HAL open science

La traque des allergènes masqués dans l'alimentation. Exemples de l'extraction et de la détection immunochimique des protéines de l'arachide et du lait

Hervé Bernard

▶ To cite this version:

Hervé Bernard. La traque des allergènes masqués dans l'alimentation. Exemples de l'extraction et de la détection immunochimique des protéines de l'arachide et du lait. Innovations Agronomiques, 2016, 52, pp.37-49. 10.15454/1.5135838939195532E12 . hal-01652909

HAL Id: hal-01652909

https://hal.science/hal-01652909v1

Submitted on 30 Nov 2017

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.

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

La traque des allergènes masqués dans l'alimentation.

Exemples de l'extraction et de la détection immunochimique des protéines de l'arachide et du lait.

Bernard H.[1]

[1]UMR CEA-INRA, Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire (LIAA), IBiTecS/SPI, Bat 136, CEA de Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette cedex.

Correspondance : herve.bernard-INRA@cea.fr

Résumé

La présence fortuite d'allergènes dans l'alimentation peut provoquer des réactions parfois sévères chez des individus sensibilisés. La détection de ces allergènes masqués dépend de la méthodologie développée, du marqueur protéique choisi et de la matrice alimentaire analysée. Différentes méthodologies ont été évaluées pour leur capacité à détecter des allergènes du lait et de l'arachide dans des matrices alimentaires complexes. Les conditions d'extraction ainsi que les tests ELISA appliqués influencent le dosage de l'arachide dans les différentes matrices alimentaires analysées. De nouvelles approches, autant en termes de méthodologies d'extraction protéique que de définition des réactifs de test ELISA, ont été investiguées pour améliorer la détection de l'arachide. En parallèle, des outils immunologiques originaux ont été développés pour détecter la présence de traces de lait de chèvre dans des aliments, sans aucune interaction avec le lait de vache. Ce test ELISA pourrait contribuer à évaluer le potentiel allergique des aliments dans le cas de l'allergie particulière aux laits de chèvre et de brebis chez des patients tolérant le lait de vache.

Mots-clés : Allergie alimentaire, Arachide, Lait, Allergènes, ELISA, Détection, Contamination, Aliments, Extraction protéique.

Abstract: Masked allergens in food. Extraction and immunodetection of peanut and milk proteins.

The presence of masked allergens in processed food can be dangerous to allergic individuals. Detection of these undeclared allergens widely depends on the dedicated methodology, analyzed food matrix and chosen target. Immunochemical methods of commercial kits and home laboratory have been assessed for the detection of peanut and milk proteins in complex food matrices. Peanut and milk allergens can be detected by the different methods. However, recovery of allergens varied greatly depending on the food matrix, the protein extraction protocol and the immunoassay used. New methods for protein extraction protocols and ELISA test are suggested to improve detection of peanut in food. In parallel, an original immunochemical tool have been developed to detect caprine and ovine proteins in bovine dairy products. This last easy and rapid ELISA would allow a better food management to reduce the risk of exposure to goat's milk allergens in patients tolerant to cow's milk.

Keywords: Food allergy, Peanut, Milk, Allergens, Immunoassay, Detection, Food, Contamination, Protein extraction.

Introduction

Depuis novembre 2005, la directive européenne 2003/89/CE rend obligatoire, à quelques exceptions près, l'étiquetage des produits alimentaires contenant volontairement des allergènes majeurs répertoriés (http://www.economie.gouv.fr/dgccrf/Publications/Vie-pratique/Fiches-pratiques/Allergene-alimentaire). Cette directive a alors permis des avancées quant à la gestion du risque allergique dans l'alimentation. Cependant, elle ne garantit pas la présence fortuite d'allergènes, résultant d'une contamination de l'aliment par les ingrédients utilisés ou lors de son élaboration au sein de la chaîne de fabrication. Le risque de présences fortuites d'allergènes dans les denrées alimentaires a alors généré les mentions d'étiquetages préventifs. Ce type d'étiquetage, généralement appelé « étiquetage de précaution », utilise de multiples mentions comme « produit pouvant contenir » un allergène donné ou encore « produit fabriqué dans un atelier utilisant » un allergène particulier. Il a été mis en place à l'initiative des entreprises du secteur agroalimentaire mais ne repose sur aucun texte réglementaire. Garantir l'absence de « traces d'allergène » ou au contraire quantifier leur présence apporterait un étiquetage plus précis et faciliterait ainsi la gestion du risque allergique. La détection d'allergènes dans un aliment, à des doses susceptibles de déclencher une réaction allergique, nécessite des méthodes sensibles et spécifiques. A l'heure actuelle, les sensibilités atteintes par les différentes méthodes, sont de l'ordre de la partie par million (ppm) ce qui revient à déterminer la présence d'au moins 1 µg d'allergène dans 1 g d'aliment. La détection d'allergènes dans des aliments fait essentiellement appel à des approches de biologie moléculaire, de biochimie et d'immunochimie. Les techniques de biologie moléculaire sont développées autour des méthodes dites PCR (Polymerase Chain Reaction). À partir d'amorces et de sondes spécifiques, la séquence d'un gène codant pour une protéine d'intérêt est amplifiée des millions de fois et, alors, mise en évidence. Cependant, la détection de l'ADN dans l'aliment dépend de sa qualité d'extraction. Par ailleurs, l'existence de l'ADN codant pour un allergène, ou plus exactement sa quantification relative, n'est pas forcément corrélée avec la présence de la protéine dans l'aliment et, donc, avec le risque allergique. Le développement de méthodes biochimiques et plus particulièrement d'analyses par spectrométrie de masse associées ou non à des techniques chromatographiques, connait un essor important. Leur évaluation est l'objet de nombreuses études dont certaines font actuellement partie d'un programme européen iFAAM (Integrated approaches to Food Allergen and Allergy Management). Cependant les différentes approches de biologie moléculaire et de spectrométrie de masse sont majoritairement des méthodes dites « internes » : peu de celles-ci sont commercialisées du fait de la nécessité de disposer d'un appareillage lourd et d'un savoir-faire important.

