

Projet MANOE

Etude de la réactivité de patients allergiques à des faibles doses d'allergènes (blé, œuf, lait, arachide).

Détection et quantification des allergènes présents à faibles doses dans des matrices alimentaires complexes

► Vendredi 17 juin 2016

Olivier Tranquet

olivier.tranquet@nantes.inra.fr



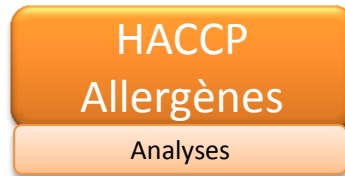
Réglementation sur l'étiquetage - Europe

Allergènes à Déclaration Obligatoire



2003/89/CE & 2007/68/CE

Puissance, Sévérité and Prévalence
Björkstén et al. 2008; van Bilsen et al. 2011

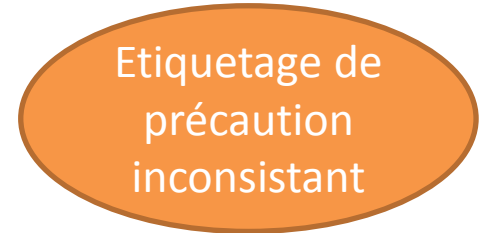


Risques de contaminations croisées

Pas de seuils Cliniques



Pas de seuils réglementaires



Difficile à appréhender pour les patients
Choix alimentaire restreint
Qualité de vie affectée

Comment prendre en charge une telle problématique au niveau d'une collectivité?

Opinion Allergologues : de nombreux patients ne réagissent pas à des « Traces » d'allergènes.

**On souhaite régler
100 % des cas**

Principe de
précaution

Régime strict
pour tous

**On ne souhaite pas
régler 100 % des cas**

Individus
« Hyper
réactifs »

Individus non
« Hyper
réactifs »

Projet MANOE



- Quels sont ces seuils dans une population pédiatrique française ?
- Comment les fabricants peuvent-ils les utiliser ?
- Les méthodes de dosages des allergènes permettent-elles de les garantir ?
- Comment les patients perçoivent-ils les seuils ?

Projet MANOE

Projet FUI
Financé par la région PdL
Coordonné par Biofortis



Volet Industriel

- Développer de nouveaux produits « garantis sans » ou à teneur maîtrisée en allergènes

Volet Analytique

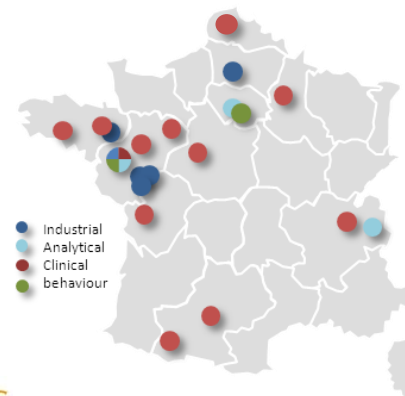
- Optimiser et développer de nouvelles méthodes de dosage des allergènes adaptées aux matrices des industriels

Volet clinique

- Etudier la tolérance de petites doses pour les enfants allergiques pour les 4 allergènes

Volet consommateur

- Compréhension des pratiques alimentaires de l'enfant allergique et de son entourage



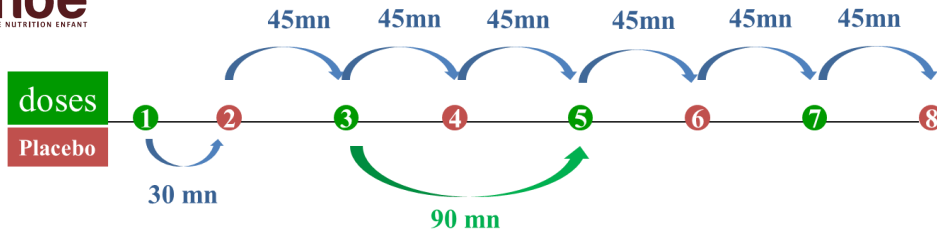
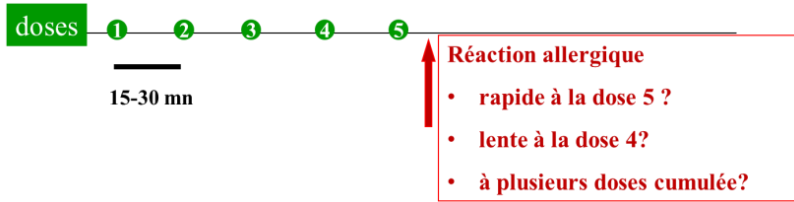
Lait - Œuf - Arachide - Blé



