

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

UMR CEA-INRA, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse,
Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire



- Etiquetage obligatoire des aliments contenant des ingrédients allergènes (gluten, crustacées, arachide, fruits à coque, moutarde, céleri, œuf, poisson, lait, lupin, soja, sésame, mollusques, sulfites).
- Quid de la présence **fortuite** de ces allergènes dans des matrices alimentaires complexes?
 - Par exemple : présence méconnue dans les ingrédients de l'aliment ou contamination d'une chaîne de fabrication au sein d'un atelier utilisant une source allergénique.

Détection d'allergènes masqués dans l'alimentation : la recherche du grain de sable

Par trois méthodologies :



- De biologie moléculaire

Méthodes « PCR » avec amplification d'un segment d'ADN cible et détection du segment amplifié.

- Biochimique

Analyses par spectrométrie de masse avec identification d'une protéine/de peptides marqueurs de la source allergénique.

- Immunochimique (principalement des tests ELISA)

Sensible, spécifique, simple à mettre en œuvre.

Nombreux kits ELISA commerciaux pour la détection d'allergènes masqués dans l'alimentation.

Détection immunochimiques d'allergènes masqués : rôle majeur du traitement de la matrice



- Mode d'extraction :
 - Le plus performant possible en termes de rendement protéique.
 - Polyvalent, adaptable aux différentes matrices alimentaires.
 - Compatible avec les conditions du test.

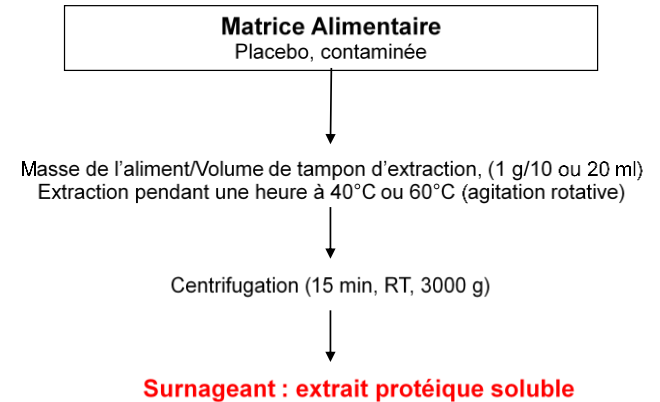


Détection immunochimiques d'allergènes masqués : cas de l'arachide.

- Source allergénique majeure, responsable de réactions allergiques fréquemment sévères.
- De nombreux allergènes aux caractéristiques physico-chimiques variées en termes de solubilité, de résistance aux traitements thermiques et aux dégradations protéasiques.
- Existence de nombreux kits commerciaux impliquant des anticorps ciblant des protéines différentes et proposant des conditions d'extraction variées :
 - Composition du tampon d'extraction
 - Température et temps de traitement de l'échantillon
 - ...

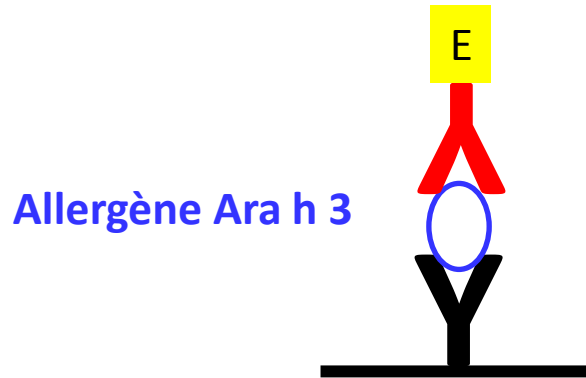
Détection d'arachide dans des matrices de type gâteau à l'aide de tests ELISA commerciaux : programme MANOE (Maitrise Allergènes NutritiOn Enfant)

- Matrices de type gâteau élaborées en l'absence ou en présence d'arachide volontairement introduite à de faibles quantités (10 ppm : 10 μg d'arachide par gramme de produit).
- Contamination effectuée au début de la fabrication.
- Prélèvement d'échantillons dans la chaîne de fabrication avant et après cuisson de la matrice alimentaire.
- Remise en suspension de l'échantillon et extraction des protéines solubles.



