléiques spécifiques est fixé à 20 copies au maximum (AFNOR, 2008). Les cibles TM-WING et Cadherin-CRAW pourraient satisfaire ce critère. Seule la LOD₆ a été évaluée au cours de ce travail, consistant en une analyse d'une gamme de dilutions en 6 réplicats pour chaque nombre de copies (20000, 5000, 1000, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1 et 0,1). Ainsi la LOD₆ pour l'échantillon de *T. molitor* (CRL 2049) est égale à 20 copies avec la cible TM-WING et à 10 copies avec la cible Cadherin-CRAW.

La cible 18s-INS ne peut pas figurer dans le Tableau 23. L'étude de la LOD₆ a en effet fourni 6 réponses positives pour des échantillons censés contenir 0,1 copies. Or, une seule réponse positive sur les 6 réplicats est acceptée (AFNOR, 2008). Cependant, ce résultat n'est pas lié à une erreur de dilution, mais plutôt au caractère multi-copie du gène codant pour l'ARN 18s (Reeder, 1999). Une difficulté supplémentaire du gène codant pour l'ARN 18s est que le nombre de copie est fortement variable d'une espèce à l'autre. Ainsi, Prokopowich et collègues (2003) mentionnent, au cours d'une étude tentant d'établir une corrélation entre la taille du génome et le nombre de copie des ARN ribosomiques, un nombre de copies pour les animaux utilisés s'étalant de 39 à 19300 copies. Afin de pouvoir estimer l'ordre de grandeur du nombre de copies du gène codant pour l'ARN 18s, des dilutions plus importantes ont été effectuées pour 2 échantillons (CRL 2718 et 2049) et testées, toujours en 6 réplicats par point de dilution. Ainsi, la gamme employée est la suivante : 0,1 ; 0,02 ; 0,01 ; 0,005 ; 0,002 et 0,001 copie. Après analyse de ces dilutions supplémentaires, il ressort que le dernier nombre de copies pour lequel les 6 réplicats fournissent une réponse supérieure au seuil de détection est 0,1. De là, on peut corroborer que le nombre de copies de ce gène se situerait entre 10 et 100 chez ces deux espèces.

4. Extraction protéique

Différents échantillons d'insectes broyés et de farines industrielles ont subi une extraction protéique en 3 réplicats. La teneur en protéine totale contenue dans 200 mg des différents échantillons mesurée grâce au test de Pierce est reprise dans le Tableau 20 ci-dessous. Chacune des espèces considérées est représentée par une couleur dans ce dernier. L'ensemble des données brutes relatives à l'analyse protéiques sont reprises en Annexe 10 à ce document, de même qu'un exemple de droite d'étalonnage requise pour la détermination de ces teneurs. L'analyse des résultats montre une forte variation en terme de quantités de protéines extraites, tant entre espèces qu'au sein d'une même espèce. Cette observation est probablement liée aux différences de traitements qu'ont subis les différents échantillons de farines. Ainsi, des résultats inattendus peuvent être constatés : le CRL 2274 censé ne contenir que des protéines et de la chitine est un des échantillons qui a fourni le moins bon rendement d'extraction. Néanmoins, les trois extraits protéiques fournissent pour tous les échantillons, à l'exception du CRL 2704, des concentrations finales similaires en protéines montrant une bonne reproductibilité au niveau de la méthode d'extraction. Les quantités extraites fournissent largement assez de protéines pour poursuivre la purification et l'analyse par spectrométrie de masse.

Tableau 24 - Quantités de protéines extraites des différents échantillons d'insecte par la méthode au TCA/Acétone et pourcentages totaux en protéines des échantillons. La couleur orange représente *H. illucens*, la jaune *A. diaperinus*, la verte *G. assimilis* et la bleue *T. molitor*.

Echantillon	Quantité moyenne de protéines dans 200 mg (mg)	Ecart-type (mg), n=3	Pourcentage de protéines (%)
CRL 2241	11,06	0,85	5,53
CRL 2697	3,84	0,72	1,92
CRL 2704	18,72	4,15	9,36
CRL 2705	10,94	1,21	5,47
CRL 2274	3,38	0,46	1,69
CRL 2275	2,38	0,35	1,19
CRL 2276	2,95	0,28	1,48
CRL 2051	7,90	1,48	3,95
CRL 2700	5,88	1,08	2,94
CRL 2047	5,53	0,41	2,765
CRL 2703	4,48	0,92	2,24
CRL 2049	6,06	0,40	3,03
CRL 2699	2,03	0,13	1,015
CRL 2709	4,44	0,18	2,22

Au terme de la rédaction de ce travail, les résultats de l'analyse par LC-MS/MS ne nous étant pas encore parvenus, il est malheureusement impossible d'inclure une quelconque interprétation dans le document. Néanmoins, les résultats de cette analyse seront présentés, dans la mesure du possible, lors de la défense orale de ce travail de fin d'études.

Conclusions et perspectives

Tout au long de ce travail, différents systèmes d'amorces et sondes pour analyse par PCR en temps réel ont été conçus et évalués afin de permettre la détection d'insectes dans des matrices alimentaires à destination humaine ou animale. Douze cibles ont été testées et évaluées au cours de ces 6 mois de recherches, de nombreuses adaptations ou améliorations des cibles de départ ayant été requises. Ces cibles étaient réparties en 4 catégories : les cibles globales reconnaissant tous les insectes (18s-INS, Duplex 1 et Duplex 2), les cibles spécifiques aux Diptères (1 α -DIPT et 18s-DIPT) et celles spécifiques à *T. molitor* (TM-COI, TM-WING, Cadherin-Genesig2 et Cadherin-CRAW) et à *H. illucens* (COI-HERM, HI-MITO et HI-ITO2). La spécificité de l'ensemble des cibles a été évaluée sur une cinquantaine d'espèces d'insectes et au moins 10 ADN d'autres animaux ou d'espèces végétales.

Parmi toutes les cibles testées, seules trois se sont montrées totalement intéressantes par rapport à aux objectifs recherchés : les cibles TM-WING, Cadherin-Genesig2 et Cadherin-CRAW pour une détection spécifique de *T. molitor*. La cible HI-MITO2, conçue dans le but de reconnaître spécifiquement *H. illucens*, pourrait se montrer intéressante après élimination des trois aspécificités rencontrées parmi les 50 extraits testés.

Les résultats obtenus avec toutes les autres cibles ont été plutôt décevants. Tout d'abord, la cible 18s-INS et ses dérivés reconnaissent l'entièreté des échantillons d'insectes à l'exception de *M. melolontha* mais, malheureusement, quelques espèces végétales couramment utilisées dans l'alimentation, tel que le froment, ont révélé des aspécificités, ce qui est fort dommageable. Malgré les modifications apportées au système 18s-INS, il ne fut pas possible d'éliminer ces réponses parasites. Les deux cibles testées pour la détection des Diptères ont fourni des résultats contraires : 1 α -DIPT ne reconnaît pas suffisamment d'espèces, tandis que 18s-DIPT génère de nombreuses détections aspécifiques. Enfin, dans le cas des cibles spécifiques à *T. molitor* ou *H. illucens*, les cibles TM-COI, COI-HERM et HI-MITO ne sont pas assez spécifiques pour être utilisables.

Pour les cibles TM-WING et Cadherin-CRAW, cette dernière obtenant la préséance sur la cible Cadherin-Genesig2 en raison de signaux plus précoces, une évaluation plus poussée des performances a été entamée. Ainsi, la LOD₆ a été évaluée comme étant inférieure ou égale à 20 copies pour ces 2 cibles, ce qui correspond aux performances requises. La cible 18s-INS avait également fait l'objet d'une étude de sensibilité avant la découverte de l'aspécificité liée aux espèces végétales. Cette analyse avait permis de confirmer le caractère multi-copies du gène codant pour l'ARN 18s, et donc l'impossibilité de déterminer une LOD sur ADN génomique.

Concernant l'analyse des protéines contenues dans les différents échantillons de farine d'insectes, aucun résultat ne peut être présenté dans le présent document. En effet, après avoir été extraits par la méthode au TCA/Acétone et purifiés à l'aide du kit 2D-Clean Up, les culots ont été envoyés au CART pour une analyse en GC-MS/MS au cours du mois de juin ; mais, mi-août, aucun résultat n'avait encore été reçu. Ces derniers seront utilisés par le CRA-W et Gembloux Agro-Bio Tech dès leur réception et présentés lors de la défense orale de ce mémoire.

Globalement, les avancées se révèlent fort limitées par rapport aux attentes concernant le développement d'une cible générale permettant de reconnaître tous les insectes, d'autant que les instances européennes commencent à exercer une pression importante sur les laboratoires de recherche quant à la mise à disposition d'une telle cible. Néanmoins, deux cibles spécifiques à *T. molitor*, TM-WING et Cadherin-CRAW, ont pu être conçues avec succès. Pour celles-ci, un début de processus de validation a été mené. En outre, la cible HI-MITO2, spécifique à *H. illucens* devrait subir des améliorations supplémentaires afin d'accroître sa spécificité. Pour cela, des

extraits d'ADN de nouveaux échantillons relatifs aux espèces problématiques devraient être testés, afin de confirmer ou infirmer les résultats obtenus. Dans le cas où les aspécificités se présenteraient à nouveau, une alternative pourrait être d'augmenter légèrement la température d'hybridation et d'élongation afin d'éliminer ces mésappariements.

Dans les perspectives, il serait intéressant de poursuivre le processus d'évaluation des performances des deux cibles spécifiques au ver de farine (TM-WING et Cadherin-CRAW), et de celle spécifique à la mouche soldat noire (HI-MITO2) après en avoir augmenté la spécificité. Une validation au sein du laboratoire (*in house validation*) des méthodes selon diverses recommandations internationales est en effet requise avant de pouvoir procéder à la publication d'une méthode PCR en temps réel. Pour ce faire, la limite de détection, la linéarité, l'efficacité d'amplification et la robustesse doivent être évaluées (Broeders et al., 2014). Une fois reconues, ces différentes méthodes pourraient être utilisées par des laboratoires pour effectuer des analyses de routine sur des échantillons alimentaires et de détecter la présence de *H. illucens* et *T. molitor*.

Dans le cas de la limite de détection (LOD), la LOD_{95%} devra être effectuée en complément de la LOD₆ pour les cibles TM-WING et Cadherin-CRAW. Pour cela, il faudra tester en 60 répétitions le nombre de copies déterminé pour la LOD₆, soit respectivement 20 et 10 copies pour ces deux cibles. Si au moins 57 puits sur les 60 fournissent une réponse positive, le critère de performance correspondant à la LOD_{95%} sera atteint. Tout comme la LOD₆, la LOD_{95%} doit être inférieure ou égale à 20 copies.

La linéarité s'étudiera au moyen d'une gamme de dilutions contenant un nombre décroissant de copies. Chacun des points sera analysé en 6 réplicats et 4 runs successifs, pour un total de 24 répétitions par nombre de copies. Un graphe des Ct en fonction du nombre de copies doit alors être conçu et soumis à une régression linéaire, permettant de déterminer le coefficient de détermination, qui doit être supérieur à 0,98 pour être accepté.