Volet Clinique

Test de Réintroduction Petites Doses (RPD)

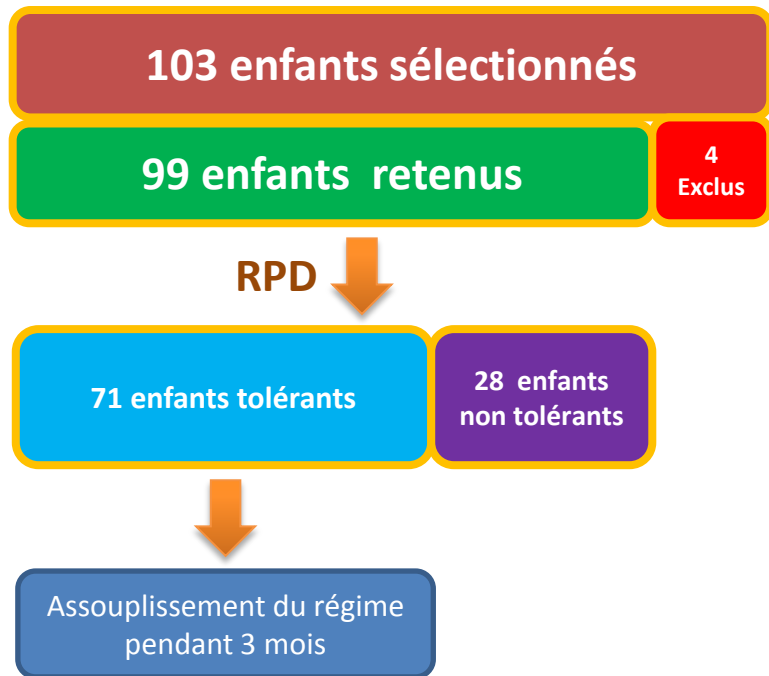
Pratique usuelle : Seuil réactogène



- Petites doses vs placebo (max qq dizaine de mg).
- En hôpital de jour
- Réaction non recherchée
- Si réaction, Individualisation de la dose



RPD Arachide



- Réaction tardive : 57 min
- Dose réactogène protégeant 95 % des enfants :
- ED₀₅ = 1,2 mg de protéines

une cacahuète de taille moyenne = 400 à 500 mg
soit 100 à 125 mg de protéines d'arachide

Conclusion RPD arachide

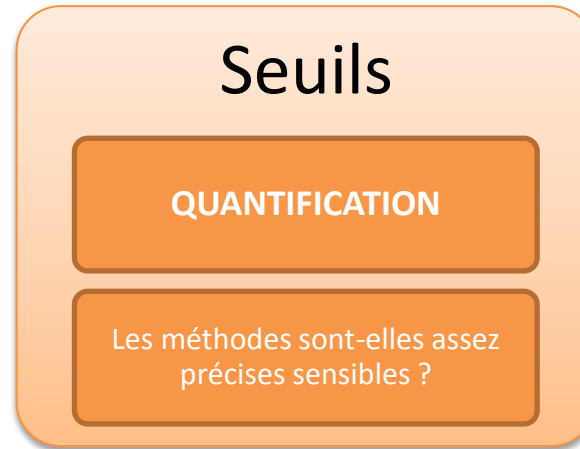
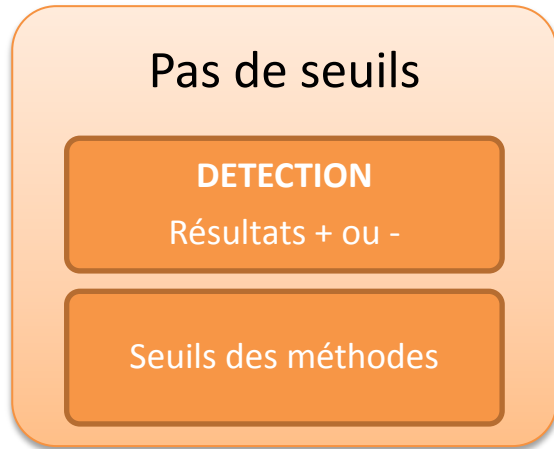
En cas de tolérance de la RPD, un régime assoupli a été proposé.

