

ALLERRISK - Résultats

Développement d'une stratégie intégrée pour le contrôle des allergènes dans l'alimentation belge et l'industrie de la restauration collective

DUREE DU PROJET
15/12/2006 – 31/01/2011

BUDGET
799.231 €

MOTS CLES

Allergie alimentaire, allergénicité, ELISA, PCR, spectrométrie de masse, BAT

CONTEXTE

Les allergies alimentaires représentent un problème de santé important et la prévalence des réactions allergiques indique une tendance à l'augmentation au cours des dernières années. Actuellement, le seul remède à l'allergie alimentaire est de s'abstenir de consommer des aliments contenant des allergènes. Le dépistage d'allergènes possibles dans des produits alimentaires est un élément essentiel pour une politique préventive solide au niveau des autorités publiques et de l'industrie alimentaire. L'industrie alimentaire est actuellement confrontée à un problème relatif à la validation de ses processus de fabrication afin de garantir l'absence de contamination croisée dans les lignes de production et aussi à un contrôle fiable de qualité des intrants. En raison de caractéristiques spécifiques et de la grande variabilité dans les allergènes, le développement de méthodes fonctionnelles pour détecter les allergènes les plus importants permettra aux autorités publiques la mise en œuvre d'une nouvelle politique de prévention afin d'améliorer la sécurité sanitaire des aliments.

OBJECTIFS

L'objectif principal de ce projet est d'évaluer différentes méthodes de détection des allergènes présents dans la nourriture et de développer de nouveaux tests améliorés.

Dans cette étude, les résultats de l'évaluation des techniques de détection analytiques sont associés à l'impact pour le patient allergique. Il était donc important que les analytes biologiques utilisés pour ce faire soient également pertinents sur le plan clinique, c.-à-d. qu'ils contiennent les allergènes en question dans leur conformérie allergique active. La comparaison de divers protocoles d'extraction protéique a mis en évidence l'importance de l'utilisation d'inhibiteurs de la protéase durant la procédure, afin de préserver la conformérie native des protéines.

La sensibilité des tests ELISA commerciaux évalués a semblé être meilleure que ne l'indiquaient les kits. Les kits de détection des noisettes ont pu détecter dans les différentes matrices alimentaires jusqu'à 1 ppm de noisette dégraissée, ce qui correspond à quelque 2,6 ppm de noisettes. Avec les tests PCR temps réel commerciaux, un résultat positif a seulement été obtenu dans tous les réplicats testés à partir de 100 ppm de noisettes dégraissées. La sensibilité moindre de la détection PCR temps réel peut être imputée à la plus faible concentration en ADN que dans l'analyte cible, comparé avec la protéine visée par le test ELISA. Cela ne signifie donc pas que la détection PCR soit intrinsèquement une technique moins sensible. Le protocole d'extraction de l'ADN sélectionné a abouti à un ADN de bonne qualité sur les plans de sa pureté et de son intégrité. Toutefois, un degré de pureté élevé influence souvent de manière négative le rendement ADN. Il se peut que la sensibilité des tests PCR soit améliorée en utilisant un protocole dont le rendement est supérieur ou en optimisant davantage le protocole actuel. Cependant, les résultats obtenus confirment aussi qu'une sensibilité accrue est généralement associée à une spécificité réduite, comme le montrent les tests ELISA commerciaux pour la noisette et le soja.

Induire des réactions chimiques pour simuler la transformation des aliments a conduit à des modifications des protéines au niveau moléculaire. Le fait de provoquer la réaction de Maillard a engendré des groupes carbonyles liés aux protéines, une baisse des résidus de lysine libres et la formation d'importants agrégats. Consécutivement à l'oxydation amenée tant par l'hypochlorite que par les lipides, on a constaté une modification des acides aminés essentiels, une hausse des groupes carbonyles en liaison protéique et une agrégation des protéines. Une hydrolyse partielle des protéines avec la pepsine a provoqué une hydrolyse poussée des protéines de noisette, au contraire des protéines de soja qui ont semblé plus stables.



ALLERRISK - Resultaten

Développement d'une stratégie intégrée pour le contrôle des allergènes dans l'alimentation belge et l'industrie de la restauration collective

Ce point a été démontré par les hausses des groupes aminés libres et par la fraction azotée non protéique. Néanmoins, certaines protéines de noisette et de soja semblaient malgré tout stables vis-à-vis de ces modifications. Les peptides dérivés des protéines Cor a 9 de la noisette et Gly m 5 et Gly m 6 du soja semblaient être les plus stables comparés aux autres protéines allergènes. Ces peptides stables pourraient servir de cibles analytiques pour de nouveaux outils d'analyse puissants permettant de détecter des allergènes non étiquetés, surtout dans les aliments fortement transformés.

