

ACTALIA

# CLEAN : CLEaning AllergeN

*Rapport Final*

Rédactrice : S. ZOUAGHI  
17/03/2021



## Remerciements

Cette étude a été soutenue par France Filière pêche via le projet CLEAN (CLEaning AllergeN), dans le cadre de l'appel à projet « Enjeux immédiats Aval 2019 ». Le Projet CLEAN était porté par le pôle AQUIMER, en partenariat avec ACTALIA et le CHRU de Nancy.

## TABLE DES MATIERES

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Remerciements .....                                                                             | 1  |
| INTRODUCTION .....                                                                              | 4  |
| 1. APPROCHE BIBLIOGRAPHIQUE.....                                                                | 5  |
| 1.1. Généralités .....                                                                          | 5  |
| 1.2. Les réactions d'hypersensibilité immunologique aux produits de la mer .....                | 5  |
| 1.2.1. Allergie IgE dépendante .....                                                            | 5  |
| 1.2.2. Allergie non-IgE-dépendante.....                                                         | 6  |
| 1.3. Les allergènes de produits de la mer.....                                                  | 7  |
| 1.3.1. Principaux allergènes des poissons .....                                                 | 7  |
| 1.3.2. Principaux allergènes des crustacés.....                                                 | 8  |
| 1.3.3. Mollusques et coquillages .....                                                          | 8  |
| 1.4. Effets des technologies agro-alimentaires sur l'allergénicité des produits de la mer ..... | 8  |
| 1.4.1. Effet des traitements thermiques .....                                                   | 9  |
| 1.4.2. Effet des réactions liées au brunissement de Maillard .....                              | 9  |
| 1.4.3. Effet du pH.....                                                                         | 10 |
| 1.4.4. Additifs.....                                                                            | 10 |
| 1.4.5. Technologie de fabrication du Surimi .....                                               | 10 |
| 1.4.6. Lyophilisation.....                                                                      | 10 |
| 1.5. Le risque allergique et sa gestion dans les Industries Agro-Alimentaires (IAA) .....       | 11 |
| 1.5.1. Origine du risque .....                                                                  | 11 |
| 1.5.2. Étiquetage .....                                                                         | 12 |
| 1.5.3. Importance du nettoyage.....                                                             | 12 |
| 1.5.4. Gestion préventive du risque .....                                                       | 14 |
| 1.5.5. Contrôle qualité.....                                                                    | 15 |
| Conclusion .....                                                                                | 16 |
| 2. APPROCHE APPLIQUEE .....                                                                     | 16 |
| 2.1. Généralités .....                                                                          | 16 |
| 2.2. Etude de terrain.....                                                                      | 17 |
| 2.2.1. Constats généraux .....                                                                  | 17 |
| 2.2.2. Thématique allergène .....                                                               | 17 |
| 2.2.3. Procédures de nettoyage .....                                                            | 17 |
| 2.3. Mise en place des modes opératoires.....                                                   | 18 |
| 2.3.1. Choix des Matériaux.....                                                                 | 18 |
| 2.3.2. Jus allergènes.....                                                                      | 19 |
| 2.3.3. Conditionnement et souillure des coupons .....                                           | 20 |

|        |                                                                   |    |
|--------|-------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.4. | Nettoyage des coupons.....                                        | 20 |
| 2.3.5. | Recherche des allergènes.....                                     | 20 |
| 2.3.6. | Essais préliminaires. ....                                        | 21 |
| 2.4.   | Essais de nettoyage .....                                         | 22 |
| 2.4.1. | Efficacité des procédures de N&D.....                             | 22 |
| 2.4.2. | Action mécanique vs. Action chimique .....                        | 24 |
| 2.4.3. | Impact chimique des produits de nettoyage sur les allergènes..... | 25 |
| 2.4.4. | Cas du poisson gras .....                                         | 25 |
|        | Conclusion .....                                                  | 26 |
|        | CONCLUSION GENERALE .....                                         | 27 |
|        | REFERENCES .....                                                  | 29 |

## TABLE DES FIGURES

|           |                                                                                 |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1. | Représentation synthétique des phénomènes liés à l'allergie IgE-dépendante..... | 6  |
| Figure 2. | Cercle de Sinner, adapté de Zouaghi (2018). ....                                | 14 |
| Figure 3. | Coupons PEHD (gauche) et acier inoxydable (droite). ....                        | 19 |
| Figure 4. | Matières premières sélectionnées. ....                                          | 19 |
| Figure 5. | Approche expérimentale.....                                                     | 20 |
| Figure 6. | Tests Disp&Flow. ....                                                           | 21 |
| Figure 7. | Tests ProClean. ....                                                            | 21 |
| Figure 8. | Résultats des essais de N&D.....                                                | 23 |

## TABLE DES TABLEAUX

|            |                                                                         |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1. | Vérification de l'absence de faux positifs.....                         | 21 |
| Tableau 2. | Evaluation des seuils de détection des kits ProClean et Disp&Flow ..... | 22 |
| Tableau 3. | Action mécanique à froid. ....                                          | 24 |
| Tableau 4. | Action mécanique à chaud. ....                                          | 24 |
| Tableau 5. | Action chimique. ....                                                   | 24 |
| Tableau 6. | Impact des produits de nettoyage sur les allergènes.....                | 25 |
| Tableau 7. | Nettoyage comparés du jus de saumon et de cabillaud. ....               | 25 |

## INTRODUCTION

Dans une économie mondialisée, assurer la sécurité des aliments est un défi croissant pour les acteurs des filières alimentaires. Souvent principalement axée sur l'aspect microbiologique, cette sécurité passe également par la maîtrise des risques liés aux allergènes. En effet, en 2015, l'Académie Européenne d'Allergie et d'Immunologie Clinique a recensé plus de 120 aliments allergéniques (EAACI, 2015), et parmi eux. En Europe, quatorze substances ou ingrédients allergènes ont été identifiés comme les plus courants et font l'objet d'un étiquetage obligatoire. C'est notamment le cas des crustacés, des poissons et des mollusques.

Les acteurs de la filière des produits aquatiques se doivent donc de maîtriser les risques de contamination dus aux allergènes. Il est essentiel de gérer les risques dans le cas d'allergènes naturellement présents dans la matière première, mais ils doivent également lutter contre le risque de contaminations croisées (allergène passant de manière fortuite d'un produit alimentaire à un autre dans les ateliers de transformation) (La Vieille, 2008).

L'élimination des allergènes par le nettoyage-désinfection des équipements partagés ou des chaînes de transformation a été identifiée comme l'un des points critiques pour une maîtrise efficace du risque allergène (Jackson *et al.*, 2008). A ce jour, il existe peu d'informations publiées sur l'efficacité des procédures courantes de nettoyage-désinfection pour l'élimination des allergènes. Il n'existe pas non plus de consensus sur la manière de valider ou de vérifier l'efficacité des procédures de nettoyage-désinfection.