Détection d'arachide dans des matrices de type gâteau à l'aide de tests ELISA commerciaux : programme MANOE (Maitrise Allergènes NutritiOn Enfant)

- Détection et dosage à l'aide de deux tests ELISA ciblant préférentiellement l'allergène Ara h 3, protéine la plus abondante de l'arachide (Jayasena et al., 2015).



- Limite de quantification de 1 à 2.5 ppm
- Limite de détection de 0.1 à 1.5 ppm

Détection et dosage d'arachide dans des matrices de type gâteau à l'aide de deux tests ELISA commerciaux: programme MANOE.

DETECTION

- **Absence de signal significatif dans les différentes matrices non contaminées.**
- **Détection significative dans toutes les matrices contaminées (avec et sans pépites de chocolat, crues et cuites).**

DOSAGE

Matrice gâteau avec pépites de chocolat contaminée par 10 ppm d'arachide. Résultats exprimés en ppm.

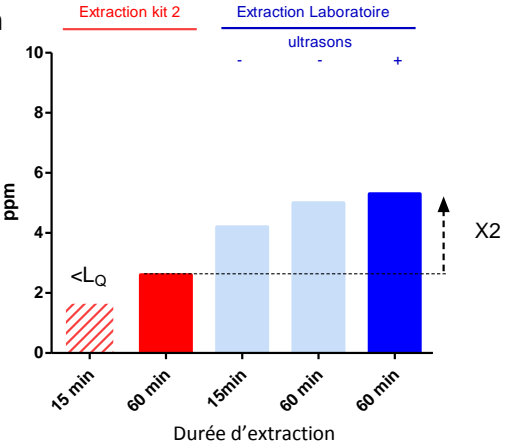
Test ELISA	Matrice crue		Matrice cuite	
	Extraction	Extraction	Extraction	Extraction
	<u>Commerciale 1</u>	<u>Commerciale 2</u>	<u>Commerciale 1</u>	<u>Commerciale 2</u>
Kit 1	2.2	2.1	1.1	<L _Q
Kit 2	3.9	2.6	<L _Q	<L _Q

- **Influence des conditions d'extraction sur le dosage de l'arachide.**
- **Impact important du traitement thermique sur le dosage de l'arachide.**

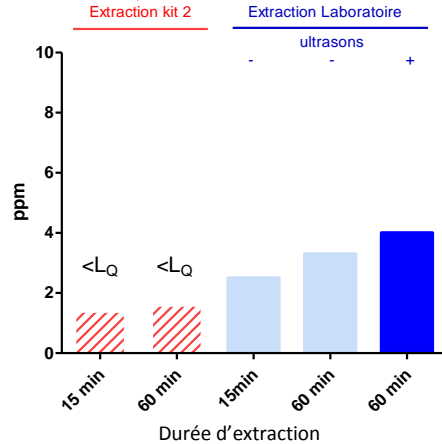
Dosage d'arachide dans une matrice de type gâteau avec pépites de chocolat : influence des conditions d'extraction protéique.

Test ELISA	Matrice crue	Matrice cuite
	Extraction	Extraction
	<u>Commerciale 2</u>	<u>Commerciale 2</u>
Kit 2	2.6	<L _Q

Avant cuisson



Après cuisson

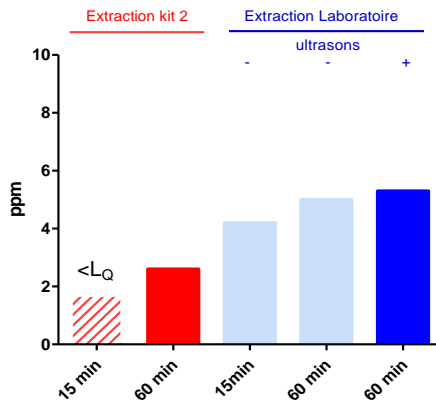


➤ La modification des conditions d'extraction améliore la détection et le dosage de l'arachide.