La détection des allergènes dans les échantillons alimentaires avec les deux tests – tant ELISA que PCR temps réel – a semblé dépendre des influences de la transformation des aliments et de la matrice alimentaire. Ce lien a également été établi par l'impact des modifications chimiques sur la détection des protéines de noisettes et de soja avec les kits ELISA commerciaux. De plus, la détection semblait dépendre fortement du test utilisé. Sur la base des résultats obtenus dans cette étude, il est impossible de se prononcer : quel analyte biologique, protéine ou ADN, est le plus robuste au niveau de la transformation des aliments (dans ce cas, la cuisson). Une comparaison semi-quantitative des deux plateformes de détection a établi que l'impact de la transformation était très variable entre les différents tests des deux techniques entre elles.

La détection et/ou la quantification précises des protéines (modifiées) de noisette ou de soja à l'aide des kits ELISA commerciaux a semblé poser problème. Il est possible que les anticorps utilisés pour développer ces kits soient stimulés face à des protéines non modifiées/natives et que leur réactivité vis-à-vis de ces protéines modifiées soit réduite en raison d'une modification des épitopes. C'est pourquoi de nouveaux tests ELISA ont été développés durant ce projet avec des anticorps ciblant de manière spécifique les protéines modifiées. Ces tests ELISA présentaient une grande spécificité envers les protéines modifiées et une spécificité moindre pour les protéines natives. De plus, il n'y avait pas de réactivité croisée avec d'autres noix ou fruits. La robustesse des tests ELISA développés a été évaluée à l'aide de petits biscuits préparés par les chercheurs, dopés à différents niveaux de concentration.

Le dopage des biscuits, donc après leur préparation – application souvent utilisée pour déterminer la robustesse des tests ELISA – a entraîné une récupération (recovery) élevée. Toutefois, si le dopage était effectué avant la préparation, le niveau de récupération était beaucoup plus faible, sans doute à cause d'une extractivité moindre des protéines compte tenu de la préparation.

Un test ELISA développé avec des anticorps ciblant les protéines de soja modifiées a été comparé à un test ELISA détectant l'inhibiteur Kunitz Trypsin, décrit comme un allergène stable du soja. Il s'avère que l'utilisation d'anticorps ciblant des protéines modifiées chimiquement – comme celles qui apparaissent durant une transformation alimentaire – est une manière efficace de détecter des allergènes dans les aliments transformés.

Afin de développer une méthode quantitative basée sur la spectrométrie de masse et permettant de détecter des allergènes dans les aliments, les chercheurs ont sélectionné des peptides cibles spécifiques des allergènes majeurs de la noisette et du soja. Pour la noisette, une méthode a été développée pour la quantification et la détection de Cor a 9. Cette protéine a été semi-quantifiée dans des biscuits achetés dans le commerce et d'autres préparés par les chercheurs. Il s'agit de la première méthode de spectrométrie de masse pour la détection et la semi-quantification de Cor a 9. Pour le soja, deux courbes d'étalonnage ont été esquissées avec des biscuits et de la pâte à biscuits dopés par des concentrations croissantes d'extraits protéiques de soja dont la concentration en glycinine était fixée. Pour les biscuits, une limite de détection de 50 ppm d'extrait protéique de soja a été fixée. Cette méthode a été appliquée avec succès pour la détection du soja dans les biscuits et dans une crème à dessert.

CONCLUSIONS

L'un des résultats majeurs de cette enquête est que les basophiles des patients qui présentent une allergie grave à la noisette peuvent être utilisés pour mettre en évidence des allergènes fonctionnels et actifs de noisette dans différentes matrices alimentaires. Bien que cette technique ne soit pas applicable comme analyse de routine, elle peut être très précieuse pour déterminer l'existence de traces pertinentes sur le plan clinique d'allergènes dans les aliments, ce qui est impossible avec les techniques classiques comme ELISA et PCR.

Pour le moment, les tests de routine disponibles actuellement ne peuvent être utilisés pour déterminer l'allergénicité résiduelle des aliments. Les tests de routine peuvent uniquement donner des informations sur la présence de l'ingrédient allergène ou des protéines allergènes spécifiques. Comme nous l'avons déjà souligné, l'allergénicité ne peut être déterminée qu'à l'aide de tests fonctionnels qui utilisent du sang frais des patients allergiques. Le BAT ne convient donc pas en tant que test de routine. Néanmoins, le BAT possède une sensibilité bien supérieure en comparaison avec les autres méthodes évaluées.