Le besoin d'accroître les connaissances en la matière est indéniable. C'est pourquoi l'objectif du projet CLEAN était d'étudier l'efficacité des méthodes de nettoyages employées dans la filière pêche française au regard de l'élimination des allergènes des produits de la mer (poissons, mollusques et crustacés).

Pour ce faire, le projet CLEAN s'est articulé en deux approches : (i) une approche bibliographique destinée à l'étude approfondie des allergènes de produits de la mer, de leur devenir pendant les transformations alimentaires et de leur élimination par le nettoyage et (ii) une approche appliquée mettant en jeu des visites d'entreprises partenaires et la réalisation d'essais de nettoyage d'allergènes en laboratoire. Ce rapport sera donc structuré en deux parties, correspondant aux deux approches précédemment décrites.

## 1. APPROCHE BIBLIOGRAPHIQUE

Les recherches bibliographiques réalisées dans le cadre du projet CLEAN ont donné lieu à la rédaction d'un article qui sera soumis à la revue IAA au printemps 2021, intitulé « Influence des technologies agro-alimentaires sur l'allergénicité des produits de la mer ». Cet article rendant parfaitement compte du travail accompli, il sera reproduit avec l'accord de tous les partenaires et constituera cette première partie.

### 1.1. Généralités

La mer nous fournit des produits alimentaires nombreux et variés : poissons, crustacés et coquillages. Les produits de la mer peuvent être responsables de réactions d'hypersensibilité immunologique appelée allergies. Il convient de distinguer ces dernières des réactions qui ne font pas intervenir le système immunitaire, c'est-à-dire liées aux intoxications histaminiques ou à l'intolérance aux amines biogènes, ou encore à des toxines d'algues (Lefèvre, Astier and Kanny, 2017).

La prévalence de l'allergie aux produits de la mer varie en fonction des pays et des habitudes alimentaires. Elle est plus importante dans les pays forts consommateurs comme l'Australie, certains pays d'Asie, l'Espagne, le Portugal et les Pays Scandinaves. Une revue de la littérature internationale, publiée en 2016 par Moonesinghe *et al.*, montre que la prévalence de l'allergie alimentaire au poisson en Europe varie de 0 à 7 % et aux fruits de mer de 0 à 10,3%. Quant aux enquêtes par questionnaire, elles évaluent la prévalence de l'allergie aux crustacés de 0,1 % à 5,5 %, aux mollusques de mer de 0,4 % à 1,5 % et aux fruits de mer de 0,1 % à 1,5 % (Moonesinghe *et al.*, 2016).

En France, l'enquête SOFRES menée en 2001 par questionnaire sur la population française âgée de moins de 60 ans au 1/1000<sup>ème</sup> a montré que les crustacés et les fruits de mer représentaient respectivement 8 % et 7 % des aliments incriminés dans les allergies alimentaires (Kanny *et al.*, 2001). Le rapport de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), sur la base des données du réseau d'allergovigilance, rapporte que les crustacés sont responsables de 6,9 % des cas rapportés d'anaphylaxie sévère, les mollusques 2,9 % et les poissons 1,7% ANSES 2018. Les mollusques marins (moule, seiche, calamar, coquille Saint Jacques, amande de mer) représentent 1,3% des cas rapportés

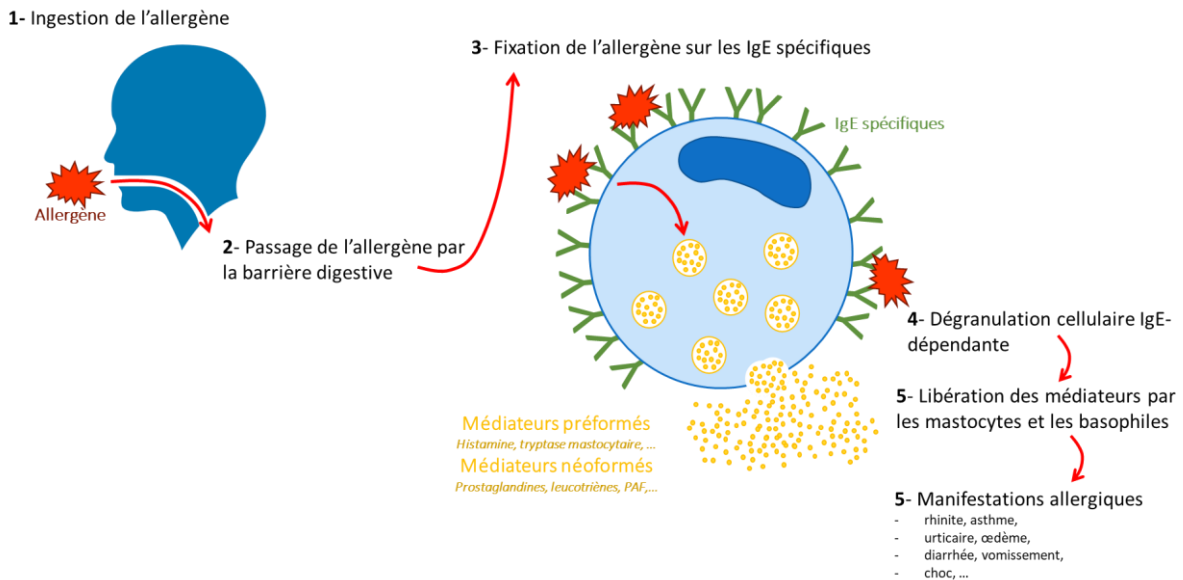
L'allergénicité des aliments peut être modifiée par les procédés de transformation (Moneret-Vautrin, 1997; Besler, Steinhart and Paschke, 2001). L'analyse de la littérature qui fait l'objet de cet article a pour objectifs, en premier lieu de dresser un état des lieux du risque allergique dans le secteur des produits de la mer, puis d'étudier l'effet des technologies agro-alimentaires sur l'allergénicité des aliments issus de ce secteur et enfin de présenter l'état des connaissances pour la maîtrise de ce risque allergénique. Seules les allergies directes aux produits de la mer seront traitées ici, les allergies aux contaminants tels que l'*Anisakis simplex* (Fernández de Corres *et al.*, 1996) ne seront pas abordées.

### 1.2. Les réactions d'hypersensibilité immunologique aux produits de la mer

#### 1.2.1. Allergie IgE dépendante

L'allergie alimentaire IgE-dépendante correspond à une absence, un retard ou à une rupture de la tolérance orale à un aliment. C'est le mécanisme le plus souvent incriminé dans les allergies. La réaction allergique peut être déclenchée par l'ingestion, le contact cutanéomuqueux voire l'inhalation de fumet de poisson pendant la cuisson ou par exposition professionnelle (Taylor *et al.*, 2000). Lors de la première exposition à l'aliment incriminé, des anticorps (immunoglobulines E (IgE) spécifiques d'une

ou plusieurs molécules de l'aliment) vont se fixer sur les leucocytes basophiles dans le sang et les mastocytes dans les tissus. Lorsque le sujet est, une nouvelle fois, exposé à l'aliment, les molécules allergènes se fixent aux IgE spécifiques présentes à la surface des cellules et entraînent la libération dans le sang de médiateurs préformés responsables de la réaction anaphylactique immédiate (Figure 1). Dans certains cas, une phase tardive peut survenir 4 à 6 heures après l'exposition à l'allergène, du fait de la synthèse d'autres médiateurs à partir de l'acide arachidonique membranaire (leucotriènes, prostaglandines, PAF...) et du recrutement de cellules inflammatoires.



