



**HAL**  
open science

## Les biocapteurs en milieu alimentaire

Didier Dupont

► **To cite this version:**

Didier Dupont. Les biocapteurs en milieu alimentaire. Ecole thématique CNRS "Fonctionnalisation de surfaces et méthodes de détection pour les biocapteurs", Feb 2010, Les Houches, France. hal-01454489

**HAL Id: hal-01454489**

**<https://hal.science/hal-01454489>**

Submitted on 6 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole thématique CNRS

# Les biocapteurs dans l'industrie agro-alimentaire

Didier DUPONT  
INRA UMR 1253

Science & Technologie du Lait et de l'œuf  
35042 RENNES



Ecole thématique CNRS  
Les Houches  
8-12 février 2010

ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT



# Portrait

## L'institut National de la Recherche Agronomique

- Créé en 1946
- Etablissement public, scientifique et technologique
- Sous la double tutelle des Ministères de l'Agriculture et de la Recherche
- Second plus gros institut de recherche publique en France avec environ 9000 permanents et un budget de 700 millions d'euros
- Plus gros institut européen de recherche en agriculture



DIET  
AGRICULTURE  
ENVIRONMENT

INRA

# Département Caractérisation et élaboration des Produits issus de l'Agriculture

500 personnes dans 25 unités



**Lait et produits laitiers,  
Œuf et ovo-produits**

**Structures des biopolymères  
Protéines de graines – Amidon  
Polysaccharides végétaux**



*Guadeloupe*

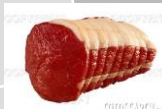
**Chimie verte,  
Biotechnologie  
Enzymes**

**Vins, Polyphénols,  
Fractionnement des  
céréales**

**Fruits et légumes,  
micronutriments**



**Produits carnés**



**Interactions  
texture-  
flaveur**



*Nantes*

*Rennes*

**Procédés de transformation**

*Paris*

*Reims*

**Fibres**

*Nancy*

**Bois**

*Lille*

**Hygiène**

*Montpellier*

*Avignon*

*Toulouse*

*Clermont*

*Dijon*

75 standing fellow workers  
18 PhD students  
6 private companies



**Milk &  
Egg  
Science &  
Technology**

## Our disciplinary skills

**Biochemistry  
Microbiology  
Molecular biology  
Process & technology**



**Model systems**

***In situ* systems**

## Our facilities

**Mass spectrometry  
Confocal microscopy, AFM  
Quantitative PCR  
ITC, Biacore 3000  
Technology platform  
Biological Resource Centre**



# Plan de l'exposé

- 1 Les besoins en techniques analytiques
- 2 Applications des biocapteurs à l'aliment: les difficultés rencontrées
- 3 Quelques applications potentielles
  - 3.1. Sucres, alcool et acides organiques
  - 3.2. Antibiotiques et résidus médicamenteux
  - 3.3. Microorganismes pathogènes
  - 3.4. Toxines d'origine bactérienne
  - 3.5. Allergènes alimentaires
  - 3.6. Organismes Génétiquement Modifiés (OGM)
  - 3.7. Composition et qualité des matières premières et des produits
  - 3.8. Suivi de procédés de transformation
- 4 Cahier des charges à respecter pour réussir un développement de biocapteur en agro-alimentaire
- 5 Les perspectives
  - 5.1 La détection on-line
  - 5.2 Techniques multi-paramétriques / tests à usage unique
  - 5.3 Les emballages intelligents



# Les besoins en techniques analytiques



Ecole thématique CNRS  
Les Houches  
8-12 février 2010

ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT





Le contrôle de la qualité des aliments représente 1 à 2% des budgets de vente des entreprises



# Quelques données économiques

Alocilja & Radke (2003), Luong et al. (2008)

- ☞ Marché mondial pour les biocapteurs : 7-10 milliards de dollars en 2009 (85% médical, glucose)
- ☞ Les plus gros marchés pour l'industrie agro-alimentaire
  - Pathogènes: 192 millions de dollars
  - OGM: forte ↑ avec 34 millions de dollars
  - Pesticides: 13 millions de dollars
- ☞ Un constat : problème de transfert de technologie
- 😊 Multitude de publications sur le développement de biocapteurs appliqués à l'aliment
- ☹ Très peu de systèmes atteignent le marché (coût, stabilité, sensibilité, justesse, énorme différence entre solutions modèles d'analytes et les matrices alimentaires réelles...)
- ☞ En AA: tests ELISA et bandelettes disponibles commercialement

“Despite the great R&D effort spent on developing biosensors in the last years, only a few biosensors for bacterial detection are commercially available or are approaching commercialization”  
(Ivnitski et al. 1999)

### **10 ans plus tard...**

“Though a lot of research activity has been involved in developing biosensors for various purposes the time has come to bring this technology to the forefront and make it commercially available”  
(Nayak et al. 2009)

En agroalimentaire: tests ELISA et bandelettes disponibles commercialement

Biacore Q + kits dosage vitamines, antibiotiques... Appareillage couteux réservé au grands groupes agro-alimentaires



# Les difficultés liées à l'aliment



Ecole thématique CNRS  
Les Houches  
8-12 février 2010

ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT



# Les difficultés liées à l'aliment

- ☞ Détection de traces de certains analytes, voire d'absence totale  
ex: législation pour E. Coli O157:H7 = absence totale  
 $10^3$  cellules/ml  $\sim 1.7 \cdot 10^{-18}$  M
- ☞ Problèmes de la représentativité de l'échantillon  
ex: absence de pathogène dans 1g d'aliment alors que  
l'analyse ne requiert que quelques  $\mu$ l
- ☞ Difficultés de travailler avec une matrice complexe
  - interactions de l'analyte avec autres constituants (lipides...)
  - accessibilité limitée à l'analyte
  - solides ou gels à solubiliser
  - nécessité parfois de techniques d'extraction de l'analyte



# Les applications potentielles



Ecole thématique CNRS  
Les Houches  
8-12 février 2010

ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT

INRA

# Sucres, alcools et acides organiques

Nombreuses applications possibles en agro-alimentaire

- **Glucose :**

- utilisé comme édulcorant
- Substrat pour les microorganismes dans les processus de fermentation
- ☞ Biocapteurs ampérométriques utilisant la glucose oxydase comme ligand
- ☞ Aliments: soda, jus de fruits, vin, lait, biscuit, yaourt

**Fructose:**

- Pouvoir sucrant supérieur au glucose
- Marqueur de la fraîcheur des fruits
- ☞ Biocapteurs ampérométriques utilisant la fructose déshydrogénase
- ☞ Aliments: miel, fruits, légumes, sodas, aliments diabétiques

Ethanol (vins & spiritueux), polyphénols (fruits, légumes, huile d'olives, thé)

# Les antibiotiques

Utilisés dans le traitement des maladies de la vache, mais...

- ☹ non détruits par la chaleur
- ☹ peuvent rendre le lait intransformable par inhibition de la croissance des levains
- ☹ peuvent être à l'origine d'allergies, de toxicités ou provoquer des phénomènes de résistance

# Les antibiotiques

## Législation européenne: définition des MRLs (Maximum Residue Limits)

Table 1. List of $\beta$ -lactam antibiotics for which maximum residue limits (MRLs) have been fixed for animal-produced products [12]			
Pharmacologically-active substance(s)	Marker residue	MRLs in milk ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	MRLs in food-producing species <sup>(1)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
<b>Penicillins</b>			
Amoxicillin	Amoxicillin	4	50
Ampicillin	Ampicillin	4	50
Benzylpenicillin	Benzylpenicillin	4	50
Cloxacillin	Cloxacillin	30	300
Dicloxacillin	Dicloxacillin	30	300
Nafcillin	Nafcillin	30 <sup>(1)</sup>	300 <sup>(1)</sup>
Oxacillin	Oxacillin	30	300
Penethamate	Benzylpenicillin	4 <sup>(2)</sup>	50 <sup>(2)</sup>
<b>Cephalosporins</b>			
Cefacetile	Cefacetile	125 <sup>(3)*</sup>	-
Cephalexin	Cephalexin	100 <sup>(3)</sup>	200 (muscle, fat, liver) 1000 (kidney) <sup>(3)</sup>
Cefalonium	Cefalonium	20 <sup>(3)</sup>	-
Cephapirin	Sum of cephapirin and Desacetylcephapirin	60 <sup>(3)</sup>	50 (muscle, fat) 100 (kidney) <sup>(3)</sup>
Cefazolin	Cefazolin	50 <sup>(4)</sup>	-
Cefoperazone	Cefoperazone	50 <sup>(3)</sup>	-
Cefquinome	Cefquinome	20 <sup>(3)</sup>	50 (muscle, fat) 100 (liver) 200 (kidney)
Ceftiofur	Sum of all residues retaining the $\beta$ -lactam structure expressed as Desfuroylceftiofur	100 <sup>(3)</sup>	1000 (muscle) 2000 (fat, liver) 6000 (kidney)
Target tissues for food-producing animals: muscle, fat, liver, kidney.			
<sup>(1)</sup> All ruminants (for intramammary use only).			
<sup>(2)</sup> Bovine, Porcine and all mammalian food-producing species.			
<sup>(3)</sup> Bovine, * For intramammary use only.			
<sup>(4)</sup> Bovine, ovine, caprine.			



# Antibiotiques – Les techniques disponibles commercialement

**Table 2.** Microbial inhibition tests commercially available for the detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in animal-derived products

Commercial Test	Time	LODs ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )										Ref.
		AMO	AMP	PEN	OXA	CLOX	DICL	CEFAL	CEFAZ	CEFT	CEFO	
<b>Microbial Inhibition tests</b>												
Delvotest SP	2:30 h	2	2-3	2	5	15	10	40-60	10	50	-	[96,97]
CMT COPAN	3:15 h	2-4	<2	1-2 (2-3) <sup>1</sup>	5-10	10-15	10-15	>45	5-10	50-100	25-50	[98, <sup>1</sup> 96]
AIM-96	4 h	4	4	3	30	50	30	-	-	50	-	[97]
Delvotest Accelerator	1:40 h	The same as for Delvotest SP										[98]
BRT-AIM	3 h	2-3	2-3	1.5-2	5-10	10-20	5-10	100-200	10-25	50-100	20-30	[30,43,44,99]
Delvotest MCS	3:15 h	4	4	4	30	30	30	100	50	100	50	[44,97]
Eclipse 100	<4 h	7	-	5	28	68	-	115	-	85	110	[43,44]
Blue-Yellow II	<3 h	2-3	2-3	2-3	8-10	10-20	10-20	-	-	45-75	-	[100]
CowSide II	<3 h	3-4	3-4	2-3	5-10	10-25	5-10	-	-	50-100 <sup>1</sup>	-	[100]
<b>Rapid Test Kits</b>												
Parallux	4 m	3.6	2.9	3.2	10	7.4	20	-	-	33.7	-	[96]
SNAP	<10 m	6	4-5	2-4	35-40	30	30	-	25-27.5	50	-	[96]
MRL $\beta$ -L	<9 m	4	4	4	30	30	25	-	40-50	100	-	[96]
Beta s.t.a.r.	5 m	2-4	2-5	2-4	5-10	5-10	5-10	-	-	75-150	-	[96]
Delvo-X-Press $\beta$ L-II	<7 m	4-8	4-8	2-4	25-50	30-60	25-50	25-50	-	4-8	-	[96]
Fluorophos BetaScreen	10 m	-	-	1.8	-	-	-	-	-	-	-	[96,101]
Rosa SL3	3 m	7.8	8.7	4.2	-	-	-	-	-	51 <sup>1</sup>	-	[100,102] <sup>1</sup>
Rosa MRL3	3 m	4-5	3-5	2-3	-	20-30	15-25	15-30	12-20	10-20	5-9	[100]
Rosa SL-6	8 m	7.1	9.6	4.2	-	8.3	-	-	-	-	-	[100]
SL Farm	8 m	4/5.6	6/8.5	4/3.6	30/-	50/50	-	-	-	-	-	[96,100]
Charm II	8-15 m	9	8	3.5	75	50	-	-	-	-	-	[90]
Delvo-X-Press $\beta$ L	<10 m	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	[96]
New SNAP	14 m	-	-	2-3	-	-	-	-	-	-	-	[96]
AMO, Amoxicillin; AMP, Ampicillin; PEN, Penicillin; OXA, Oxacillin; CLOX, Cloxacillin; DICL, Dicloxacillin; CEFAL, Cefaloridine; CEFAZ, Cefazolin; CEFT, Cefotiofur; CEFO, Cefoperazone. <sup>1</sup> The reported values refer to cefotiofur and metabolites.												

De 2 à 3 €/test !

# Les pesticides

Pesticide = produit anti-parasitaire naturel ou de synthèse utilisé en agriculture, lors du stockage de denrées alimentaires, en médecine vétérinaire et humaine, en industrie, pour lutter contre les rongeurs, les insectes, les mauvaises herbes, les champignons, les micro-organismes

☹ peuvent être à l'origine de toxicités chez l'homme

# Les pathogènes et les toxi-infections alimentaires collectives

## Quelques données épidémiologiques France, 1987-2003

- 7 670 foyers ont été déclarés aux Ddass ou / et aux DDSV
  - 136 366 personnes ont été affectées
  - 12 703 personnes ont été hospitalisées
  - 97 personnes sont décédées
  - un germe a été identifié ou suspecté pour 4 420 foyers
- 68% des foyers dont l'agent a été confirmé biologiquement étaient dus à *Salmonella*
- un agent a été confirmé pour 58% des foyers ; suspecté pour 21% des foyers ; l'agent est resté inconnu pour 21% des foyers.