A l'heure actuelle, l'approche immunochimique reste la méthodologie la plus appliquée pour détecter et quantifier des allergènes masqués dans les aliments. Elle s'appuie sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'allergène et repose essentiellement sur le développement de tests ELISA qui présentent des caractéristiques de spécificité et de sensibilité propices à la détection de traces d'allergènes dans un aliment (Schubert-Ullrich et al., 2009).

Cependant, tout comme pour les approches de biologie moléculaire et de biochimie, les techniques immunochimiques nécessitent le plus souvent un traitement préalable de l'échantillon. La détection des allergènes masqués s'avère dépendante de la matrice alimentaire étudiée, de la protéine ciblée et de l'extraction protéique adoptée (Figure 1). Cette dernière, tout en assurant un bon rendement d'extraction protéique, doit préserver les capacités des entités isolées à être reconnues par les anticorps impliqués dans les dosages ELISA. Elle doit tenir compte de la solubilité des protéines d'intérêt ainsi que des modifications induites sur celles-ci par les traitements appliqués. Elle doit alors s'adapter à l'analyse d'une multitude d'aliments aux compositions et aux processus technologiques divers.

Figure 1 : De la matrice alimentaire à la détection d'allergènes masqués

1. Immunodétection des allergènes de l'arachide dans des matrices alimentaires

L'arachide est une source allergénique majeure par la fréquence et la gravité des réactions qu'elle peut engendrer. Ses caractéristiques nutritionnelles et fonctionnelles l'impliquent dans de nombreux aliments complexes, notamment en tant qu'exhausteur de goût.

La détection de protéines masquées de l'arachide illustre l'ensemble des difficultés décrites précédemment. En effet, l'arachide comprend une diversité d'allergènes aux caractéristiques physico-chimiques variées. Sa composition protéique, son immunoréactivité et son potentiel allergénique sont modulés en fonction des variétés, des formes utilisées (arachide entière, farine, beurre) ou encore des processus thermiques subis (Poms et al., 2004 ; Mondoulet et al., 2007 ; Schmitt et al., 2010 ; Chassaigne et al., 2007 ; Fu et al., 2013 ; Block et al., 2015). De fortes variabilités des rendements protéiques ont été également observées en fonction des conditions d'extraction mises en jeu. Dans le cadre du programme Européen iFAAM, nous avons défini et analysé 20 conditions d'extraction d'allergènes en prenant en compte le tampon utilisé, son pH, son volume par rapport à la masse de farine d'arachide traitée mais aussi la température et la durée d'extraction appliquées. Les rendements et compositions protéiques ainsi que le potentiel allergénique des extraits produits ont été évalués et comparés. Les résultats ont souligné l'influence du pH et de l'addition de sels, de détergent ou encore d'agent chaotropique sur le rendement d'extraction protéique. Cependant, l'utilisation d'agent chaotropique modifie l'allergénicité de certaines protéines. Par ailleurs, les compositions et rendements protéiques dépendent du rapport du volume de tampon d'extraction par rapport à la masse de farine traitée. Un faible rapport (5 ml de tampon/1g de produit traité) engendre un rendement inférieur à 20% en limitant l'extraction des allergènes les moins solubles. De plus, des extractions effectuées à une température de 40°C et avec des durées supérieures à 30 minutes accroissent significativement le rendement protéique.

L'extraction protéique et la détection d'arachide se trouvent également liées au type de matrice alimentaire étudiée. En effet, la composition de l'aliment et les différentes étapes de son élaboration, peuvent modifier les protéines et influencer leurs extractions et détections. Ces points tendent à la recherche d'une cible omniprésente dans les aliments, peu sensible aux processus industriels, ainsi qu'à la définition d'une méthode d'extraction « consensuelle » permettant d'isoler cette cible en dépit de la variabilité de la matrice alimentaire. Les cibles protéiques et les systèmes d'extraction sont alors variables (Westphal et al., 2004 ; Poms et al., 2005 ; Jayasena et al., 2015). Certains tests privilégient la détection d'un allergène précis de l'arachide alors que d'autres apparaissent plus généraux en détectant les protéines « solubles » qui contiennent une diversité d'allergènes. Il existe ainsi de nombreuses méthodes commercialisées qui n'ont pas été validées selon une procédure standardisée (Abbott et al., 2010). Cependant, certaines d'entre elles ont fait l'objet de comparaisons voire d'évaluations entre laboratoires pour leurs capacités à détecter des traces d'arachide dans différentes matrices alimentaires de type gâteau, céréales ou chocolat (Whitaker et al., 2005 ; Poms et al., 2005 ; Matsuda et al., 2006 ; Khuda et al., 2012). Ces différentes études attestent de la capacité de la majorité des kits commerciaux à détecter des quantités résiduelles d'arachide dans les matrices alimentaires

analysées. Toutefois, elles démontrent une grande variabilité dans le dosage d'arachide en fonction du kit, de ses conditions d'extraction protéique et de la matrice alimentaire testée.

1.1 Détection de l'arachide dans une matrice gâteau à l'aide de tests ELISA

Deux de ces méthodes ont été évaluées dans le cadre du programme national MANOE (Maitrise Allergènes NutritiOn Enfant). Une partie de ce projet visait à tester la fiabilité de méthodes commerciales de détection des allergènes dans des aliments industriels et à proposer des solutions alternatives autant sur les procédures de traitement des matrices alimentaires que sur celles des tests ELISA. L'étude a été menée en collaboration avec des partenaires industriels, Sadac, Charal, Brioche Pasquier et Lactalis. Différents allergènes, arachide, blé, lait et œuf ont été volontairement introduits dans des aliments industriels lors de leurs élaborations. Les contaminations ont été effectuées à un niveau de 10 mg/kg (10 ppm) dans des conditions réelles de production. L'allergène contaminant a alors été suivi en début et en fin de chaîne de fabrication. Les mêmes matrices alimentaires produites en l'absence de contamination, servent de « contrôles négatifs » lors de l'étude.