L'efficacité peut quant à elle être évaluée à l'aide de l'équation suivante :

$$E = 100 \times \left(10^{\frac{1}{\text{pente}}} - 1 \right)$$

Enfin, l'évaluation de la robustesse de ces méthodes est également recommandée par le Codex Alimentarius (2010). Ainsi, sur 4 plaques PCR, différents paramètres de la méthode seront modifiés :

- Changement de thermocycleur
- Changement de Master Mix
- Diminution de 30% de la concentration en sonde
- Diminution de 30% de la concentration en amorces
- Volume réactionnel de 26 µl au lieu de 25 µl
- Volume réactionnel de 24 µl au lieu de 25 µl
- Hausse ou diminution de 1°C de la température d'élongation

La robustesse se détermine sur un échantillon comprenant 20 copies de la cible, soit le nombre de copies correspondant à la LOD maximale tolérée pour une validation.

Concernant le développement d'une méthode permettant la détection de l'ensemble des ordres d'insectes, il semblerait que la piste de la cible 18s-INS et de ces dérivés doive être abandonnée, de nombreuses tentatives d'optimisation ayant déjà été effectuée sans succès. Il conviendrait donc de

persévérer dans l'analyse des séquences des différents insectes pour le gène codant pour l'ARN 18s, mais en incluant directement dans l'alignement des espèces végétales, des champignons, des crustacés et des mammifères. Il est en effet probable que d'autres portions de ce gène se prêtent à la conception de la cible tant recherchée. Si ce n'est le cas, le screening bio-informatique doit être repris dès son point de départ et de nouveaux gènes doivent être cherchés.

Après avoir optimisé et évalué les performances de toutes ces méthodes qualitatives, il serait intéressant de se focaliser sur le potentiel quantitatif de celles-ci. Une analyse quantitative permettrait par exemple d'estimer le pourcentage d'un insecte précis dans une farine.

Enfin, pour l'analyse protéique, tout reste à faire. A leur retour, les résultats devront être analysés dans l'optique de mettre en lumière l'éventuelle présence de protéines spécifiques aux insectes, et non retrouvées dans les autres matrices. Ce type de découverte permettrait d'ouvrir de multiples perspectives de modes de détection des insectes dans les aliments.

Index

bibliographique

ACERO, S., TABAR, A. I., ALVAREZ, M. J., *et al.* Occupational asthma and food allergy due to carmine. *Allergy*, 1998, vol. 53, no 9, p. 897-901.

ADAMS, Mark D., CELNIKER, Susan E., HOLT, Robert A., *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 2000, vol. 287, no 5461, p. 2185-2195.

AGABOU, A. & ALLOUI, N. Importance of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) as a Reservoir for Pathogenic Bacteria in Algerian Broiler Houses. *Veterinary World*, 2010, vol. 3, no 2.

AGBIDYE, F. S., OFUYA, T. I., AKINDELE, S. O., *et al.* Marketability and Nutritional Qualities of Some Edible Forest Insects in Benue State Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2009, vol. 8, no 7, p. 917-922.

ANSES. (2015). *Consommation d'insectes: état des lieux des dangers potentiels et des besoins de recherche* en ligne <https://www.anses.fr/fr/content/consommation-d%E2%80%99insectes-%C3%A9tat-des-lieux-des-dangers-potentiels-et-des-besoins-de-recherche> consulté le 14 août 2016.

Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (AFSCA). (2016). *Mise sur le marché d'insectes et de denrées alimentaires à base d'insectes pour la consommation humaine* en ligne <http://www.afsca.be/denreesalimentaires/insectes/> consulté le 23 juillet 2016.

Agence Française de Normalisation (AFNOR), norme XP V03-020-1 du 1 septembre 2003, *Produits alimentaires – Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés – Partie 1 : lignes directrices et exigences pour les méthodes basées sur la détection des acides nucléiques.*

Agence Française de Normalisation (AFNOR), norme XP V03-044 de juillet 2008, *Critères de validation intralaboratoire pour les méthodes de détections et quantification de séquences d'acides nucléiques spécifiques.*

AIKING, Harry. Future protein supply. *Trends in Food Science & Technology*, 2011, vol. 22, no 2, p. 112-120.

ANAND, Hena, GANGULY, Arijit, et HALDAR, Parimalendu. Potential value of acridids as high p

ARIF, I. A. et KHAN, H. A. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 2009, vol. 32, no 1, p. 9-17.4

AYUSO, Rosalía. Update on the diagnosis and treatment of shellfish allergy. *Current allergy and asthma reports*, 2011, vol. 11, no 4, p. 309-316.

BECKETT, J. L. et OLTJEN, J. W. Estimation of the water requirement for beef production in the United States. *Journal of animal science*, 1993, vol. 71, no 4, p. 818-826.

BELLMANN, Heiko, *Insectes d'Europe*, 2010, Charmalière (France), ed. Artémis

BELLUCO, Simone, LOSASSO, Carmen, MAGGIOLETTI, Michela, *et al.* Edible insects in a food safety and nutritional perspective: a critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2013, vol. 12, no 3, p. 296-313.

BENSON, Dennis A., CAVANAUGH, Mark, CLARK, Karen, *et al.* GenBank. *Nucleic acids research*, 2012, p. gks1195.

- BERENBAUM, M. Sequestering of plant toxins by insects. *The Food Insects Newsletter* 6 (3). 1993.
- BESLER, Matthias, STEINHART, Hans, et PASCHKE, Angelika. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001, vol. 756, no 1, p. 207-228.
- BEXFIELD, Alyson, NIGAM, Yamni, THOMAS, Stephen, *et al.* Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes and Infection*, 2004, vol. 6, no 14, p. 1297-1304.
- BLUM, M. S. The limits of entomophagy: a discretionary gourmand in a world of toxic insects. *The Food Insects Newsletter*, 1994, vol. 7, no 1, p. 1-6.
- BOORE, Jeffrey L. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic acids research*, 1999, vol. 27, no 8, p. 1767-1780.
- BORGES, M. E., TEJERA, R. L., DÍAZ, L., *et al.* Natural dyes extraction from cochineal (*Dactylopius coccus*). New extraction methods. *Food chemistry*, 2012, vol. 132, no 4, p. 1855-1860.
- BROEKMAN, Henrike, VERHOECKX, Kitty C., DEN HARTOG JAGER, Constance F., *et al.* Majority of shrimp-allergic patients are allergic to mealworm. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2016.
- BROEDERS, S., HUBER, I., GROHMANN, L., *et al.* Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, 2014, vol. 37, no 2, p. 115-126.
- BROWER, A. V. Z. et DESALLE, R. Patterns of mitochondrial versus nuclear DNA sequence divergence among nymphalid butterflies: the utility of wingless as a source of characters for phylogenetic inference. *Insect molecular biology*, 1998, vol. 7, no 1, p. 73-82.
- BROWN, W. V., DOYEN, J. T., MOORE, B. P., *et al.* Chemical composition and taxonomic significance of defensive secretions of some Australian Tenebrionidae (Coleoptera). *Australian Journal of Entomology*, 1992, vol. 31, no 1, p. 79-89.
- BROWN, Wesley M., GEORGE, Matthew, et WILSON, Allan C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, vol. 76, no 4, p. 1967-1971.
- BUKKENS, Sandra GF. The nutritional value of edible insects. *Ecology of Food and Nutrition*, 1997, vol. 36, no 2-4, p. 287-319.
- BUSTIN, Stephen A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 2000, vol. 25, no 2, p. 169-193.
- CAMERON, Stephen L. Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. *Annual Review of Entomology*, 2014, vol. 59, p. 95-117.
- CARAPPELLI, Antonio, FRATI, Francesco, NARDI, Francesco, *et al.* Molecular phylogeny of the apterygotan insects based on nuclear and mitochondrial genes. *Pedobiologia*, 2000, vol. 44, no 3, p. 361-373.

CHAI, Jong-Yil, SHIN, Eun-Hee, LEE, Soon-Hyung, *et al.* Foodborne intestinal flukes in Southeast Asia. *The Korean journal of parasitology*, 2009, vol. 47, no Suppl, p. S69-S102.

CHAMPION, Matthew M., SHEPPARD, Aaron D., RUND, Samuel SC, *et al.* Qualitative and Quantitative Proteomics Methods for the Analysis of the *Anopheles gambiae* Mosquito Proteome. In : *Short Views on Insect Genomics and Proteomics*. Springer International Publishing, 2016. p. 37-62.

CHAPAGAIN, Ashok K. et HOEKSTRA, Arjen Y. Virtual water flows between nations in relation to trade in livestock and livestock products. 2003.

CHAPMAN, A. D., *Numbers of living species in Australia and the World*, 2009, 2e édition. Canberra: Australian Biological Resources Study. 60 p, ISBN 978-0-642-56850-2.

CHEN, Xiaoming, FENG, Ying, et CHEN, Zhiyong. Common edible insects and their utilization in China. *Entomological research*, 2009, vol. 39, no 5, p. 299-303.

CHINERY, M., *Insectes de France et d'Europe occidentale*, 1988, Paris, ed Arthaud

CHO, Soowon, MITCHELL, Andrew, REGIER, Jerome C., *et al.* A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: elongation factor-1 alpha recovers morphology-based tree for heliothine moths. *Molecular Biology and Evolution*, 1995, vol. 12, no 4, p. 650-656.

CHRISTENSEN, Dirk L., ORECH, Francis O., MUNGAI, Michael N., *et al.* Entomophagy among the Luo of Kenya: a potential mineral source?. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2006, vol. 57, no 3-4, p. 198-203.

CHUNG, Arthur YC. Edible insects and entomophagy in Borneo. *Forest insects as food: humans bite back*, 2010, p. 141.

Comité Européen de Normalisation (CEN). 2005. ISO21571:2005. Produits alimentaires - Détection des organismes génétiquement modifiés et produits dérivés - Extraction des acides nucléiques

COOK, Samantha M., KHAN, Zeyaur R., et PICKETT, John A. The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annual review of entomology*, 2006, vol. 52, no 1, p. 375.

Centre de Recherches Agronomiques de Wallonie. (2015). *Conserver et amplifier l'excellence scientifique et l'utilité sociétale*. En ligne <http://www.cra.wallonie.be/fr/ses-missions> consulté le 23 juillet 2016.

DANFORTH, Bryan N. et JI, Shuqing. Elongation factor-1 alpha occurs as two copies in bees: implications for phylogenetic analysis of EF-1 alpha sequences in insects. *Molecular biology and evolution*, 1998, vol. 15, no 3, p. 225-235.

DAWNAY, Nick, OGDEN, Rob, MCEWING, Ross, *et al.* Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International*, 2007, vol. 173, no 1, p. 1-6.

DEFOLIART, Gene R. Insects as human food: Gene DeFoliart discusses some nutritional and economic aspects. *Crop protection*, 1992, vol. 11, no 5, p. 395-399.

De MANDAL, Surajit, CHHAKCHHUAK, Liansangmawii, GURUSUBRAMANIAN, Guruswami, *et al.* Mitochondrial markers for identification and phylogenetic studies in insects—A Review. *DNA Barcodes*, 2014, vol. 2, no 1.

DEAGLE, Bruce E., JARMAN, Simon N., COISSAC, Eric, *et al.* DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biology letters*, 2014, vol. 10, no 9, p. 20140562.

DELFINO, Dominique. (2016). *Le monde des insectes* en ligne <http://baladesnaturalistes.hautetfort.com/insectes/> consulté le 23 juillet 2016.