# Les pathogènes

## Les aliments incriminés dans les TIAC

	Nombre de cas
<b>Laits et produits laitiers</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25
<b>Oeufs et produits à base d'œufs</b>	
<i>Salmonella</i>	160
<b>Viandes</b>	
<i>Salmonella, Clostridium perfringens</i>	58
<b>Volailles</b>	
<i>Salmonella</i>	30
<b>Poissons et fruits de mer</b>	
Très grande variété	54
<b>Autres aliments</b>	
<i>Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus</i>	59

## Listériose - Epidémiologie

- ☞ De 1987 à 2001: diminution du nombre de cas jusqu'à 3.5cas /Million d'hab
- ☞ De 2001 à 2005: stabilisation
- ☞ De 2006 à 2008: nette augmentation jusqu'à 5 cas/Million d'hab !!!
  - ☞ Recrudescence touche principalement les + de 60 ans et les personnes immunodéprimées

# La détection des pathogènes dans les aliments

☞ Laborieuse car nécessitant 4 étapes successives:

-Pré-enrichissement

-Enrichissement sélectif

-Isolation

-Identification

(Intérêt des Labs-on-a-chip pour réaliser ces différentes étapes)

☞ Durée totale de l'analyse: 16 à 48h

☞ Limite de détection: de  $10^5$  à  $10^7$  cellules/ml

# Exemples de biocapteurs appliqués à la détection d'E. coli

Table 1  
Summary of immunosensors for *E. coli* O157:H7 detection

Method	Group	Detection limit, cells/ml	Assay time, min	Label	Number of antibodies involved	Pre-concentration	State of pathogen	Dilution diluent	Interferences with other bacterial species	Direct application foods, detection limit
SPR	IS	$5-7 \times 10^7$	10	NA	2	NA	V	HBS	NCR: <i>S. typhimurium</i> , <i>S. enterocolitica</i>	NT
PS, <i>E. coli</i> K12	IS	$10^6$	-	NA	1	NA	V	PS	NT	NT
PS	IS	$10^3$	30-50	NA	1	NA	D	PBS	NCR: <i>S. typhimurium</i>	NT
EI	IS	$10^6$	-	NA	1	N/A	D	PS	NT	NT
EI	IS	$10^4$	10	NA	1	NA	V	PW	NCR: <i>S. infantis</i>	$10^7$ cfu/ml romaine lettuce wash
SPFCI	IA	-	10 + enr	FC	1	m-EC broth; + IMS for cider	V	PS	NT	1 cfu/10 g beef; 0.5 cfu/ml apple cider
FIA-SPFCI	IA-IS	$3.6 \times 10^2$	45	FC	2	N/A	D	-	NT	NT
TRF	IA	$10^3$	120 + enr	FC	2	IMS, + m-EC broth for cider	V	AS	NCR: <i>C. freundii</i> , <i>E. coli</i> O9:K99, <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Y. enterocolitica</i>	$10-10^2$ cfu/ml apple cider
EWFB	IA-IS	-	20	FC	2	NA	V	PBS	NT	3-30 cfu/g beef; $9.0 \times 10^3$ cfu/g in 25 g beef; $5.2 \times 10^2$ cfu/g in 10 g beef
CL, <i>E. coli</i> K2	IA	$\sim 6 \times 10^1$	$\sim 60$	EZ	3	F	V	PBS	NT	NT
CL	IA-IS	$10^5$	24	EZ	2	NA	-	-	NT	NT
LAPS	IS	$2.5 \times 10^4$ $7.1 \times 10^2$	30	EZ	3	IMF	VD	TBS with BSA	NCR: non-pathogenic <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i>	NT
A, FIA	A	$10^5$	120	NA	1	IMS	V	PBS with KCl	NT	NT
A, FIA	A	$10^2$	30	EZ	2	IMF	D	PBS	NT	NT
A	IS	$2 \times 10^2$	40	EZ	2	N/A	D	AB with BSA	NT	NT
ECL	IA	$10^2$	<60	CLC	2	IMS	D	PB	NCR: non-pathogenic <i>E. coli</i>	$10^3 - 2 \times 10^3$ cells/ml
A	A	$5 \times 10^3$	25	EZ	1	F	D	TBS	NT	NT
EI	IS	$6 \times 10^3$	-	EZ	2	NA	D	TBS	NT	NT
C	IS	$7.9 \times 10^1$	10	CP	2	NA	D	0.1 % PW	NCR: non-pathogenic <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i>	NT
C	IS	-	6	CP	2	F	V	0.1 % PW	NCR: non-pathogenic <i>E. coli</i>	$8.1 \times 10^1$ cfu/ml lettuce, alfalfa strawberry wash

**Method:** SPR, - surface plasmon resonance; PS,-piezoelectric sensor; CL, - chemiluminescence; ECL,-electrochemiluminescence; SPFCI,-solid-phase fluorescent capillary immunoassay; TRF, - time-resolved fluorometry; EWFB, - evanescent-wave fluorescence biosensor; LAPS, - light addressable potentiometric sensor; C, - conductometry; A, - amperometric; FIA, - flow-injection analysis; EI,-electrochemical impedance.

**Group:** IS, - "strict" immunosensor. Immunological reaction is carried out on the surface of the transducer, which transforms recognition at its surface into measurable signals; A, - amperometric sensor with antibody-based technique involved; IA, - immunoassay; IA-IS, - immunoassay called immunosensor by authors.

**Labels:** FC, - fluorescent compound; EZ, - enzyme; CP, - conducting polymer; CLC, - chemiluminescent compound.

**State of pathogen:** V, - viable; D,-dead.

**Pre-concentration:** IMS, - immunomagnetic separation; IMF, - immunofiltration or other active filtration; F, - filtration capture.

**Diluent:** PS,-physiological saline; PBS, - phosphate-buffered saline; BSA,-bovine serum albumin; KCl, - potassium chloride; PW, - peptone water; PB, - pristine buffer; AB, - acetate buffer; TBS, - Tris-buffered saline; HBF, - HEPES-buffered saline; AS, - assay buffer containing Tris-HCl, NaCl, NaN3, BSA, bovine gamma globulins, Tween 40 and diethylenetriamine-penta-acetic acid.

Tokarsky &  
Marshall, 2007

Ecole thématique  
Les Houches  
8-12 février 2010





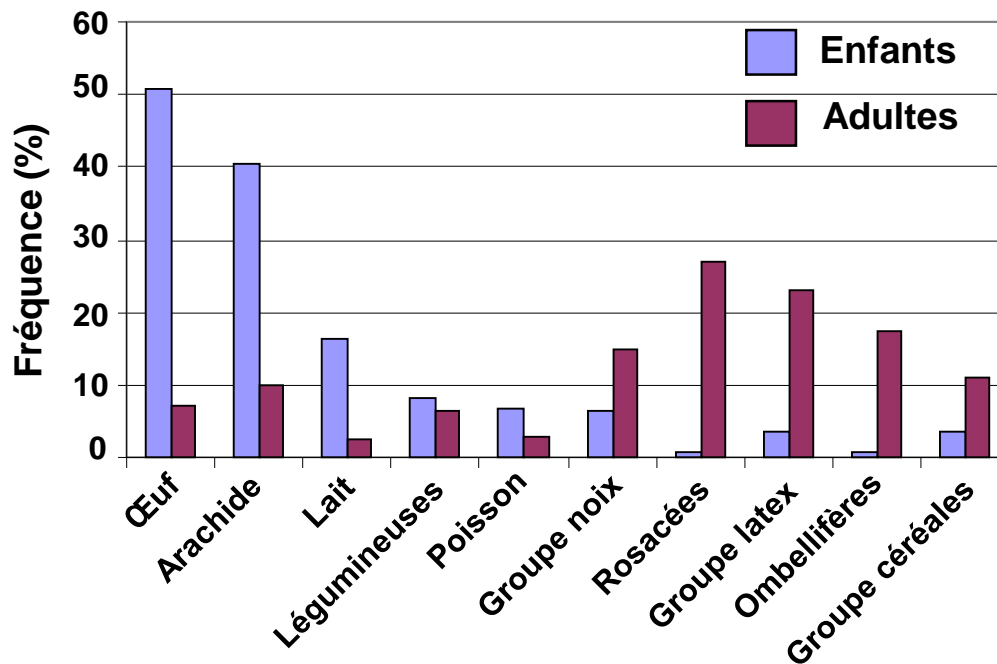
- Tableau des applications récentes d'après  
Nayak et al. 2009 et Palchetti et al. 2008
- Homola 2008



# L'allergie alimentaire

- Prévalence :
  - 6-10 % de la population pédiatrique (Venter et al. 2008)
- - 3 % de la population adulte (Rona et al. 2007 ; Kanny et al. 2001) / **1% en 1970**

Aliments responsables des allergies alimentaires



D'après les données du CICBAA, février 2005

## ■ Allergie au lait :

- importante chez les nourrissons
- acquisition de tolérance



# Détection des allergènes alimentaires

Quelques techniques utilisant des systèmes commerciaux...

allergens

peanut allergens  
peanut proteins  
conalbumin  
sesame seed protein  
tropomyosin

Spreeta  
Biacore Q

buffer  
chocolate  
pasta  
bread  
pasta

700 ng/mL  
1  $\mu\text{g/g}$   
0.3  $\mu\text{g/g}$   
12.5  $\mu\text{g/g}$   
10  $\mu\text{g/g}$

direct  
direct sandwich

276  
277



# Diagnostic de l'allergie alimentaire

1 « Interrogatoire » par un praticien

2 Tests cutanés (prick-tests) avec l'aliment natif, consistant à effectuer une scarification au travers d'un morceau de l'aliment déposé sur la peau

## 3 Quantification des IgE-spécifiques

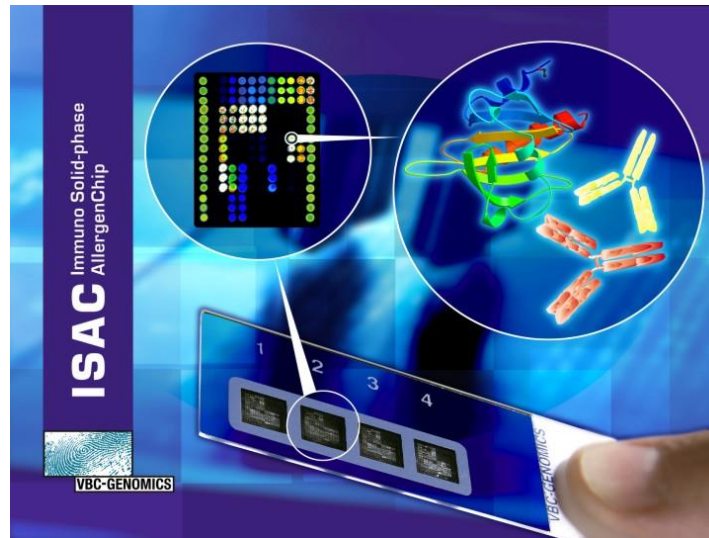
Difficile car:

- Faibles concentrations d'IgE spécifiques (1 ng/ml)
- Environ 1 IgE pour 1000 IgG