ALLERRISK - Resultaten

Développement d'une stratégie intégrée pour le contrôle des allergènes dans l'alimentation belge et l'industrie de la restauration collective

Cette étude montre clairement que les tests ELISA et PCR ont la même valeur pour la détection des allergènes dans les aliments, puisqu'ils donnent tous les deux uniquement des informations sur la présence de l'ingrédient allergène. Même si un test ELISA cible spécifiquement les protéines allergènes, cela reste une technique de détection pure, muette sur l'allergénicité des protéines correspondantes. L'évaluation des kits commerciaux de détection de la noisette et du soja a montré que la précision de la détection et/ou de la quantification est ébranlée par la transformation des aliments et la perturbation de la matrice alimentaire. Une analyse des risques axée sur l'influence de la transformation des aliments sur la détection des allergènes avec des tests de routine/commerciaux est compliquée par le fait que l'impact sur la détection dépend du test utilisé et que l'impact sur l'allergénicité varie d'un individu à l'autre. En ce qui concerne les études axées sur l'influence de la transformation des aliments, l'extractivité de l'analyte biologique de la matrice pose encore problème et ce pour les différentes plateformes de détection (ELISA, PCR, MS, BAT). Dans ce contexte, les méthodes basées sur MS sont prometteuses, car il est possible d'utiliser des méthodes d'extraction plus brutes – en effet, cette technique n'analyse pas les protéines intactes mais les peptides.

Cette recherche a établi qu'il est nécessaire de procéder à une évaluation plus poussée des tests analytiques de détection des allergènes, comme celle effectuée dans le cadre de la présente étude. Cette information doit permettre aux différents acteurs concernés d'arrêter un choix réfléchi quant au test le plus approprié pour l'application souhaitée.

CONTACT INFORMATIE

Coordinateurs

Marc De Loose & Els Daeseleire

Instituut voor Landbouw- en
Visserijonderzoek
(ILVO)
Technology and Food Unit (T&V)
Brusselsesteenweg 370, 9090 Melle
Tel: +32 (0)9 272 28 42 (Marc De Loose)
Tel: +32 (0)9 272 30 32 (Els Daeseleire)
Tel: +32 (0)9 272 30 11 (Wim Reybroeck)
Fax: +32 (0)9 272 30 01
marc.deloose@ilvo.vlaanderen.be
els.daeseleire@ilvo.vlaanderen.be
wim.reybroeck@ilvo.vlaanderen.be
<http://www.ilvo.vlaanderen.be/TenV/>

Partenaires

Bruno De Meulenaer

Universiteit Gent (UGent)
Research Group Food Chemistry
and Human Nutrition
Coupure Links 653, B-9000 Gent
Tel: +32 (0)9 264 61 66
Fax: +32 (0)9 264 62 15
bruno.demeulenaer@ugent.be
<http://www.foodscience.ugent.be/>

Bart Devreese

Universiteit Gent (UGent)
Laboratory for Protein Biochemistry
and Protein Engineering
K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent
Tel: +32 (0)9 264 52 73
Fax: +32 (0)9 264 53 38
bart.devreese@ugent.be
<http://www.eiwitbiochemie.ugent.be/>

Edwin De Pauw &

Guy Maghuin-Rogister

Université de Liège (ULg)
Centre for Analysis of Residues in Traces
Institut de Chimie, Bat. B6c, B-4000 Liège
Tel: +32 (0)4 366 34 14 (Edwin De Pauw)
Tel: +32 (0)4 366 40 40 (Guy Maghuin-
Rogister)
Fax: +32 (0)4 366 34 13 (Edwin De Pauw)
Fax: +32 (0)4 366 40 44 (Guy Maghuin-
Rogister)
e.depauw@ulg.ac.be;
g.maghuin@ulg.ac.be
<http://www.mslab.ulg.ac.be/cart/>

Wim Stevens & Didier Ebo

Universiteit Antwerpen
Department for Immunology, Allergology
and Rheumatology
Campus Drie Eiken
Universiteitsplein 1, B-2610 Antwerpen
Tel: +32 (0)3 820 25 94 (Wim Stevens)
Tel: +32 (0)3 820 25 95 (Didier Ebo)
Fax: +32 (0)3 820 26 55
wim.stevens@ua.ac.be
didier.ebo@ua.ac.be
<http://www.ua.ac.be>