**Figure 1.** Représentation synthétique des phénomènes liés à l'allergie IgE-dépendante.

La symptomatologie de l'allergie alimentaire IgE-dépendante s'installe habituellement entre 10 minutes et 2 heures après l'ingestion de l'aliment. La gravité de la réaction est variable. Cette variabilité se retrouve également au niveau des symptômes, pouvant être cutanéomuqueux (syndrome oral, urticaire, angioœdème, conjonctivite), respiratoires (rhinite, asthme), digestifs (vomissements en jet, douleurs abdominales, diarrhée), cardiovasculaires (tachycardie et hypotension artérielle). Dans les formes graves telles que le choc anaphylactique, l'asthme aigu et l'œdème laryngé, le pronostic vital peut être mis en jeu. La Figure 1 reprend synthétiquement l'enchaînement des phénomènes menant à la manifestation de ces symptômes.

Des observations d'anaphylaxie induites par l'effort ont été décrites notamment avec les crevettes et les huîtres (Maulitz, Pratt and Schocket, 1979).

### 1.2.2. Allergie non-IgE-dépendante

Les réactions non IgE-dépendantes concernent principalement les enfants. Parmi ces allergies, l'accent est mis de plus en plus fréquemment sur le syndrome d'entérocolite induite par les protéines alimentaires (SEIPA). Le SEIPA aigu se manifeste entre 1 à 4 heures après l'ingestion par des vomissements répétés, une pâleur et une léthargie évoluant vers une déshydratation et, dans certains cas, un choc hypovolémique (par diminution du volume intravasculaire). Le SEIPA chronique se caractérise par des vomissements intermittents, une diarrhée aqueuse et un retard de croissance. Le mécanisme physiopathologique reste mal caractérisé. Ces réactions résultent d'une réponse des lymphocytes T à l'antigène avec intervention de cytokines pro-inflammatoires et production de TNF-alpha. L'inflammation induit une augmentation de la perméabilité intestinale expliquant la déshydratation.

Le poisson est l'un des principaux aliments incriminés (Nowak-Wegrzyn and Muraro, 2009). Le SEIPA est également décrit chez les adultes et les adolescents, induit par les crustacés, les poissons et les mollusques (Gonzalez-Delgado *et al.*, 2019).

### 1.3. Les allergènes de produits de la mer

L'allergénicité est la propriété qu'a une molécule d'induire une réponse immunitaire allergique. Les allergènes alimentaires ou trophallergènes sont en général des glycoprotéines de masse moléculaire de 10 à 70 kD. Un aliment contient le plus souvent plusieurs protéines allergéniques. Le site de reconnaissance de l'allergène par le système immunitaire appelé épitope, est un peptide de 8 à 12 acides aminés dont les acides aminés adjacents (reste de la protéine) sont utiles pour maintenir la configuration tridimensionnelle de cette dernière.

Dans de rares cas, l'allergène peut être un sucre, comme l'alpha-Galactose impliqué dans les allergies aux viandes, mais celui-ci n'est pas à ce jour décrit pour les produits de la mer (Morisset *et al.*, 2012).

Un allergène majeur est un antigène vis-à-vis duquel au moins 50% des personnes allergiques à l'aliment réagissent. L'allergénicité des aliments dépend principalement de la digestibilité des allergènes sous l'effet du suc gastrique et des enzymes digestives ainsi que de leur thermolabilité. En effet, un allergène digéré ou dénaturé thermiquement peut perdre tout ou partie de son allergénicité.

La diversité taxonomique des produits de la mer rend la caractérisation de leurs allergènes complexe. La nomenclature des allergènes (International Union of Immunological Societies, Allergen Nomenclature Sub-Committee, IUIS) est basée sur la dénomination taxonomique de la source : 3 premières lettres du genre, espace, 1 lettre pour l'espèce, espace et un chiffre arabe assigné par ordre d'identification (Marsh *et al.*, 1986). Ainsi, la tropomyosine de la crevette *Penaeus aztecus* est Pen a 1, celle de *Penaeus indicus* est Pen i 1.

Certains allergènes sont désignés sous le vocable « pan-allergène » lorsqu'une protéine partage des similarités biochimiques et immunochimiques entre différentes espèces qui peuvent être éloignées du point de vue phylogénique. Certaines protéines allergéniques ont les caractéristiques de pan-allergènes telles que la parvalbumine, la tropomyosine et l'arginine-kinase, d'autres apparaissent plus spécifiques de certaines espèces.

#### 1.3.1. Principaux allergènes des poissons

Les principaux allergènes du poisson sont des protéines : les parvalbumines, en particulier les bêta-parvalbumines. Cette protéine de 12 kD, liant le calcium est identifiée dans la plupart des espèces avec plus de 70% d'homologie (c'est-à-dire de similitude biochimique) entre elles. Cependant, 27% des patients allergiques au poisson possèdent des IgEs dirigées vis-à-vis d'autres protéines allergisantes telles que l'énolase (Gal d 9), les aldolases (Gal d 10), le collagène, la tropomyosine dont le pouvoir allergisant est moins bien connu.

Si les sensibilisations croisées sont fréquentes, des mono-sensibilisations sont décrites pour la sole, l'espadon, les pangasius/tilapia, le thon/marlin, la morue et le saumon (Kourani *et al.*, 2020). Ainsi, il est possible pour des patients réagissant aux poissons osseux de tolérer les poissons cartilagineux comme la raie (Kalic *et al.*, 2019). Sont également décrites des allergies aux œufs de poisson, particulièrement dans le cas du saumon en lien avec la vitellogénine, une protéine de réserve des œufs de poisson. Aucune réactivité croisée avec la chair de poisson n'a été mise en évidence chez les patients allergiques aux œufs de poisson (Pagès *et al.*, 2015).



### 1.3.2. Principaux allergènes des crustacés

Les principaux allergènes des crustacés sont les tropomyosines qui ont été identifiées dans plusieurs espèces de crevettes (Met e 1, Par f 1, Pen a 1, Pen i 1) et de homards (Pan s 1, Hom a 1). Ce sont des protéines hydrosolubles et résistantes à la chaleur. Elles constituent jusqu'à 20 % de la teneur totale en protéines (Kamath *et al.*, 2014). La tropomyosine (34-38 kD) est un pan-allergène avec un haut degré d'homologie atteignant 98% entre les différentes espèces de crustacés (A. J. Lee *et al.*, 2012). D'autres allergènes ont été caractérisés : arginine kinase, myosine à chaîne légère, protéines sarcoplasmiques liant le calcium, hémocyanine qui est associée à des réactions systémiques anaphylactiques à la crevette. Il convient de souligner le risque de réactivité croisée entre les crustacés et les insectes (Pali-Schöll *et al.*, 2019). En effet, ces derniers sont des denrées de consommation courante en Chine où l'allergie alimentaire grave aux insectes représente 17,6% des réactions rapportées dont 15% liées à la consommation d'orthoptères (7,5% criquets et 7,5 sauterelles) (Ji *et al.*, 2009). L'introduction des protéines d'insectes dans l'alimentation occidentale pourrait constituer un nouveau risque pour les personnes allergiques aux crustacés.

