



Protéines : Impacts des Procédés
Immunogénicité / Allergénicité

Impact des procédés sur la détection des allergènes

Problématique des seuils

Projet MANOE



Olivier Tranquet

olivier.tranquet@nantes.inra.fr

29 novembre 2016



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

Protéines
ou
ADN

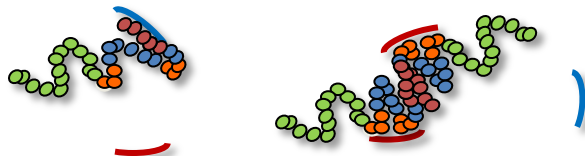
Procédés et test ELISA

Sans
dénaturation



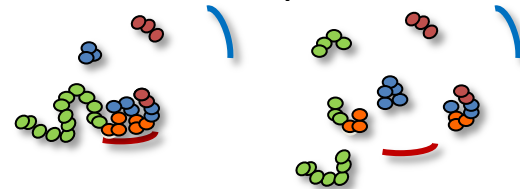
Chauffage

Déstructuration agrégation



Hydrolyse

limitée poussée



ELISA
sandwich

Ac 1
et
Ac 2

+

-

-

-

-

ELISA
compétitif

Ac 1

+

+

-

-

-

Ac 2

+

-

+

+

-



INRA
SCIENCE & IMPACT



Fonctionnalisation du gluten

Source bon marché de protéines végétales

Mais insolubilité et «goût marqué»

Hydrolyse

Enzymatique
ou chimique
(pH 1 ; 90°C)
(→deamidation)

Protéines de blé hydrolysés (“Isolats”)

Hydro-soluble
Propriétés émulsifiantes and texturantes
gain organoleptique

Nouveaux ingrédients depuis 1980-90 ...

FOOD: Meat, Pâté, cooked sausage, batters, coffee creamers, Dairy drinks, Ice cream mixes, ...

COSMETICS: Hair conditioner, Shampoo, soap, ...

Allergie aux protéines de blé hydrolysées/désamidées

- France

- First case reported in 2003 (Leduc et al. 2003)
Angioedema with generalized urticaria with acid-HWP but no reaction with native wheat proteins.
- fifteen cases study in 2012 (Denery et al. 2012)
Exercise Induced Anaphylaxis and urticaria
identification of neo-epitope induced by the acidic treatment.



Neo Allergène formé par
le process chimique :
désamidation

- Japan

- First cases reported in 2011 (Fukutomi et al 2011)
Sensitization by a soap containing acid-HWP (GluPearl19S)
- More than 2000 cases had been reported (*Nakamura et al. 2016*)
Exercise Induced Anaphylaxis which was preceded by contact urticaria for half of the patients



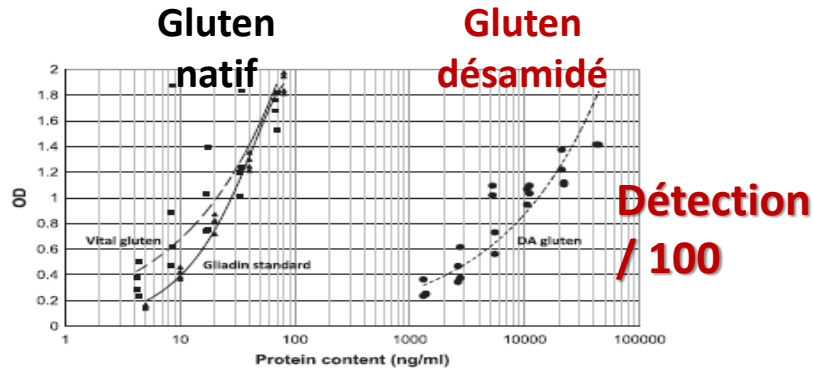
Détection des protéines de blé désamidées