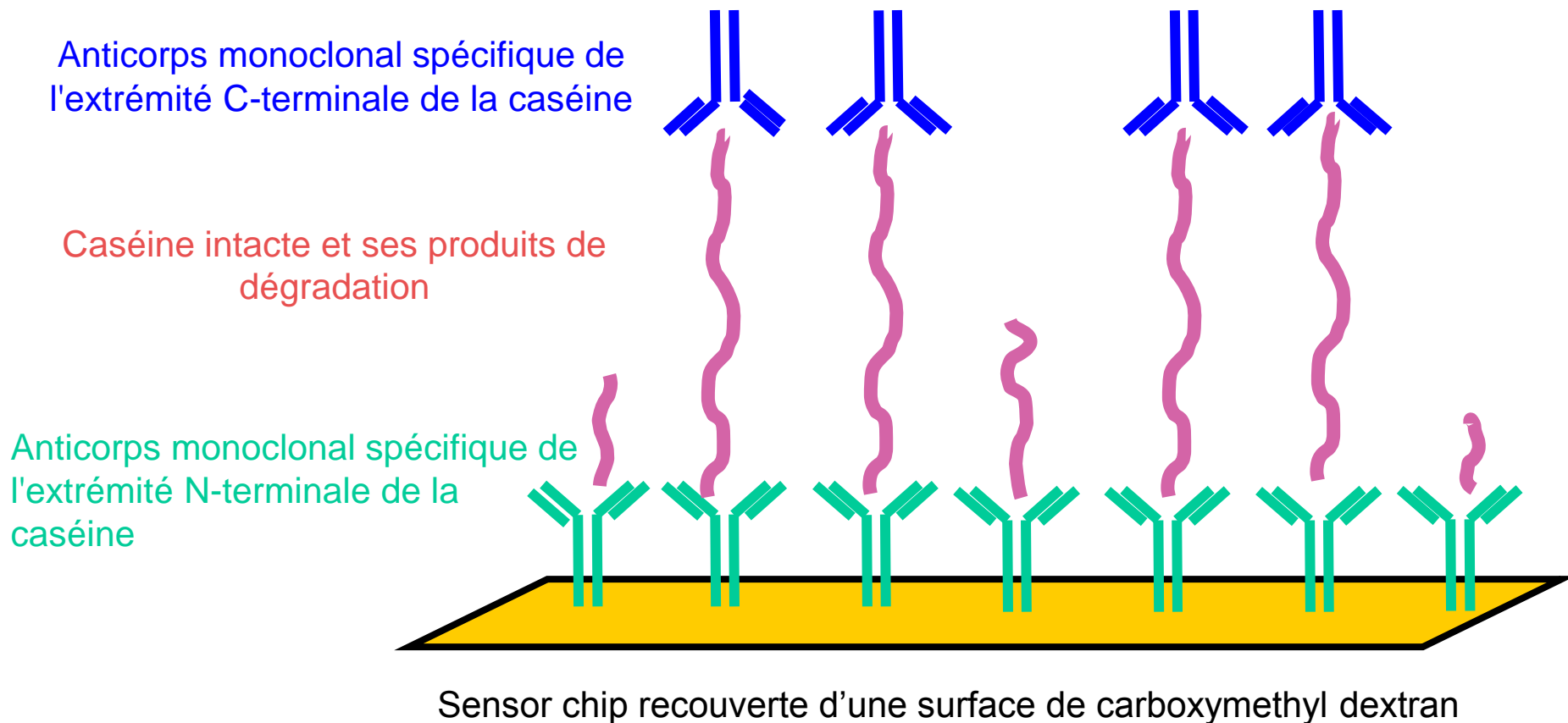
Un ex: puces à protéines

Détection de 150  
allergènes

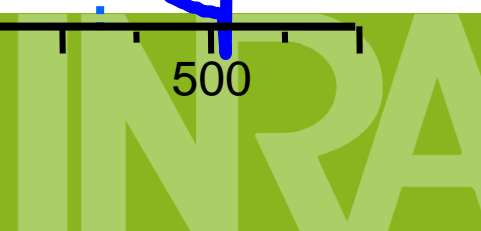
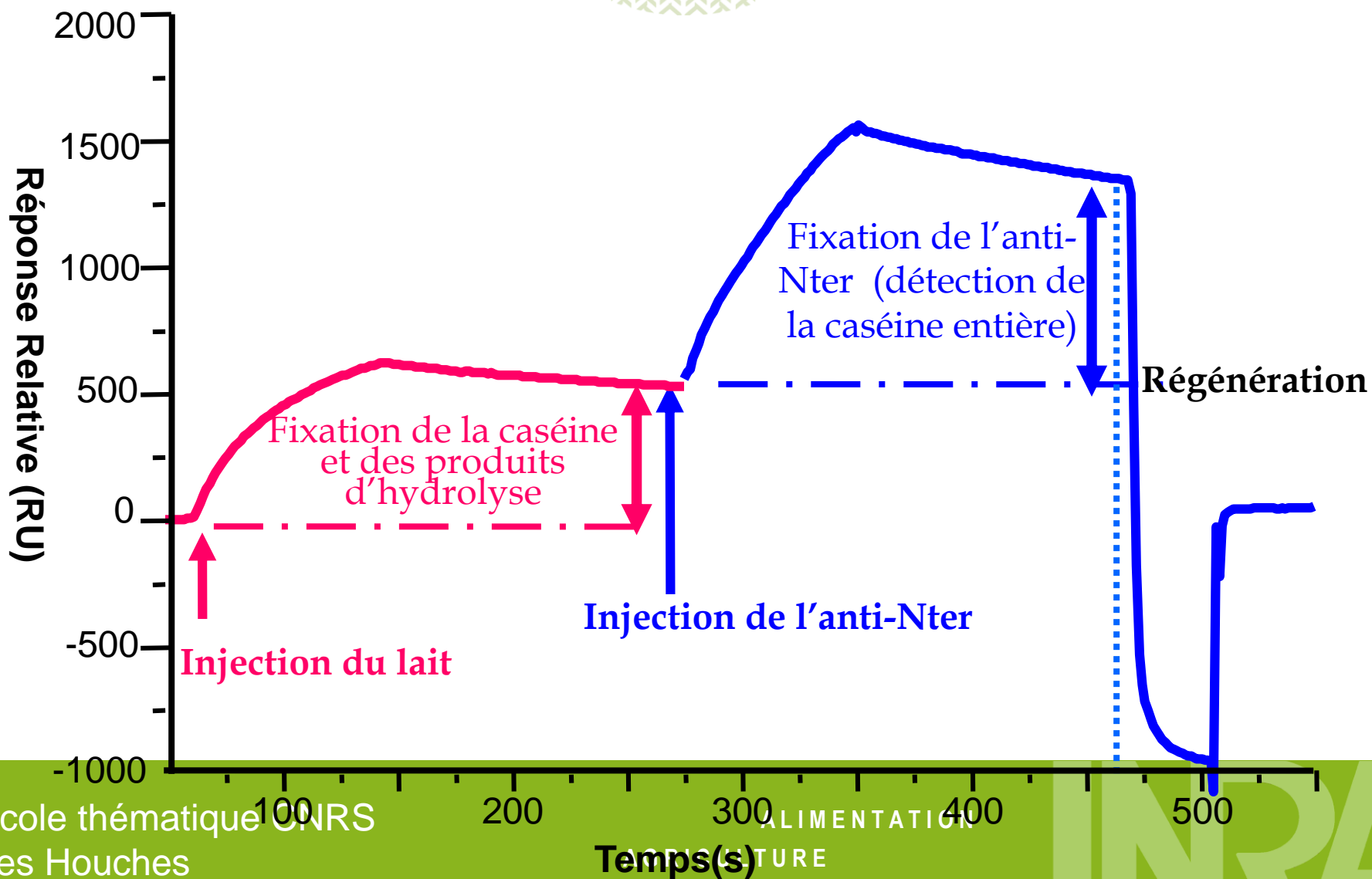
Remboursement sécurité  
sociale : 15 €/allergène  
(max: 6 allergènes)



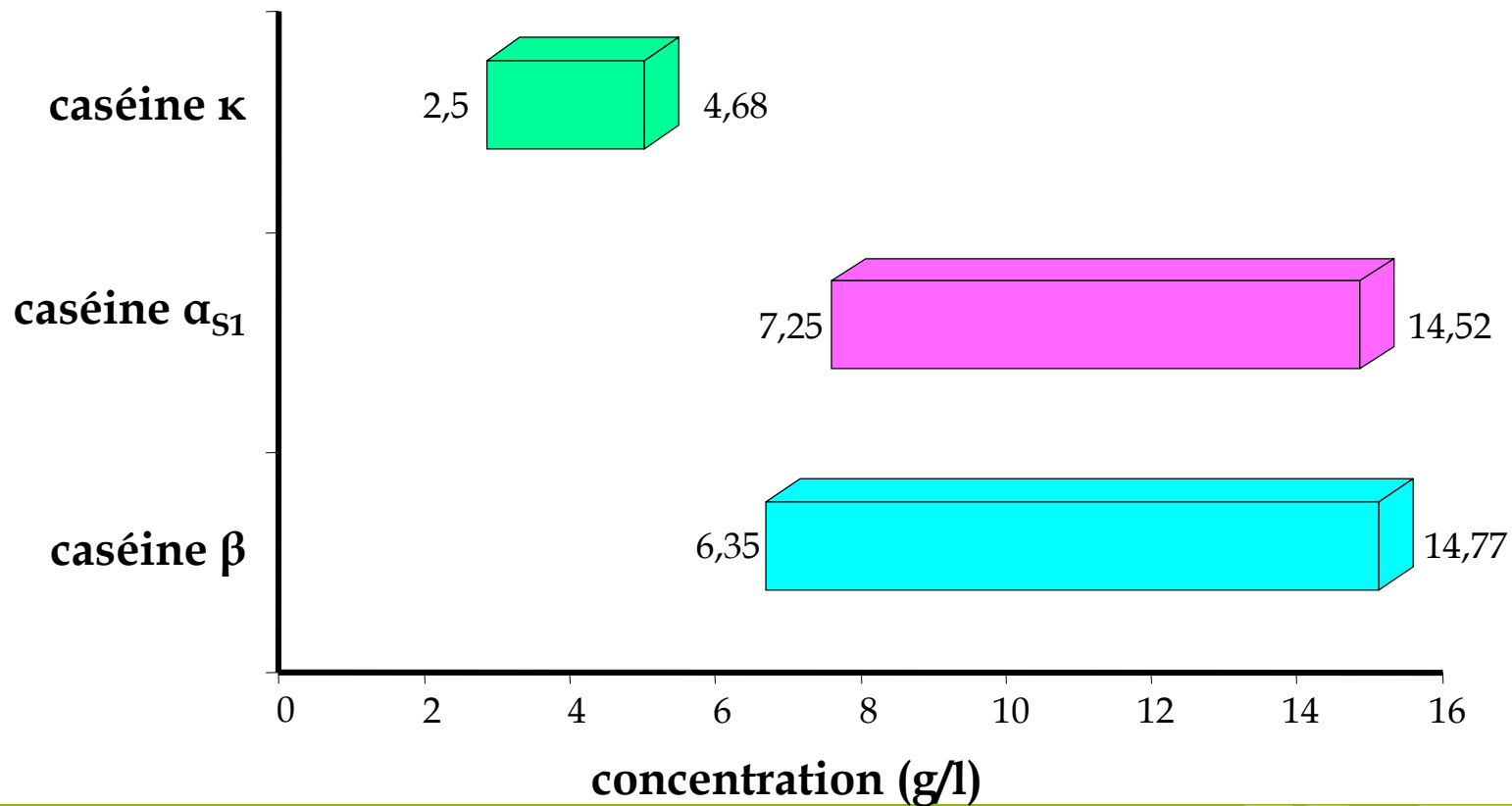
# Comment quantifier une protéine entière et pas ses produits d'hydrolyse par une technique immunochimique rapide ?



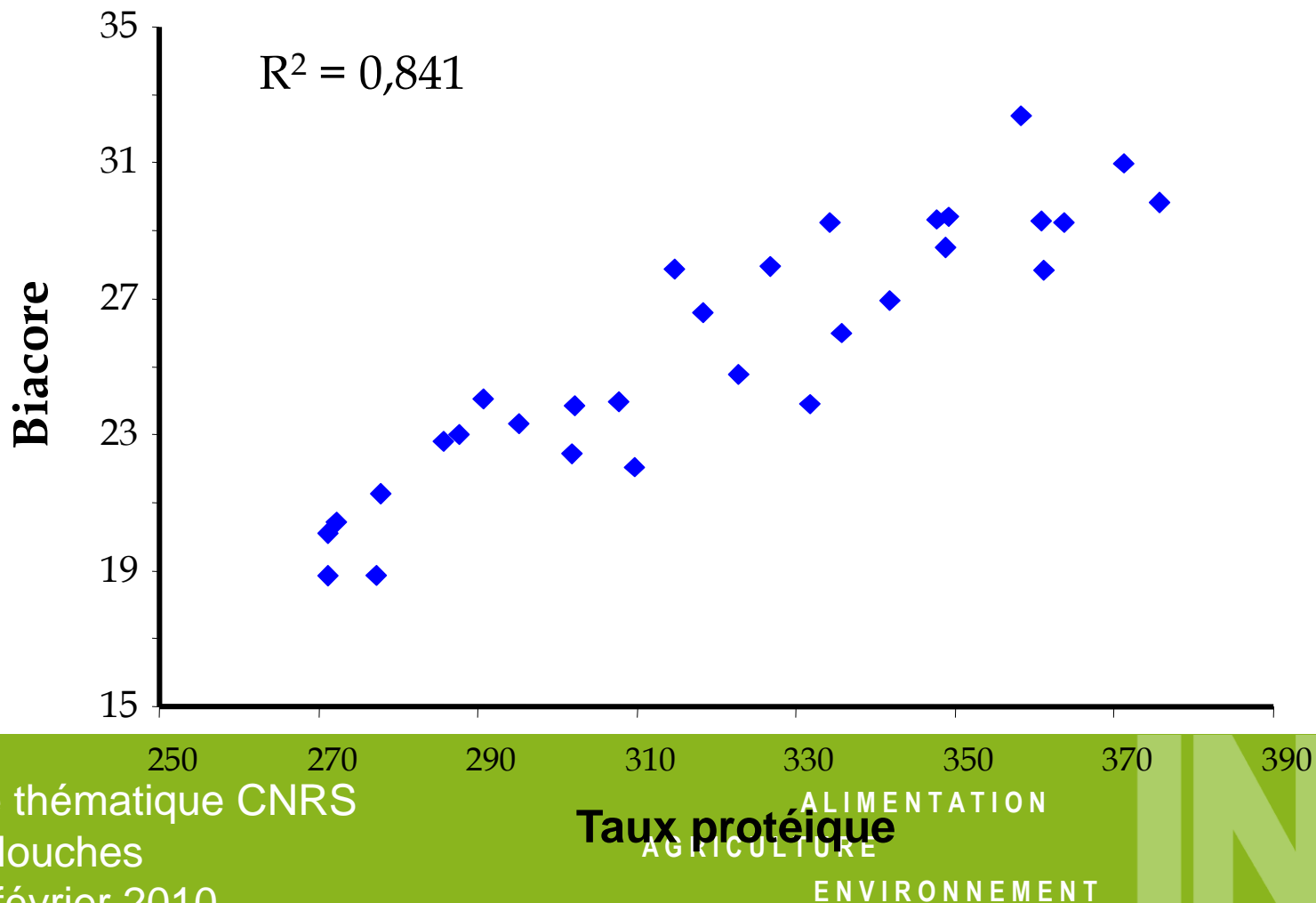
# Sensorgramme obtenu pour un échantillon



# Analyse par Biacore de 30 laits individuels



# Corrélation TP/Biacore pour $\alpha_{S1} + \beta + \kappa$



# Dosage des 3 caséines dans des laits de consommation



Echantillon	Traitement	Caséine $\beta$ (g/l)	Caséine $\alpha_{S1}$ (g/l)	Caséine $\kappa$ (g/l)
PA-1	Pasteurisé	8,39	11,63	4,26
PA-2		8,06	11,19	3,54
UI-1	UHT indirect	8,06	11,36	4,07
UI-2		6,51	8,12	4,18
UD-1	UHT direct	9,82	12,66	4,96
UD-2		8,93	12,94	4,56
S-1	Stérilisé	9,20	10,79	4,23
S-2		10,94	11,32	5,26





