Protéomique : Une nouvelle méthode pour détecter l'adultération du miel

Dr Matthias Witt Dr
Christof Kunert
Eurofins Food Integrity Control Services GmbH Septembre

2025

Introduction

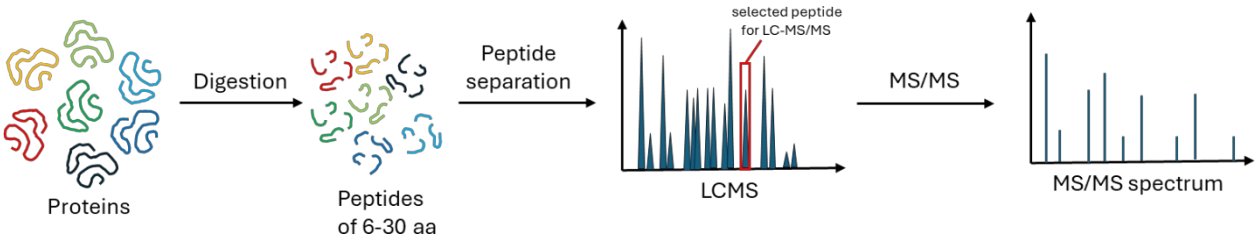
De nos jours, la fraude alimentaire est un sujet brûlant dans l'actualité quotidienne. Les aliments particulièrement coûteux, tels que le miel, ont donné lieu à de nombreuses tentatives de falsification (par exemple, l'ajout de produits sucrés bon marché tels que le sirop de riz, de maïs ou de betterave). La détermination de l'authenticité du miel est importante pour des raisons de qualité et de sécurité. Non seulement les clients accordent une grande importance à la qualité des aliments, mais l'industrie alimentaire a également besoin d'une assurance qualité pour répondre aux critères de qualité de ses produits. Grâce à ses antioxydants et à ses effets antimicrobiens et anti-inflammatoires, le miel est un produit naturel largement consommé par les humains pour ses effets thérapeutiques. Les propriétés curatives du miel sont connues depuis l'Antiquité dans le domaine de l'apithérapie [1]. Une analyse détaillée du miel est nécessaire pour caractériser cet aliment en raison de sa grande complexité, qui comprend des glucides, des protéines, des enzymes, des acides aminés et des acides organiques. De plus, à l'aide de la microscopie, le pollen du miel est également analysé afin de confirmer son origine botanique et géographique. Les analyses des ingrédients du miel (à l'exception de l'analyse du pollen) sont principalement effectuées par des méthodes spectroscopiques (UV, FLD, etc.), la chromatographie liquide à haute pression (HPLC), la chromatographie ionique (IC), la spectroscopie 1H-RMN (résonance magnétique nucléaire) ainsi que la LC-MS/MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem). Il existe des paramètres standard internationaux auxquels le miel doit satisfaire, tels que l'activité diastase/amylase [2]. Si cette activité enzymatique est faible, par exemple en raison d'une fraude alimentaire causée par l'ajout de sirop de sucre ou par la manipulation du miel à haute température pendant la récolte, une compensation peut être effectuée par l'ajout d'amylase étrangère. Les tests d'activité enzymatique pour l'α-amylase ou l'invertase sont généralement effectués par des tests spectroscopiques. L'un des critères internationaux pour la commercialisation du miel est le test d'activité diastase/amylase avec un indice diastasique (DN) généralement supérieur ou égal à 8 DN (supérieur ou égal à 3 DN pour le miel à faible teneur en enzymes naturelles, par exemple le miel d'agrumes) [3]. Cependant, ces tests ne sont pas très spécifiques aux enzymes provenant de l'abeille mellifère *Apis mellifera*. Par conséquent, des enzymes étrangères provenant d'un autre organisme, tel que la levure (par exemple *Saccharomyces cerevisiae*), pourraient être ajoutées pour satisfaire aux normes internationales (critères d'activité amylase/diastase). Avec les tests d'activité enzymatique actuellement utilisés, ces enzymes étrangères sont difficiles à détecter, car l'amylase ou l'invertase provenant de l'abeille ne peut être distinguée de celle provenant d'autres organismes. Il est donc important d'éliminer l'incertitude quant à savoir si l'activité diastase/amylase dans le miel est uniquement d'origine naturelle ou si l'activité enzymatique a été augmentée par une enzyme artificielle.