La détection d'arachide a été réalisée dans un aliment de type gâteau (Muffin) en tant que matrice modèle. Les conditions de traitement de cet aliment ont repris celles préconisées par les deux kits commerciaux avec pour seule modification, un allongement de la durée d'extraction protéique (Figure 2). En effet, des analyses préalables ont permis d'observer que l'allongement du temps d'extraction de 10 ou 15 minutes (défini par les procédures des kits commerciaux) à une heure engendrait un gain de plus de 50 % du signal pour la détection d'arachide par les tests ELISA. Par ailleurs, des solutions alternatives d'extraction s'appuyant sur une composition de tampon additionné de détergents non-ioniques ou d'agent chaotropique ont été testées.

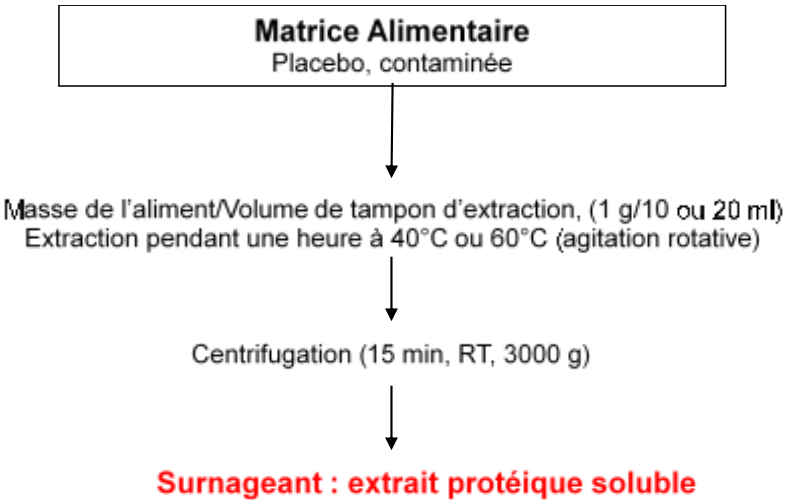

Figure 2 : Procédure d'extraction protéique appliquée aux matrices alimentaires

Les performances des kits commerciaux ont été comparées à celles d'un test ELISA que nous avons développé au laboratoire. Ce dernier s'appuie sur la détection d'un allergène majeur de l'arachide, l'albumine 2S Ara h 6, qui présente une bonne solubilité et des propriétés de résistance aux traitements thermiques et aux processus protéolytiques. Le dosage développé donne respectivement des limites de détection (L_D=moyenne du bruit de fond +3 écarts-types) et de quantification (L_Q= moyenne du bruit de fond +10 écarts-types) de 200 et 300 picogrammes/ml. Il a été récemment appliqué pour évaluer le

passage de l'allergène Ara h 6 dans le lait chez des mères allaitantes ayant ingéré de l'arachide (Bernard et al., 2014).

Pour les trois tests ELISA, aucun signal significatif (supérieur à la limite de détection) n'est observé avec les extraits de matrice non contaminée. A l'inverse, les différents immunodosages ont permis de détecter la présence d'arachide dans tous les extraits issus de matrice contaminée à 10 ppm, et ce, quelles que soient les conditions d'extraction protéique appliquées (Tableaux 1 et 2). Cependant, les contaminations mesurées varient selon les tests ELISA et les conditions d'extraction utilisées. Ainsi, l'addition de détergents non-ioniques (« Extraction de Laboratoire » des Tableaux 1 et 2) accroît la quantité d'arachide dosée et son taux de recouvrement (ratio entre la contamination mesurée par le test et celle réalisée lors de la fabrication). De même, les plus forts taux de recouvrement sont obtenus avec la méthodologie développée au LIAA qui permet d'atteindre des valeurs supérieures à 60%. Dans le cas de la matrice gâteau, l'addition d'agent chaotropique dans le tampon d'extraction n'apporte pas de gain significatif du dosage de l'arachide à l'aide du test ELISA du laboratoire. Elle entraine une perte de signal pour les kits commerciaux par dénaturation des protéines détectées (résultats non montrés).

Tableau 1 : Dosage d'arachide dans une matrice gâteau crue contaminée par 10 ppm d'arachide ($>L_D$: signal supérieur à la limite de détection mais non quantifiable). Les valeurs sont exprimées en ppm.

Test ELISA	Extraction		
	commerciale 1	commerciale 2	laboratoire
Kit Commercial 1	2,5	2,7	3,7
Kit Commercial 2	$>L_D$	3.5	4
Kit de laboratoire	4.5	5.3	7.3

Tableau 2 : Dosage d'arachide dans une matrice gâteau cuite contaminée par 10 ppm d'arachide ($>L_D$: signal supérieur à la limite de détection mais non quantifiable). Les valeurs sont exprimées en ppm.

Test ELISA	Extraction		
	commerciale 1	commerciale 2	laboratoire
Kit Commercial 1	1,7	$>L_D$	3,2
Kit Commercial 2	$>L_D$	$>L_D$	2.8
Kit de laboratoire	4,1	4.2	6.3

Les signaux et taux de recouvrement diminuent après cuisson, soulignant l'impact d'un traitement thermique sur la structure et l'extraction des protéines ciblées par les tests. Toutefois, cet effet est atténué avec la méthodologie développée au laboratoire du fait des caractéristiques de l'allergène ciblé, Ara h 6.

