

Article original

Immunoanalyse et sécurité des produits d'origine animale

Immunoanalysis and security of products of animal origin

Gilbert Mouthon*

École Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94700 Maisons-Alfort, France

Résumé – L'immuno-analyse prend une place de plus en plus importante dans la détermination des produits toxiques pouvant être présents dans les aliments. Ces méthodes ne sont pas toutes validées mais sont toujours une aide, au moins pour un tri préalable des échantillons suspects, avec une économie substantielle par rapport aux techniques conventionnelles utilisées en toxicologie. Dans le contrôle des épreuves sportives, si pratiquement toutes les analyses se font par spectrométrie de masse, il apparaît d'autres méthodes basées sur l'interaction sur le métabolisme cellulaire des agents dopants.

Mots clés : Toxicologie alimentaire, sécurité alimentaire, immunoanalyse

Abstract – Immunoanalysis is playing a more and more important role as a method to determine whether or not toxic substances are present in foodstuffs. This method has not been fully verified but at the least, as a preliminary method to test suspect samples, it offers a substantial saving when compared with the other standard techniques used in toxicology. In drug testing for sporting events, although almost all analysis is done by mass spectrometer, it appears that other methods are based on the interaction with the cell metabolism of doping agents.

Key words: Food toxicology, food safety, immunoanalysis

Reçu le 15 février 2009, accepté après modifications le 30 avril 2009

Publication en ligne le 10 juin 2009

1 Introduction

L'immuno-analyse prend une place de plus en plus importante dans la détermination des produits toxiques pouvant être présents dans les aliments.

Ces méthodes ne sont pas toutes validées mais sont toujours une aide au moins pour un tri préalable des échantillons suspects, avec une économie substantielle par rapport aux techniques conventionnelles utilisées en toxicologie.

Dans le contrôle des épreuves sportives, si pratiquement toutes les analyses se font par spectrométrie de masse, il apparaît d'autres méthodes basées sur l'interaction sur le métabolisme cellulaire des agents dopants.

plément très utile aux méthodes de référence et disposent de systèmes de validation officielle permettant de démontrer leur équivalence. Elles peuvent se conjuguer à d'autres techniques de microbiologie classique ou aux méthodes moléculaires, et leur évolution est parallèle à celle des autres méthodes habituelles.

Néanmoins, même validées, ces méthodes doivent être choisies en fonction des besoins en termes d'applications, de moyens et surtout de gain par rapport aux précédentes.

Leur mise en œuvre progressivement se simplifie et se fait plus rapide, mais la fiabilité des résultats doit être vérifiée régulièrement par leur évaluation dans les conditions du laboratoire.

2 Détection des bactéries pathogènes et des toxines bactériennes dans les aliments

Dans la recherche des bactéries pathogènes et des toxines bactériennes, les méthodes immunochimiques sont un com-

3 Détection des mycotoxines dans les aliments

Les immunométhodes ont un développement permanent qui contribue à l'amélioration des méthodes d'analyses des mycotoxines, et ce depuis les années 1980.

* Correspondance : Gilbert Mouthon, gmouthon@vet-alfort.fr

Tableau I. Quelques exemples de déterminations.

	salmonella	listeria	E. coli O157	campylobacter	vérotoxines	SE	bacillus ceruleus
Elisa microplaques Dipsticks	X	X	X	X	X	X	X
IMC bandelettes	X	X	X		X		
ELFA automate VIDAS barrettes + cône	X	X	X	X		X	
Immunocapture billes magnétiques			X				
RPLA billes de latex						X	
Immunoaffinité colonnes	X	X	X	X	X	X	
Electrochimio-luminescence							
Billes magnétiques	X	X	X			X	

RPLA : reverse phase latex agglutination

SE : entérotoxines de staphylocoque

ELFA : enzyme-linked fluorescent assay

IMC : tests Immunochromatographiques

Tableau II. Quelques exemples de détermination.

	aflatoxines	ochratoxine	désoxynivalénol	fumonisines	toxine T2	zéaralénone
Elisa microplaques	X	X	X	X	X	X
Elisa membranes	X	X	X	X	X	X
Immuno-chromatographie bandelettes	X					
Immunoaffinité	X	X	X	X	X	X

Les laboratoires d'analyses agroalimentaires les utilisent maintenant couramment et certaines méthodes sont intégrées dans des normes internationales.