DEVKOTA, B. et SCHMIDT, G. H. Accumulation of heavy metals in food plants and grasshoppers from the Taigetos Mountains, Greece. *Agriculture, ecosystems & environment*, 2000, vol. 78, no 1, p. 85-91.

Directive CAC/GL 74-2010 de la FAO relative aux critères de performance et à la validation des méthodes de détection, d'identification et de quantification de séquences d'ADN spécifiques et de protéines spécifiques contenues dans les aliments. 2010

DJERNÆS, Marie et DAMGAARD, Jakob. Exon-intron structure, paralogy and sequenced regions of elongation factor-1 alpha in Hexapoda. *Arthropod Syst. Phylogeny*, 2006, vol. 64, no 1, p. 45-52.

DUCLOHIER, Herve. Antimicrobial peptides and peptaibols, substitutes for conventional antibiotics. *Current pharmaceutical design*, 2010, vol. 16, no 28, p. 3212-3223.

EKPO, K. E., ONIGBINDE, A. O., et ASIA, I. O. Pharmaceutical potentials of the oils of some popular insects consumed in southern Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2009, vol. 3, no 2, p. 051-057.

ELEMO, Babajide O., ELEMO, Gloria N., MAKINDE, M. A., *et al.* Chemical evaluation of African palm weevil, *Rhychophorus phoenicis*, larvae as a food source. *Journal of Insect Science*, 2011, vol. 11, no 1, p. 146.

Europe Entomophagie. (2014). *Insectes déshydratés* en ligne <http://www.europe-entomophagie.com/fr/16-insectes-comestibles> consulté le 25 juillet 2016.

European Bioinformatics Institute. (2016). *Clustal Omega* en ligne <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> consulté le 26 juillet 2016.

FENSTER, Ariel. (2011). *Le rouge cochenille – un colorant “naturel”*. En ligne <http://www.sciencepresse.qc.ca/blogue/2011/02/11/rouge-cochenille-colorant-naturel> consulté le 23 juillet 2016.

FIALA, Nathan. Meeting the demand: An estimation of potential future greenhouse gas emissions from meat production. *Ecological Economics*, 2008, vol. 67, no 3, p. 412-419.

FINKE, Mark D., ROJO, S., ROOS, Nanna, *et al.* The European Food Safety Authority scientific opinion on a risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *Journal of Insects as Food and Feed*, 2015, vol. 1, no 4, p. 245-247.

FONTANETO, Diego, TOMMASEO-PONZETTA, Mila, GALLI, Claudio, *et al.* Differences in fatty acid composition between aquatic and terrestrial insects used as food in human nutrition. *Ecology of food and nutrition*, 2011, vol. 50, no 4, p. 351-367.

GATHERER, Derek et KOHL, Alain. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. *Journal of General Virology*, 2015.

GREGORY, T.R. (2016). *Animal Genome Size Database* en ligne <http://www.genomesize.com> consulté le 23 juillet 2016.

GIACCONE, V., PAOLETTI, M. G., *et al.* Hygiene and health features of "minilivestock". *Ecological implications of minilivestock: potential of insects, rodents, frogs and snails*, 2005, p. 579-598.

GONG, Zhaohui, JIN, Yongfeng, *et* ZHANG, Yaozhou. Oral administration of a cholera toxin B subunit–insulin fusion protein produced in silkworm protects against autoimmune diabetes. *Journal of biotechnology*, 2005, vol. 119, no 1, p. 93-105.

HAZELEGER, Wilma C., BOLDER, Nico M., BEUMER, Rijkelt R., *et al.* Darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae as potential vectors for the transfer of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica* serovar paratyphi B variant java between successive broiler flocks. *Applied and environmental microbiology*, 2008, vol. 74, no 22, p. 6887-6891.

HENRY, M., GASCO, L., PICCOLO, G., *et al.* Review on the use of insects in the diet of farmed fish: past and future. *Animal Feed Science and Technology*, 2015, vol. 203, p. 1-22.

HILLIS, David M. *et* DIXON, Michael T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 1991, p. 411-453.

HOLLAND, Pamela M., ABRAMSON, Richard D., WATSON, Robert, *et al.* Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, vol. 88, no 16, p. 7276-7280.

HWANGBO, J., HONG, E. C., JANG, A., *et al.* Utilization of house fly-maggots, a feed supplement in the production of broiler chickens. *Journal of Environmental Biology*, 2009, vol. 30, no 4, p. 609-614.

IPIFF. (2014). *About us* en ligne <http://www.ipiff.org> consulté le 12 août 2016.

JI, K.-M., ZHAN, Z.-K., CHEN, J.-J., *et al.* Anaphylactic shock caused by silkworm pupa consumption in China. *Allergy*, 2008, vol. 63, no 10, p. 1407-1408.

JINBO, Utsugi, KATO, Toshihide, *et* ITO, Motomi. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science*, 2011, vol. 14, no 2, p. 107-124.

KAMBHAMPATI, S. *et* SMITH, P. T. PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect molecular biology*, 1995, vol. 4, no 4, p. 233-236.

KAMYSZ, W. *et* TURECKA, K.. Antimicrobial preservative effectiveness of natural peptide antibiotics. *Acta Pol Pharm*, 2005, vol. 62, no 5, p. 341-344.

KANAKALA, Surapathrudu *et* GHANIM, Murad. Advances in the Genomics of the Whitefly *Bemisia tabaci*: An Insect Pest and a Virus Vector. In : *Short Views on Insect Genomics and Proteomics*. Springer International Publishing, 2015. p. 19-40.

KIM, Man Il, WAN, Xinlong, KIM, Min Jee, *et al.* Phylogenetic relationships of true butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea) inferred from COI, 16S rRNA and EF-1 α sequences. *Molecules and cells*, 2010, vol. 30, no 5, p. 409-425.

KING, D. A., PECKHAM, Catherine, WAAGE, J. K., *et al.* Infectious diseases: preparing for the future. *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-*, 2006, vol. 313, no 5792, p. 1392.

KLUNDER, H. C., WOLKERS-ROOIJACKERS, J., KORPELA, J. M., *et al.* Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control*, 2012, vol. 26, no 2, p. 628-631.

KOBAYASHI, Mutsuo, SASAKI, Toshinori, SAITO, Noriko, *et al.* Houseflies: not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1999, vol. 61, no 4, p. 625-629.

KRAWCZYK, Tom. *Biodiesel. Alternative fuel makes inroads but hurdles remain.* 1996.

LECRENIER, Marie-Caroline, MARBAIX, H el ene, DIEU, Marc, *et al.* Identification of specific bovine blood biomarkers with a non-targeted approach using HPLC ESI tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2016, vol. 213, p. 417-424.

LEUNG, Dong, YANG, Depo, LI, Zhuoxue, *et al.* Biodiesel from Zophobas morio larva oil: process optimization and FAME characterization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2012, vol. 51, no 2, p. 1036-1040.

LIS, Ł., BAKUŁA, T., BARANOWSKI, M., *et al.* The carcinogenic effects of benzoquinones produced by the flour beetle. *Polish journal of veterinary sciences*, 2011, vol. 14, no 1, p. 159-164.

LIU, Zhigang, XIA, Lixin, WU, Yulan, *et al.* Identification and characterization of an arginine kinase as a major allergen from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *International archives of allergy and immunology*, 2009, vol. 150, no 1, p. 8-14.

LONGO, Mary C., BERNINGER, Mark S., *et al.* HARTLEY, James L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 1990, vol. 93, no 1, p. 125-128.

LUCAS, Christine D., HALLAGAN, John B., *et al.* TAYLOR, Steve L. The role of natural color additives in food allergy. *Advances in food and nutrition research*, 2000, vol. 43, p. 195-216.

LUNT, D. H., ZHANG, D.-X., SZYMURA, J. M., *et al.* The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect molecular biology*, 1996, vol. 5, no 3, p. 153-165.

MACDONALD, Dorothy L., NHAM, Dong N., COCHRAN, William K., *et al.* Differences in the sterol composition of *Heliothis zea* fed *Zea mays* versus *Medicago sativa*. *Insect Biochemistry*, 1990, vol. 20, no 4, p. 437-442.

MACEVILLY, C. Bugs in the system. *Nutrition Bulletin*, 2000, vol. 25, no 4, p. 267-268.

MACKAY, Ian M., ARDEN, Katherine E., *et al.* NITSCHKE, Andreas. Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 2002, vol. 30, no 6, p. 1292-1305.

MANZANO-AGUGLIARO, F., SANCHEZ-MUROS, M. J., BARROSO, F. G., *et al.* Insects for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 20

MARISCAL-DIAZ, L. (2015). *Développement et évaluation de cibles PCR pour l'authentification de sous-produits dérivés d'insectes.* Mémoire de bachelier en agronomie   finalité agro-industries et biotechnologies. Fleurus. Haute-Ecole Louvain en Hainaut.

MARONI, Gustavo. *An atlas of Drosophila genes: sequences and molecular features.* Oxford University Press, 1993.

MLCEK, Jiri, BORKOVCOVA, Marie, ROP, Otakar, *et al.* Biologically active substances of edible insects and their use in agriculture, veterinary and human medicine. *Journal of Central European Agriculture*, 2014, vol. 15, no 4, p. 0-0.

MOLAVI, G. H., MASSOUD, J., et GUTIERREZ, Y. Human Gongylostrongylus infection in Iran. *Journal of helminthology*, 2006, vol. 80, no 04, p. 425-428.

MORRISON, Tom B., WEIS, Janis J., et WITTEWER, Carl Thomas. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 1998, vol. 24, no 6, p. 954-8, 960, 962.

MULLIS, K. B. F. F., FALOONA, Fred, SCHARF, Stephen, *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In : *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. p. 263-273.

National Center for Biotechnology Information. (s.d.). En ligne <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide> consulté le 26 juillet 2016.

National Center for Biotechnology Information. (s.d.). En ligne <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy> consulté le 23 juillet 2016.

National Library of Medicine. (s.d.). *Standard Nucleotide BLAST* en ligne https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch consulté le 26 juillet 2016.

NELSON, Warrick et HARRIS, Ben. Flies, fingers, fomites, and food. Campylobacteriosis in New Zealand--food-associated rather than food-borne. *The New Zealand Medical Journal (Online)*, 2006, vol. 119, no 1240.

NJAN NLOGA, A., ROBERT, Vincent, TOTO, J. C., *et al.* Anopheles moucheti, vecteur principal du paludisme au sud-Cameroun. *Bulletin de Liaison et de Documentation-OCEAC*, 1993, vol. 26, no 2, p. 63-67.

OMOTOSO, O. T. Nutritional quality, functional properties and anti-nutrient compositions of the larva of *Cirina forda* (Westwood)(Lepidoptera: Saturniidae). *Journal of Zhejiang University Science B*, 2006, vol. 7, no 1, p. 51-55.

OONINCX, Dennis GAB et DE BOER, Imke JM. Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans—a life cycle assessment. *PloS one*, 2012, vol. 7, no 12, p. e51145.

OONINCX, Dennis GAB, VAN ITTERBEECK, Joost, HEETKAMP, Marcel JW, *et al.* An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no 12, p. e14445.