### 1.3.3. Mollusques et coquillages

Les principaux allergènes des mollusques marins sont également les tropomyosines, présentes dans leurs muscles et les autres tissus. D'autres allergènes ont été identifiés chez les mollusques et coquillages : la paramyosine, l'amylase, l'arginine kinase, l'hémocyanine, la chaîne lourde de myosine, l'actine et la triosephosphate isomérase. Le rôle de ces allergènes dans l'induction de la réaction clinique et dans les réactivités croisées est mal connu. Il a été montré que les IgE spécifiques de 8 personnes allergiques à la crevette sur 9 reconnaissaient des protéines comme la tropomyosine d'autres mollusques de mer (moule, huître, ormeau, bulot, palourde, seiche, pieuvre, calamar, pinne marine) (Leung *et al.*, 1996). Des réactivités croisées sont également rapportées avec la tropomyosine du crabe batailleur (*Portunus pelagicus*), Por p 1 (Rolland *et al.*, 2018). La question d'une co-sensibilisation ou d'une réactivité croisée reste posée.

## 1.4. Effets des technologies agro-alimentaires sur l'allergénicité des produits de la mer

Les protéines allergisantes des produits de la mer (parvalbumines, tropomyosines) sont sensibles aux modifications des paramètres environnementaux tels que la température, le pH, la salinité, etc. En effet, les protéines sont des chaînes d'acides aminés repliées, maintenues dans leur conformation native qui leur confère leur fonction par des liaisons chimiques dites faibles (liaisons hydrophobes, liaisons H...). Ces liaisons peuvent être altérées par les variations environnementales, ce qui entraîne la dénaturation des protéines, c'est-à-dire la modification radicale de leur conformation tridimensionnelle, d'où une perte partielle ou totale, réversible ou irréversible de leur fonction et capacité à être détectées. Ainsi, des protéines allergisantes ayant subi un changement radical de température, de pH, de salinité comme on en rencontre dans les transformations agro-alimentaires peuvent voir leur allergénicité modifiée. En 2014, Kuehn *et al.* ont mis en évidence une réduction de la teneur en parvalbumine d'environ 60 % dans les poissons transformés (truite, saumon et maquereaux fumés, thon en boîte, morue séchée, hareng mariné) et 25% dans les poissons cuits à 95°C pendant 10 et 20 minutes par comparaison au poisson cru. Cependant, De Jongh *et al.* (2013) ont démontré que certaines transformations peuvent au contraire accentuer l'allergénicité des protéines. Il convient donc d'étudier la façon dont les différentes transformations alimentaires peuvent impacter l'allergénicité des produits finis.

#### 1.4.1. Effet des traitements thermiques

##### 1.4.1.1. Poisson

Les parvalbumines de poisson sont résistantes à la chaleur (Besler, Steinhart and Paschke, 2001). Hansen *et al.* ont démontré une grande stabilité des allergènes de poisson dans le cabillaud, le hareng et la plie après une ébullition allant jusqu'à 4 h chez deux patients allergiques au cabillaud (Hansen *et al.*, 1994). Une moindre allergénicité du thon et du saumon en conserve est rapportée : un test de provocation orale en double aveugle (TPODA) avec du thon en conserve négatif chez 18 patients allergiques au poisson ainsi qu'un TPODA au saumon en conserve négatif chez deux patients allergiques au saumon (Bernhisel-Broadbent, Strause and Sampson, 1992). La capacité de fixation des IgEs spécifiques au poisson en conserve est estimée entre 100 et 200 fois inférieure à celle du poisson bouilli (test d'inhibition ELISA). Le traitement thermique utilisé pour l'appertisation (110-120 °C) modifierait ainsi les protéines par perte de structure spatiale et agrégation avec une moindre reconnaissance par les IgE. Cela suggère une possible dégradation des allergènes de poisson à très haute température (> 100°C).

##### 1.4.1.2. Crevettes

La stabilité de la structure en spirale de la tropomyosine est liée à l'interaction des séquences répétées de sept acides aminés sur toute la longueur de la protéine, avec un acide aminé hydrophobe à chaque première et quatrième position (Lees-Miller and Helfman, 1991). Cette forme de structure secondaire et tertiaire confère une stabilité structurelle à la tropomyosine, qui est capable de résister à la chaleur. Il a été démontré une augmentation de la liaison des anticorps à la tropomyosine après traitement thermique, possiblement à cause d'une surexposition des segments protéiques reconnus par les immunoglobulines après la dénaturation thermique (Carnés *et al.*, 2007; Kamath *et al.*, 2013).

##### 1.4.1.3. Mollusques

Rolland *et al.* ont étudié l'effet de la cuisson dans du PBS (tampon phosphate salin) bouillant pendant 20 minutes sur l'allergénicité de 4 mollusques d'Asie Pacifique : huître (*Saccostrea glomerata*), moule (*Mytilus edulis*), pétoncle (*Amusium balloti*) et calamar (*Sepioteuthis australis*) (Rolland *et al.*, 2018). Treize patients allergiques aux fruits de mer et ayant des IgE spécifiques à au moins un de ces mollusques ont été inclus dans cette étude. Une augmentation de la réactivité IgE aux extraits de mollusques cuits et une activation plus importante des basophiles par les extraits cuits en comparaison aux extraits crus ont également été mises en évidence. L'immunoblot montre une forte réactivité des IgE vis-à-vis de la tropomyosine. L'immunoblot par inhibition démontre une forte réactivité croisée entre les tropomyosines des mollusques et des crustacés.

#### 1.4.2. Effet des réactions liées au brunissement de Maillard

Le terme « réactions de brunissement de Maillard » regroupe toutes les réactions de glycation des protéines alimentaires (condensation sucre-protéine) lors de leurs transformations. Bien que souvent associées aux traitements thermiques, on retrouve également ces réactions dans les produits marins en milieux salés et sucrés. Ces phénomènes induisant une modification chimique des protéines, on s'attend à ce qu'ils aient un impact sur l'allergénicité des produits de la mer.

De fait, Nakamura *et al.* ont montré que les sucres impliqués dans la réaction de Maillard (réaction de brunissement par condensation des molécules glucidiques et protéiques) pendant la cuisson influençaient l'allergénicité de la tropomyosine de deux espèces de mollusque en réduisant celle du calamar (*Todarodes pacificus*) et en augmentant celle de la pétoncle (*Patinopecten yessoensis*) (Nakamura *et al.*, 2005).