L'influence des conditions d'extraction protéique sur la détection de l'arachide a été poursuivie à l'aide de la matrice gâteau crue. Les mélanges de la matrice et du tampon d'extraction ont été « homogénéisés » par agitation forte en tube individuel « disperseur » DT 20 (IKA®) ou à l'aide d'ultrasons (40 kHz) par quatre séquences d'une minute au cours de la procédure d'extraction. En parallèle, des extractions ont été réalisées à l'aide des tampons du laboratoire et du kit commercial 2 selon les conditions définies dans la Figure 2. Les différents extraits issus des matrices « placebo » et contaminées ont été analysés à l'aide du test ELISA développé au laboratoire (Figure 3). Les signaux mesurés sont accrus après une forte homogénéisation des extraits, reflétant une plus grande extraction des protéines de l'arachide au sein de la matrice « gâteau ». Le rendement d'extraction par traitement aux ultrasons est 50% supérieur à celui obtenu sans traitement physique. Ces résultats prometteurs restent à être évalués pour d'autres matrices alimentaires.

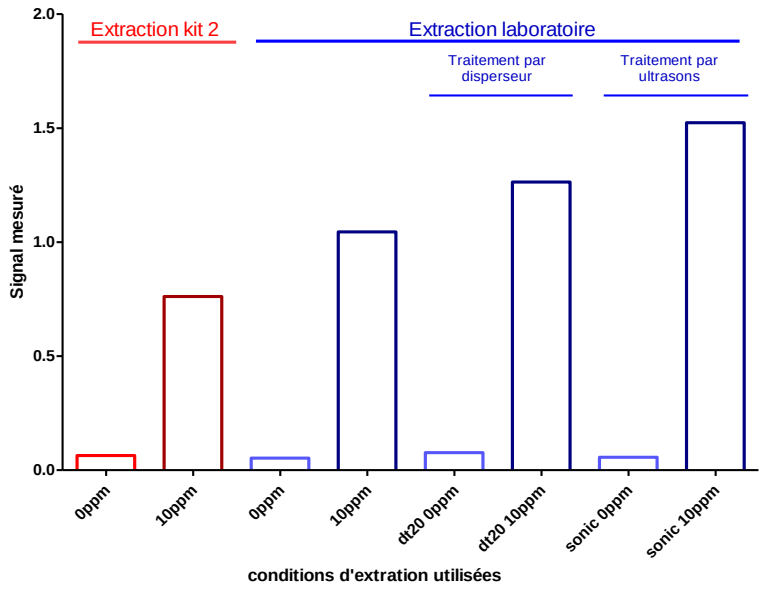

Figure 3 : Détection de l'arachide dans une matrice « gâteau » crue, placebo (0 ppm) ou contaminée (10 ppm) à l'aide d'un test ELISA de l'allergène Ara h 6 : influence d'un traitement physique lors de l'extraction protéique.

1.2 Influence des conditions d'extraction protéique sur la détection immunochimique de l'arachide dans une matrice de type « chocolat noir »

Le chocolat constitue une matrice alimentaire parmi les plus difficiles à analyser du fait notamment de fortes teneurs en composés lipidiques et polyphénoliques qui interagissent avec les protéines et diminuent leurs capacités d'extraction. Dans le cadre du programme européen iFAAM, nous avons étudié une matrice de type « chocolat noir » exempt de contamination ou contenant de l'arachide à hauteur de 3, 10 ou 100 ppm. Les différentes conditions d'extraction appliquées ont reposé sur l'addition de détergents non-ioniques ou d'urée mais également sur une délipidation préalable à l'aide de solvants. Une simple remise en suspension (en eau) a également été effectuée afin d'estimer l'accessibilité des protéines au sein de la matrice. La capacité d'extraction des protéines de l'arachide dans ce chocolat a été évaluée à l'aide du dosage développé au laboratoire (Figure 4).

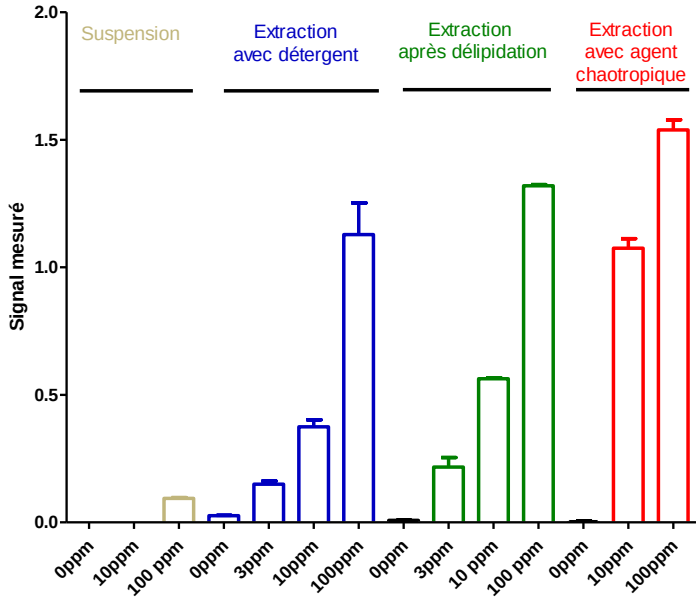

Figure 4 : Détection de l'arachide dans une matrice chocolat, placebo (0 ppm) ou contaminée (3 à 100 ppm) à l'aide d'un test ELISA de l'allergène Ara h 6 : influence des conditions d'extraction protéique sur la détection.