OZIMEK, L., SAUER, Willem C., KOZIKOWSKI, V., *et al.* Nutritive value of protein extracted from honey bees. *Journal of Food Science*, 1985, vol. 50, no 5, p. 1327-1329.

PAOLETTI, Maurizio G., NORBERTO, Lorenzo, DAMINI, Roberta, *et al.* Human gastric juice contains chitinase that can degrade chitin. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2007, vol. 51, no 3, p. 244-251.

POITRAS, Elyse et HOUDE, Alain. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology*, 2002, vol. 2, no 2, p. 2-11.

PORTER, Teresita M., GIBSON, Joel F., SHOKRALLA, Shadi, *et al.* Rapid and accurate taxonomic classification of insect (class Insecta) cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) DNA barcode sequences using a naïve Bayesian classifier. *Molecular ecology resources*, 2014, vol. 14, no 5, p. 929-942.

PRASHANTH, KV Harish et THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in food science & technology*, 2007, vol. 18, no 3, p. 117-131.

PROKOPOWICH, Cheryl D., GREGORY, T. Ryan, et CREASE, Teresa J. The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome*, 2003, vol. 46, no 1, p. 48-50.

PURAC, Jelena, KOJIC, Danijela, PETRI, Edward, *et al.* Cold Adaptation Responses in Insects and Other Arthropods: An “Omics” Approach. In : *Short Views on Insect Genomics and Proteomics*. Springer International Publishing, 2016. p. 89-112.

RAMOS-BUENO, Rebeca Pilar, GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, María José, SÁNCHEZ-MUROS-LOZANO, María José, *et al.* Fatty acid profiles and cholesterol content of seven insect species assessed by several extraction systems. *European Food Research and Technology*, 2016, p. 1-7.

RAMOS-ELORDUY, Julieta, GONZÁLEZ, Ernesto Avila, HERNÁNDEZ, Alma Rocha, *et al.* Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. *Journal of economic entomology*, 2002, vol. 95, no 1, p. 214-220.

RAMOS-ELORDUY, Julieta, MORENO, José Manuel Pino, et CAMACHO, Víctor Hugo Martínez. Could Grasshoppers Be a Nutritive Meal?. *Food and Nutrition Sciences*, 2012, vol. 3, no 02, p. 164.

RASMUSSEN, Randy, MORRISON, T., HERRMANN, M. A. R. K., *et al.* Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye. *Biochemica*, 1998, vol. 2, no 8, p. 11.

REEDER, Ronald H. Regulation of RNA polymerase I transcription in yeast and vertebrates. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 1998, vol. 62, p. 293-327.

REESE, G., AYUSO, R., et LEHRER, Samuel B. Tropomyosin: An invertebrate pan-allergen. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1999, vol. 119, no 4, p. 247-258.

Règlement (CE) n°258/97 du Parlement Européen et du Conseil du 27 janvier 1997 concernant les *novel food* et les nouveaux ingrédients. *Official Journal*. L43, 1-6.

Règlement (CE) n°163/2009 de la Commission du 26 février 2009 modifiant l'annexe IV du règlement (CE) n°999/2001 du Parlement européen et du conseil fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles. *Official Journal*. L55, 17-18.

Règlement (CE) n°767/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 13 juillet 2009 concernant la mise sur le marché et l'utilisation des aliments pour animaux, modifiant le règlement (CE) n°1831/2003 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la directive 79/373/CEE du Conseil, la directive 80/511/CEE de la Commission, les directives 82/471/CEE, 83/228/CEE, 93/74/CEE, 93/113/CE et 96/25/CE du Conseil, ainsi que la décision 2004/217/CE de la Commission, *Official Journal*. L229, 1-27.

Règlement (UE) n°51/2013 de la Commission du 16 janvier 2013 modifiant le règlement (CE) n°152/2009 en ce qui concerne les méthodes d'analyse applicables en matière d'identification des

constituants d'origine animale pour le contrôle officiel des aliments pour animaux. *J. Off. Commun. Eur.* L20, 33-43.

Règlement (UE) n°208/2011 de la Commission du 2 mars 2011 modifiant l'annexe VII du règlement (CE) n°882/2004 du Parlement européen et du Conseil, les règlements de la Commission (CE) n°108/2008 et (CE) n°737/2008 en ce qui concerne les listes et les dénominations des laboratoires de référence de l'Union européenne. *Official Journal.* L58, 29-35

Règlement (UE) 2015/2283 du Parlement Européen et du Conseil du 25 novembre 2015 relatifs aux nouveaux aliments, modifiant le règlement (UE) n°1169/2011 du Parlement et du Conseil et abrogeant le règlement (CE) n°258/97 du Parlement Européen et du Conseil et le règlement (CE) N°1852/2001 de la Commission. *Official Journal.* L327, 1-22.

ROGER, Andrew J., SANDBLOM, Olof, DOOLITTLE, W. Ford, *et al.* An evaluation of elongation factor 1 alpha as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular biology and evolution*, 1999, vol. 16, no 2, p. 218-233.

RUMPOLD, Birgit A. et SCHLÜTER, Oliver K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular nutrition & food research*, 2013, vol. 57, no 5, p. 802-823.

RUMPOLD, Birgit A. et SCHLÜTER, Oliver K. Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2013, vol. 17, p. 1-11.

SCHAFFNER Francis, *Les insectes - initiation à l'entomologie*, 2004, Montpellier

Service Public de Wallonie. (s.d.). *Guide des institutions* en ligne <http://www.wallonie.be/fr/guide/guide-services/16336> consulté le 23 juillet 2016

Service public fédéral Santé publique, Sécurité de la chaîne alimentaire et Environnement. (2016). *Qu'est-ce qu'un nouvel aliment ?* en ligne <http://www.health.belgium.be/fr/alimentation/secure-alimentaire/nouveaux-aliments/quest-ce-que-nouvel-aliment> consulté le 29 juillet 2016.

Service public fédéral Santé publique, Sécurité de la chaîne alimentaire et Environnement. (2016). *Questions-réponses sur l'application de la réglementation « novel food » aux insectes destinés à l'alimentation humaine et son évolution dans les prochaines années* en ligne http://www.health.belgium.be/sites/default/files/uploads/fields/fpshealth_theme_file/2016_01_qna_novel_foods_insects_final_fr.pdf consulté le 29 juillet 2016.

Service public fédéral Santé publique, Sécurité de la chaîne alimentaire et Environnement. (2016). *Statut réglementaire des insectes destinés à l'alimentation humaine* en ligne <http://www.health.belgium.be/fr/news/statut-reglementaire-des-insectes-destines-lalimentation-humaine> consulté le 29 juillet 2016.

SHILOV, Ignat V., SEYMOUR, Sean L., PATEL, Alpesh A., *et al.* The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, vol. 6, no 9, p. 1638-1655.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER F.X., KIEMLE, D.J., *Identification spectrométrique de composés organiques*, 2007, 2^e édition, Bruxelles, ed De Boeck, ISBN 978-2-8041-5507-0.

SIMON, Sabrina, SCHIERWATER, Bernd, et HADRYS, Heike. On the value of Elongation factor-1 α for reconstructing pterygote insect phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, vol. 54, no 2, p. 651-656.

SIRACUSA, A., MARCUCCI, F., SPINOZZI, F., *et al.* Prevalence of occupational allergy due to live fish bait. *Clinical & Experimental Allergy*, 2003, vol. 33, no 4, p. 507-510.

SMIL, Vaclav. Eating meat: Evolution, patterns, and consequences. *Population and development review*, 2002, vol. 28, no 4, p. 599-639.

STEINFELD, Henning et GERBER, Pierre. Livestock production and the global environment: Consume less or produce better?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, vol. 107, no 43, p. 18237-18238.

Thermo Fischer Scientific. (2012). *The purpose of ROX in real-time PCR* en ligne https://www.youtube.com/watch?v=qg0l_wyhFZo consulté le 26 juillet 2016.

TRAN, G., HEUZÉ, V., et MAKKAR, H. P. S. Insects in fish diets. *Animal frontiers*, 2015, vol. 5, no 2, p. 37-44.

VAN AALTEN, D. M. F., KOMANDER, D., SYNSTAD, B., *et al.* Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, vol. 98, no 16, p. 8979-8984.

VAN BROEKHOVEN, Sarah, BASTIAAN-NET, Shanna, DE JONG, Nicolette W., *et al.* Influence of processing and in vitro digestion on the allergic cross-reactivity of three mealworm species. *Food chemistry*, 2016, vol. 196, p. 1075-1083.

VAN HUIS, A. Insects as food in sub-Saharan Africa. *International Journal of Tropical Insect Science*, 2003, vol. 23, no 03, p. 163-185.

VAN HUIS, Arnold. Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual Review of Entomology*, 2013, vol. 58, p. 563-583.

VAN ITTERBEECK, Joost et VAN HUIS, Arnold. Environmental manipulation for edible insect procurement: a historical perspective. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 2012, vol. 8, no 1, p. 1.

VERBEKE, Wim, SPRANGHERS, Thomas, DE CLERCQ, Patrick, *et al.* Insects in animal feed: Acceptance and its determinants among farmers, agriculture sector stakeholders and citizens. *Animal Feed Science and Technology*, 2015, vol. 204, p. 72-87.

WERNER, Thomas, KOSHIKAWA, Shigeyuki, WILLIAMS, Thomas M., *et al.* Generation of a novel wing colour pattern by the Wingless morphogen. *Nature*, 2010, vol. 464, no 7292, p. 1143-1148.

Wikipedia. (2016). *Réaction en chaîne par polymérase* en ligne https://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9action_en_cha%C3%A9ne_par_polym%C3%A9rase consulté le 12 août 2016

WILSON, Ian G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology*, 1997, vol. 63, no 10, p. 3741.

WILSON, Mary E., LORENTE, Carol A., ALLEN, Jennifer E., *et al.* Gongylonema infection of the mouth in a resident of Cambridge, Massachusetts. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, vol. 32, no 9, p. 1378-1380.

WINSLOW, S. G. et GERSTNER, Herbert B. Health aspects of chloroform—A review. *Drug and chemical toxicology*, 1978, vol. 1, no 3, p. 259-275.

YU, Douglas W., JI, Yinqiu, EMERSON, Brent C., *et al.* Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 2012, vol. 3, no 4, p. 613-623.

ZHANG, De-Xing et HEWITT, Godfrey M. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1997, vol. 25, no 2, p. 99-120.

ZHANG, Guojie, WANG, Hongsheng, SHI, Junjie, *et al.* Identification and characterization of insect-specific proteins by genome data analysis. *Bmc Genomics*, 2007, vol. 8, no 1, p. 93.

ZHENG, Longyu, LI, Qing, ZHANG, Jibin, *et al.* Double the biodiesel yield: rearing black soldier fly larvae, *Hermetia illucens*, on solid residual fraction of restaurant waste after grease extraction for biodiesel production. *Renewable energy*, 2012, vol. 41, p. 75-79.

ZHENG, Longyu, HOU, Yanfei, LI, Wu, *et al.* Exploring the potential of grease from yellow mealworm beetle (*Tenebrio molitor*) as a novel biodiesel feedstock. *Applied energy*, 2013, vol. 101, p. 618-621.

ZHUANG, Ping, HUILING, Z. O. U., et WENSHENG, S. H. U. Biotransfer of heavy metals along a soil-plant-insect-chicken food chain: Field study. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, vol. 21, no 6, p. 849-853.