- Conseil suivi par 52 enfants / 69 (75,3%)
- Régime non assoupli pour 7 enfants (10,15 %)
- Régime « compromis » pour 10 enfants (14,5%)

Observations

- Après assouplissement du régime, 3 enfants (4,3%) ont présenté une réaction après consommation de traces
- Malgré le régime assoupli, de nombreux patients restent méfiants à l'égard de l'huile d'arachide (35 patients sur 69 soit 50,7%)

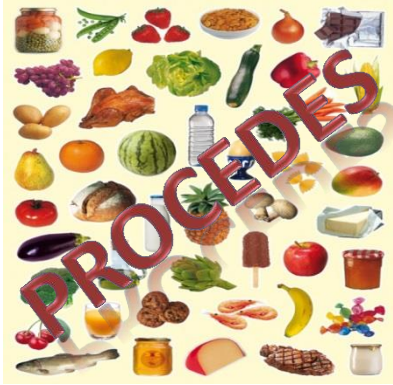
Les méthodes analytiques dans un contexte des seuils



Peut-on garantir un risque de contamination inférieure à un seuil ?

Peut-on quantifier de petites contaminations ?

Méthodes d'analyse



- Robuste
 - matrices alimentaires complexes
 - procédés de fabrication et traitements technologiques

- Sensible
 - une sensibilité entre 1 et 10 ppm est admise comme nécessaire.

1mg à 10 mg par kg

Ex de la détection du lait

Cookies contaminés à 500 ppm de lait



Baking time (min)	Neogen	r-Biopharm	Tepnel		Morinaga
	ppm milk	ppm β -LG	ppm casein	ppm β -LG	ppm soluble milk protein
0	221	22	423	8	218

← Kits
← Analytes

Carmen Diaz-Amigo, Food Anal. Methods (2010) 3:351–356

Impact fort de la cuisson sur la détection

Quel facteur de conversion utiliser pour rendre le résultat ?

Démarche MANOE

<p>4 Allergènes</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Arachide, blé, lait et œuf • 0, 10 et 1000 ppm
<p>7 Produits</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Vrais produits- recettes complexes • Contaminations homogènes • Cuisson
<p>Analyses</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Extraction • Détection • Quantification
<p>Amélioration</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Optimisation • Développement de méthodes • Transfert



Fond de sauce – Cyranie



Boulette de viande en sauce – Charal



Muffins nature /chocolat – Brioche Pasquier



Croissant – Brioche Pasquier

Biscuits infantiles – Picot (Lactalis)



Céréales infantiles – Picot (Lactalis)

Contaminations réalistes:

- en début de recette (avant cuisson)
- Sur des équipements industriels

Méthodes de dosages utilisables en routine

Homogénéité des contaminations avant cuisson

Production de plusieurs kilos - analyse sur 1 à 5 g
3 niveaux de contaminations (0, 10 et 1000 mg/kg)

7 produits
21 lots

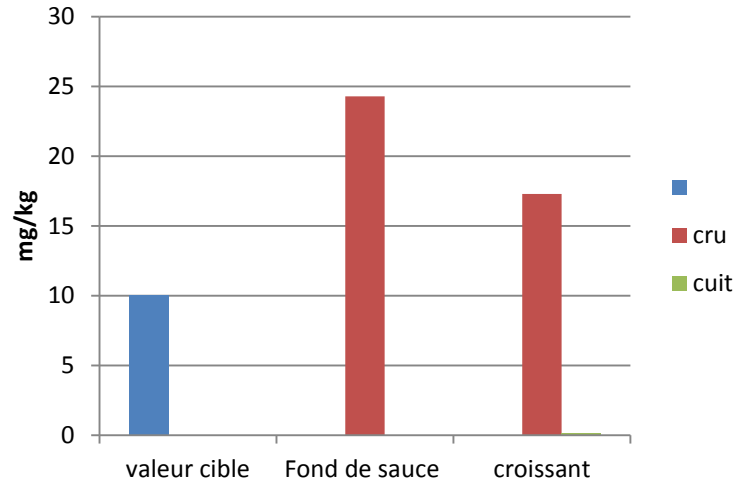
		Allergène			
Cyranie	Fond de sauce	Lait	Œuf	Blé	
Charal	Boulettes de viande + sauce	Lait		Blé	
Pasquier	Muffins nature	Lait			Arachide
	Muffins pépite	Lait			Arachide
	Croissants		Œuf		
Lactalis	Biscuits infantiles	Lait		Blé	
	Céréales infantiles	Lait			