Hydrolyse en conditions acides

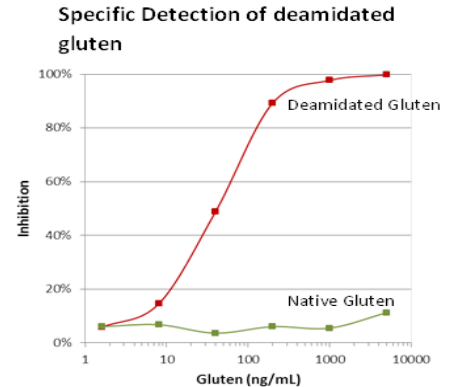
- Hydrolyse partielle (Protéines de blé hydrolysées)
- Desamidation : glutamine \rightarrow acide glutamique



recommandé par le Codex Alimentarius



nouvel Anticorps
INRA-DG1



P. Kanerva et al. / Journal of Cereal Science 53 (2011) 335e339

Ex de la détection du lait

Cookies contaminés à 500 ppm de lait



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

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 ?

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

HACCP
Allergènes
Analyses

Risques de
contaminations
croisées

Seuils Cliniques non validés



Pas de seuils réglementaires



Etiquetage de
précaution
inconsistant

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

Seuil de réactivité d'une population allergique

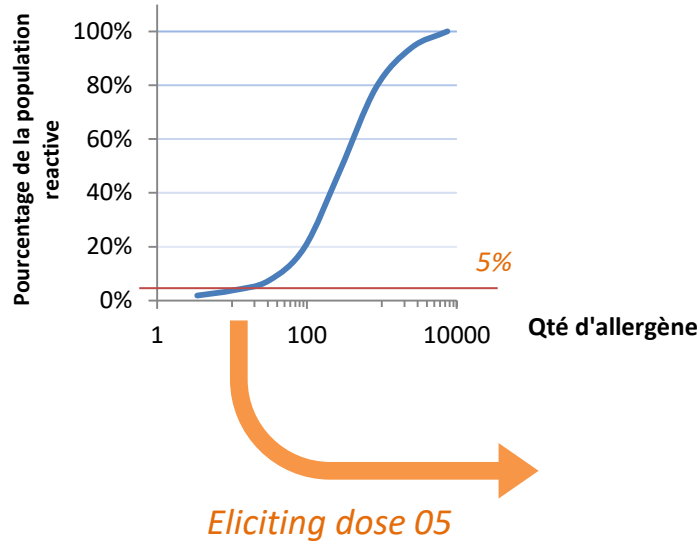


Table 1. Summary of VITAL Scientific Expert Panel Recommendations.

Allergen	mg Protein Level	Quantitative Risk	Quality of database
Peanut	0.2	ED01	Excellent
Milk	0.1	ED01	Excellent
Egg	0.03	ED01 and ED05 95% ICI*	Excellent
Hazelnut	0.1	ED01 and ED05 95% ICI	Good
Soy	1.0	ED05 95% ICI Note: this level may not completely protect certain individuals sensitive to soy milk.	Sufficient
Wheat	1.0	ED05 95% ICI Note: wheat-allergic consumers would be largely protected by foods containing <20 ppm gluten	Sufficient
Cashew	2.0 (provisional)	ED05 95% ICI	Marginally Sufficient
Mustard	0.05	ED05 95% ICI	Sufficient
Lupin	4.0	ED05 95% ICI	Sufficient
Sesame	0.2	ED05 95% ICI	Marginally Sufficient
Shrimp	10	ED05 95% ICI	Marginally Sufficient
Celery	n/a		Insufficient
Fish	n/a		Insufficient
Other tree nuts (walnut, pecan, almond, pistachio, brazil nut, macadamia nut, pine nut)			Insufficient

* Lower Confidence Interval

Réactivité aux petites quantités d'allergènes

« De nombreux patients ne réagissent pas à petites qtés d'allergènes. »

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

**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

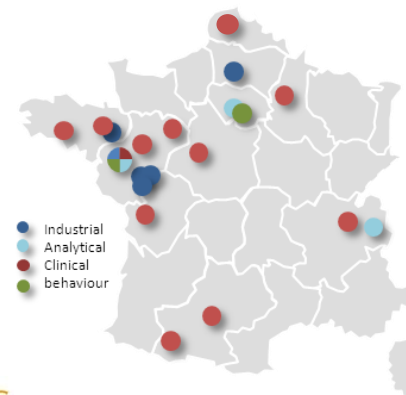
- Optimiser et développer de nouvelles méthodes de dosage des allergènes adaptées aux matrices des industriels