Il est donc nécessaire de disposer d'une méthode spécifique pour détecter les enzymes étrangères telles que l'amylase ou la glycosidase afin de découvrir ce type d'adultération du miel [4,5]. Notre approche repose sur la protéomique ascendante ciblée. Cette méthode permet d'observer de manière très spécifique de faibles quantités d'enzymes ou d'autres protéines. Cette approche protéomique utilise un flux de travail LC-MS/MS / LC-HRMS ciblé sur les peptides après purification et digestion des protéines.

Protéomique du miel

La protéomique permet de caractériser en détail l'authenticité d'aliments tels que le miel [6]. Grâce à cette méthode, il est possible de distinguer des protéines de même type, telles que l'enzyme amylase provenant d'organismes différents, car la séquence d'acides aminés de cette protéine diffère même si l'activité enzymatique biologique est identique. Cela permet de distinguer les protéines les unes des autres. Dans le processus protéomique, les protéines sont purifiées (principalement séparées du sucre et des petites molécules). Elles sont ensuite clivées de manière sélective et digérées par une protéase. Après digestion, l'échantillon est mesuré par LC-MS/MS
/ LC-HRMS pour la séparation et la détection des peptides. Lorsque les peptides sont fragmentés par dissociation induite par collision (CID), les fragments b et y sont les fragments les plus abondants. Par conséquent, ces fragments spécifiques peuvent être utilisés pour identifier la séquence des peptides et détecter la protéine dans le miel. Cette approche protéomique ascendante peut être utilisée pour un flux de travail non ciblé et ciblé (figure 1).

Figure 1 : Flux de travail protéomique ascendant



Flux de travail non ciblé

À l'aide d'un flux de travail non ciblé, tous les peptides détectables dans le digestat protéique sont mesurés par LC-MS/MS (tous les peptides sont détectés et fragmentés par CID). Les spectres MS/MS sont recherchés dans une base de données afin d'identifier la séquence peptidique et de la corréler avec les séquences d'acides aminés des protéines présentes dans la base de données. Les protéines trouvées à l'aide de cette méthode sont ensuite répertoriées avec un score de probabilité basé sur la couverture séquentielle de chaque protéine (couverture séquentielle des peptides détectés et de leurs fragments). Une condition préalable à un faible taux de faux positifs est l'erreur de masse du peptide détecté. Cette valeur doit être faible pour permettre une identification correcte de la séquence peptidique. De plus, une résolution de masse élevée du spectromètre de masse est nécessaire dans les échantillons complexes afin de séparer les peptides coélués et de résoudre les états de charge multiples et élevés des peptides dans le spectre de masse. C'est pourquoi cette méthode est généralement utilisée avec des instruments Orbitrap (ou q-TOF) présentant des erreurs de masse inférieures à 5 ppm et une résolution de masse de 30 000 ou plus. Cette méthode est utilisée pour détecter toutes les protéines d'un protéome dans un organisme ou dans des échantillons complexes tels que le miel. Le flux de travail non ciblé est utilisé pour trouver les peptides d'enzymes artificielles ajoutées au miel. La masse et les fragments très précis sont nécessaires pour générer une liste de précurseurs/qualificateurs pour le flux de travail ciblé.