# Suivi de la concentration de caséine $\beta$ durant l'affinage du fromage



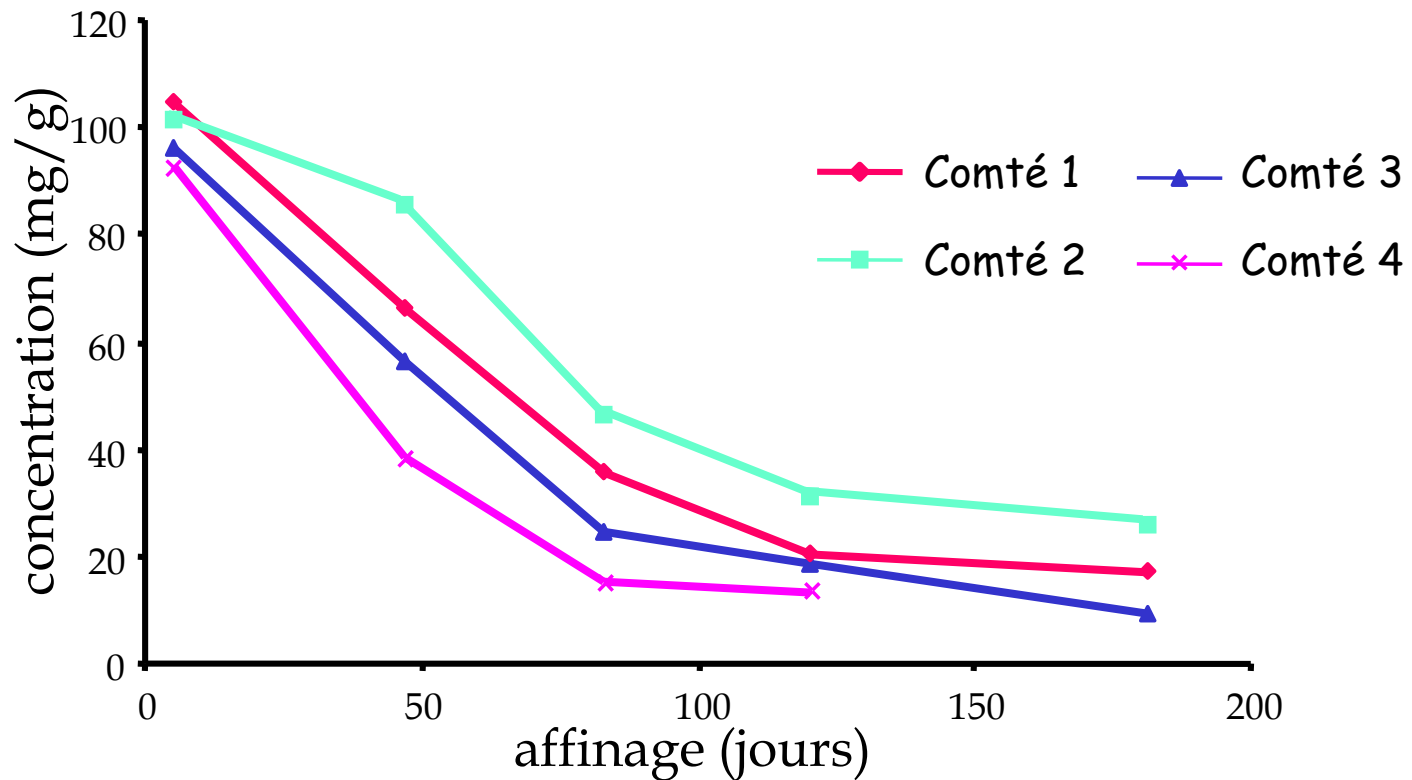
**4 fromages de Comté prélevés en fromagerie et affinés à l'INRA avec le procédé d'affinage suivant :**



**Pré-affinage, 13°C, 49 jours,  
Cave chaude, 17°C, 35 jours,  
Cave froide, 6°C, 63 jours**

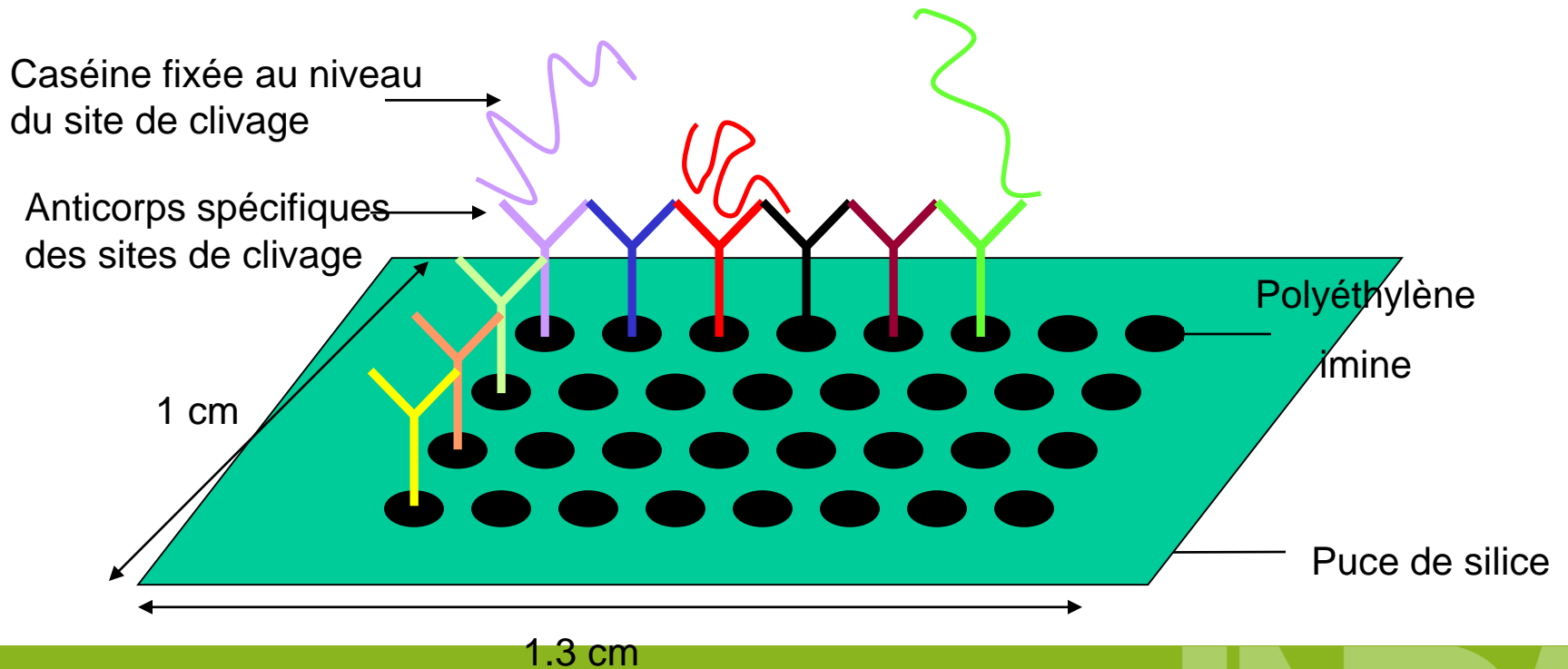


# Suivi de la concentration de caséine $\beta$ durant l'affinage

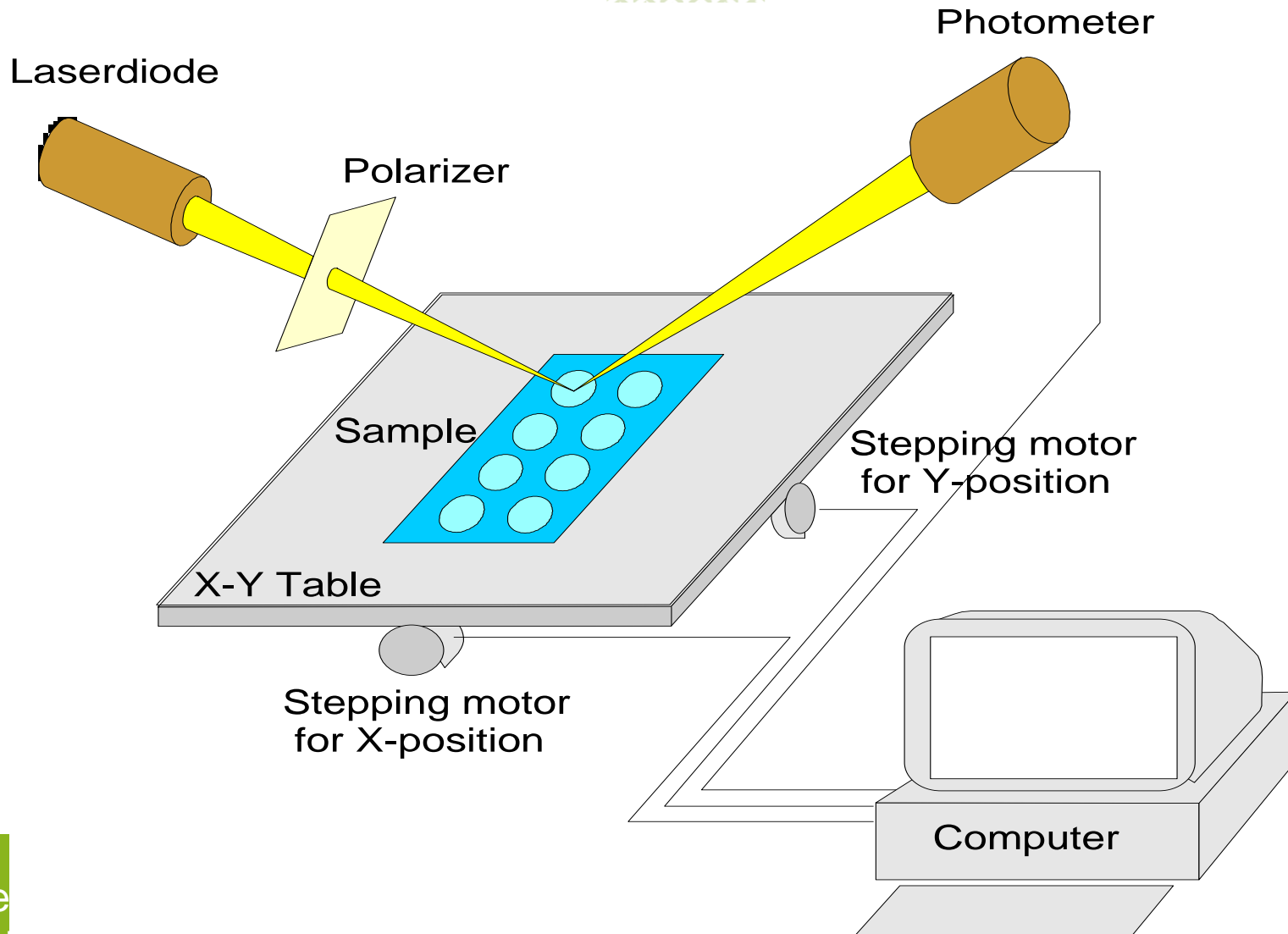


# L'objectif final du projet :

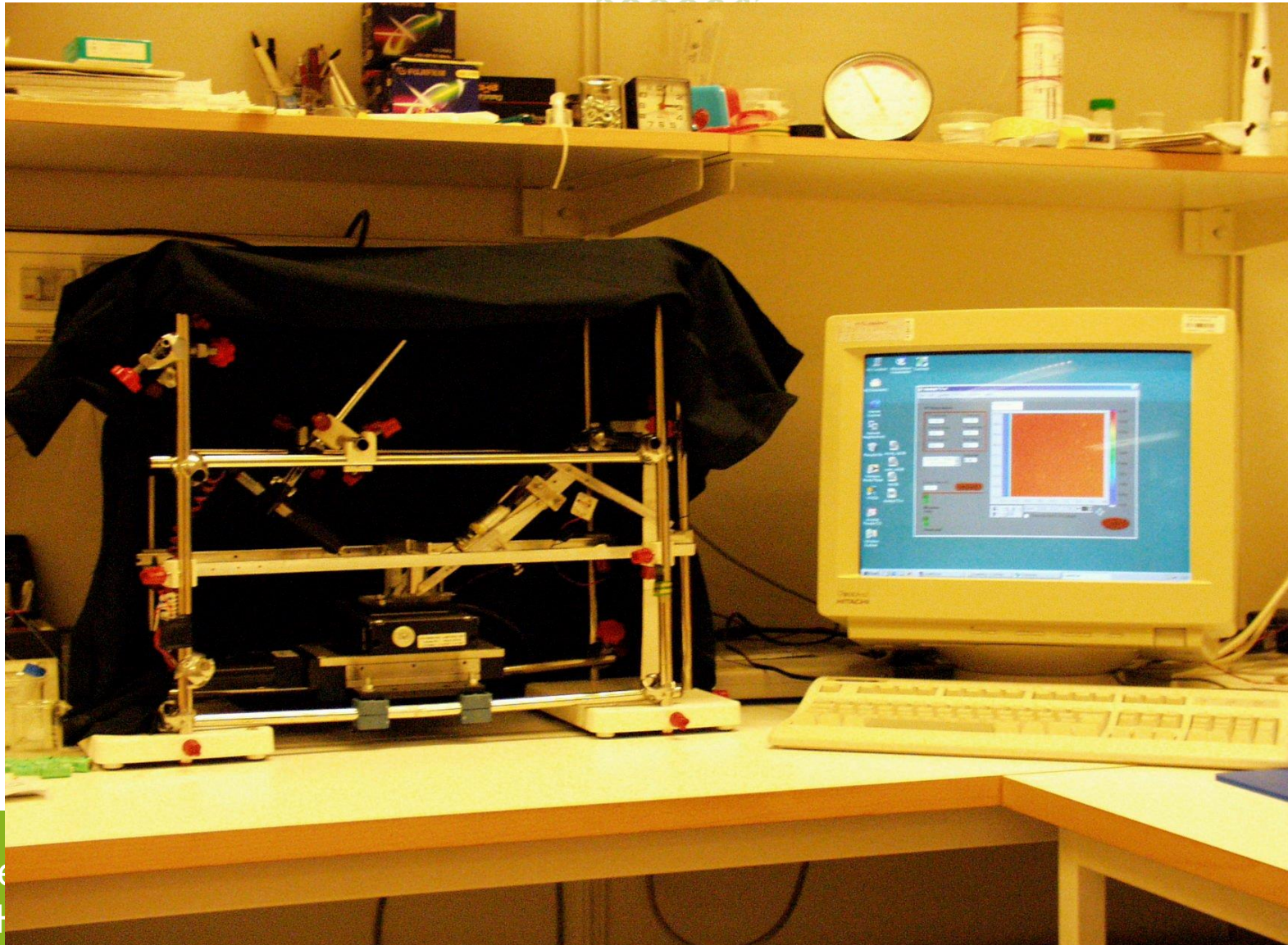
Développer un multicapteur permettant de suivre la protéolyse au cours de l'affinage des fromages (Cheese Sensor project, 2000-2004, Lund University)