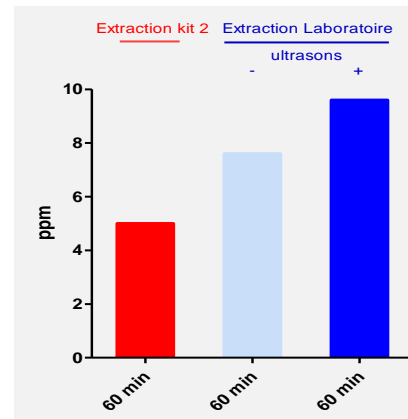
Dosage d'arachide dans une matrice gâteau avec pépites de chocolat : apport d'un test ELISA dosant l'allergène Ara h 6.

- Développement d'un test ELISA ciblant un allergène majeur de l'arachide Ara h 6 (Albumine 2S) présentant des caractéristiques physico-chimiques de solubilité et de résistance aux processus protéolytiques.

Dosage de
Ara h 3



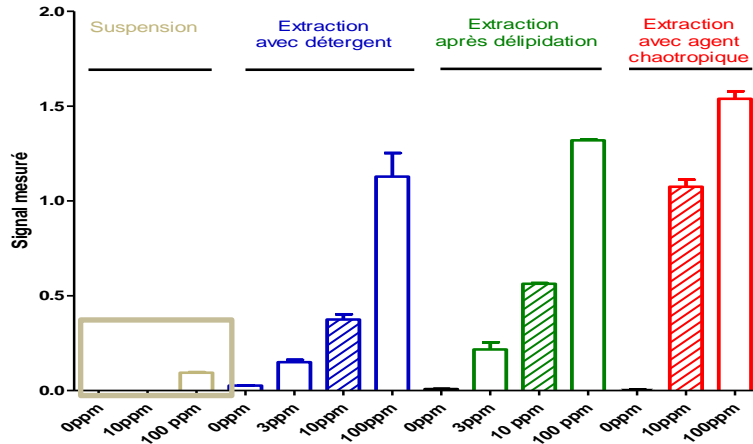
Dosage de
Ara h 6



- L'utilisation d'un test ELISA ciblant l'allergène Ara h 6 accroît le dosage de l'arachide dans les matrices de type gâteau.
- Taux de recouvrement (ratio entre la contamination mesurée par le test et celle réalisée lors de la fabrication) compris entre 50 et 95% dans les matrices de type gâteau avec et sans pépites de chocolat, crue et cuite.

Détection d'arachide masquée dans une matrice de type chocolat à l'aide du test ELISA de l'allergène Ara h 6: programme iFAAM.

- Le chocolat, une matrice alimentaire « difficile » en termes d'extraction des protéines.
- Etude d'une matrice chocolat contaminée par des protéines de l'arachide à hauteur de 3, 10 ou 100 ppm (programme européen « Integrated approaches to Food Allergen and Allergy Management »).



➤ Absence de signal dans du chocolat contaminé simplement remis en suspension (eau) : masquage de l'allergène
Nécessité d'une extraction protéique

- Détection significative dans toutes les matrices contaminées, quelles que soient les conditions d'extraction.
- Les signaux les plus forts sont observés après extraction en milieu chaotrope (taux de recouvrement de 50%).

➤ **Pertinence du dosage : mise en évidence d'une réactivité IgE liée à l'arachide dans la matrice chocolat contaminée chez des patients allergiques à l'arachide.**

Détection et dosage immunochimiques des allergènes de l'arachide

- **La détection d'allergènes masqués de l'arachide est possible avec des tests ELISA.**
- **Le dosage d'allergènes masqués dépend de la cible choisie, de la matrice alimentaire étudiée et des conditions d'extraction protéique.**