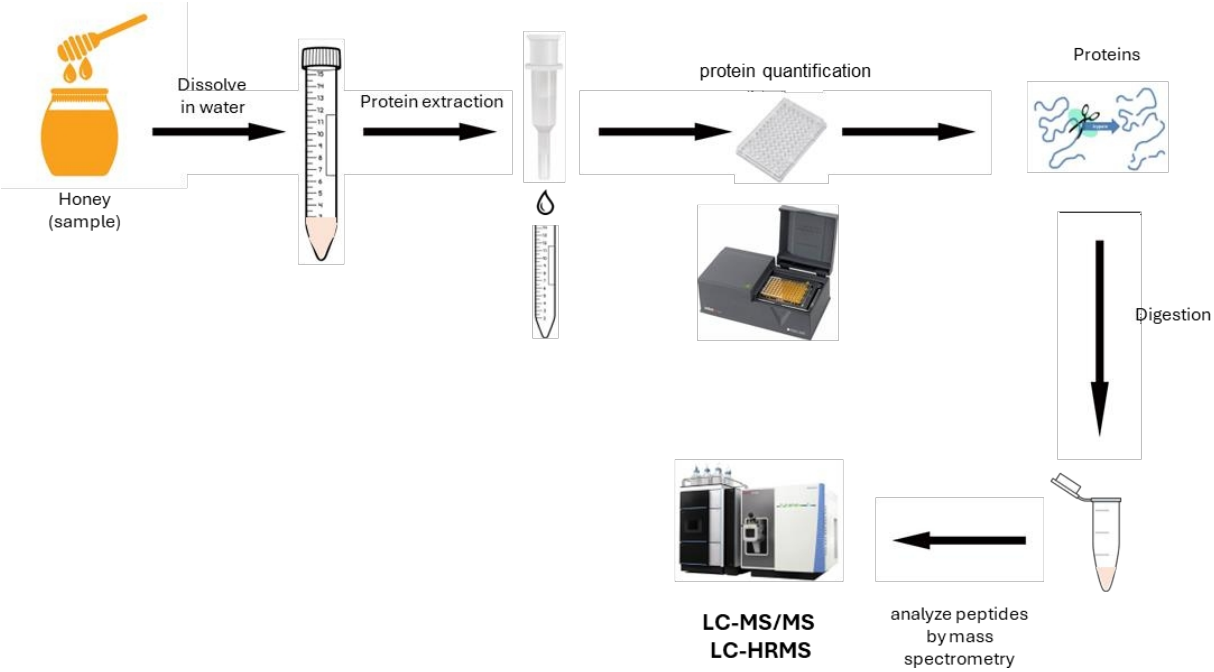
Flux de travail ciblé

Le flux de travail ciblé est une approche permettant de détecter des peptides spécifiques et leurs qualificatifs (fragments b et y) de protéines/enzymes spécifiques à l'aide de la LC-MS/MS / LC-HRMS. Ce flux de travail présente l'avantage de pouvoir utiliser des spectromètres de masse à résolution de masse unitaire, tels que les instruments triple quad (qQq). Ce mode MRM (surveillance de réactions multiples) est connu pour sa haute sensibilité et sa sélectivité. C'est pourquoi cette méthode est couramment utilisée pour les analyses pharmaceutiques. Un instrument qQq utilise des fragments qualificatifs simples ou multiples de masses précurseurs et le temps de rétention pour identifier correctement le précurseur, qui peut être une petite molécule ou un peptide. Il convient de noter que le flux de travail ciblé peut également être réalisé avec une méthode LC-HRMS, en particulier lorsqu'il est combiné avec le mode SIM (surveillance sélective des ions). La combinaison du SIM pour la sélection des précurseurs et du MS/MS ciblé avec un instrument Orbitrap augmente cette sensibilité pour détecter les peptides en faible quantité. Cette méthode extrêmement sensible se traduit également par un faible taux de faux positifs grâce à la détection précise de la masse des précurseurs. De plus, le flux de travail protéomique ciblé ne nécessite pas de recherche dans la base de données, ce qui peut prendre beaucoup de temps selon la taille de la base de données.

Processus protéomique pour la détection d'enzymes étrangères chez Eurofins

Le flux de travail protéomique pour la détection d'enzymes étrangères peut être divisé en plusieurs étapes (voir figure 2) :

Figure 2 : Processus protéomique pour la détection d'enzymes étrangères dans le miel



Préparation de l'échantillon

L'échantillon de miel est dilué avec le tampon d'extraction et mélangé pendant un certain temps afin de dissoudre tous les composés du miel dans le solvant. La densité de la solution est mesurée afin de calculer la concentration en protéines dans le miel.

Purification de l'échantillon

La solution de miel est filtrée à travers une colonne de chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Les colonnes SEC sont souvent utilisées pour l'échange de tampon ou le dessalement des solutions protéiques, mais elles peuvent également être utilisées pour séparer les espèces de poids moléculaire élevé, telles que les protéines de MW > 10 kDa, des espèces de faible poids moléculaire présentes dans le miel, telles que les sucres, les polyphénols, les acides aminés, les acides organiques, etc. de MW < 1 kDa. La SEC utilise une résine poreuse comme phase stationnaire et empêche les molécules de plus grande taille de pénétrer dans les pores, tandis que les molécules plus petites peuvent pénétrer dans les pores et prennent plus de temps à éluer. La solution de miel est d'abord pipetée sur la colonne SEC, puis les protéines sont éluées de la colonne par ajout d'eau d'éluant.

Quantification des protéines dans le miel

La quantité de protéines dans le miel est déterminée par un test protéique. Il s'agit d'un test de liaison à un colorant permettant une quantification rapide et simple des protéines. Le test est réalisé à température ambiante. Le réactif est pipeté dans une plaque de microtitrage. Des solutions standard (albumine sérique bovine à différentes concentrations) et des solutions échantillons sont pipetées dans la plaque de microtitrage. L'absorption est ensuite mesurée à l'aide d'un spectromètre. La quantification des protéines dans le miel est nécessaire pour le protocole de digestion des protéines.