Annexes

Annexe 1: Insectes rencontrés dans l'alimentation humaine (en Belgique) ou dans l'alimentation animale et illustrations de leurs applications

Acheta domesticus – Grillon domestique



<http://teca.fao.org/>



Crêpe aux grillons (grillons.pagesperso-orange.fr)

Locusta migratoria – Cricket migrateur



M. Lecoq, 71

<http://locust.cirad.fr/>



Salade feta au crickets
(www.entomoveproject.com)

Zophobas atratus morio – Ver de farine géant



Imago de Zophobas atratus (bugguide.net)



Larve pour l'alimentation humaine
(<http://www.europe-entomophagie.com>)

Tenebrio molitor – Ver de farine



uniprot.org



lefigaro.fr

Alphitobius diaperinus – Ver buffalo



www.koleopterologie.de



Soupe tomate-ver buffalo (www.insectes-food.com)



Tapenade au tenebrion (www.lameuse.be)

Galleria mellonella – Fausse teigne (chenille)



Bugguide.net



Chenilles de fausse teigne au paprika et au sel
(www.conbuggie.be)

Schistocera americana – Criquet pèlerin d'Amérique



www.giffbeaton.com



Criquets enrobés de chocolat (www.insectes-food.com)

Grylloides sigillatus – Grillon à ailes courtes



bugguide.net



Farine de Grylloides sigillatus pour alimentation animale

Hermetia illucens – Mouche soldat noire



biolib.cz



Farine de Hermetia illucens pour alimentation animale

Achroia grisella – Petite fausse teigne (chenille)



bugguide.net



Omelette aux larves de fausse teigne

Bombyx mori – Ver à soie (chenille)



cbif.gc.ca



Brochettes de ver à soie (crokfun.com)

Annexe 2: Photos des espèces reçues de Gembloux Agro-Bio Tech et dont l'ADN a été extrait

Bibio marci



Calliphora vicina



Sarcophagia carnaria



Bombylius major



Melolontha melolontha



Leptinotarsa decemlineata



Cassida viridis



Cicindela campestris



Nicrophorus humator



Nicrophorus vespillo



Blatta orientalis



Acheta domesticus



Locusta migratoria



Annexe 3: Protocole d'extraction de l'ADN par la méthode au CTAB

Préparation des tampons, solutions et mélanges requis

- **Tampon d'extraction CTAB (CTAB1)** : 20 g/l CTAB ; 1,4 mol/l NaCl ; 0,1 mol/l Tris, 0,02 mol/l Na₂-EDTA. Ajuster le pH à 8,0 à l'aide de HCl ou de NaOH.
- **Tampon de précipitation CTAB (CTAB2)** : 5 g/l CTAB, 0,04 mol/l NaCl.
- **Solution de chlorure de sodium (CTAB3)** : 1,2 mol/l NaCl.
- **Solution de protéinase K** (20 mg/ml, préparée extemporanément selon la fiche technique du fournisseur).
- **Ethanol 70%** : Préparer l'éthanol 70 % en plaçant 70 % du volume désiré d'éthanol absolu dans un verre à pied gradué puis en portant à 100 % du volume avec de l'eau de qualité PCR. Transférer le tout dans un récipient approprié (bouteille en verre ou tube en polypropylène).

Extraction de l'ADN

1. Placer **200 (-2/+10) mg** de l'échantillon pour essai dans un tube de 2 ml en polypropylène.
2. Ajouter **1,5 ml** de tampon d'extraction CTAB1 et **5 µl** de RNase A (**20 mg/ml**) et mélanger (à l'aide d'un vortex).
3. Incuber **30 minutes à 60 (±2)°C** (agiter après 15 min pour remettre la matière en suspension).
4. Ajouter **10 µl** de protéinase K (20 mg/ml).
5. Vortexer en douceur.
6. Incuber **30 minutes à 60 (±2)°C** (agiter après 15 min pour remettre la matière en suspension).
7. Centrifuger 10 minutes à **15.000 g**.
8. Transférer **900 µl** de surnageant dans une nouvelle cupule à usage unique contenant **900 µl** de chloroforme.
9. Vortexer **30 secondes**.
10. Centrifuger 15 minutes à **15.000 g**.
11. Transférer **650 µl** de surnageant dans une nouvelle cupule à usage unique de 2 ml.
12. Ajouter **1300 µl** de tampon de précipitation CTAB2.
13. Incuber **60 minutes à température ambiante** sans agitation.
14. Centrifuger **15 minutes à 15.000 g**.
15. Evacuer le surnageant (attention l'ADN est dans le culot).
16. Ajouter **700 µl** de la solution de NaCl (CTAB3)
17. Vortexer pour dissoudre l'ADN.
18. Ajouter **700 µl** de chloroforme.
19. Vortexer à « fond » 30 secondes.
20. Centrifuger **10 minutes à 15.000 g**.
21. Transférer **600 µl** de la phase aqueuse dans une nouvelle cupule à usage unique de 2 ml.
22. Ajouter **0.6 (360µl)** volume d'isopropanol.
23. Inverser 4 ou 5 fois.
24. Incuber **20 minutes à température ambiante**.
25. Centrifuger **15 minutes à 15.000 g**.
26. Eliminer le surnageant.
27. Ajouter **500 µl** d'éthanol à 70 %.
28. Inverser 4 ou 5 X délicatement.

29. Centrifuger **10 minutes** à **15.000 g**.
30. Evacuer le surnageant.
31. Faire sécher dans le concentrateur-évaporateur ou à défaut **sécher 30 minutes** dans une étuve à ~55°C.
32. Resuspendre l'ADN dans **200 µl** d'eau de qualité PCR.
33. Si l'extrait d'ADN n'est pas pris en charge le jour même pour analyses PCR, le congeler pour sa conservation.

Annexe 4: Protocole d'extraction et de purification des protéines

Préparation des solutions

TCA 10% (Solution 1) = pour +/- 32 éch.

10 g de TCA + 0,3 g de DTT dans 100 ml d'acétone (à -20°C) (porter à 100 ml)
A stocker à -20°C pendant au moins 1h avant utilisation.

A préparer fraîchement !!

Acétone 100% (Solution 2) = pour +/- 16 éch.

0,3 g de DTT dans 100 ml d'acétone (à -20°C) (porter à 100 ml)
A stocker à -20°C pendant au moins 1h avant utilisation.

Acétone 90% (Solution 3) = pour +/- 32 éch.

0,3 g de DTT + 90 ml d'acétone (à -20°C) + 10 ml d'eau milliQ (porter à 100 ml)
A stocker à -20°C pendant au moins 1h avant utilisation.

DLA

- Peser 10,5 g d'urée 7M et 3,8 g de thiourée 2M dans berlin de 25ml
- Rajouter de l'eau mQ jusqu'à un peu moins de 25 ml
- Agiter pendant au moins 15 min (jusqu'à complète dissolution, éventuellement ajouter de l'eau goutte par goutte)
- Rajouter 91 mg de Tris 30 mM et 1g de CHAPS 4%
- Agiter jusqu'à solubilisation complète
- Porter au trait (25 ml) avec de l'eau
- Mélanger
- Constituer des aliquotes de 1 ml

Stocker à -20°C

Extraction des protéines au TCA/Acétone

- Peser 200 mg de farine
- Ajouter 1,8 ml de TCA/acétone (solution 1)
- Vortexer
- Mettre à -20°C overnight. Pendant les 1^{ère} 30 min, vortexer toutes les 10 minutes
- Centrifuger à 16 000 g à 4°C pendant 10 min
- Décanté
- Remettre 1,8 ml d'acétone 100% sur le culot (solution 2)
- Vortexer
- Mettre à -20°C pendant 1h
- Centrifuger à 16 000 g à 4°C pendant 10 min
- Décanté
- Ajouter 1,8 ml d'acétone 100% sur le culot (solution 2)
- Vortexer
- Mettre à -20°C pendant 30 min
- Centrifuger à 16 000 g à 4°C pendant 10 min
- Décanté
- Ajouter 1,8 ml d'acétone 90% sur le culot (solution 3)
- Vortexer

- Mettre à -20°C pendant 30 min
- Centrifuger à 16 000 g à 4°C pendant 10 min
- Décanner (+dip tip)
- Laisser quelques minutes (2-3 min, pas trop sec) à l'air libre pour évaporer l'acétone
- Ajouter 300 µl de DLA sur le culot
- Vortexer
- Mélanger avec une spatule (et ajouter DLA au besoin)
- Agiter pendant 1h à 1400 rpm (12°C)
- Centrifuger à 16 000 g à 12°C pendant 10 min (si pas de surnageant, ajouter DLA et agiter 20-30 min)
- Reprendre le surnageant dans de nouveaux eppendorf (1,5 ml) (jeter le culot solide) et estimer volume
- Au besoin, Centrifuger le surnageant avec rotor incliné à 16000g à 10°C pdt 10 min
- Reprendre le surnageant dans de nouveaux eppendorf et estimer volume (si il y a un culot)

Dosage des protéines par Pierce

- Incliner un peu la plaque
- 1^{ère} colonne = droite étalon : utilisation de témoins aux différentes concentrations
- 2^{ème} colonne : blanc (= tampon d'extraction : DLA par exemple)
 - A : 9 µl H₂O + 1 µl de tampon d'extraction
 - B : 9 µl H₂O + 1 µl de tampon d'extraction
- Colonnes suivantes : échantillons
 - A : 9 µl H₂O + 1 µl d'échantillon (dilué ou pas)
 - B : 9 µl H₂O + 1 µl d'échantillon (dilué ou pas)
- Rajouter 150 µl de solution Pierce dans chaque puits
- Laisser le plaque 5 min à l'abri de la lumière

Purification des extraits protéiques avec le kit 2-D Clean-Up

- 1. Avant manipulation**
 - Aller chercher de la glace
 - Savoir quels volumes et quantités on va précipiter (70 µg de protéines)
 - Vérifier la quantité nécessaire des différents composants du kit :
 - 300 µl de précipitant
 - 340 µl de co-précipitant
 - 25 µl d'eau milliQ
 - 1 ml de wash buffer conservé à -20 °C
 - 5 µl de Wash additive
- 2. Précipitation des protéines dont le volume est compris entre 1 et 100 µl (contenant 1-100 µg)**
 - Transférer 1-100 µl d'échantillon (70 µg de protéines) dans un eppendorf de 1,5 ml

- Ajouter 300 µl de précipitant, vortexer et laisser sur glace 15 min
- Ajouter 300 µl de co-précipitant, vortexer.
- Centrifuger à vitesse maximale pendant 5 min à 4°C
- Enlever le plus possible de surnageant sans déranger le précipité
- Centrifuger à vitesse maximale 1 min
- Enlever le surnageant à l'aide de loading tips
- Ajouter 40 µl de co-précipitant tout doucement (contre les parois). Laisser agir 5 min sur glace
- Centrifuger à vitesse maximale pendant 5 min
- Enlever le plus possible de surnageant sans déranger le précipité (loading tips)
- Ajouter 25 µl d'eau milliQ (ou plus si nécessaire pour recouvrir le culot)
- Bien vortexer (le culot doit être cassé en suspension dans l'eau) + casser avec spatule
- Ajouter 1 ml de Wash Buffer (conservé à -20°C) et 5 µl de Wash additive
- Vortexer pour disperser le précipité (laisser toujours l'échantillon à froid).
- Incuber les tubes à -20°C pendant 3h. Vortexer toutes les 10 min pendant la première demi-heure
- Centrifuger 5 min à vitesse maximale (4°C)
- Enlever le plus possible de surnageant
- Centrifuger à vitesse maximale 1 min
- Enlever le surnageant à l'aide de loading tips
- Laisser sécher à l'air max 2 min