Détection et dosage immunochimiques des allergènes du lait

- Une problématique commune à celle des allergènes de l'arachide.
 - Multitude de tests ELISA commerciaux ciblant les différents groupes protéiques du lait (les caséines et les protéines du lactosérum).
 - Variabilité du potentiel des tests en fonction de la protéine ciblée, de la matrice alimentaire étudiée et des conditions d'extraction.
 - Exemple : une étude menée dans cadre du programme MANOE démontre la capacité d'un dosage des caséines à détecter la présence de 10 ppm de poudre de lait dans différentes matrices alimentaires. Une variabilité du dosage en fonction de la matrice étudiée et des conditions d'extraction.
- Une problématique particulière.
 - Détection spécifique des protéines de lait de chèvre et de brebis sans interaction avec les homologues bovins.

Détection de contaminations de laits de chèvre et de brebis

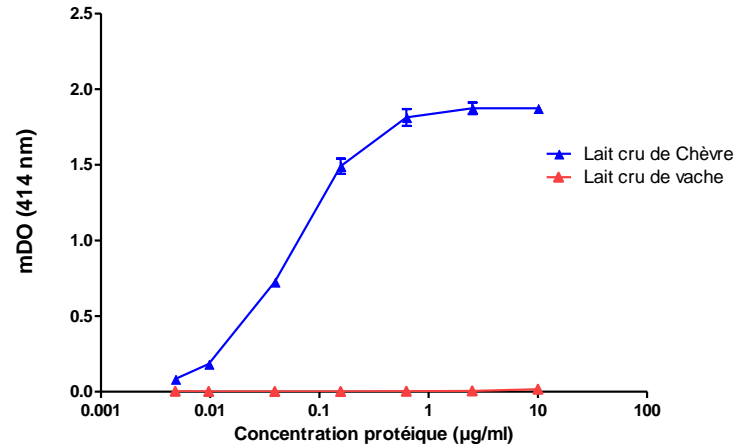
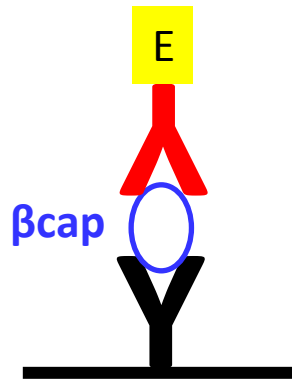
- Existence d'une allergie aux laits de chèvre et de brebis chez des patients tolérants les produits laitiers de vache.
- Réactions allergiques sévères après ingestion de produits alimentaires contaminés par des protéines de lait de chèvre et de brebis.
- Implication majeure des caséines caprines sans allergénicité croisée avec les protéines équivalentes bovines en dépit de fortes homologues de séquences (supérieures à 80%).

➤ « Distinguer le lait (de chèvre/de brebis) du lait (de vache) !? »



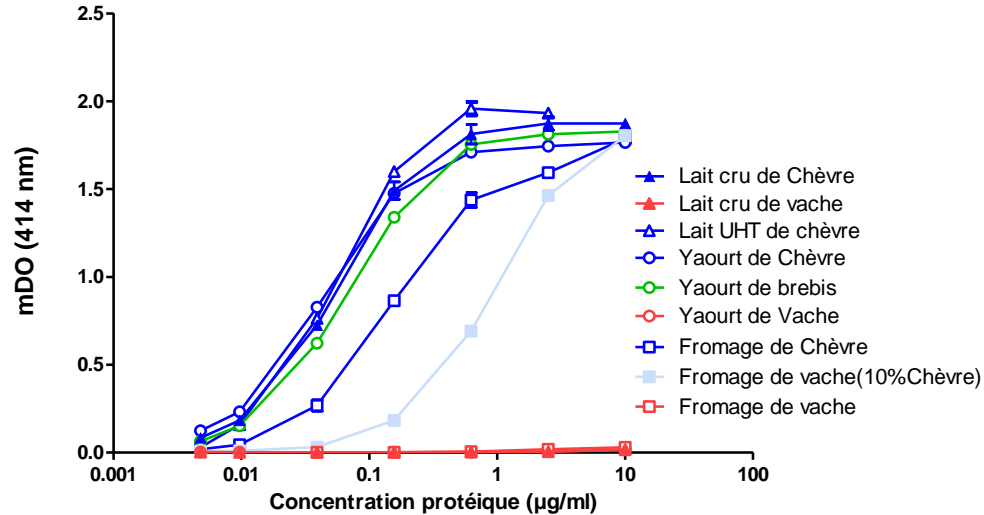
Développement d'un dosage ELISA de la caséine β caprine