L'un des premiers points à souligner est l'absence de signal significatif pour les extraits issus de matrice non contaminée (absence de faux positif). Un autre aspect concerne également l'absence de signal

pour les échantillons de matrice remis en suspension dans de l'eau, à l'exception de la matrice contaminée par 100 ppm d'arachide. Ce résultat souligne l'impact fort de la matrice chocolat sur l'accessibilité des protéines (effet de masquage des protéines). Il démontre la nécessité de procéder à une étape d'extraction en dépit de la bonne solubilité de la protéine Ara h 6 ciblée. Les signaux mesurés dépendent alors des conditions de traitement de l'échantillon. L'extraction à l'aide d'un tampon contenant un détergent permet de détecter l'allergène Ara h 6 dans une matrice contaminée par 3 ppm d'arachide. Une délipidation préalable à l'extraction permet d'augmenter la détection de l'allergène Ara h 6. Enfin, L'extraction à l'aide du milieu additionné d'agent chaotropique génère les plus forts signaux spécifiques pour les matrices contaminées par 10 et 100 ppm d'arachide (extraction sur la matrice 3 ppm non effectuée dans ces conditions).

Une étude de la réactivité IgE des allergènes de l'arachide inclus dans cette matrice chocolat a été menée dans le cadre du programme européen iFAAM à l'aide de sérums de patients allergiques. Les résultats corroborent les dosages de l'allergène Ara h 6 et démontrent :

- Le masquage complet des allergènes de l'arachide dans une matrice contaminée simplement remise en suspension dans de l'eau.
- Une accessibilité des allergènes de l'arachide dans les échantillons issus d'extractions.

2. Immunodétection des allergènes du lait dans des matrices alimentaires

2.1 Détection des allergènes du lait de vache

L'utilisation du lait de vache ou de certains de ses composants est considérable dans la nutrition humaine. Cet aliment est ainsi un allergène majeur particulièrement durant les premières années de vie et engendre une allergie chez 1.8 à 3% des nourrissons (Host et al., 2002 ; Rona et al., 2007 ; Liu et al., 2010). Si l'allergie au lait de vache a tendance à se résoudre durant les trois premières années de la vie, des études récentes montrent que cette pathologie présente une persistance de plus en plus fréquente (Cantani et al., 2004 ; Saarinen et al., 2005 ; Skripak et al., 2007 ; Santos et al., 2010).

Les allergènes du lait sont retrouvés dans les deux groupes protéiques les plus abondants, distinguables par leurs caractéristiques physico-chimiques : une première fraction protéique majoritaire (80% des protéines) qui, dans certaines conditions (pH, sels, traitements protéasiques), tend à précipiter, correspond à la caséine entière. Ce constituant est un complexe micellaire de quatre protéines différentes, les caséines αs1, β, αs2 et κ, dans des proportions respectives de 37, 37, 13 et 13 %. Ces quatre protéines présentent peu d'homologies de séquence entre elles. Seule une structure dite site majeur de phosphorylation, correspondant à une succession d'acides glutamiques et de sérines phosphorylées, est retrouvée dans les caséines αs1, αs2 et β. Chacune des quatre caséines est constituée d'une chaine polypeptidique possédant peu de structures secondaires (hélice α et feuillet β). Une deuxième fraction plus soluble dite lactosérum représente 20% des protéines du lait. Cette dernière est essentiellement composé de protéines globulaires, la β-lactoglobuline et l'α-lactalbumine (respectivement 50% et 20% des protéines du lactosérum). Elles sont synthétisées dans la glande mammaire alors que d'autres protéines mineures comme le sérum albumine bovine, la lactoferrine ou les immunoglobulines proviennent du sang.

Si les protéines du lactosérum s'avèrent généralement plus résistantes aux dégradations protéolytiques que les caséines, elles montrent une grande sensibilité aux traitements thermiques. Les processus technologiques, essentiellement d'ordre thermique, chimique ou enzymatique, subis par l'aliment peuvent alors engendrer des changements structuraux importants des protéines du lait (dénaturation, glycation, agrégation, dégradation,…). La prise en compte de ces procédés est déterminante pour les choix de la méthode immunoenzymatique de détection de protéines du lait masqués dans l'alimentation et de la technique d'extraction associée. Là encore, de nombreuses méthodes ELISA commerciales de détection sont disponibles. Les performances de certaines d'entre elles ont été comparées (Diaz-Amigo

et al., 2010 ; Stumr et al., 2010 ; Downs et al., 2010). L'influence de processus thermiques sur la détection des protéines du lait est particulièrement prononcée dans le cas des tests ELISA impliquant des anticorps dirigés contre la β-lactoglobuline.

La présence d'allergènes du lait masqués dans l'alimentation a été évaluée dans le cadre du programme MANOE à l'aide d'un test ELISA commercial détectant les caséines. L'étude a porté sur quatre matrices différentes : Fond de sauce, boulette de viande, biscuit infantile et céréales infantiles. Chaque matrice a été évaluée avant et après un traitement thermique à l'exception du fond de sauce. Chacune des préparations est exempte de contamination ou contient de la poudre de lait à hauteur de 10 ppm.

Les premières extractions ont été effectuées selon les conditions définies par le kit commercial. Une seconde série d'extraction a été menée avec un tampon basique additionné de détergent et d'un agent chélatant. Le dosage des caséines a été réalisé dans les différents extraits à l'aide du test ELISA commercial selon les indications fournies. Aucun signal significatif n'a été observé dans les différents extraits issus de matrices non contaminées (Tableau 3). A l'inverse, la détection est significative dans les différents extraits issus de matrices contaminées. Outre les différences de dosage entre les conditions d'extraction, une variabilité importante des mesures est obtenue en fonction du produit alimentaire considéré. Pour les différentes matrices crues, les valeurs varient ainsi de 2.5 ppm à 25 ppm. Une surestimation de la quantité incorporée dans les céréales infantiles est observée avant cuisson. L'utilisation d'urée dans le milieu d'extraction engendre le même phénomène de surestimation, et ce, quelle que soit la matrice étudiée. Un tel phénomène souligne la problématique de la quantification et de la calibration des tests ELISA. En effet, Il apparait difficile d'avoir un standard de référence, applicable à l'ensemble des méthodologies utilisées et des matrices étudiées.

Tableau 3 : Dosage de lait dans quatre matrices alimentaires contaminées par 10 ppm de poudre de lait. (<LD : signal inférieur à la limite de détection). Les valeurs sont exprimées en ppm.