Digestion des protéines

Les protéines sont dissoutes dans une solution tampon et digérées à l'aide d'une enzyme protéase. Celle-ci clive les protéines avec une grande spécificité, ce qui entraîne une charge positive à l'extrémité C-terminale du peptide, ce qui est avantageux pour l'analyse MS.

Détection d'enzymes étrangères par LC-HRMS ou LC-MS/MS

La digestion des protéines est mesurée à l'aide d'un flux de travail ciblé standard pour la protéomique ascendante à l'aide d'une colonne à phase inverse (RP) et de LC-MS/MS / LC-HRMS.

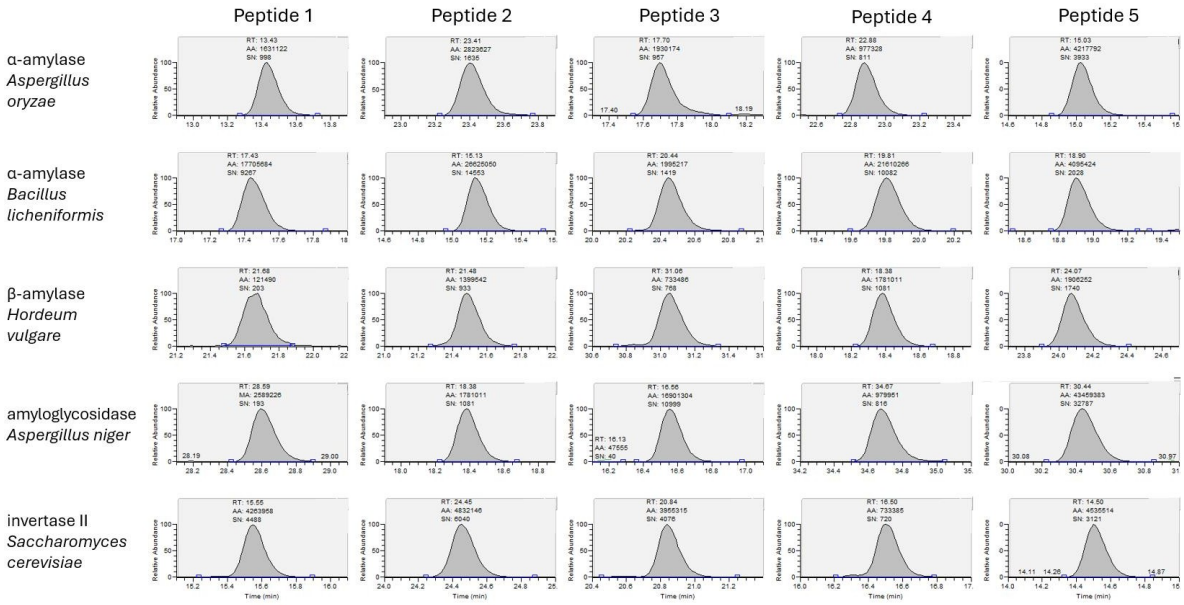
Les enzymes suivantes (voir tableau 1) sont actuellement mesurées à l'aide de notre nouveau flux de travail, mais cette liste peut être facilement étendue à de nouvelles enzymes attendues comme enzymes artificielles dans le miel. Outre les enzymes étrangères, la protéine MRJP1 (protéine majeure de la gelée royale), très abondante dans le miel, ainsi que l'α-glucosidase *Apis mellifera* sont également mesurées afin de détecter les irrégularités de la MRJP1 et de l'enzyme α-glucosidase naturellement présente, causées par l'ajout d'une grande quantité de sirop de sucre ou par un traitement rigoureux du miel.

Tableau 1 : Protéines recherchées à l'aide du flux de travail protéomique ascendant ciblé

Nom de la protéine
α-amylase *Aspergillus oryzae*
α-amylase *Bacillus licheniformis*
β-amylase *Hordeum vulgare*
Amyloglucosidase *Aspergillus niger*
invertase *Saccharomyces cerevisiae*
MRJP1 (protéine majeure de la gelée royale)
α-glucosidase *Apis mellifera*

Pour prouver la présence de l'enzyme étrangère dans le miel, tous les peptides et qualificatifs doivent être détectés (voir figure 3) afin de signaler que cette enzyme a été trouvée dans le miel.