Par ailleurs, De Jongh *et al.* (2013) ont démontré que la glycation de la parvalbumine de morue marinée, induit la formation de dimères et multimères qui ont une capacité plus importante à fixer les IgE spécifiques que les monomères, augmentant ainsi leur réactivité.

Ces résultats divergents montrent que les effets des réactions de Maillard sur l'allergénicité des produits de la mer semblent difficiles à appréhender globalement et doivent donc faire l'objet d'études au cas par cas.

#### 1.4.3. Effet du pH

Selon Sletten *et al.* (2010), la dénaturation protéique consécutive à une acidification du milieu entraîne généralement un changement de conformation induisant une perte de liaison aux IgE. La faible teneur en parvalbumines allergisantes des poissons marinés pourrait ainsi être en partie expliquée par la dénaturation de la protéine dans le milieu acide de la marinade (Kuehn *et al.*, 2014). Cependant, Untersmayr *et al.* (2005) arguent que la parvalbumine de poisson n'est pas dégradée à pH < 2,5. Ceci amène à penser que comme dans le cas des réactions de Maillard, l'effet du pH sur l'allergénicité des produits de la mer reste un phénomène complexe et peu connu.

Cependant, il est intéressant de noter que les effets du pH gastrique sur l'efficacité de la digestion enzymatique des allergènes, c'est-à-dire leur dégradation en peptides par les enzymes, est un fait bien documenté. Untersmayr *et al.* (2005) ont en effet montré que l'élévation du pH de 2,5 à 2,75 inhibait l'action de la pepsine (enzyme gastrique). Ainsi, la prise de médicaments anti-acides, très prescrits dans les pays occidentaux, peut être associée à une augmentation du risque de développer une allergie (Jordakieva *et al.*, 2019).

#### 1.4.4. Additifs

Les additifs alimentaires sont très répandus et utilisés dans les produits transformés pour en améliorer la couleur, la texture, ou la durée de conservation. De notoriété publique, les additifs alimentaires, d'origine naturelle ou synthétique, peuvent occasionner des réactions allergiques, IgE-dépendantes ou non. Ainsi, les additifs alimentaires, peuvent augmenter l'allergénicité d'un produit (Gultekin and Doguc, 2013). Cependant, la littérature ne présente pas, à notre connaissance, d'études sur l'effet des additifs sur les allergènes pré-existants des produits de la mer.

#### 1.4.5. Technologie de fabrication du Surimi

Le surimi est produit à partir de la chair de poisson provenant de différentes espèces, hachée et lavée. Des agents texturants y sont ensuite ajoutés, selon les procédés, de l'amidon, du blanc d'œuf et d'autres additifs alimentaires donnant une structure gélatineuse après chauffage à basses températures (autour de 50°C). En testant six individus allergiques à la morue, Mata *et al.*, (1994) ont étudié l'allergénicité du surimi en le comparant à la morue fraîche. Les tests cutanés étaient positifs pour deux patients et la recherche d'IgE spécifiques positive pour les six patients. Les produits à base de surimi mimant la chair de crabe peuvent induire le consommateur allergique au poisson en erreur et être à l'origine de réactions chez les personnes qui en consommeraient par inadvertance (Musmand, Helbling and Lehrer, 1996).

#### 1.4.6. Lyophilisation

Ce procédé de congélation-déshydratation est utilisé de façon croissante pour augmenter la durée de conservation des produits hydratés tout en réduisant leur volume (ex. soupes, bouillons). Bernhisel-Broadbent, Strause and Sampson (1992) soulignent une perte d'allergénicité du poisson ayant subi ce traitement. Cependant, il convient de noter que les extraits utilisés pour les tests de provocation orale étaient ingérés par les patients sous forme lyophilisée et non réhydratée. La persistance de la perte

d'allergénicité après réhydratation reste à valider, d'autant que la dénaturation protéique consécutive à une déshydratation est parfois réversible.

## 1.5. Le risque allergique et sa gestion dans les Industries Agro-Alimentaires (IAA)

### 1.5.1. Origine du risque

Les dépôts de protéines allergisantes sur les surfaces industrielles (tables de découpe, tapis convoyeurs...) peuvent être à l'origine de contamination croisée avec d'autres produits alimentaires dans les usines où plusieurs produits sont traités avec un même équipement. La persistance d'allergènes sur des surfaces de contact alimentaire induit donc un risque de contamination croisée (transfert de l'allergène d'un produit à l'autre) et peut conduire à l'introduction non-intentionnelle d'un allergène dans un aliment, via des voies parfois inattendues (Food and Drug Administration, 2011). Ainsi, Yunginger *et al.* rapportent une observation d'anaphylaxie fatale lors de la consommation de pomme de terre frites dans une huile ayant servi à faire frire précédemment du poisson (Yunginger *et al.*, 1988). Fæste *et al.* décrivent en outre une allergie à un gâteau à base de poisson, contaminé par de la tropomyosine de crustacés via une contamination croisée sur la chaîne de production où était fabriquée au préalable une pâte à base de crustacés (Faeste *et al.*, 2003).

Les protéines de produits de la mer peuvent former, de par leur nature filmogène, une couche résiduelle persistante sur différents matériaux très présents dans les industries agro-alimentaires (IAA), notamment le polystyrène, le plastique vinylique, l'acier inoxydable et le verre. Ce film réduit l'adhésion des bactéries aux matériaux et a même été proposé comme un procédé non toxique et peu coûteux pour réduire la colonisation bactérienne des surfaces inertes (Vejborg *et al.*, 2008). Cependant, le risque allergénique reste quant à lui bien réel.

Dans l'étude de Thammathongchat *et al.*, le comportement d'adsorption de la tropomyosine sur des particules d'acier inoxydable 316L à 25 °C a été étudié à partir d'un extrait de crevettes (*Pandalus eous*) (Thammathongchat, Hagiwara and Sakiyama, 2010). Les protéines de crevettes sont adsorbées sur le métal en formant une monocouche jusqu'à une valeur de saturation estimée à environ 2500 µg/m<sup>2</sup>. Il a été constaté que la tropomyosine était adsorbée sur l'acier inoxydable de façon plus importante que les autres protéines de l'extrait de crevette. De plus, l'expérience de désorption a montré qu'un lavage prolongé à l'eau (2h à 25°C sous agitation constante) ne permettait pas de décrocher efficacement les protéines adsorbées.

Il est important de noter que les transformations des aliments peuvent modifier les caractéristiques de leurs protéines, et par là même la capacité de ces dernières à adhérer aux surfaces. Par exemple, les crevettes sont le plus souvent consommées cuites. Or, la dénaturation thermique et l'agréation des protéines peuvent affecter leurs capacités d'adsorption sur les surfaces solides. Hagiwara *et al.* (2015) ont étudié l'absorption des protéines de crevette (*Pandalus eous*) sur une surface en acier inoxydable à des températures variant de 30 à 95 °C en utilisant un extrait de crevette. Il a ainsi été montré qu'au-dessus de 60°C, la quantité totale de protéines adsorbées augmente rapidement tandis que le ratio d'adsorption de la tropomyosine tend à diminuer.