# Le système de détection optique du Cheese Sensor



# Le prototype du Cheese Sensor

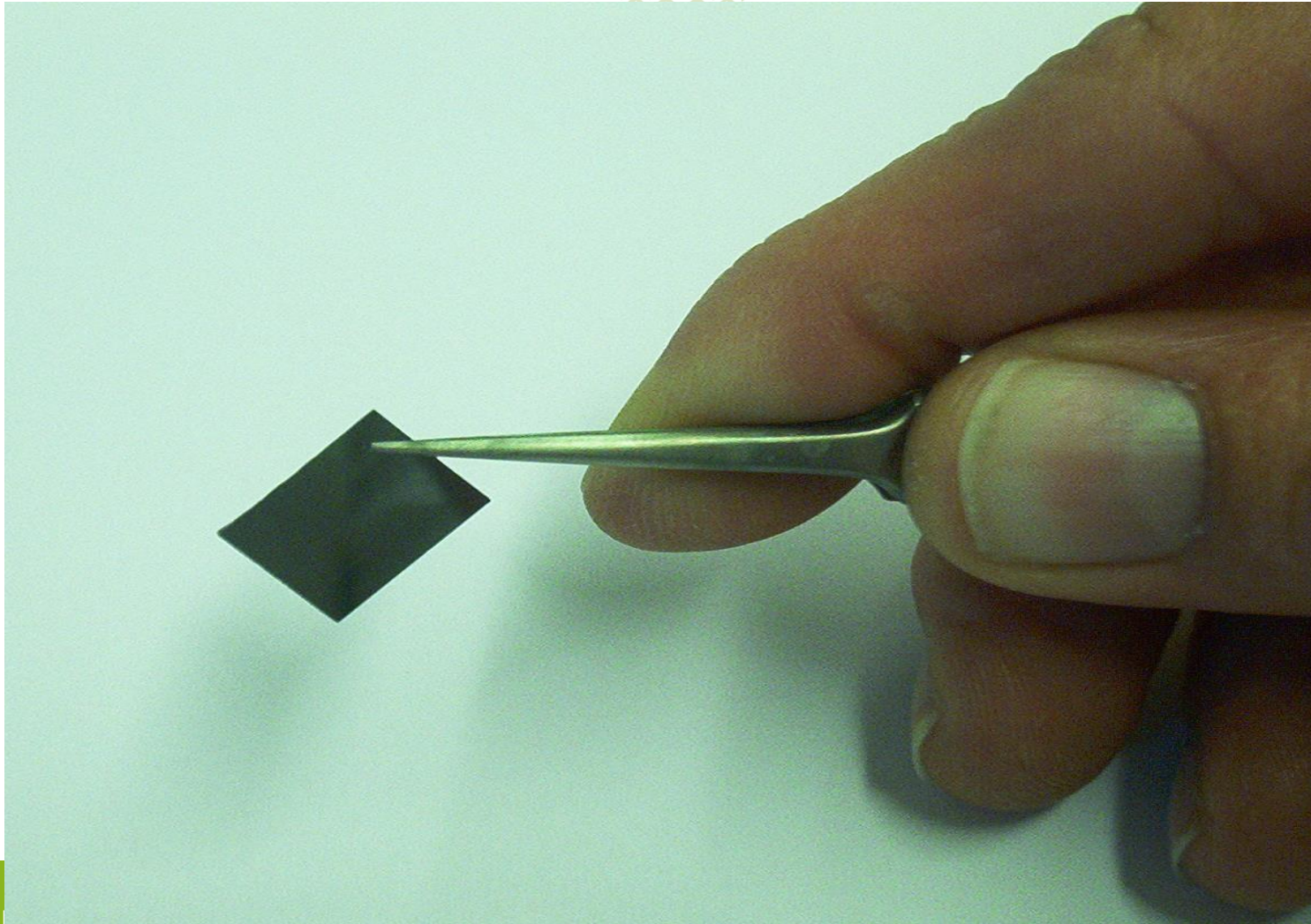


Ecole  
Les H  
8-12 février 2010

ENVIRONNEMENT



# La puce

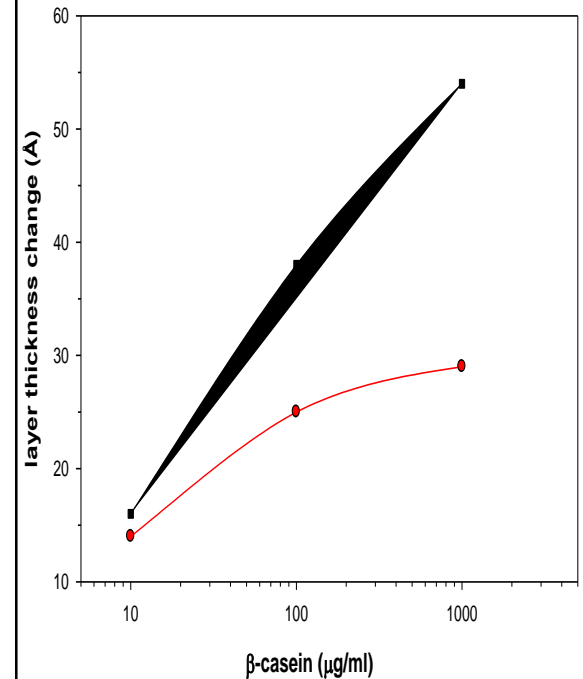
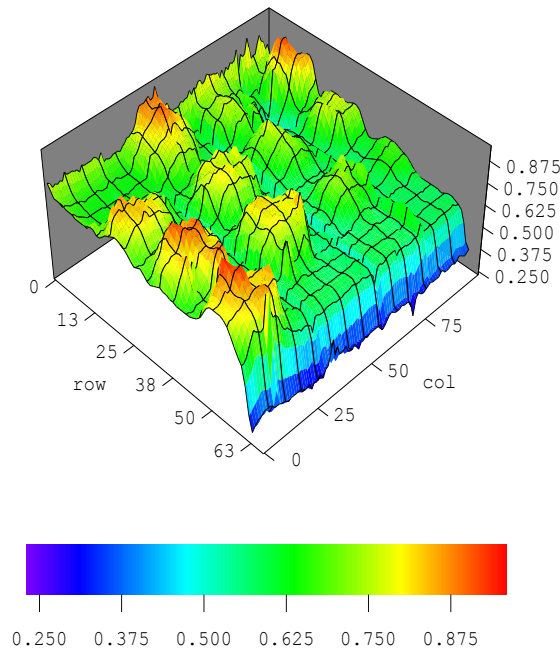
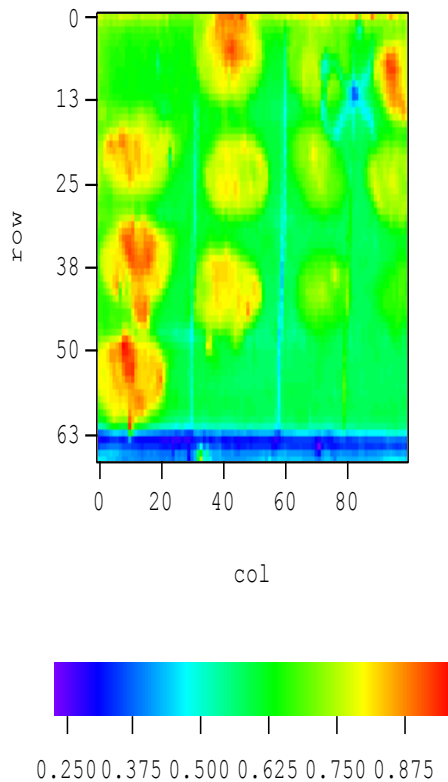


Ecole thématique CNRS  
Les Houches  
8-12 février 2010

ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT



# Quantification de la caséine $\beta$ intacte au site $\text{Lys}_{28}$ - $\text{Lys}_{29}$ avec le « Cheese Sensor »





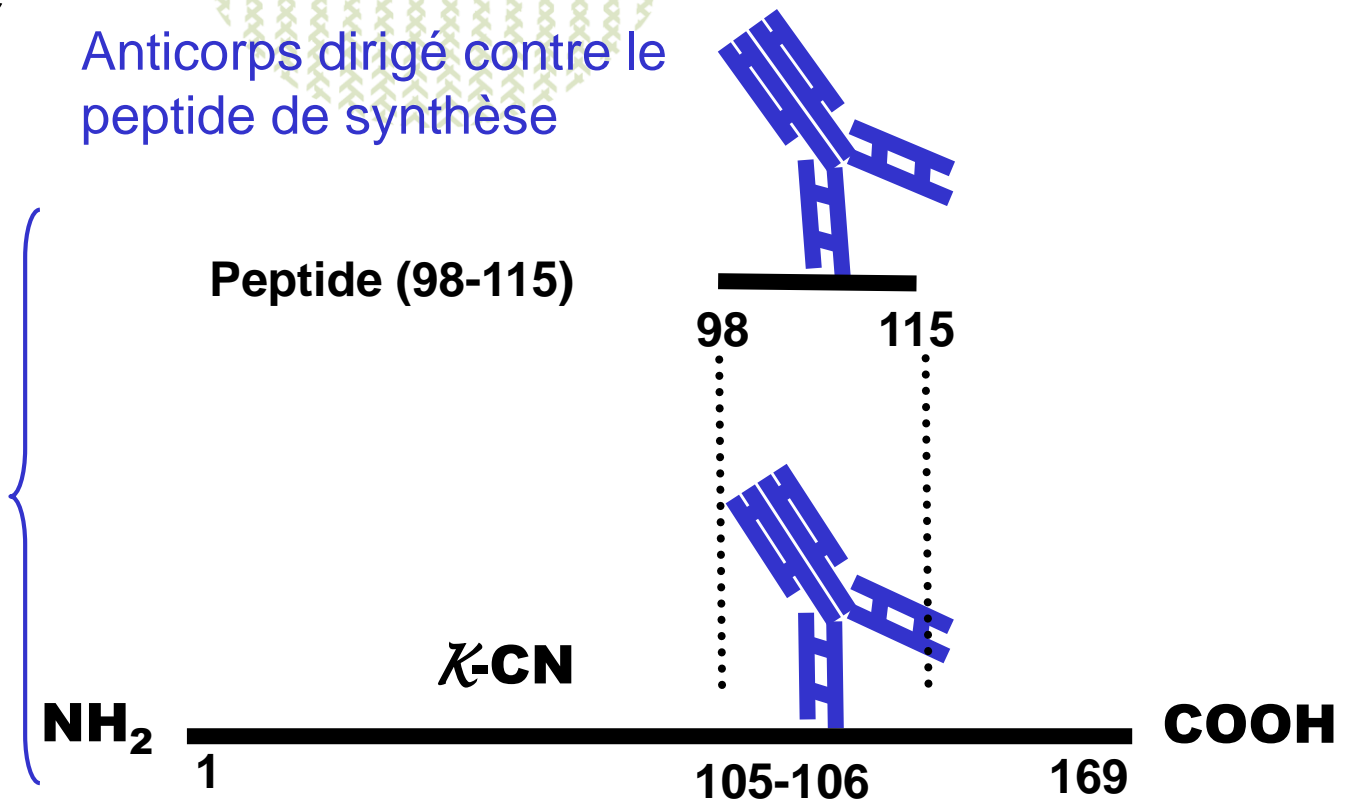
Développer une méthode permettant d'évaluer le risque de déstabilisation d'un lait au cours de son stockage en suivant l'hydrolyse de la liaison Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> de la caséine  $\kappa$ .