Volet clinique

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

Volet consommateur

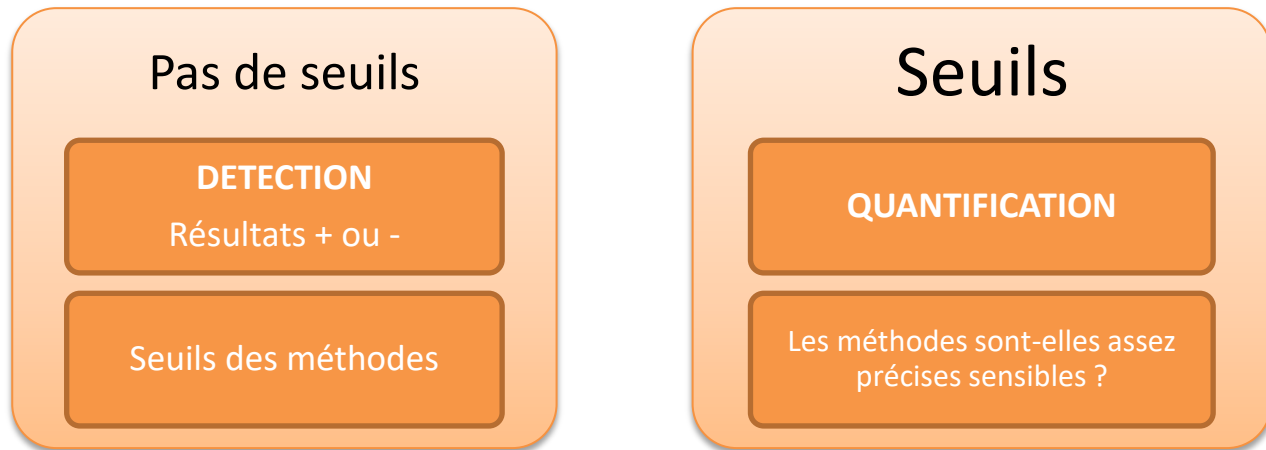
- Compréhension des pratiques alimentaires de l'enfant allergique et de son entourage



Lait - Œuf - Arachide - Blé



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 ?

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 – Brische Pasquier
- Biscuits infantiles – Picot (Lactalis)
- Céréales infantiles – Picot (Lactalis)



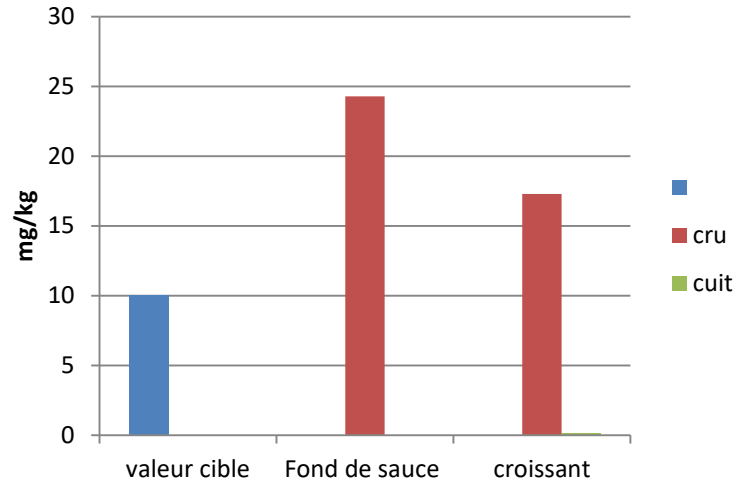
Contaminations réalistes:

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

Méthodes de dosages utilisables en routine

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 1000 mg/kg	2400	3,65

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

Procédés ont un impact favorable ou défavorables à l'allergénicité

- Création de neo allergènes
- Destruction des allergènes

Méthodes Allergène:

- 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



**Merci de votre
attention**