En outre, Ratanasumawong, Hagiwara and Sakiyama (2015) ont investigué l'effet du chlorure de sodium (NaCl), utilisé dans la saumure de refroidissement des crevettes, sur l'adsorption des protéines sur des particules d'acier inoxydable 316L. L'addition de NaCl (3 et 5%) dans l'extrait de crevette augmente légèrement le ratio des protéines totales adsorbées, alors que celui de la tropomyosine diminue. En effet, le NaCl augmente la force ionique des milieux liquides et peut modifier les interactions électrostatiques, la solubilité des protéines et la conformation des protéines.

Ainsi, l'adhésion de protéines allergisantes sur les surfaces industrielles est un fait avéré pouvant être modulé par les transformations alimentaires. Un risque de contamination croisée non-négligeable est induit lorsque des produits différents entrent en contact avec une même surface. Afin de protéger les consommateurs, les industriels se voient donc dans l'obligation d'étiqueter leurs produits de façon adéquate et préventive, en signalant la présence éventuelle d'allergènes. Ceci pouvant constituer un frein à l'achat, les acteurs des IAA s'efforcent de diminuer la persistance de molécules problématiques sur les équipements en alliant plans de nettoyage et contrôles préventifs.

#### 1.5.2. Étiquetage

Parmi les familles d'allergènes alimentaires à déclaration obligatoire, trois sont des produits de la mer : les poissons, les crustacés et les mollusques (Kanny *et al.*, 2015). Cependant, la gélatine de poisson, pourtant allergisante, utilisée comme support pour les préparations de vitamines ou de caroténoïdes et la gélatine de poisson ou de l'ichthyocolle utilisées comme agent de clarification dans la bière et le vin font l'objet d'une exemption d'étiquetage (Journal Officiel de la République Française, 2008). En 2007, une étude rétrospective portant sur 530 réactions d'allergie alimentaire en Espagne, montre que la consommation d'allergènes cachés était responsable de 22,4 % des réactions et concernait 9,2 % des patients allergiques au poisson, 6,7 % aux fruits de mer (Anibarro, Seoane and Mugica, 2007). Cette étude relate des contaminations produites lors la consommation d'un canapé apéritif contenant du poisson, mais également via une serviette ou une fourchette contaminée.

Les réactions allergiques aux fruits de mer sont associées à 3 phyla : Chordata (poisson à nageoires), Mollusca (mollusques) et Arthropoda (crustacés) (Prester, 2016). Certains fruits de mer comestibles et à risque allergique n'appartiennent pas à ces familles et ne sont donc pas d'étiquetage obligatoire. C'est le cas de l'oursin, un échinoderme incriminé dans des réactions d'anaphylaxie sévère et responsable d'allergie croisée avec certains crustacés et poissons (Pascal *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2014).

Gendel et Zhu analysent à partir de la base de données de la FDA-Recall Enterprise System (RES), les rappels de produits alimentaires aux USA en raison de la détection d'un risque allergique (Gendel and Zhu, 2013). Au total, 732 produits ont été rappelés entre 2007 et 2012 en raison d'un risque allergénique identifié et les rappels tendaient à augmenter au fil des années passant de 78 en 2007 à 189 en 2012. Les allergènes concernés sont le lait (40%), suivi par le blé (23%), le soja (21%), les fruits à coques (16%), l'œuf (15%), l'arachide (9%), les poissons (4%) et les crustacés (1,5%). Il faut noter qu'une erreur d'emballage ou l'utilisation d'une mauvaise étiquette constituent la cause de 26% des rappels, suivi par des problèmes de terminologie, l'absence de déclaration d'un ingrédient allergène, au total 67% des rappels sont liés à un défaut de contrôle de l'étiquetage. Cette étape de la gestion du risque allergique apparaît critique. Ces rappels sont initiés pour 44% par une inspection ou un audit des agences gouvernementales réglementaires, 12% par le rapport d'une réaction allergique par un consommateur et 27% par une plainte sans réaction rapportée. Des constats similaires sont également retrouvés au Royaume-Uni (Ward *et al.*, 2010).

L'étiquetage de précaution ne devrait être recommandé que si la teneur des allergènes qui pourraient être présents de façon non-intentionnelle est supérieure aux doses de référence cliniquement significatives (Reese *et al.*, 2015).

#### 1.5.3. Importance du nettoyage

L'élimination des allergènes par le nettoyage des équipements ou des chaînes de transformation a été identifiée comme l'un des points critiques pour un contrôle efficace du risque allergène (Food and Drug Administration, 2011). Dans la littérature, peu d'études ciblent le nettoyage des allergènes en IAA. Jackson *et al.* (2008) ont néanmoins réalisé une étude poussée sur les contaminations croisées

d'allergènes et les bonnes pratiques de nettoyage dans différents environnements de production agroalimentaire. Ce travail a permis de générer un faisceau de recommandations générales (ex. formation des équipes au risque allergène) et plus spécifiques au nombre desquelles le nettoyage minutieux des surfaces figure en bonne place.

Les procédures de nettoyage et désinfection (N&D) sont omniprésentes dans les IAA, où elles sont cruciales pour le maintien de la sécurité et de la salubrité alimentaires. Cependant, largement focalisées sur le risque microbiologique, elles peuvent ne pas être adaptées à la gestion du risque allergénique. Il existe peu d'informations publiées sur l'efficacité des procédures de nettoyage pour éliminer les allergènes des équipements de transformation, d'autant que les méthodes de nettoyage doivent être validées et/ou adaptées aux caractéristiques de l'allergène potentiel. En effet, comme vu précédemment l'adsorption des protéines natives ou transformées sur les surfaces est un phénomène complexe et multifactoriel dont il est important de comprendre les mécanismes afin d'y apporter une réponse adaptée en matière de prévention et remédiation (nettoyage).

En dehors de certaines industries particulières (ex. minoteries, industries des poudres de lait) où l'eau est proscrite, les méthodes de nettoyage humide, utilisant de l'eau additionnée de produits chimiques (détergents, biocides) sont le plus souvent utilisées. Dans le travail des produits de la mer, les procédures de N&D comportent typiquement plusieurs phases : (i) un dégrossissage à l'eau froide pour éliminer les résidus particuliers (écailles, morceaux de chair...), (ii) une phase de détergence à chaud (température inférieure à 60°C pour éviter la coagulation des protéines sur les surfaces), (iii) une phase de désinfection (température selon le biocide employé), (iv) éventuellement un détartrage acide. Il faut noter que les phases (ii) et (iii) peuvent être réalisées en une seule fois, avec l'utilisation d'un détergent biocide (ex. formulations alcalines-chlorées).