# Stratégie utilisée

Anticorps dirigé contre le peptide de synthèse

Reconnaissance spécifique

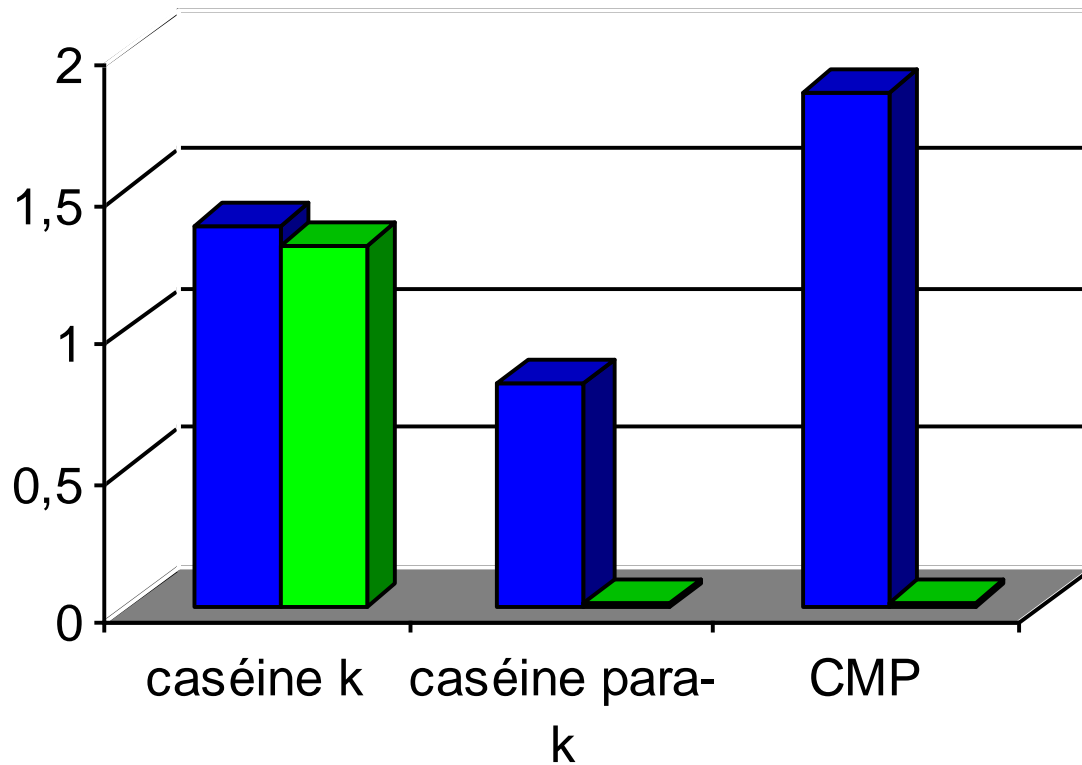


Coupure enzymatique ↓

Pas de reconnaissance

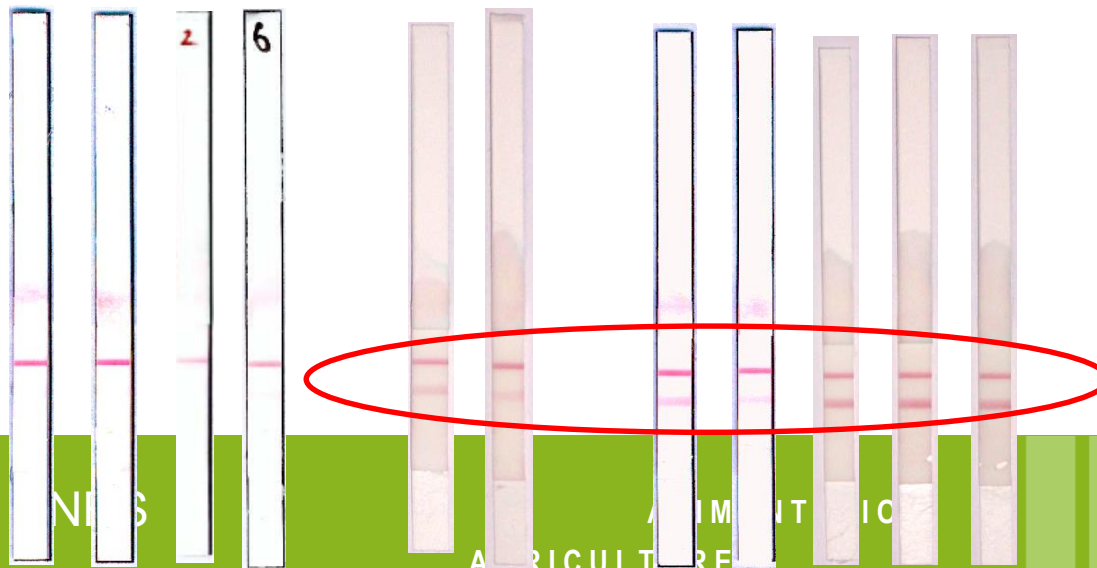
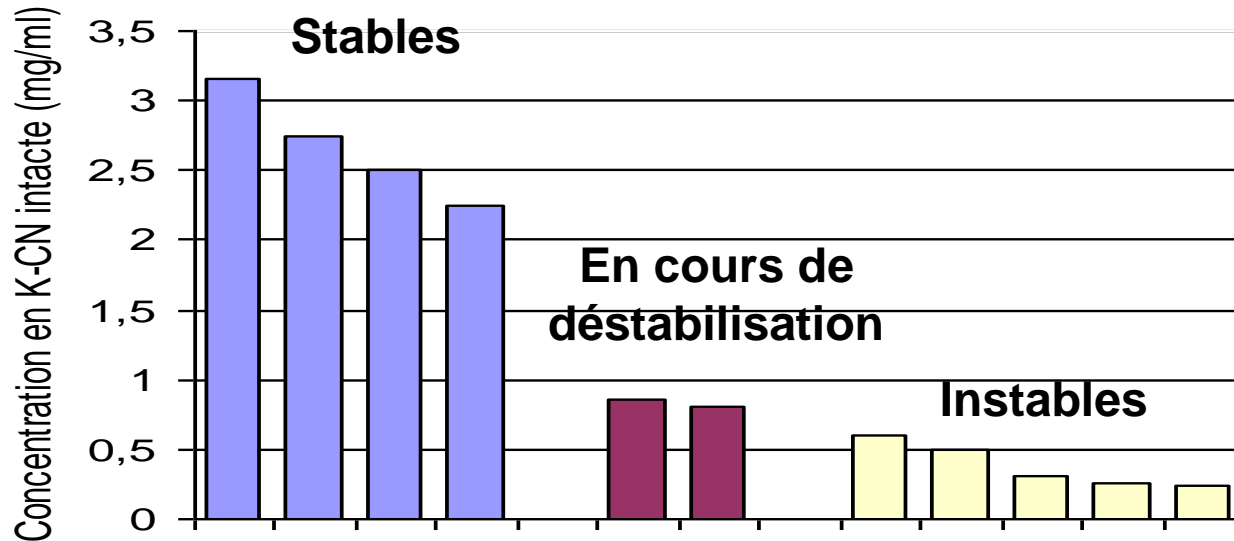


# Spécificité des anticorps produits



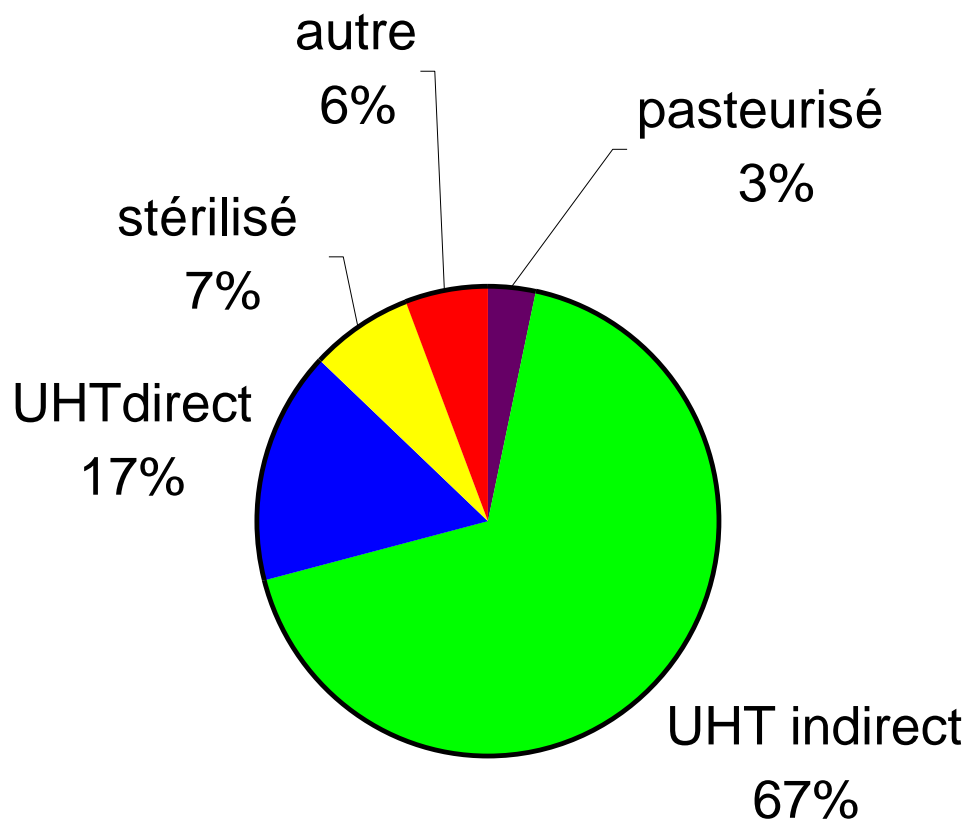
■ polyclonal anti-k ■ monoclonal anti Phe105-Met106

# Détection des laits UHT instables





Apparition  
d'une  
seconde  
bande  
correspondant  
à l'hydrolyse  
de la  $\kappa$  entre  
les résidus  
105-106

# Les différents types de laits de consommation produits en France



# Est-il possible de connaître le « passé thermique » d'un lait sans disposer du lait cru d'origine ?

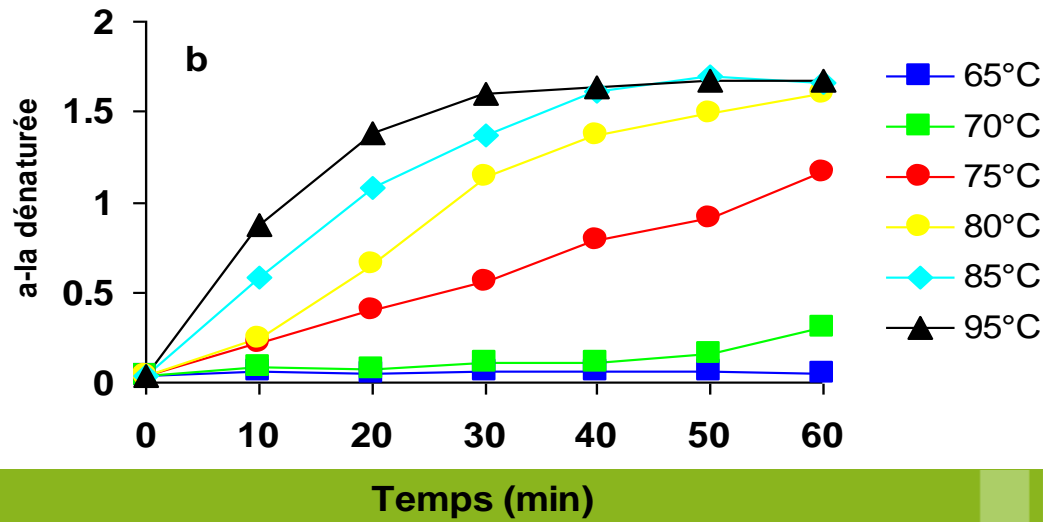
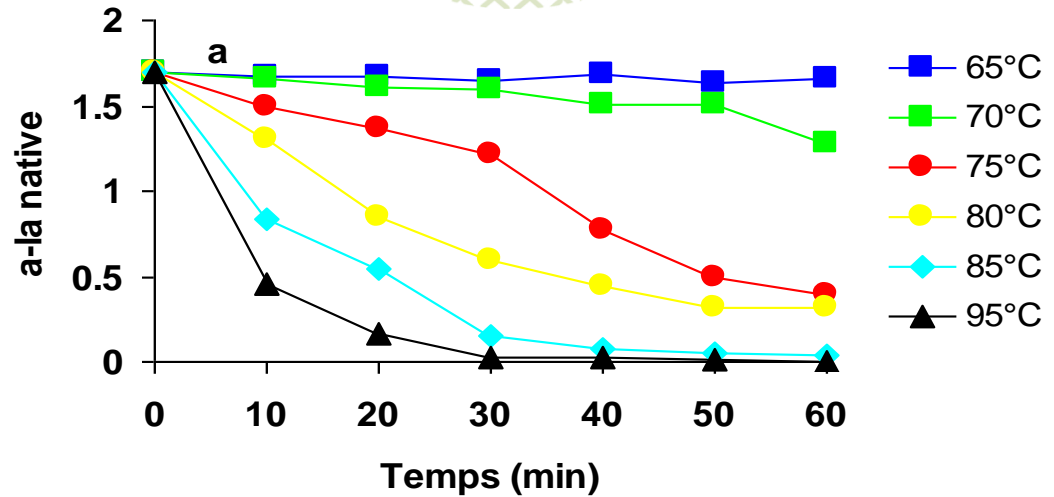
- Chauffage du lait  changements de conformations des protéines globulaires détectables par des anticorps spécifiques
- Modèle choisi :  $\alpha$ -lactalbumine  pertinent pour laits UHT

**Production d'anticorps monoclonaux spécifiques des formes native et « dénaturée » du marqueur et développement d'une technique ELISA et d'un biocapteur optique pour suivre les changements conformationnels du marqueur**



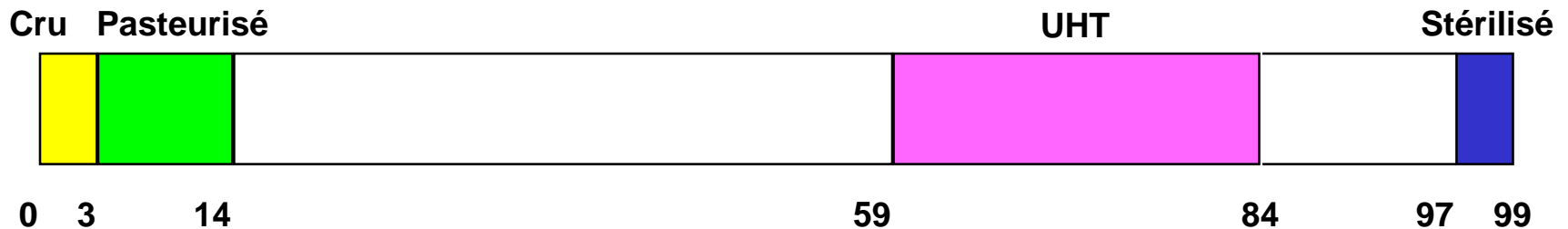
**Evaluation du traitement thermique d'un lait d'origine inconnue**

# Concentrations (mg/ml) d' $\alpha$ -lactalbumine native (a) et "dénaturée" (b) dans un échantillon de lait soumis à différents traitements thermiques déterminées par ELISA



# Pourcentages de dénaturation de l' $\alpha$ -lactalbumine déterminés sur 32 laits par ELISA

## Traitement thermique



Pourcentage de dénaturation (%)

## Conclusion I - La technique ELISA développée :

- ☺ permet de discriminer les laits pasteurisés, UHT et stérilisés
- ☺ ne nécessite pas de disposer du lait cru d'origine
- ☺ utilise quelques microlitres d'échantillon
- ☺ est peu coûteuse en réactifs et matériels