Annexe 5: Liste des espèces utilisées pour les alignements

Nom latin	Nom français	Nom anglais	Ordre	Famille
<i>Tenebrio molitor</i>	Ver de farine	Yellow mealworm	Coleoptera	Tenebrionidae
<i>Alphitobius diaperinus</i>	Ver buffalo	Lesser mealworm	Coleoptera	Tenebrionidae
<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	Charançon rouge du palmier	Red palm weevil	Coleoptera	Curculionidae
<i>Cicindela campestris</i>	Cicindèle champêtre	Green tiger beetle	Coleoptera	Cicindelidae
<i>Carabus coriaceus</i>	Procruste chagriné		Coleoptera	Carabidae
<i>Carabus auratus</i>	Carabe doré	Golden ground beetle	Coleoptera	Carabidae
<i>Dytiscus marginalis</i>	Dytique bordé	Great diving beetle	Coleoptera	Dytiscidae
<i>Cybister lateralmarginalis</i>	Cybistère marginé		Coleoptera	Dytiscidae
<i>Acilius sulcatus</i>	Acilie sillonnée		Coleoptera	Dytiscidae
<i>Ocypus olens</i>	Staphylin odorant	Devil's coach-horse beetle	Coleoptera	Staphylinidae
<i>Nicrophorus vespillo</i>	Nécrophore fureteur		Coleoptera	Silphidae
<i>Lampyris noctiluca</i>	Ver luisant	Common glow-worm	Coleoptera	Lampyridae
<i>Cantharis fusca</i>	Téléphore sombre		Coleoptera	Cantharidae
<i>Agrypnus murinus</i>	Lacon gris-de-souris		Coleoptera	Elateridae
<i>Buprestis octoguttata</i>	Bupreste à 8 points		Coleoptera	Buprestidae
<i>Coccinella septempunctata</i>	Coccinelle à 7 points	Seven-spot ladybird	Coleoptera	Coccinellidae
<i>Dermestes lardarius</i>	Dermeste du lard	Larder beetle	Coleoptera	Dermestidae
<i>Blaps gigas</i>	Blaps géant		Coleoptera	Tenebrionidae
<i>Lytta vesicatoria</i>	Cantharide officinale	Spanish fly	Coleoptera	Meloidae
<i>Oedemera nobilis</i>	Oedémère noble	False oil beetle	Coleoptera	Odemeridae
<i>Anoplotrupes stercorosus</i>	Géotrupe sylvain		Coleoptera	Geotrupidae
<i>Melolontha melolontha</i>	Hanneton commun	May bug	Coleoptera	Melolonthidae
<i>Oryctes nasicornis</i>	Rhinocéros	European rhinoceros beetle	Coleoptera	Scarabaeidae
<i>Trichius fasciatus</i>	Trichie fasciée		Coleoptera	Scarabaeidae

Annexes

<i>Cetonia aurata</i>	Cétoine dorée	Rose chafer	Coleoptera	Scarabaeidae
<i>Lucanus cervus</i>	Lucane cerf-volant	Stag beetle	Coleoptera	Lucanidae
<i>Dorcus parallelipedus</i>	Petite biche	Lesser stag beetle	Coleoptera	Lucanidae
<i>Sinodendron cylindricum</i>	Sinodendron cylindrique		Coleoptera	Lucanidae
<i>Cerambyx cerdo</i>	Grand capricorne	Great capricorn beetle	Coleoptera	Cerambycidae
<i>Ergates faber</i>	Ergate forgeron		Coleoptera	Cerambycidae
<i>Clytus arietis</i>	Clute commun	Wasp beetle	Coleoptera	Cerambycidae
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Doryphore	Colorado potato beetle	Coleoptera	Chrysomelidae
<i>Cassida rubiginosa</i>	Casside de la bardane	Thistle tortoise beetle	Coleoptera	Chrysomelidae
<i>Clytra laeviuscula</i>	Clytre lustrée		Coleoptera	Chrysomelidae
<i>Pissodes pini</i>	Pissode du pin		Coleoptera	Curculionidae
<i>Carabus maiyasanus</i>			Coleoptera	Carabidae
<i>Forficula auricularia</i>	Perce-oreille commun	Common earwing	Dermaptera	Forficulidae
<i>Blatella germanica</i>	Blatte germanique	German cockroach	Blattodea	Ectobiidae
<i>Blatta orientalis</i>	Blatte orientale	Oriental cockroach	Blattodea	Blattidae
<i>Mantis religiosa</i>	Mante religieuse	Praying Mantis	Mantodea	Mantidae
<i>Eristalis tenax</i>	Clairon des alvéoles	Drone fly	Diptera	Cleridae
<i>Hermetia illucens</i>	Mouche soldat noire	Black soldier fly	Diptera	Stratiomyidae
<i>Musca domestica</i>	Mouche commune	House fly	Diptera	Muscidae
<i>Lucilia sericata</i>	Mouche verte	Common green bottle fly	Diptera	Calliphoridae
<i>Sarcophaga carnaria</i>	Mouche à damier	Common flesh fly	Diptera	Sarcophagidae
<i>Scatophaga stercoraria</i>	Scatophage du fumier	Yellow dung fly	Diptera	Scatophagidae
<i>Calliphora vomitoria</i>	Mouche bleue	Blubottle fly	Diptera	Calliphoridae
<i>Culex pipiens</i>	moustique commun	Common house mosquito	Diptera	Culicidae
<i>Bibio longipes</i>			Diptera	Bibionidae
<i>Episyrphus balteatus</i>	Syrphe ceinturé	Marmalade hoverfly	Diptera	Syrphidae
<i>Tipula paludosa</i>	Tipule des prairies		Diptera	Tipulidae
<i>Anopheles maculipennis</i>	Anophèle du paludisme		Diptera	Culicidae
<i>Mikiola fagi</i>	Cécidom-yie du hêtre		Diptera	Cecidomyiidae

Annexes

<i>Haematopota pluvialis</i>	Taon des pluies	Common horse fly	Diptera	Tabanidae
<i>Bombylius major</i>	Grand bombyle	Large bee-fly	Diptera	Bombyliidae
<i>Machimus sadyates</i>			Diptera	Asilidae
<i>Machimus antimachus</i>			Diptera	Asilidae
<i>Meliscaeva cinctella</i>	Syrphe manche-à-air		Diptera	Syrphidae
<i>Drosophila melanogaster</i>	Drosophile commune	Vinegar fly	Diptera	Drosophilidae
<i>Stomoxys calcitrans</i>	Mouche des étables	Stable fly	Diptera	Muscidae
<i>Anopheles annulipes</i>			Diptera	Culicidae
<i>Machimus occidentalis</i>			Diptera	Asilidae
<i>Ephemera danica</i>	Grande mouche de mai		Ephemeroptera	Ephemeridae
<i>Ephemera orientalis</i>			Ephemeroptera	Ephemeridae
<i>Aphis fabae</i>	Puceron de la fève	Black bean aphid	Hemiptera	Aphididae
<i>Pulvinaria psidii</i>			Hemiptera	Coccidae
<i>Corixa punctata</i>	Corise ponctuée	Lesser water boatman	Heteroptera	Corixidae
<i>Notonecta glauca</i>	Notonecte glauque		Heteroptera	Notonectidae
<i>Gerris odontogaster</i>			Heteroptera	Gerridae
<i>Gerris lateralis</i>			Heteroptera	Gerridae
<i>Velia caprai</i>	Vélie des ruisseaux	Water cricket	Heteroptera	Veliidae
<i>Hydrometra stagnorum</i>	Hydromètre des étangs		Heteroptera	Hydrometridae
<i>Anthocoris nemorum</i>	Anthocore des bois	Common flowerbug	Heteroptera	Anthocoridae
<i>Miris striatus</i>	Miride striée		Heteroptera	Miridae
<i>Rhynocoris iracundus</i>	Réduve irascible		Heteroptera	Reduviidae
<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Gendarme	Firebug	Heteroptera	Pyrrhocoridae
<i>Lygaeus equestris</i>	Punaise marginée	Black and red bug	Heteroptera	Lygaeidae
<i>Coreus marginatus</i>	Corée marginée	Dock bug	Heteroptera	Coreidae
<i>Graphosoma lineatum</i>	Scutellère rayée	Italian striped-bug	Heteroptera	Pentatomidae
<i>Dolycoris baccarum</i>	Pentatome des baies	Sloe bug	Heteroptera	Pentatomidae
<i>Hydrometra gracilentata</i>		Lesser water measurer	Heteroptera	Hydrometridae
<i>Cicadetta montana</i>	Cigale des montagnes	New forest cicada	Homoptera	Cicadidae

Annexes

<i>Philaenus spumarius</i>	Cercopie spumeuse	Meadow froghopper	Homoptera	Cercopidae
<i>Pulvinaria vitis</i>	Cochenille rouge de la vigne		Homoptera	Coccidae
<i>Vespa vulgaris</i>	Guêpe commune	Common wasp	Hymenoptera	Vespidae
<i>Tenthredo scrophulariae</i>	Allante de la scrophulaire	Figwort sawfly	Hymenoptera	Tenthredinidae
<i>Urocerus gigas</i>	Sirex géant	Giant woodwasp	Hymenoptera	Siricidae
<i>Dolichomitus imperator</i>	Pimple empereur		Hymenoptera	Ichneumonidae
<i>Myrmica rubra</i>	Fourmi rouge	European fire ant	Hymenoptera	Formicidae
<i>Tapinoma erraticum</i>	Fourmi nomade	Erratic ant	Hymenoptera	Formicidae
<i>Vespa crabro</i>	Frelon	European hornet	Hymenoptera	Vespidae
<i>Vespa germanica</i>	Guêpe germanique	German wasp	Hymenoptera	Vespidae
<i>Odynerus spinipes</i>	Odynère sinipède		Hymenoptera	Eumenidae
<i>Auploplus carbonarius</i>	Pompile charbonnier		Hymenoptera	Pompilidae
<i>Ammophila sabulosa</i>	Ammophile des sables		Hymenoptera	Sphecidae
<i>Philanthus triangulum</i>	Philanthe apivore	European beewolf	Hymenoptera	Crabronidae
<i>Hylaeus hyalinatus</i>	Prosopide masquée		Hymenoptera	Colletidae
<i>Andrena vaga</i>	Andrène vagabonde		Hymenoptera	Andrenidae
<i>Lasioglossum pauxillum</i>	Halicte menu		Hymenoptera	Halictidae
<i>Megachile parietina</i>	Mégachile des murailles		Hymenoptera	Megachilidae
<i>Nomada lathburiana</i>	Nomade roussâtre		Hymenoptera	Anthophoridae
<i>Bombus terrestris</i>	Bourdon terrestre	Buff-tailed bumblebee	Hymenoptera	Apidae
<i>Apis mellifera</i>	Abeille domestique	European honey bee	Hymenoptera	Apidae
<i>Tenthredo campestris</i>			Hymenoptera	Tenthredinidae
<i>Bombyx mori</i>	Bombyx du mûrier	Silkworm	Lepidoptera	Bombycidae
<i>Tineola bisselliella</i>	Mite des vêtements	Common clothes moth	Lepidoptera	Tineidae
<i>Plodia interpunctella</i>	Pyrale de la farine	Indian mealmoth	Lepidoptera	Pyralidae
<i>Parenthrene tabaniformis</i>	Sésie asiliforme	Dusky clearwing	Lepidoptera	Sesiidae
<i>Zygaena purpuralis</i>	Zygène du serpolet	Transparent burnet	Lepidoptera	Zygaenidae
<i>Lasiocampa quercus</i>	Bombyx du chêne	Oak eggar	Lepidoptera	Lasiocampidae
<i>Saturnia pavonia</i>	Petit paon-de-nuit	Small emperor moth	Lepidoptera	Saturniidae