Ainsi, plusieurs familles de molécules présentent un intérêt potentiel dans ces procédures de N&D :

- Les détergents alcalins (ex. NaOH) ou enzymatiques, utilisés pour éliminer la souillure organique ;
- Certains acides (nitrique, phosphorique) utilisés en tant qu'agents détartrants ;
- Les désinfectants (biocides) de la classe « type de produits 4 » (TP 4) relative aux surfaces en contact avec les denrées alimentaires et les aliments pour animaux dans le règlement biocide 528-2012 (Journal Officiel de l'Union Européenne, 2012), au nombre desquels on peut citer les ammoniums quaternaires (ex. chlorure de dimethyldialkyl-ammonium (DDAC), benzalkonium), les peroxyacides (acide peracétique), le chlore et les chlorites, les alcalins chlorés, les triamines, les alcools, le peroxyde d'hydrogène et le glutaraldéhyde.

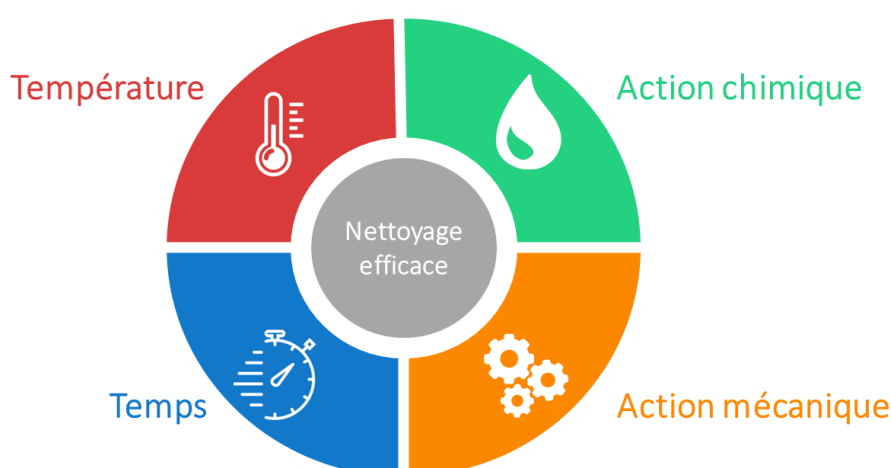
Peu de travaux portent sur l'influence des processus de nettoyage chimique sur l'allergénicité des produits de la mer et leur élimination potentielle par les procédures de N&D.

Comme souligné plus tôt, les allergènes sont principalement de nature protéique, particulièrement difficiles à éliminer, surtout lorsqu'ils ont été dénaturés ou chauffés, du fait de leur adhérence renforcée aux surfaces. L'usage de détergents alcalins (hydroxyde de sodium ou de potassium) permet d'hydrolyser les souillures protéiques, et la présence d'agents oxydants, comme l'hypochlorite de sodium, peut faciliter la solubilisation des souillures. Les surfactants aident également à éliminer les souillures insolubles dans l'eau et à les disperser dans la solution de lavage (Jackson *et al.*, 2008), surtout lorsque la matière première alimentaire est riche en matières grasses (ex. poissons gras comme le saumon et le maquereau). En revanche, les produits très acides (agents détartrants) peuvent

renforcer l'adhésion des protéines aux surfaces. Ils doivent donc impérativement être employés après élimination de la souillure organique.

Le peroxyde d'hydrogène, agent à fort potentiel d'oxydation, est utilisé en agro-alimentaire pour le blanchiment de certains produits de la mer. Cette pratique n'est pas autorisée en France, cependant cette molécule est couramment utilisée pour les opérations de nettoyage et désinfection. Il a été montré que la composition en acides aminés n'est pas affectée par ce traitement, à l'exception d'un acide aminé, la méthionine, alors oxydée en sulfoxyde de méthionine (Raksakulthai, Aksnes and Njaa, 1983).

Le cercle de Sinner (Figure 2) rappelle que les différents facteurs-clés pour un nettoyage efficace sont le temps de contact, l'action mécanique, la chimie (molécules présentes et temps de contact) et la température. En règle générale, dans les nettoyages de surfaces ouvertes en IAA (tables de découpe, tapis convoyeurs...), l'action mécanique est limitée à celle du jet d'eau pure ou d'eau additionnée dont les pressions usuelles restent inférieures à 20 bars. Dans le cas précis du nettoyage d'allergènes, l'utilisation de pressions élevées est déconseillée car pouvant mener à la dissémination de gouttelettes contaminées dans l'atelier. Les actions mécaniques au sens propre (type brossage) restent souvent limitées au petit matériel (couteaux, pinces...) et doivent être réalisées avec précaution, pour éviter la contamination croisée des équipements. Une identification claire du matériel de nettoyage (brosse, grattoir) par typologie de matière première est donc fortement recommandée de même que l'emploi de matériel à usage unique dans la mesure du possible.



**Figure 2.** Cercle de Sinner, adapté de Zouaghi (2018).

Le nettoyage de surfaces fermées (tuyauterie) est exclusivement réalisé « en place », via la circulation interne de produits nettoyants. Il est d'usage de réutiliser les solutions nettoyantes un certain nombre de fois, pour des raisons économiques. Cependant, cette pratique est fortement déconseillée, du fait de la persistance des allergènes dans la solution nettoyante réutilisée, et du fort risque de re-contamination des parois.

#### 1.5.4. Gestion préventive du risque

Le contrôle du risque allergénique est le plus souvent assuré par la mise en œuvre de plan de contrôle de type HACCP. Ward *et al.* (2010) préconisent une approche de gestion des risques fondée sur un ensemble de principes communs et convenus, conduisant à des niveaux d'action de gestion cohérents et bien compris dans l'ensemble de l'industrie alimentaire. Selon Dzwolak (2017), les facteurs critiques pour la mise en œuvre de la gestion des allergènes alimentaires sont d'une part l'accès aux méthodes validées d'évaluation de l'efficacité du nettoyage pour éliminer des allergènes spécifiques, et d'autre



part le respect des bonnes pratiques de séparation des matières allergènes et non allergènes pendant le transport et le stockage ainsi que la formation du personnel.

#### 1.5.5. Contrôle qualité

La validation des protocoles de nettoyage est essentielle pour assurer l'élimination efficace des allergènes. Cependant, il n'existe pas réellement de consensus sur la manière de valider ou de vérifier l'efficacité des procédures de nettoyage.

Cette validation implique une inspection visuelle des équipements, une analyse du produit fini et des produits en cours de fabrication, de l'eau de rinçage et la réalisation de prélèvements diagnostiques par écouvillonnage à intervalles réguliers (Food and Drug Administration, 2011). Idéalement, l'évaluation doit être réalisée à la fin du processus de nettoyage et avant l'utilisation suivante pour s'affranchir du risque de re-contamination (Jackson *et al.*, 2008) et les méthodes analytiques, lorsqu'elles existent, doivent être utilisées pour vérifier l'absence de résidus allergéniques, ce qui n'est pas forcément le cas sur le terrain. Dzwolak souligne dans son étude portant sur 24 petites entreprises polonaises de production alimentaire que les procédés de nettoyage ne sont le plus souvent pas validés par des tests spécifiques de l'allergène mais basés sur la détermination du contenu total en protéines et l'inspection visuelle (Dzwolak, 2017).