- A partir d'anticorps monoclonaux spécifiques de la caséine β caprine produits au laboratoire LIAA



- Limite de détection : de 3 ng de protéines de lait de chèvre/ml (correspondant à une dilution au 10^{-7} de lait de chèvre).
- Absence de réactivité croisée avec le lait de vache.

Dosage de la caséine β caprine dans des produits laitiers de chèvre, de brebis et de vache

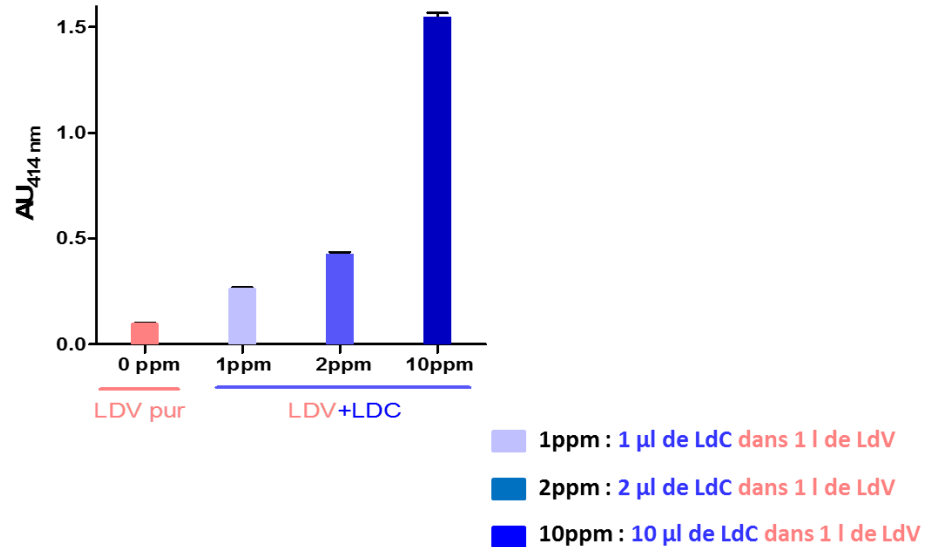


- **Détection possible dans différents produits laitiers de chèvre en dépit de procédés de fabrication (thermique, coagulation, fermentation, affinage) conduisant notamment à une protéolyse des caséines.**
- **Absence de réactivité croisée avec les produits laitiers de vache.**
- **Fortes réactivités croisées avec des produits laitiers de brebis.**

Traces de lait de chèvre dans du lait de vache : dosage de la caséine β caprine

- Contamination volontaire de laits de vache par des laits de chèvre (UHT et cru)

Détection de lait de chèvre (UHT) dans du lait de vache (UHT)



➤ Détection significative de « traces » de laits de chèvre dans des laits de vache (UHT et cru).

Détection et dosage immunochimique des allergènes

Une méthodologie :

- Fonctionnelle pour la détection d'allergènes masqués dans l'alimentation, en dépit de la variabilité des performances des tests.
- A optimiser pour augmenter la précision du dosage d'allergènes dans des matrices alimentaires.
 - Modification des conditions d'extraction.
 - Choix du test et de la protéine dosée.
- Evolutive pour enrichir le panel des sources allergéniques détectées.
 - Apport d'outils immunologiques ciblant de nouvelles sondes allergéniques.
- En devenir pour détecter simultanément la présence de différents allergènes.
 - Développement de méthodes de détection multiple d'allergènes masqués dans l'alimentation (systèmes de type « Multiplex » ou bandelette par exemple).