Annexes

<i>Agria tau</i>	Hachette	Tau emperor	Lepidoptera	Saturniidae
<i>Agrius convolvuli</i>	Sphinx du liseron	Convolvulus hawk moth	Lepidoptera	Sphingidae
<i>Macroglossum stellatarum</i>	Moro-sphinx	Hummingbird hawk moth	Lepidoptera	Sphingidae
<i>Acherontia atropos</i>	Sphinx tête de mort	Death's-head hawk moth	Lepidoptera	Sphingidae
<i>Pyrgus malvae</i>	Hespérie de l'ormière	Grizzled skipper	Lepidoptera	Hesperiidae
<i>Papilio machaon</i>	Machaon	Old world swallowtail	Lepidoptera	Papilionidae
<i>Iphiclides podalirius</i>	Flambé	Scarce swallowtail	Lepidoptera	Papilionidae
<i>Anthocharis cardamines</i>	Aurore	Orange tip	Lepidoptera	Pieridae
<i>Pieris brassicae</i>	Piérade du chou	Large white	Lepidoptera	Pieridae
<i>Lycaena phlaeas</i>	Cuivré commun	Small copper	Lepidoptera	Lycaenidae
<i>Lysandra coridon</i>	Argus bleu-nacré	Chalkhill blue	Lepidoptera	Lycaenidae
<i>Agrynnis paphia</i>	Tabac d'Espagne		Lepidoptera	Nymphalidae
<i>Vanessa atalanta</i>	Vulcain	Red admiral	Lepidoptera	Nymphalidae
<i>Inachis io</i>	Paon du jour	European peacock	Lepidoptera	Nymphalidae
<i>Aglais urticae</i>	Petite tortue	Small tortoiseshell	Lepidoptera	Nymphalidae
<i>Limenitis populi</i>	Grand sylvain	Poplar admiral	Lepidoptera	Nymphalidae
<i>Lasiommata megera</i>	Satyre	Wall brown	Lepidoptera	Nymphalidae
<i>Biston betularia</i>	Phalène du bouleau	Peppered moth	Lepidoptera	Geometridae
<i>Phalera bucephala</i>	Bucéphale	Buff-tip	Lepidoptera	Notodontidae
<i>Catocala sponsa</i>	Lichenée fiancée	Dark crimson underwing	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Euplagia quadripunctaria</i>	Ecaille chinée	Jersey tiger	Lepidoptera	Arctiidae
<i>Attacus atlas</i>	Atlas	Atlas moth	Lepidoptera	Saturniidae
<i>Panorpa communis</i>	Panorpe commune	Common scorpionfly	Mecoptera	Panorpidae
<i>Sialis longidens</i>			Megaloptera	Sialidae
<i>Chrysoperla carnea</i>	Chrysope commune	Common green lacwing	Nevroptera	Chrysopidae
<i>Aeshna cyanea</i>	Aeshne bleue	Southern hawkler	Odonata	Aeshnidae
<i>Anax imperator</i>	Anax empereur	Emperor dragonfly	Odonata	Aeshnidae
<i>Crocothemis erythraea</i>	Libellule écarlate	Broaed scarlet	Odonata	Libellulidae
<i>Calopteryx splendens</i>	Caloptéryx éclatant	Banded demoiselle	Odonata	Calopterygidae

Annexes

<i>Lestes sponsa</i>	Leste fiancé	Emerald damselfly	Odonata	Lesdidae
<i>Ischnura elegans</i>	Agrion élégant	Blue-tailed damselfly	Odonata	Coenagrionidae
<i>Aeshna affinis</i>		Southern migrant hawk	Odonata	Aeshnidae
<i>Aeshna crenata</i>		Siberian hawk	Odonata	Aeshnidae
<i>Anax nigrofasciatus</i>			Odonata	Aeshnidae
<i>Crocothemis servilia</i>		Scarlet skimmer	Odonata	Libellulidae
<i>Lestes japonicus</i>			Odonata	Lestidae
<i>Acheta domesticus</i>	Grillon domestique	House cricket	Orthoptera	Gryllidae
<i>Locusta migratoria</i>	Criquet migrateur	Migratory locust	Orthoptera	Acrididae
<i>Tettigonia viridissima</i>	Grande sauterelle verte	Great green bush-cricket	Orthoptera	Tettigoniidae
<i>Schistocera americana</i>		American grasshopper	Orthoptera	Acrididae
<i>Tetrix subulata</i>	Tetrix riverain		Orthoptera	Tetrigidae
<i>Phasma gigas</i>			Phasmoptera	F
<i>Perla marginata</i>	Perle dorée		Plecoptera	Perlidae
<i>Phaeostigma notata</i>	Petite raphidie		Raphidioptera	Stylopidae
<i>Ceratophyllus sp.</i>			Siphonaptera	Ceratophyllidae
<i>Stylops melittae</i>			Strepsiptera	Stylopidae
<i>Parthenothrips dracaenae</i>	Thrips des dragonniers		Thysanoptera	Thripidae
<i>Chaetopteryx villosa</i>	Phrygane velue		Trichoptera	Limnephilidae

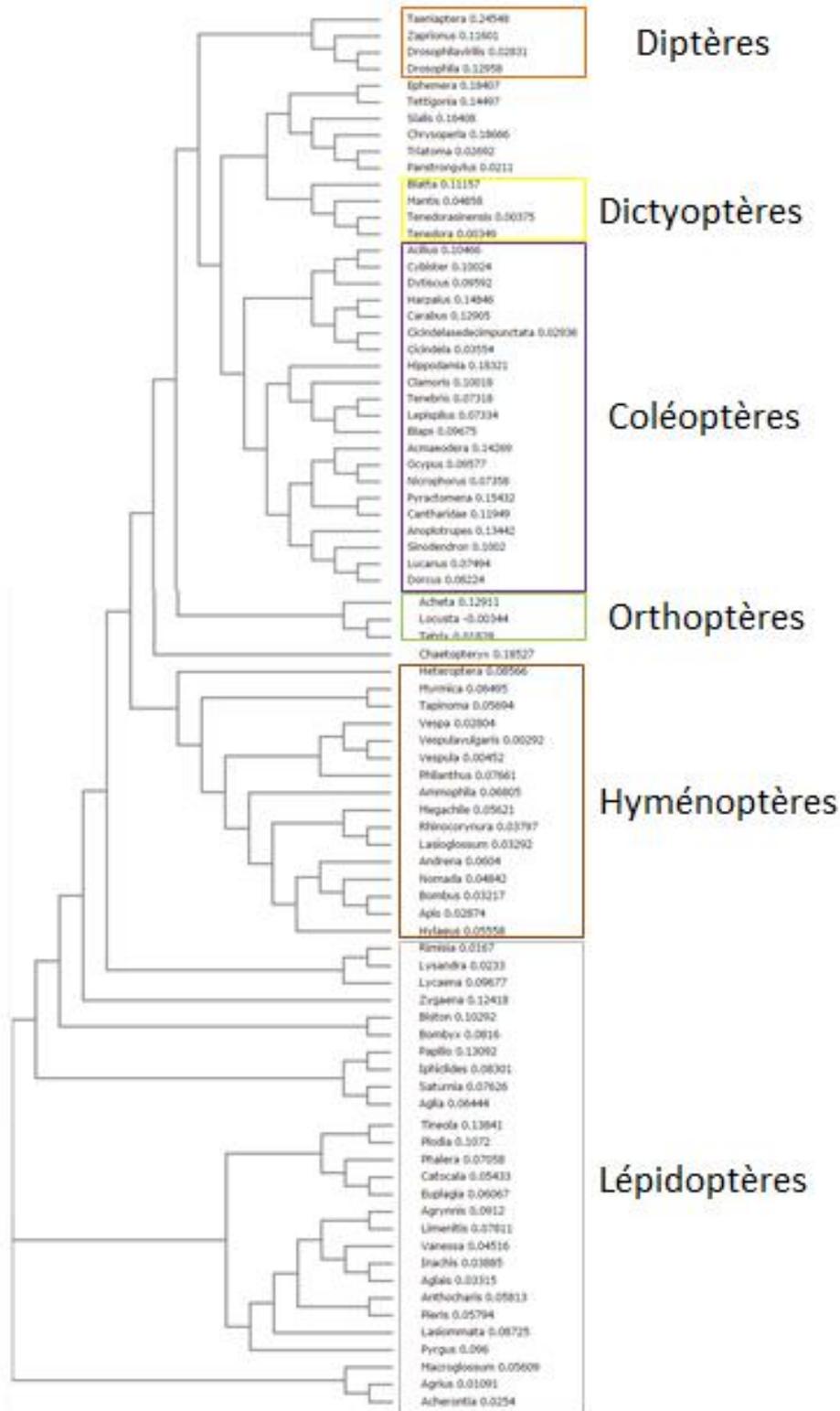
Annexe 6: Protocole des reconstitution des différents réactifs composant le kit Primer Design spécifique à *Tenebrio molitor*

1. Centrifuger brièvement chacun des tubes avant ouverture afin de s'assurer que le contenu lyophilisé se trouve bien au fond des tubes
2. Reconstituer les composants du kit par adjonction du volume adéquat d'eau exempte de DNase/ RNase en respectant les indications fournies par le tableau suivant :