Les tests immunoenzymatiques et immunochromatographiques sont adaptés au traitement de grandes séries ainsi qu'à l'analyse sur site de prélèvements. Mais ils doivent être confirmés par les méthodes de référence (tableau II).

Ils sont hautement utiles dans le tri des échantillons pour isoler les positifs qui seront confirmés ensuite : ce sont donc des méthodes complémentaires validées mais dont la fiabilité doit être néanmoins régulièrement vérifiée par l'utilisation de tests de référence et d'aptitude.

4 Applications de l'immunoanalyse à la production et aux industries de transformation de la viande

4.1 Sur l'animal de production : le problème des anabolisants

Concernant les hormones destinées à augmenter artificiellement le poids des animaux, tels que les β -agonistes et les corticoïdes, même si elles ont été interdites par la CEE d'une part une utilisation frauduleuse est possible, et d'autre part les États-Unis et certains pays d'Amérique du Sud continuent à autoriser l'usage du zéranol, de la trenbolone et des hormones naturelles.

Ce sont surtout les méthodes de spectrométrie de masse qui sont actuellement utilisées en expertises pour leur détection. Mais les techniques de purification des échantillons par immunoaffinité ont amélioré leur sensibilité.

Les recherches s'orientent vers la mise au point de tests directement utilisables à la ferme ou à l'abattoir et, pour cela, l'immunocapteur serait préféré aux techniques Elisa classiques.

Il n'en reste pas moins que les techniques immunochimiques, du fait de leur sensibilité et de leur facilité d'usage, sont un moyen pratique de contrôle des anabolisants.

4.2 Dans les industries de la viande

Dans le domaine de la transformation des viandes, les méthodes immunochimiques peuvent servir à l'étude des marqueurs moléculaires pour déterminer une caractéristique, des défauts ou des qualités d'une viande, mais aussi pour identifier un produit carné ou vérifier ses traitements technologiques.

Cela concerne surtout la matière première : tendreté (avec l'étude des chaînes lourdes de la myosine, la protéolyse de la troponine), les défauts d'odeur, en particulier sur les porcs mâles entiers, mais aussi les produits finis avec l'identification des espèces animales, le contrôle de la cuisson, la recherche de système nerveux central.

Ce sont surtout les technologies de biopsies, par la possibilité qu'elles apportent de révéler rapidement plusieurs paramètres en une seule analyse, qui permettront le développement de l'immunochimie dans le domaine de la viande.

5 Applications de l'immunoanalyse à l'industrie laitière

L'immunochimie est largement utilisée dans l'industrie laitière dans des applications telles que l'analyse de la composition du lait avec dosage des protéines pour la détection de colostrum, de laits de mammites, de laits d'espèces différentes.

Elles sont aussi employées dans les vérifications lors des procédés industriels de transformation, comme la détermination des effets du traitement par la chaleur (intensité du traitement thermique, réaction de Maillard), la protéolyse (au cours de l'affinage, pour la réduction de l'allergénicité des protéines laitières), ou les propriétés émulsifiantes des protéines du lait (les changements de structures des protéines laitières lors de traitements chimiques).

Ces techniques vont de l'immunodiffusion radiale simple, aux méthodes Elisa, à l'utilisation d'antisera polyclonaux, d'anticorps monoclonaux, couplée à la résonance plasmonique de surface, technique la plus sophistiquée.