Matrice alimentaire		EXTRACTION	
		Kit commercial	Laboratoire
Fond de sauce			
	Cru	2.5	4.7
Boulette de viande			
	Cru	3,9	4.6
	Cuit	7.3	$>L_D$
Biscuit infantile			
	Cru	7.7	12
	Cuit	$>L_D$	6
Céréales infantiles			
	Cru	25	37
	Cuit	6.5	12

2.2 Méthodes immunochimiques détectant les laits de chèvre et de brebis sans interaction avec le lait de vache.

L'existence d'allergie aux laits de chèvre et de brebis chez des patients tolérant le lait de vache a accru la complexité de la gestion du risque allergique lié à la présence de laits dans les aliments. En effet, il s'agit dans ce cas précis, de « distinguer le lait du lait », et plus exactement de détecter des traces de laits de chèvre et de brebis dans des aliments pouvant contenir des produits laitiers de vache. Cette difficulté est soulignée par des compositions protéiques proches entre les laits de différents ruminants.

Les allergènes les plus abondants du lait de vache sont retrouvés dans les laits de chèvre et de brebis avec des proportions relativement similaires. De plus, ces différentes protéines laitières sont fortement conservées au sein des ruminants avec des homologies de séquences supérieures à 80%. De ce fait, la mise au point de méthodes évaluant le risque de contaminations croisées entre laits de vache, de chèvre et de brebis dans l'alimentation représente un défi. Si là encore, des méthodologies de biologie moléculaire et de biochimie sont proposées, les techniques immunochimiques restent les plus adaptées pour détecter des traces de protéines des lait de chèvre et de brebis sans nécessiter un matériel lourd et un fort savoir-faire.

Pour répondre à cette demande, le laboratoire a développé un test ELISA à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de la caséine β caprine sans aucune interaction avec son équivalent bovin. Le test présente une limite de détection de 3 ng de protéines de lait de chèvre/ml (correspondant approximativement à une dilution au 10-7 de lait de chèvre) et une absence de réactivité croisée avec le lait de vache (Figure 5). Les différents produits laitiers de chèvre analysés (lait UHT, yaourt, fromage) sont fortement reconnus (Ld ≤ 10 ng de protéines/ml), et ce, en dépit de procédés variés de fabrication (thermique, coagulation, fermentation, affinage) pouvant conduire notamment à une protéolyse des caséines. De fortes réactivités croisées entre yaourts de chèvre et de brebis sont également observées. Au contraire, les produits laitiers de vache n'engendrent pas de signaux significatifs confirmant l'absence de réactivité croisée entre caséines de vache et de chèvre pour le test ELISA développé.

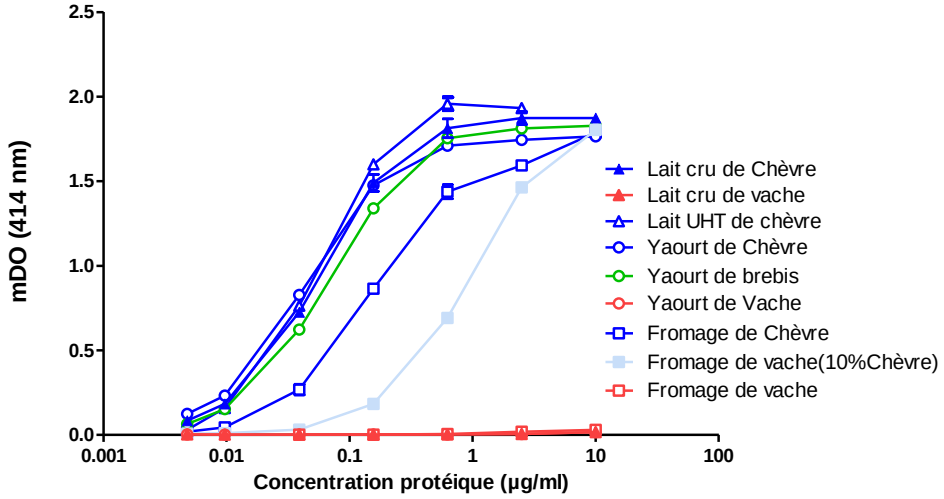

Figure 5 : Détection par le dosage ELISA de la caséine β caprine dans des produits laitiers de chèvre, de brebis et de vache.

Des laits de vache, crus et UHT, ont été également contaminés volontairement par de faibles quantités de laits de chèvre équivalents (cru et UHT). L'analyse immunochimique de tous les laits de vache contaminés a permis d'observer des signaux se distinguant significativement de ceux d'échantillons non contaminés (Figure 6). Il est ainsi capable de détecter une contamination du lait de vache par du lait de chèvre de l'ordre de la partie par million, soit 1 µL de lait de chèvre dilué dans 1 L de lait de vache.

Ces résultats démontrent la possibilité de caractériser de façon très sensible et spécifique la présence de caséines de chèvre ou de brebis dans une variété de produits laitiers de vache.