Plus de 900 analyses

Les faibles niveaux ne sont
pas tous détectés

Exemple Détection et Quantification de l'œuf avant et après cuisson

Contamination volontaire à 10 mg/kg



1. Défaut de standardisation

Cru : Surestimation

2. Impact fort de la cuisson

Absence de détection à 10 mg/kg

	cru	cuit
Croissant	2400	3,65
1000 mg/kg		

Taux de recouvrement 0,1%

Bilan des méthodes du marché

- Contamination avec 10 ppm d'allergène avant et après cuisson

Allergène	produit	Détection		Quantification	
		Avant cuisson	Après cuisson	Avant cuisson	Après cuisson
Blé	Fond de sauce	✓		✓	
	Boulette de viande	✓	✓	✓	✓
	Biscuits	✓	✓	±	±
Arachide	Muffins nature	✓	✓	×	×
	Muffins pépite	✓	✓	×	×
Lait	Fond de sauce	✓		×	
	Boulette de viande	✓	✓	×	×
	Biscuits Infantiles	✓	×	✓	×
	Céréales Infantiles	✓	✓	×	✓
Œuf	Fond de sauce	✓		×	
	Croissant	✓	×	×	×

- Détection

- Avant cuisson OK
- Après cuisson
 - 1 cas limite pour le lait
 - Perte complète pour l'œuf

- Quantification

- Conforme dans 2/3 pour le blé
- Non conforme pour le lait, l'arachide et l'œuf
 - Défaut de standardisation
 - Défaut d'extraction
 - Dénaturation des cibles

Améliorations des méthodes Immuno (ELISA)

Exhaustivité de l'extraction
(durée – puissance)



Compatibilité des sondes

Allergène 10 mg/kg	produit	Détection		Quantification	
		Avant cuisson	Après cuisson	Avant cuisson	Après cuisson
Blé	Fond de sauce	✓		✓	
	Boulette de viande	✓	✓	✓	✓
	Biscuits	✓	✓	±	±
Arachide	Muffins nature	✓	✓	✓	±
	Muffins pépite	✓	✓	✓	±
Lait	Fond de sauce	✓		✓	
	Boulette de viande	✓	✓	*	✓
	Biscuits infantiles	✓	✓	✓	*
	Céréales infantiles	✓	✓	* (trop détecté)	✓
Œuf	Fond de sauce	✓		✓	
	Croissant	✓	✓	✓	✓

Conclusions

Volet Clinique :

- Le protocole de RPD est efficace
- A quoi et pourquoi les 3 enfants ont réagi après l'assouplissement de leur régime ?

Volet Analytique :

- Sous réserve d'adaptations, les méthodes sont efficaces pour la détection à 10 mg/kg.
- Les quantification n'est pas acquise d'emblée
Sauf pour le gluten (pour lequel il existe un seuil dans une autre réglementation)

Remarques

- La perte de détection ne signifie pas la perte d'allergénicité.
- Les méthodes ne remplacent pas un HACCP
Contaminations non homogènes

De la dose réactogène au seuil analytique

		Patient	→	Méthode
		(mg de protéines)	portion (g)	Seuil (ppm)
MANOE	Arachide ED05	1,2	50	24
		1,2	100	12
VITAL2 Taylor et al. 2014	Arachide ED01	0,2	50	4
		0,2	100	2
	Œuf ED01	0,03	50	0,6
		0,03	100	0,3
	Blé ED05	1	50	20
		1	100	10



**Merci de votre
attention**



INRA
SCIENCE & IMPACT



CARREFOURS
DE L'INNOVATION AGRONOMIQUE