6 Recherche des prions (ESB et tremblante du mouton) dans les produits d'origine animale

6.1 Recherche dans les tissus

6.1.1 Méthodes conventionnelles

Les techniques immunohistologiques, en utilisant des anticorps spécifiques de la PrP pour détecter l'accumulation de la PrPres dans les dépôts amyloïdes, permettent une augmentation de la sensibilité de l'observation microscopique habituelle des lésions caractéristiques (spongieuse, astroglieuse, plaques amyloïdes PrP).

6.1.2 Techniques d'immunoempreinte (western blot)

Ces techniques sont employées depuis plus de 20 ans.

Les échantillons sont traités par la protéinase K qui détruit la PrPsens. L'homogénat dénaturé à chaud est ensuite analysé sur gel de polyacrylamide, et la protéine est transférée sur un support solide dans un état dénaturé avant d'être détectée par un anticorps marqué par une enzyme.

Le déplacement des bandes est caractéristique de la PrPres.

6.2 Tests rapides

Ils sont tous fondés sur la détection immunologique de la PrPres mais il n'existe pas d'anticorps bien identifié ayant une capacité à reconnaître spécifiquement la PrPres native. Il est donc utilisé des méthodes indirectes dans des extraits de tissus pour distinguer la PrPres de la PrPsens reposant sur les propriétés biochimiques différentielles de ces deux formes, généralement par utilisation de la résistance relative de la PrPres à la dégradation par des enzymes protéolytiques (protéinase K).

Il peut aussi être utilisé les propriétés d'agrégation de la PrPres extraite en présence de détergents.

Dans tous ces tests, l'extraction de la PrP (res ou sens) est indispensable, effectuée par un ou plusieurs détergents, accompagnée de la dénaturation rapide de la PrPres pour permettre sa détection par des anticorps qui reconnaissent la PrPres ou la PrP dénaturée. Certains tests utilisent directement pour détecter la PrPres l'augmentation de l'immunoréactivité après dénaturation.

6.3 Recherches de tests *ante mortem* et précliniques

Chez les bovins, la quantité d'agents infectieux et de PrPres présente hors du système nerveux est faible, ce qui n'est pas le cas des petits ruminants, en particulier dans leurs organes lymphoïdes. Les tests sanguins sont difficiles du fait de la très faible concentration en PrPres supposée dans ce tissu : seul actuellement un test développé aux États-Unis, à partir d'un extrait de leucocytes, avec un dosage immunologique par compétition après séparation par électrophorèse capillaire, a été mis au point mais sa validation est en cours.

Si le test est moins sensible qu'un test *post mortem*, compte tenu de la destination pour la consommation de ces animaux, son intérêt sera très limité. À l'inverse naturellement, l'intérêt de son application au diagnostic de la vMCHJ chez l'homme serait considérable : de nombreux travaux sont en cours.

6.4 Détection des prions dans les produits finis de l'industrie agroalimentaire et dans l'environnement

Il n'existe actuellement aucun test utilisable pour rechercher le prion dans les produits finis issus de l'industrie agroalimentaire. Mais il est possible de faire des tests sur les animaux abattus.

Le problème se pose pour le lait des petits ruminants.

La détection du prion dans l'environnement nécessite l'identification des sources de contamination possibles (abattoirs, centres d'équarrissage, entrepôts de farines animales, déjection des ruminants infectés).

Le problème est celui de la persistance dans l'environnement : on peut penser que les prions se diluent pour atteindre une concentration inférieure à la dose infectieuse.

Néanmoins, l'agent de la tremblante du mouton persiste dans les exploitations.

Le prion n'étant pas soluble dans l'eau, il devrait être recherché dans des particules en suspension ou dans des supports tels que les boues.

7 Applications de l'immunoanalyse à la prévention des allergies alimentaires

La détermination des principaux agents responsables des allergies alimentaires par immunochimie a connu un fort développement dans la dernière décennie, surtout par immunodosage mais aussi par la technique PCR ou PRC Elisa.