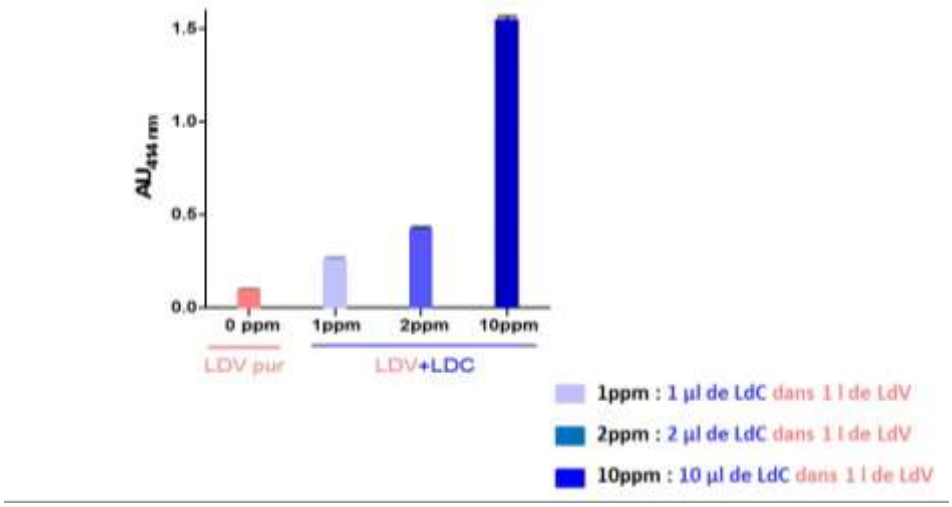

Figure 6 : Détection de la contamination du lait de vache par du lait de chèvre à l'aide du dosage ELISA de la caséine β caprine.

Conclusion

La détection de protéines d'arachide ou du lait masquées dans l'alimentation contribue à la gestion du risque allergique. L'hétérogénéité des processus industriels et des matrices alimentaires diversifie l'état et l'accessibilité de l'allergène. Les capacités de méthodes immunochimiques à détecter des allergènes masqués dépendent alors des caractéristiques physico-chimiques des cibles choisies mais aussi de la méthodologie d'extraction protéique associée au dosage. Pour chaque source allergénique, il apparaît difficile de valider un test ELISA et de définir la méthode d'extraction protéique optimale, applicable à tout type de matrice alimentaire. Dans le cadre des allergènes masqués du lait et de l'arachide, des améliorations dans les dosages existants peuvent être notamment apportées en modifiant les conditions d'extraction des protéines de la matrice. Ces modifications se déclinent notamment en trois points :

- Allongement des temps d'extraction.
- Addition d'agents pouvant, par exemple, rompre les interactions entre les protéines, les lipides et les polyphénols.
- Favorisation de la remise en suspension voire en solution à l'aide de traitements thermiques doux ou de méthodes physiques faisant appel à des disperseurs, des broyeurs (Ultraturrax) ou des appareils à ultrasons de laboratoire. De même, le traitement par micro-ondes de matrices contaminées pourrait être une méthode alternative d'extraction et améliorer le dosage d'allergènes masqués mais devrait prendre en compte les risques de dénaturation des protéines (Ochoa et al., 2015).

Par ailleurs, les travaux menés au laboratoire ont conduit au développement d'un dosage ELISA de l'arachide ciblant de nouvelles sondes protéiques. La détection s'avère, alors, moins influencée par la matrice alimentaire et ses traitements technologiques. De nouveaux outils immunologiques sont également proposés pouvant distinguer la présence, dans des aliments, de traces de lait de chèvre et de de brebis de celles de produits laitiers de vache. Ces dernières méthodes pourraient être une aide à la gestion du risque allergique des aliments dans le cas de l'allergie particulière aux laits de chèvre et de brebis chez des patients tolérant les produits laitiers de vache. Les outils développés, notamment mis en œuvre dans les programmes iFAAM et MANOE, font l'objet de démarches de valorisation.

L'homogénéisation des méthodologies de détection constitue un des enjeux du futur. La détection d'un allergène présent involontairement, pourrait être garantie par une extraction protéique dénaturante optimale indépendante de la matrice alimentaire et par l'application d'un test approprié à la détermination de l'allergène ainsi modifié. Une telle approche nécessite la définition et la mise au point de méthodes capables de détecter des protéines dénaturées. La généralisation de ces méthodes appliquées pour certaines protéines pourrait être généralisée (Négroni et al., 1998 ; Watanabe et al., 2005 ; Faeste et al., 2007). Enfin, la polyvalence des systèmes de détection est une voie émergente. Elle passe par la conception de systèmes permettant la détection simultanée de protéines issues de différentes sources allergéniques. Actuellement, de telles méthodes font autant appel à des technologies complexes de type « Bioplex® » qu'à des outils de terrain de type bandelette.

Références bibliographiques

Abbott M., Hayward S., Ross W., Godefroy S.B., Ulberth F., Van Hengel A.J., Roberts J., Akiyama H., Popping B., Yeung J.M., Wehling P., Taylor S.L., Poms R.E., Delahaut P., 2010. Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. J. AOAC Int. 93:442-450.

Bernard H., Ah-Leung S., Drumare M.F., Feraudet-Tarisse C., Verhasselt V., Wal J.M., Créminon C., Adel-Patient K., 2014. Peanut allergens are rapidly transferred in human breast milk and can prevent sensitization in mice. Allergy. 69(7):888-897.

Block D., Stephanie F., King E.M., Commins S.P., Chapman M.D., 2015. FAAAAI. Monitoring Major Peanut Allergen Levels in Foods and in Therapeutic Preparations Used for Oral Immunotherapy. JACI. Volume 135, Issue 2, Supplement, February 2015, Pages AB15.

Cantani A., Micera M., 2004. Natural history of cow's milk allergy. An eight-year follow-up study in 115 atopic children. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 8, 153-164.

Chassaigne H., Brohée M., Nørgaard J.V., Van Hengel A.J., 2007. Investigation on sequential extraction of peanut allergens for subsequent analysis by ELISA and 2D gel electrophoresis. Food Chem. 105, 1671-1681.

Diaz-Amigo C., 2010. Towards a Comprehensive Validation of ELISA Kits for Food Allergens. Case 2: Milk. Food Analytical Methods 3(4), 344-350.

Downs M.L., Taylor S.L., 2010. Effects of thermal processing on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of milk residues in a model food matrix. J Agric Food Chem. 58(18):10085-10091.

Faeste C.K., Løvberg K.E., Lindvik H., Egaas E., 2007. Extractability, stability, and allergenicity of egg white proteins in differently heat-processed foods. J AOAC Int. (2007); 90(2): 427-36.