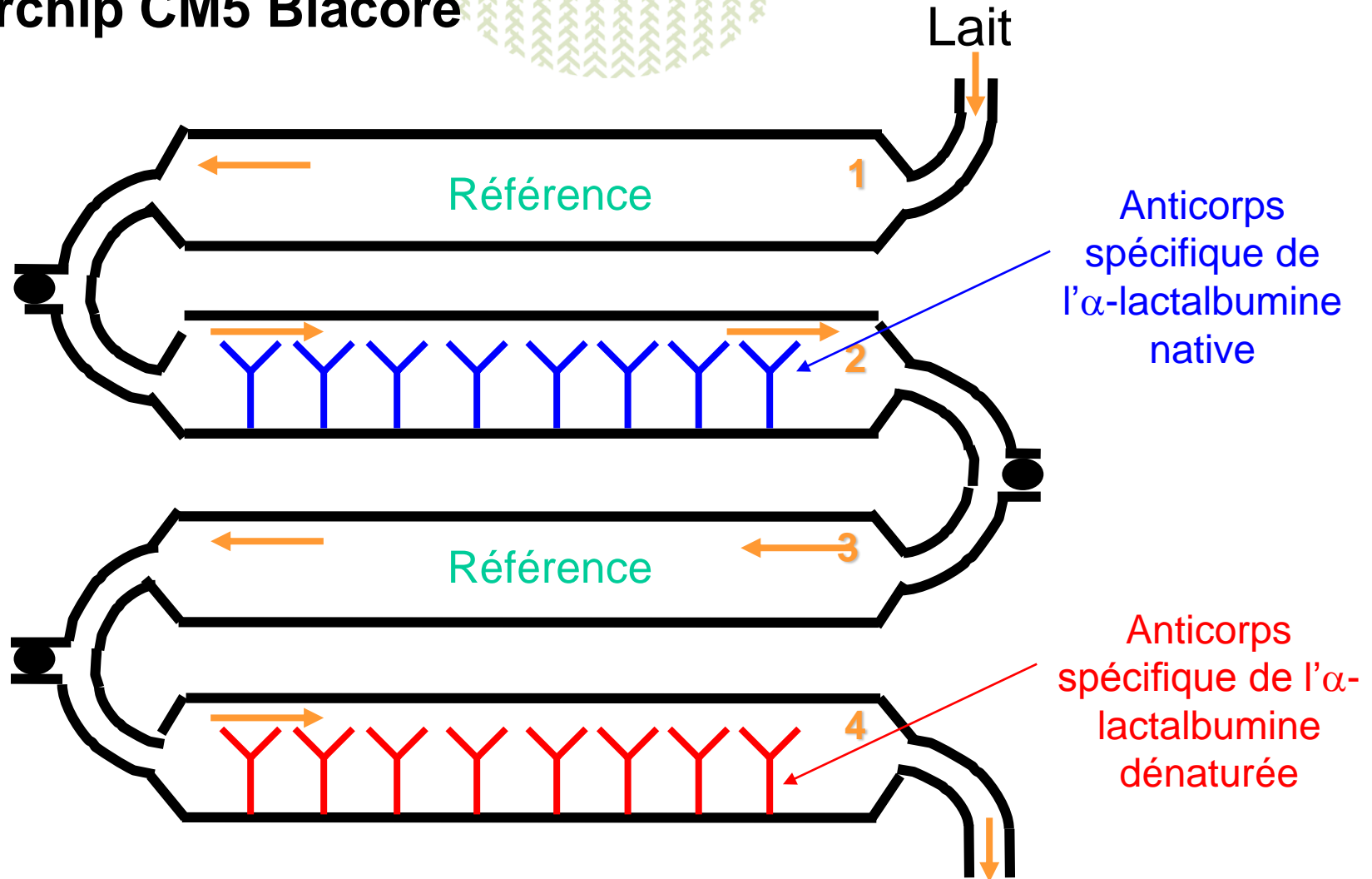
Cependant elle ...

- ☹ est peu répétable (CV = 11 et 12%)
- ☹ permet l'analyse de seulement 8 à 16 échantillons par jour. La technique est inadaptée pour une utilisation en routine

➡ **Il semble y avoir un intérêt à développer une technique utilisant les mêmes anticorps sur Biacore 3000**

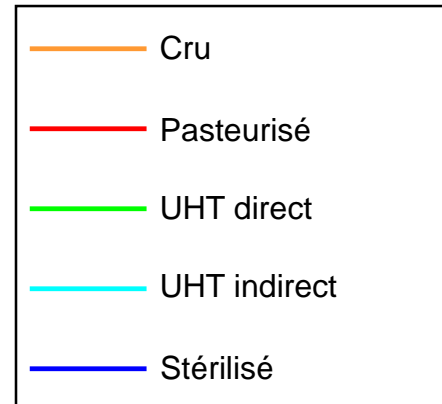
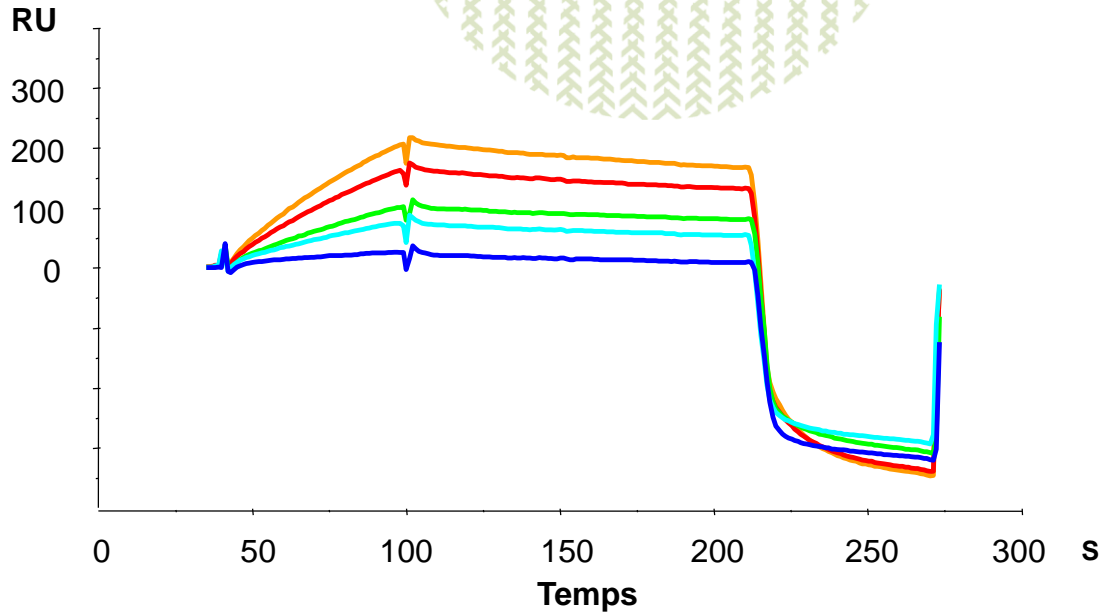


# Les anticorps monoclonaux ont été immobilisés sur une sensorchip CM5 Biacore

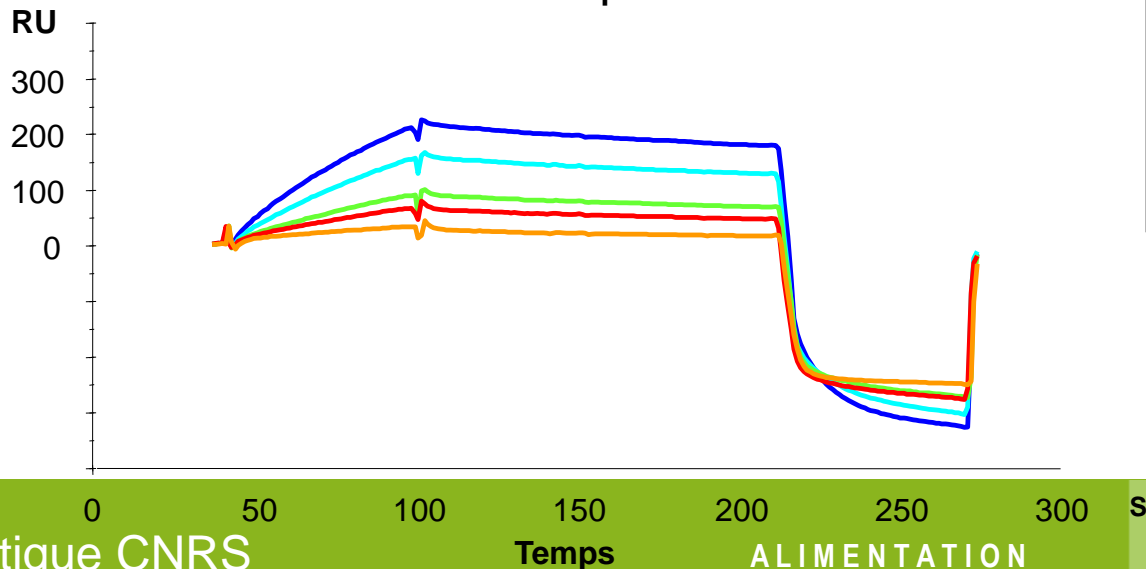


# Sensorgrammes obtenus avec des laits commerciaux

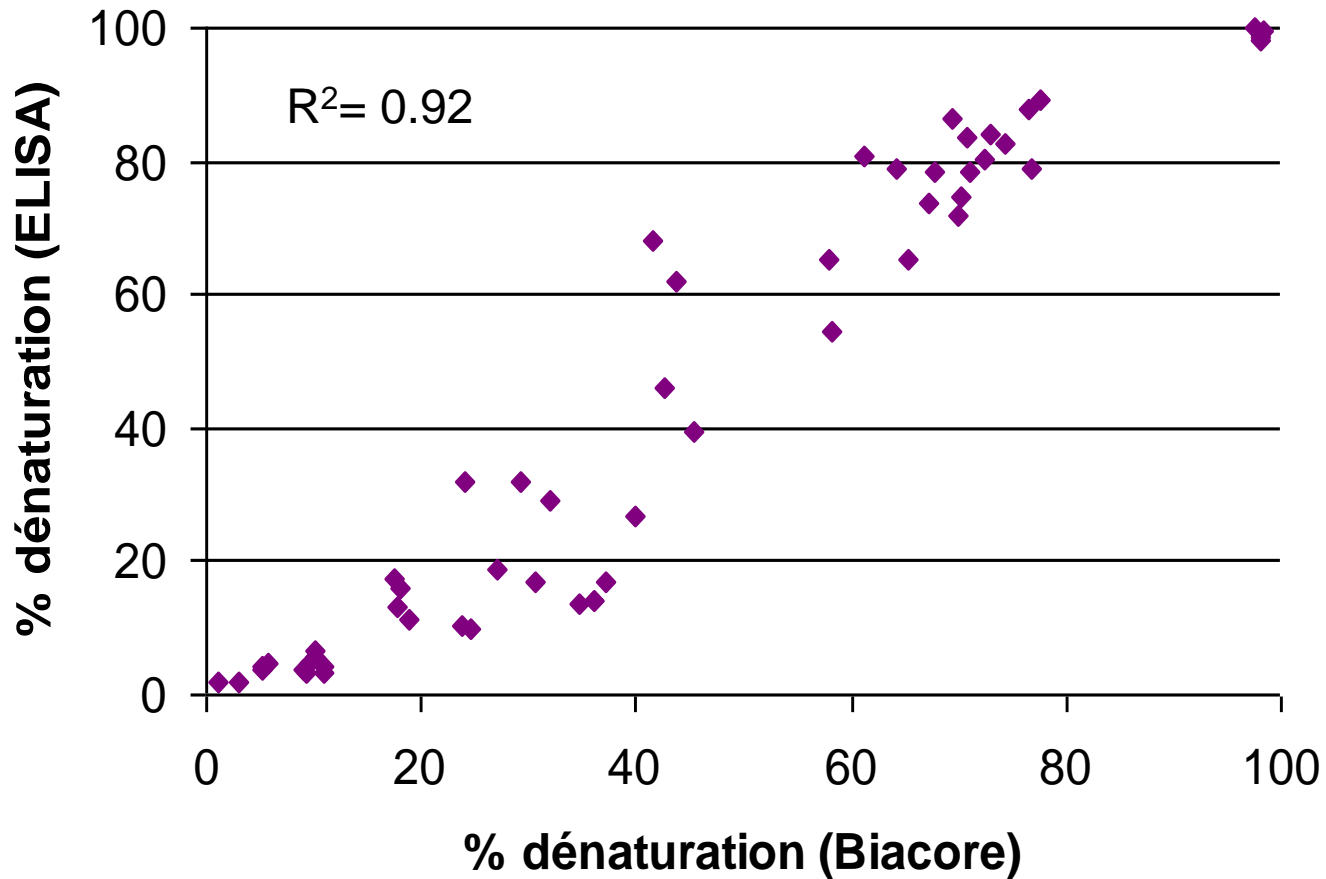
$\alpha$ -La  
Native



$\alpha$ -La  
dénaturée



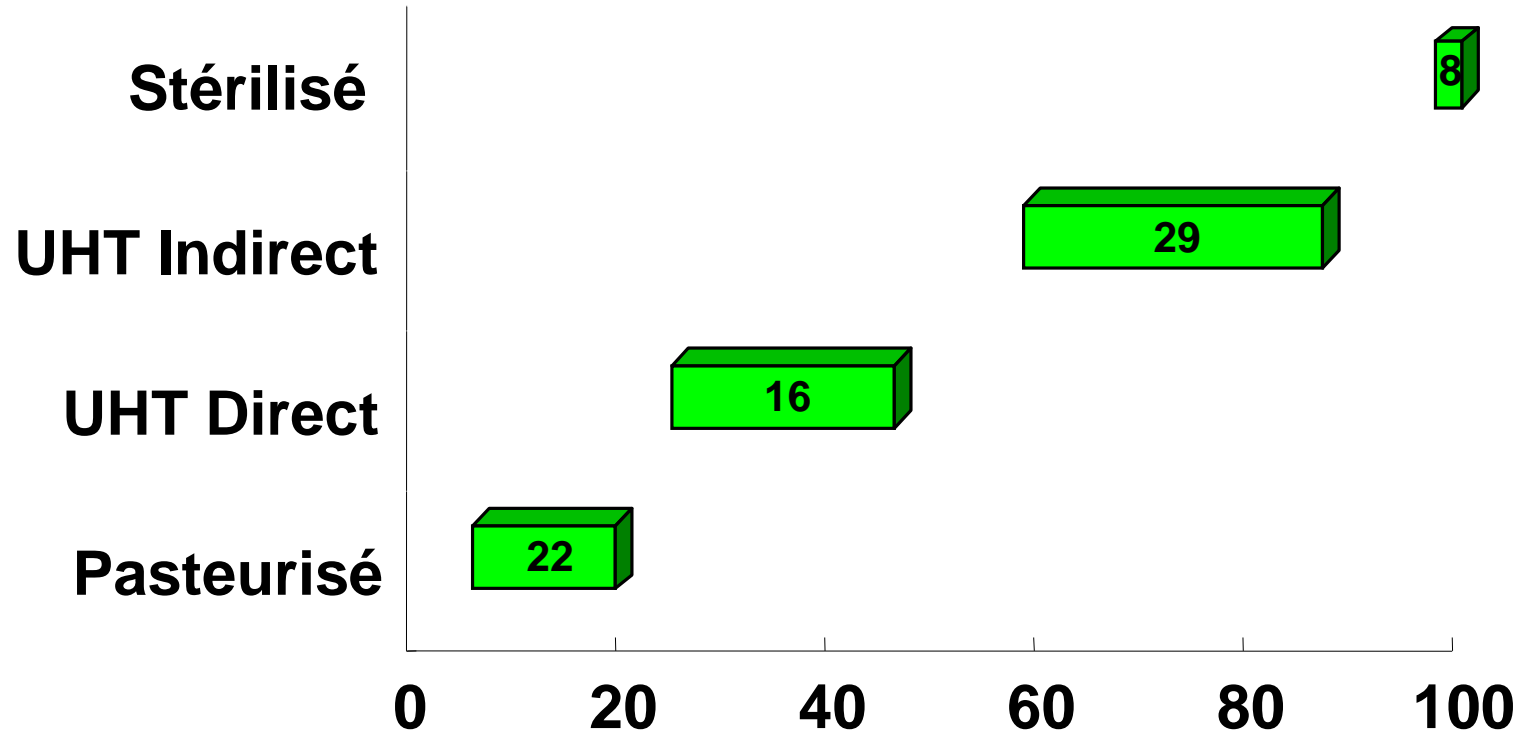
# Corrélation entre les techniques ELISA et Biacore (100 échantillons)