Mais la signification quantitative fait encore l'objet de travaux de recherche afin de répondre aux différentes lois et règlements sur les aliments visant la déclaration des ingrédients allergiques dans les aliments. Elles portent surtout actuellement sur la validation ou l'homologation des techniques analytiques disponibles, les procédés d'évaluation et de gestion du risque basés sur l'interprétation des résultats analytiques, la confirmation par spectrométrie de masse pour la détection des protéines ou des peptides marqueurs spécifiques d'un allergène, et la fixation de nouvelles normes sur les seuils minima de protéines conduisant à une réaction allergique chez les consommateurs sensibles.

En outre, la recherche et le développement de nouveaux tests sur les allergènes prioritaires actuellement non couverts par les tests de diagnostic identifiés, végétaux (sésame, moutarde) ou animaux (poissons, crustacés) sont en cours.

Enfin, l'adaptation de ces tests à la production industrielle, en particulier pour l'échantillonnage de produits finis ou de marqueurs liés aux produits de nettoyage, vise à fournir la base scientifique permettant la mise en œuvre des règlements visant la protection des consommateurs allergiques, par les efforts de développement à la fois des techniques analytiques de dépistage, de leur homologation et de l'harmonisation de ces méthodes.

8 Immunologie et épreuves equestres

Le contrôle de l'utilisation de produits interdits dans les épreuves équestres se fait actuellement pratiquement exclusivement par spectrométrie de masse.

Néanmoins, quelques tests Elisa sont encore utilisés ainsi que la chromatographie d'immunoaffinité. Ce sont surtout les plasmas (et les urines, si ces dernières ont pu être collectées) qui font l'objet d'investigations.

Il existe une nouvelle méthode de détection de la DPO (darbe poietin alfa) et de la rh-EPO (recombinant human erythropoietin) par extraction et enrichissement par immunoaffinité couplés à la spectrométrie de masse tandem (LC-MS/MS).

Une méthode utilise sur les récepteurs essais, basés sur l'action des hormones stéroïdes et surtout de l'hormone de croissance, pour stimuler la transcription de gènes cibles et leur traduction en protéines cibles.

Des fragments de récepteurs ont été produits par des techniques de génie génétique et sont utilisés dans des radiorécepteurs essais (ceci est équivalent à la RIA) mais les anticorps sont remplacés par des récepteurs avec l'avantage de pouvoir détecter tous les ligands du récepteur utilisé.

Enfin, une méthode toute récente qui en dérive est la mesure directe du ratio des protéines ou peptides dont la synthèse

est provoquée ou augmentée, par exemple pour l'hormone de croissance. Le profil en pourcentage de ces protéides circulant signe la nature et la quantité du produit injecté.

9 Conclusion

Les méthodes immunologiques et en particulier immuno-chimiques ont une expansion considérable dans le domaine du contrôle des produits d'origine animale, du début de la chaîne alimentaire, voire sur l'animal vivant, jusqu'à l'assiette du consommateur.

Toute la filière est concernée, de la production à la commercialisation en passant par la transformation industrielle, la chaîne du froid ou les conserves.

L'élevage industriel rend les animaux plus fragiles et la qualité des produits qui en sont issus doit être surveillée tant sur les plans microbiologiques et toxicologiques que sur leur qualité intrinsèque.

Le consommateur doit s'en protéger et les contrôles systématiques de plus en plus nombreux : ces méthodes devraient les simplifier.

Références

1. Arbault P, Daussant J. Méthodes d'analyses immuno-chimiques pour le contrôle de qualité dans les IAA. Paris : Ed. Tec & Doc, Lavoisier, 2005.
2. Scippo ML, Maghuin-Rogister G. Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse. II Méthodes biologiques de dépistage. *An Med Vét.* 2006; 150: 125-130.
3. Jeanney M. Des travaux français et italiens éclairent les origines possibles de l'ESB *La Dépêche Vétérinaire*, N° 1011 du 6 au 12 décembre 2008.
4. Laboratoire des courses hippiques. Document consulté sur le site www.fncf.fr/index.php?id=17 le 1^e décembre 2008.