Fu T.J., Maks N., 2013. Impact of thermal processing on ELISA detection of peanut allergens. J Agric Food Chem. 19 (61) 5649-58.

Host A., Halken S., Jacobsen H.P., Christensen A.E., et al., 2002. Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. Pediatr Allergy Immunol. 13 Suppl 15:23-8., 23-28.

Jayasena S., Smits M., Fiechter D., de Jong A., Nordlee J., Baumert J., Taylor S.L., Pieters R.H., Koppelman S.J., 2015. Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens. J Agric Food Chem. 63(6):1849-55.

Khuda S., Slate A., Pereira M., Al-Taher F., Jackson L., Diaz-Amigo C., Bigley E.C., Whitaker T., Williams K.M., 2012. Effect of processing on recovery and variability associated with immunochemical analytical methods for multiple allergens in a single matrix: sugar cookies. J Agric Food Chem. 60(17):4195-4203.

Khuda S., Slate A., Pereira M., Al-Taher F., Jackson L., Diaz-Amigo C., Bigley E.C., Whitaker T., Williams K.M., 2012. Effect of processing on recovery and variability associated with immunochemical analytical methods for multiple allergens in a single matrix: Dark chocolate. J Agric Food Chem. 60(17):4204-4211.

Lee P.W., Niemann L.M., Lambrecht D.M., Nordlee J.A., Taylor S.L., 2009. Detection of mustard, egg, milk, and gluten in salad dressing using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). J. Food Sci. 74:T46-T50.

Liu A.H., Jaramillo R., Sicherer S.H., Wood R.A., et al., 2010. National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. J Allergy Clin Immunol. 126, 798-806.

Matsuda R., Yoshioka Y., Akiyama H., Aburatani K., Watanabe Y., Matsumoto T., Morishita N., Sato H., Mishima T., Gamo R., Kihira Y., Maitani T., 2006. Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of egg, milk, wheat, buckwheat, and peanut in foods. J AOAC Int. 89(6):1600-1608.

Mondoulet L., Paty E., Drumare M.F., Ah-Leung S., Scheinmann P., Willemot R.M., Wal J.M., Bernard H., 2005. Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. J Agric Food Chem. 1;53(11):4547-53.

Negroni L., Bernard H., Clement G., Chatel J.M., Brune P., Frobert Y., Wal J.M., Grassi J., 1998. Two-site enzyme immunometric assays for determination of native and denatured beta-lactoglobulin. J Immunol Methods. 220(1-2):25-37.

Ochoa A.C., Chuck C., 2015. Alkaline peanut protein extraction assisted with microwaves (MAE). 2015 AIChE Annual Meeting. Paper 426208.

Poms R.E., Agazzi M.E., Bau A., Brohee M., Capelletti C., Nørgaard J.V., Anklam E., 2005. Inter-laboratory validation study of five commercial ELISA test kits for the determination of peanut proteins in biscuits and dark chocolate. Food Addit Contam. 22(2):104-12.

Poms R.E., Capelletti C., Anklam E., 2004. Effect of roasting history and buffer composition on peanut protein extraction efficiency. Mol Nutr Food Res. 48(6):459-64.

Pomés A., Butts C.L., Chapman M.D., 2006. Quantification of Ara h 1 in peanuts: why roasting makes a difference. Allergy. 36(6):824-30.

Rona R.J., Keil T., Summers C., Gislason D., et al., 2007. The prevalence of food allergy: a meta-analysis. J Allergy Clin Immunol. 120, 638-646.

Saarinen K.M., Pelkonen A.S., Makela M.J., Savilahti E., 2005. Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. J Allergy Clin Immunol. 116, 869-875.

Santos A., Dias A., Pinheiro J.A., 2010. Predictive factors for the persistence of cow's milk allergy. Pediatr Allergy Immunol. 21, 1127-1134.

Schmitt D.A., Nesbit J.B., Hurlburt B.K., Cheng H., Maleki S.J., 2010. Processing can alter the properties of peanut extract preparations. J Agric Food Chem. 27;58(2):1138-43.

Schubert-Ullrich P., Rudolf J., Ansari P., Galler B., Führer M., Molinelli A., Baumgartner S., 2009. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. Anal Bioanal Chem. 395(1):69-81.

Shefcheck K.J., Callahan J.H., Musser S.M., 2006. Confirmation of peanut protein using peptide markers in dark chocolate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). J Agric Food Chem. 54(21):7953-9.

Skripak J.M., Matsui E.C., Mudd K., Wood R.A., 2007. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. J Allergy Clin Immunol. 120, 1172-1177.

Stumr F., Gabrovská D., Rysová J., Hanák P., Plicka J., Tomková K., Dvorská P., Cuhra P., Kubík M., Barsová S., Karsulínová L., Bulawová H., Brychta J., Yman I.M., 2010. ELISA kit for casein determination: interlaboratory study. J AOAC Int. 93(2):676-82.

Taylor S.L., Nordlee J.A., Niemann L.M., Lambrecht D.M., 2009. Allergen immunoassays - considerations for use of naturally incurred standards. Anal. Bioanal. Chem. 395:83-92.

Watanabe Y., Aburatani K., Mizumura T., Sakai M., Muraoka S., Mamegosi S., Honjoh T., 2005. Novel ELISA for the detection of raw and processed egg using extraction buffer containing a surfactant and a reducing agent. J Immunol Methods. 300(1-2):115-23.

Westphal C.D., Pereira M.R., Raybourne R.B., Williams K.M., 2004. Evaluation of extraction buffers using the current approach of detecting multiple allergenic and nonallergenic proteins in food. J AOAC Int. 87(6):1458-1465

Whitaker T.B., Williams K.M., Trucksess M.W., Slate A.B., 2005. Immunochemical analytical methods for the determination of peanut proteins in foods. J AOAC Int. 88(1):161-74.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL ou son DOI)