# Laits commerciaux analysés sur Biacore

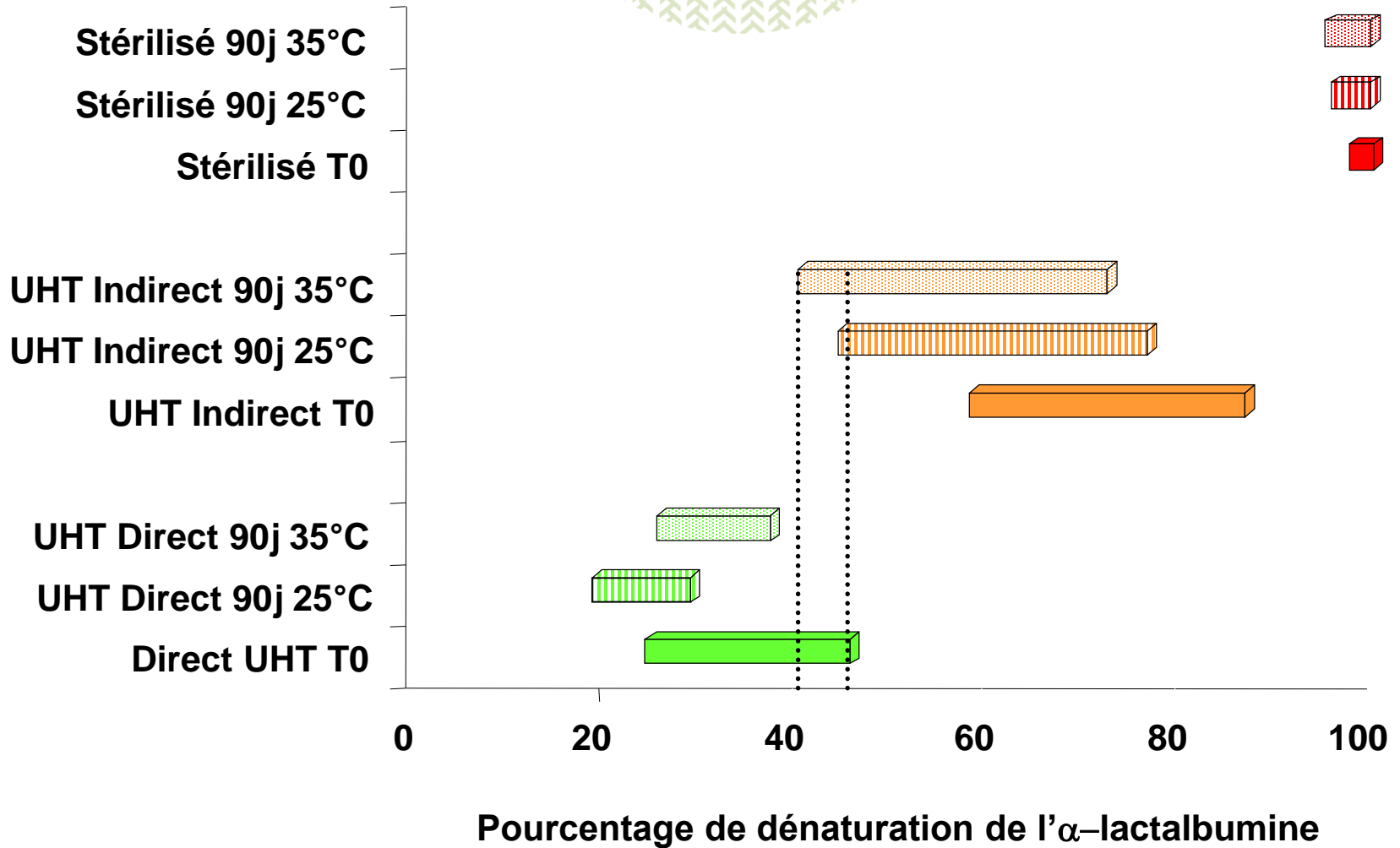
Lait	Echantillon	Analyse après fabrication	Analyse après 90 jours de stockage à		Total
			25°C	35°C	
<b>Pasteurisé</b>	6 usines x 2 saisons	22	0	0	22
<b>UHT Direct</b>	6 usines x 2 saisons	16	16	16	48
<b>UHT Indirect</b>	7 usines x 2 saisons	29	29	29	87
<b>Stérilisé</b>	2 usines x 2 saisons	8	8	8	24
<b>TOTAL</b>					<b>181</b>

# Pourcentage de dénaturation de l' $\alpha$ -lactalbumine de laits du commerce analysés après fabrication

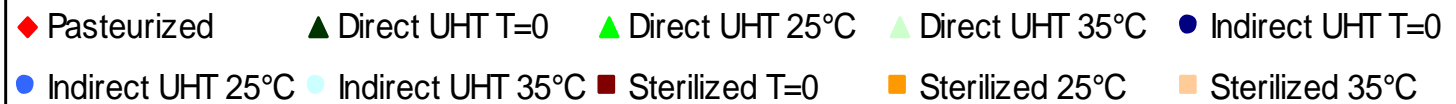
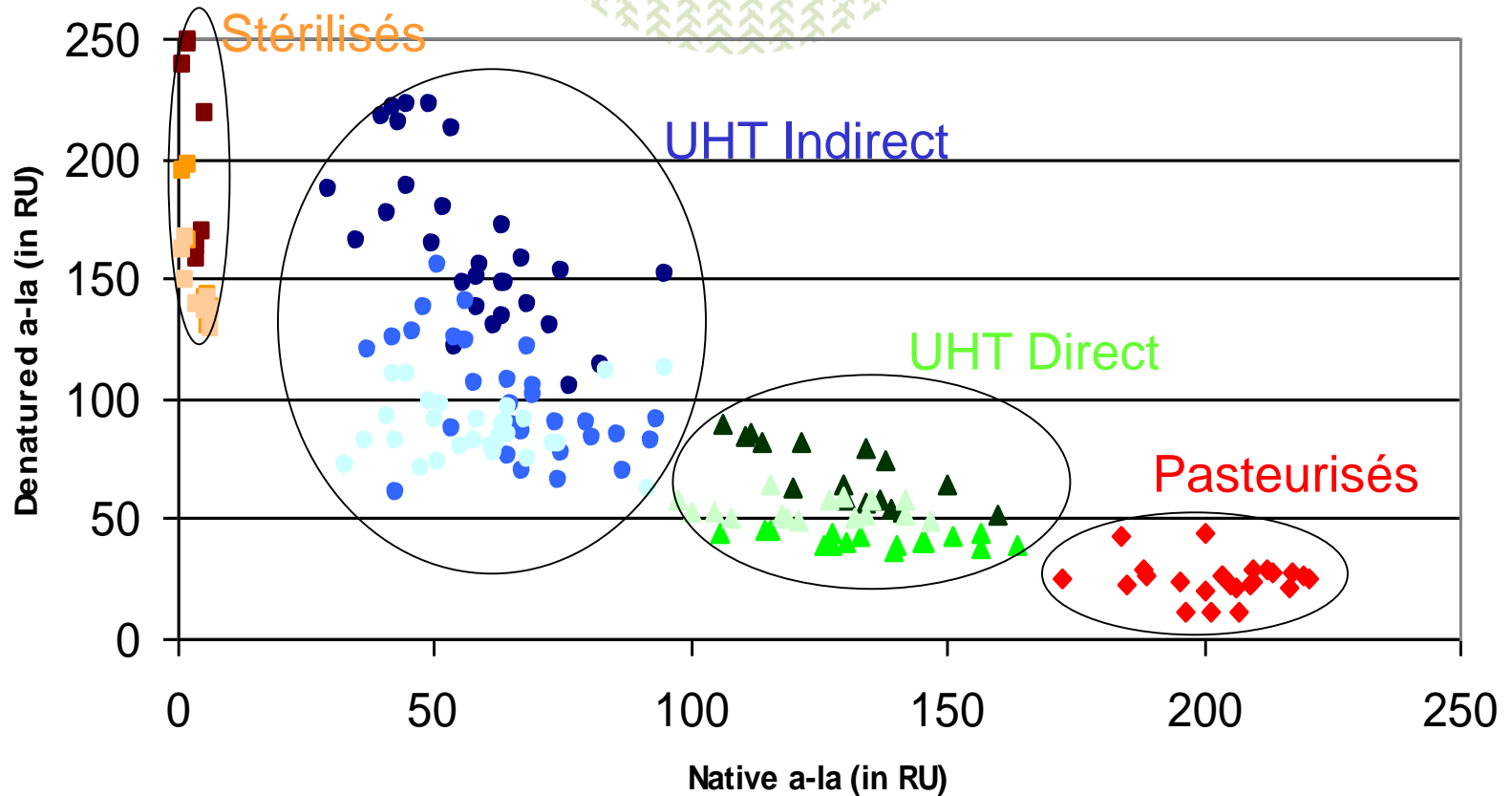


Pourcentage de dénaturation de l' $\alpha$ -lactalbumin (%)

# Effet du stockage



# Discrimination de laits commerciaux par leurs concentrations relatives en $\alpha$ -lactalbumine native et dénaturée





# Cahier des charges à respecter



Ecole thématique CNRS  
Les Houches  
8-12 février 2010

ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT

INRA





# Les perspectives



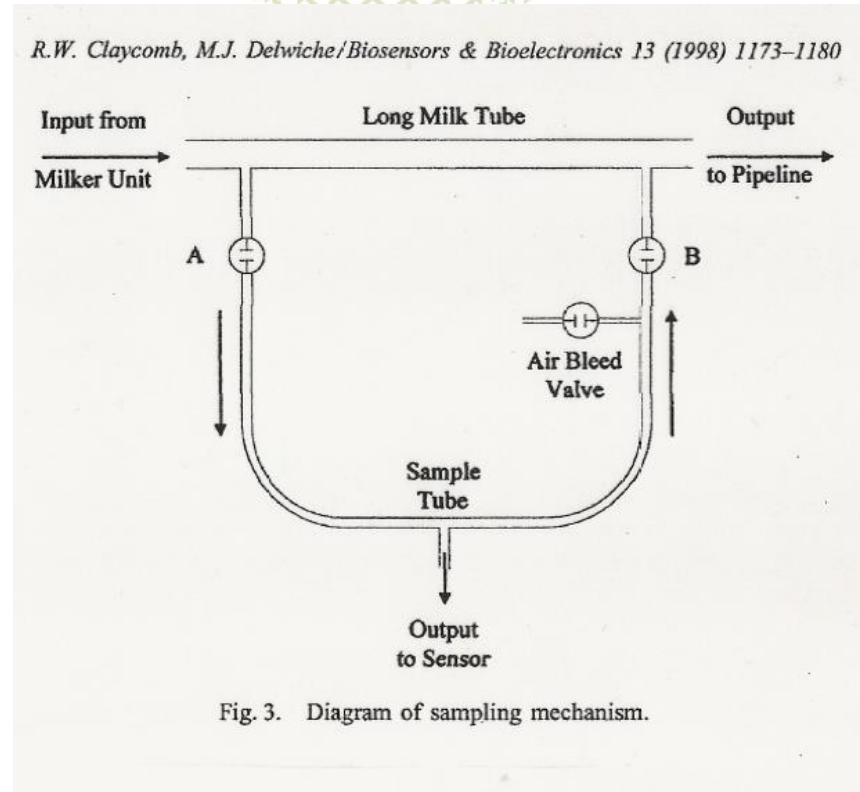
Ecole thématique CNRS  
Les Houches  
8-12 février 2010

ALIMENTATION  
AGRICULTURE  
ENVIRONNEMENT



# Exemple 1 - Détection on-line de la progestérone

Machine à traire  
du futur ???



Permet de déterminer précisément la période d'œstrus de la vache au cours de la traite

## Exemple 2 – Vérification de l'intensité d'un traitement thermique



Colmatage des plaques de l'échangeur par dépôt de protéines dénaturées

↳ Diminution de l'efficacité du traitement

↳ Augmentation des risques sanitaires

↳ Biocapteur intégré en sortie d'échangeur et avant conditionnement