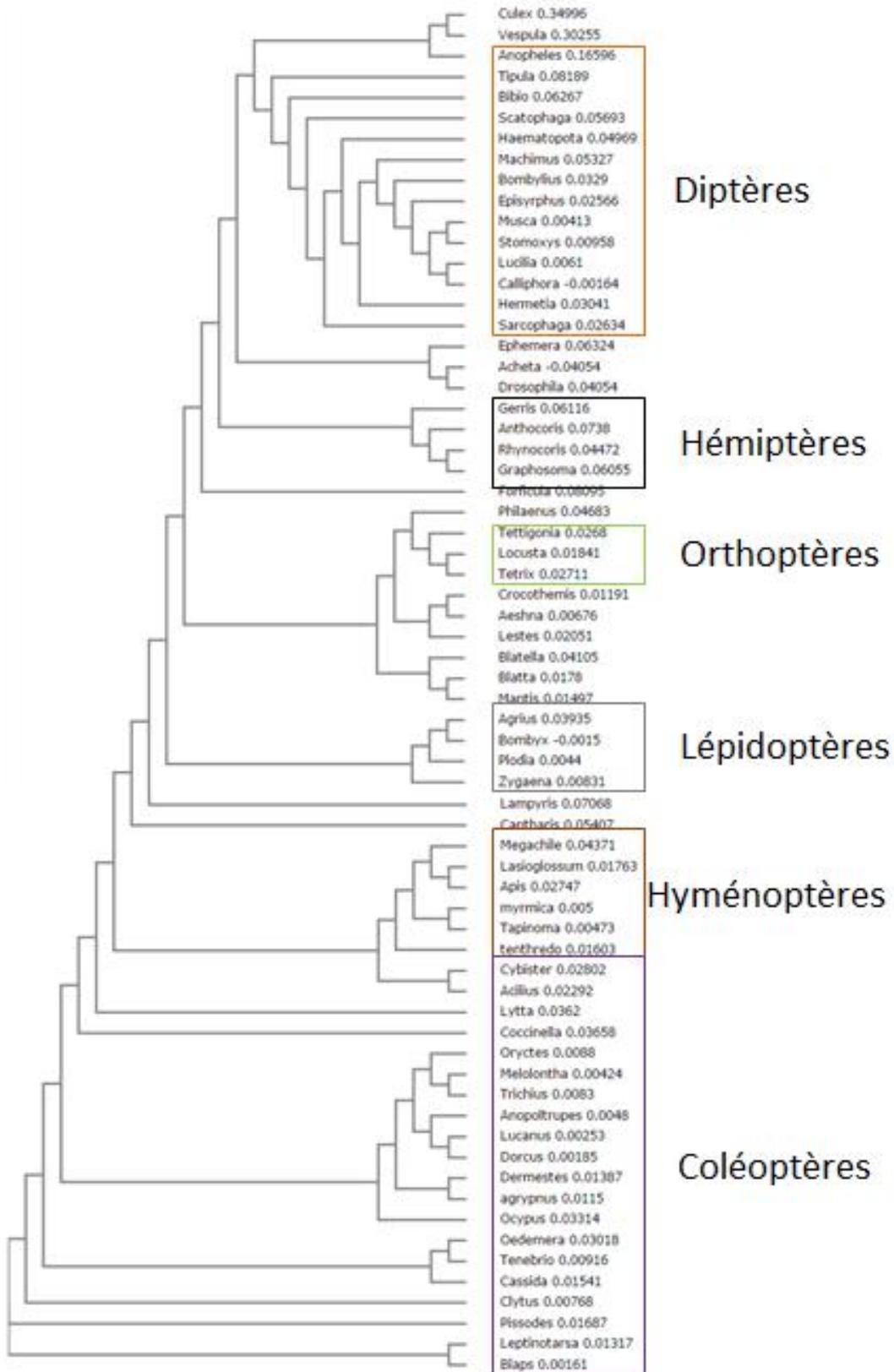
Réactif	Volume d'eau à adjoindre (µl)
Mix sonde/amorces <i>T. molitor</i>	165
Contrôle interne d'extraction pour mix d'amorces et sonde	165
Contrôle endogène pour mix d'amorces et sonde	165
Contrôle interne d'extraction de l'ADN	600

3. Reconstituer le témoin positif par ajout de 500 µl de tampon de préparation. Ce témoin étant particulièrement concentré, il est vivement recommandé de procéder à sa mise en suspension dans une autre pièce que le local pré-PCR.

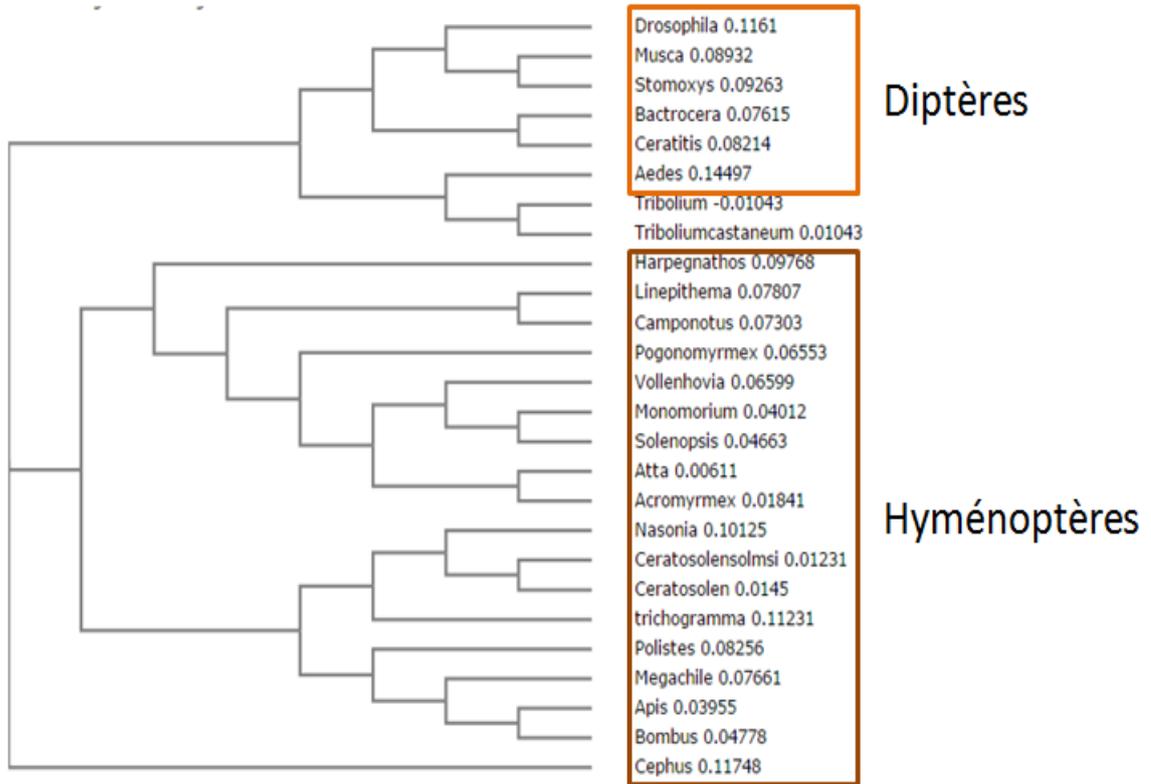
Annexe 7 : Arbre phylogénétique réalisé pour le gène wingless



Annexe 8: Arbre phylogénétique obtenu pour le gène codant pour l'ARN 18s



Annexe 9: Arbre phylogénétique obtenu pour le gène codant pour le facteur d'élongation 1 α



Annexe 10: Données brutes relatives à l'extraction protéique au TCA/Acétone et au dosage des extraits par le teste de Pierce

CRL	Type	Dilution (x)	Concentration dilué avec DLA	Concentration dilué-conc DLA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Volume extrait (μl)	Volume à prélever dans dilué (pour 70 μg de protéines)(μl)	Volume à prélever dans non dilué (pour 70 μg de protéines)(μl)	Quantité de protéines au départ dans 200mg d'ech (μg)	Quantité de protéines au départ dans 200mg d'ech (mg)
2241-1	Hermetia illucens (entier broyé)	x5	4,526	4,526	500	15,5	3,09	11315	11,315
2241-2		x5	5,055	5,055	400	13,8	2,77	10110	10,11
2241-3		x5	5,876	5,876	400	11,9	2,38	11752	11,752
2697-1	Farine Hermetia illucens (firme 1)	x5	2,3	2,3	400	30,4	6,09	4600	4,6
2697-2		x5	2,117	2,117	300	33,1	6,61	3176	3,1755
2697-3		x5	2,495	2,495	300	28,1	5,61	3743	3,7425
2704-1	Farine Hermetia illucens (firme 2)	x5	8,015	8,015	500	8,7	1,75	20038	20,0375
2704-2		x5	5,628	5,628	500	12,4	2,49	14070	14,07
2704-3		x5	8,815	8,815	500	7,9	1,59	22038	22,0375
2705-1	Farine Hermetia illucens (firme 2)	x5	4,227	4,227	500	16,6	3,31	10568	10,5675
2705-2		x5	3,986	3,986	500	17,6	3,51	9965	9,965
2705-3		x5	4,915	4,915	500	14,2	2,85	12288	12,2875
2274-1	Farine protéine + chitine d'Hermetia illucens (firme 1)	x2	6,858	6,858	250	10,2	5,10	3429	3,429
2274-2		x2	6,36	6,36	300	11,0	5,50	3816	3,816
2274-3		x2	4,845	4,845	300	14,4	7,22	2907	2,907
2275-1	Farine protéines hydrolysées Hermetia	x1	9,82	9,82	250	7,1	7,13	2455	2,455

Annexes

2275-2	illucens (firme 1)	x1	7,687	7,687	350	9,1	9,11	2690,45	2,69045
2275-3		x1	7,985	7,985	250	8,8	8,77	1996,25	1,99625
2276-1		x1	7,941	7,941	400	8,8	8,82	3176,4	3,1764
2276-2	Farine Hermetia illucens (firme 1)	x1	8,803	8,803	300	8,0	7,95	2640,9	2,6409
2276-3		x1	8,704	8,704	350	8,0	8,04	3046,4	3,0464
2051-1	Alphitobius diaperinus (entier broyé)	x2	7,961	7,961	500	8,8	4,40	7961	7,961
2051-2		x2	7,983	7,983	400	8,8	4,38	6386,4	6,3864
2051-3		x2	9,344	9,344	500	7,5	3,75	9344	9,344
2700-1	Farine d'Alphitobius diaperinus (firme 4)	x2	5,401	5,401	450	13,0	6,48	4860,9	4,8609
2700-2		x2	5,779	5,779	500	12,1	6,06	5779	5,779
2700-3		x2	7,789	7,789	450	9,0	4,49	7010,1	7,0101
2047-1	Gryllus assimilis (entier broyé)	x2	6,363	6,363	400	11,0	5,50	5090,4	5,0904
2047-2		x2	7,011	7,011	400	10,0	4,99	5608,8	5,6088
2047-3		x2	6,557	6,557	450	10,7	5,34	5901,3	5,9013
2703-1	Farine de Gryllus assimilis (firme 5)	x2	5,444	5,444	500	12,9	6,43	5444	5,444
2703-2		x2	5,466	5,466	400	12,8	6,40	4372,8	4,3728
2703-3		x2	4,515	4,515	400	15,5	7,75	3612	3,612
2049-1	Tenebrio molitor (entier broyé)	x1	16,288	16,288	400	4,3	4,30	6515,2	6,5152
2049-2		x1	14,441	14,441	400	4,8	4,80	5776,4	5,7764
2049-3		x1	14,729	14,729	400	4,8	4,80	5891,6	5,8916
2699-1	Farine de Tenebrio molitor (firme 6)	x2	3,596	3,596	300	19,5	9,73	2157,6	2,1576
2699-2		x2	4,049	4,049	250	17,3	8,64	2024,5	2,0245
2699-3		x2	3,795	3,795	250	18,4	9,22	1897,5	1,8975
2709-1	Farine de Tenebrio molitor (firme 7)	x2	5,807	5,807	400	12,1	6,03	4645,6	4,6456
2709-2		x2	5,442	5,442	400	12,9	6,43	4353,6	4,3536
2709-3		x2	5,409	5,409	400	12,9	6,5	4327,2	4,3272