Figure 3 : Traces de qualificateurs ajoutés pour tous les peptides d'enzymes étrangères d'un miel de référence enrichi d'un mélange de ces enzymes.



Résumé

Des enzymes artificielles peuvent être ajoutées au miel afin d'augmenter l'activité enzymatique diastase/amylase et de satisfaire aux normes internationales (critères d'activité amylase/diastase) requises pour la commercialisation du miel. La protéomique peut être utilisée pour détecter très spécifiquement les protéines dans le miel. Le flux de travail protéomique ascendant ciblé d'Eurofins permet de détecter des enzymes étrangères qui ne peuvent pas être détectées à l'aide des tests d'activité enzymatique courants (Phadebas/Schade). La méthode protéomique est si spécifique et sensible qu'elle permet de détecter même de faibles quantités d'enzymes artificielles. Nous recommandons donc d'utiliser ce test pour détecter l'adultération du miel.

► Quelle est la limite de détection des enzymes étrangères dans le miel ?

Le résultat de ce test est qualitatif. Cependant, la limite de détection des enzymes dans le miel se situe dans la fourchette basse des µg/g, en fonction de l'équipement utilisé et de la quantité de miel utilisée pour l'extraction des protéines.

► Pouvez-vous quantifier chaque enzyme étrangère ajoutée au miel ?

La quantification des enzymes étrangères dans le miel est possible, mais nous ne disposons pas d'un protocole permettant de déterminer la quantité exacte de chaque protéine dans le miel. Nos résultats sont donc qualitatifs, car l'ajout d'enzymes étrangères au miel est interdit.

► Avez-vous besoin d'une base de données protéiques pour ce flux de travail protéomique ?

Notre flux de travail protéomique ciblé chez Eurofins ne nécessite aucune base de données. Nous utilisons la séquence d'acides aminés de la protéine (enzyme) pour déterminer les peptides par digestion *in silico*. Nous mettons constamment à jour notre base de données protéiques avec des enzymes (amylases et diastases). Les enzymes sont testées sur un système HRMS (Orbitrap) afin de déterminer le temps de rétention des peptides les plus abondants de cette protéine. Ces informations sont ensuite utilisées pour notre flux de travail ciblé.

Bibliographie

[1] E.R.H.S.S. Ediriweera, N. Y. S. Premarathna, Utilisations médicinales et cosmétiques du miel d'abeille – une revue, Ayu 33 (2012), 178-182.

[2] M. Voldrich, A Rajchi, H. Cizkova, P. Cuhra, Détection de l'ajout d'enzymes étrangères dans le miel frelaté, Czech J. Food. Sci. 27 (2009) S280-S282.

[3] Conseil de l'Union européenne, Directive 2001/110/CE du Conseil de décembre 2001 relative au miel ; 12.1.2002, J.O. Union européenne L 10 (2002) 47-52. https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2001/110/oj/eng

[4] Erban T, Shcherbachenko E, Talacko P, Harant K (2019) La composition protéique unique du miel révélée par une analyse protéomique complète : allergènes, protéines de type venin, propriétés antibactériennes, protéines de la gelée royale, sérine protéase et leurs inhibiteurs. J. Nat Prod. 82 : 1217-1226.

[5] Erban T, Shcherbachenko E, Talacvko P, Harant K, (2021) Un ensemble unique de données protéomiques sur le miel permettant d'identifier l'adultération par des amylases étrangères et d'extraire divers marqueurs protéiques naturels du miel. J. Proteomics 239 : 104157.

[6] I. Ortea, G. O'Connor, A. Maquet, Revue sur la protéomique pour l'authentification des aliments, J. Proteome 147 (2016) 212-225.

Contact :
Dr Matthias Witt Dr
Christof Kunert
efics@ftdach.eurofins.com
Eurofins Food Integrity Control Services GmbH Berliner
Str. 2, 27721 Ritterhude, Allemagne

Date de publication : 1er septembre 2025

Les informations contenues dans cette publication sont basées sur nos connaissances actuelles et ont été minutieusement vérifiées. Néanmoins, leur actualité, leur exhaustivité et leur exactitude ne peuvent être garanties. Eurofins ne saurait être tenu responsable des dommages ou préjudices liés à l'utilisation de ces informations. Il appartient notamment à l'utilisateur de vérifier les détails juridiques. Toutes les offres sont sans engagement et non contraignantes.