La réflexion autour des méthodes et points de prélèvement sont un des éléments clés d'un contrôle pertinent et de qualité. La recherche de l'allergène dans les eaux de rinçage peut se révéler techniquement difficile, d'une part car les volumes d'eau mis en jeu sont trop importants et diluent les résidus de telle façon qu'il n'est plus possible de les percevoir, et d'autre part car certains détergents et produits chimiques utilisés en N&D peuvent interférer avec les méthodes analytiques. Un plan de prélèvement judicieux est dès lors nécessaire pour assurer la pertinence des résultats. De façon analogue, la technique de l'écouvillonnage utilisée pour analyser les surfaces doit être effectuée pour les zones difficiles à nettoyer (interstices, recoins) pour correspondre au « pire cas ».

Les prélèvements ainsi réalisés peuvent ensuite être analysés de plusieurs façons, plus ou moins complexes. Pour une recherche simple de protéines, des tests colorimétriques prêts à l'emploi sont disponibles sur le marché. En quelques minutes, à partir d'un écouvillonnage, ils révèlent la présence ou l'absence de protéines résiduelles sur une surface. Ces tests ne permettent cependant pas de connaître la nature des protéines en présence, ni leur concentration. Les résultats sont uniquement qualitatifs.

Pour plus de spécificité, il est possible de se tourner vers des tests d'immunodiffusion, qui grâce à des anticorps monoclonaux, révèlent la présence d'une protéine définie (ex. tropomyosine de crevette). Ces tests rapides et faciles d'utilisation sur le terrain permettent l'identification d'un allergène particulier, mais ne permettent pas de le quantifier. Pour les besoins de quantification d'un allergène spécifique, il existe des tests ELISA prêts à l'emploi, mais qui sont plus onéreux et qui nécessitent un équipement particulier (ex. spectromètre de lecture).

Enfin, la technologie PCR peut également être utilisée pour une recherche de contamination, mais dans ce cas, la molécule recherchée est l'ADN de l'organisme d'où provient l'allergène et non la protéine allergisante elle-même.

Le fait de réaliser des tests de suivi pour vérifier la présence d'allergènes sur les surfaces critiques permet de valider ou non des procédures de N&D mais surtout de garantir la sécurité des consommateurs. Cependant, il est important de noter que de nombreux facteurs peuvent en diminuer la significativité et que les faux-positifs comme les faux-négatifs restent possible. En outre, un résultat négatif ne signifie pas forcément l'absence totale d'allergène, mais peut indiquer une présence



inférieure à la limite de détection du test utilisé. Il est également important de rester vigilant quant à l'efficacité des tests de détection, qui peuvent être biaisés dans leur conception. Ruethers *et al.* ont, par exemple, montré les limites de trois kits ELISA de détection d'allergènes du poisson : les taux de détection pour 57 poissons osseux se situaient entre 26% et 61% seulement (Ruethers *et al.*, 2020). Les espèces communes d'Europe et d'Amérique du Nord, notamment la carpe, la morue et le saumon, ont affiché un taux de détection plus élevé que celles de la région Asie-Pacifique, notamment le pangasius et plusieurs espèces de maquereaux et de thons. Parmi les 17 produits de poissons osseux en conserve, seuls 65 à 86 % ont été détectés, le thon affichant le taux le plus faible, alors qu'aucun des poissons cartilagineux n'a été détecté. Le choix du test ainsi que l'analyse critique des résultats sont donc essentiels, d'autant que les doses réactogènes peuvent être très faibles chez certains sujets.

En effet, la dose minimale induisant un effet adverse est fixée à titre provisoire à 0,1 mg de protéines de poisson, la dose réactogène pour 5% des sujets allergiques à la crevette est de 10 mg (Reese *et al.*, 2015). Les doses réactogènes pour les mollusques ne sont pas connues.

En Australie et en Nouvelle-Zélande, les opérateurs alimentaires ont développé le système VITAL (<http://www.allergenbureau.net/vital/>) pour fournir une procédure standardisée d'évaluation du risque allergénique dans l'ensemble de l'industrie alimentaire sur la base de l'évaluation du risque fondée sur les preuves. Ils ont établi les doses de référence auxquelles 1% des patients réagissent pour 11 allergènes alimentaires courants. VITAL a été développé par un comité composé de représentants de l'industrie alimentaire, de régulateurs, de conseillers juridiques, d'un défenseur des consommateurs allergiques et d'un consultant scientifique et a été lancé en tant qu'outil librement accessible pour l'industrie alimentaire en juin 2007 (Allen *et al.*, 2014). L'adoption de VITAL est volontaire et n'est pas une obligation légale. Cependant, les détaillants alimentaires attendent de plus en plus des fabricants qu'ils utilisent VITAL pour l'évaluation des risques de contamination croisée.

## Conclusion

Les produits de la mer se caractérisent par la grande diversité des espèces et de nombreuses réactivités croisées. La gestion du risque allergique justifie le développement des connaissances sur la nature et les caractéristiques biochimiques des allergènes ainsi que l'étude de l'influence des technologies agro-alimentaires sur leur allergénicité. Le risque de contamination croisée justifie la mise en œuvre de plan de contrôle dans l'industrie et la validation de procédés de nettoyage. L'étiquetage de précaution par l'incertitude qu'il génère chez le consommateur allergique n'est pas une alternative acceptable et devrait s'appuyer sur une gradation du risque tenant compte des mesures mises en œuvre dans l'unité de production et des doses réactogènes.

## 2. APPROCHE APPLIQUEE

### 2.1. Généralités

La partie applicative du projet CLEAN s'est déroulée en trois temps. Tout d'abord, des visites sur sites industriels ont été organisées dans les Hauts de France (Frais Embal, Conegan) et en Normandie (Lequertier Caen) afin de récolter des données concernant la place de la thématique allergène dans les différentes structures, les pratiques de contrôles qualité du risque allergénique en vigueur et les protocoles de N&D utilisés en entreprise.

Les résultats de cette phase d'enquête ont ensuite alimenté la réflexion menée autour de la construction des modes opératoires expérimentaux et des essais préliminaires. Enfin, la phase

expérimentale élaborée sur la base desdits modes opératoires a permis de tester l'efficacité de différents scénarios de nettoyage sur l'élimination des allergènes de produits de la mer.

## 2.2. Etude de terrain

### 2.2.1. Constats généraux

Les 3 entreprises partenaires du projet CLEAN ont ouvert leurs portes à l'équipe d'ACTALIA, permettant ainsi la réalisation d'un état des lieux sur la thématique des allergènes de produits de la mer, de leur contrôle et de leur nettoyage. La diversité des entreprises partenaires a été très intéressante car elles étaient représentatives des différents niveaux de transformation de la filière (mareyage / découpe, filetage / élaboration/ conditionnement multi-matières premières).

Selon les sites, une variabilité des matières premières a été remarquée. Il est important de souligner que les acteurs industriels peuvent travailler une matière première unique, plusieurs matières premières issues de la pêche ou plusieurs matières premières issues de différentes filières. Les niveaux de risques de contamination croisée sont donc très différents selon la situation.

Les opérations unitaires observées étaient elles aussi très variées, tant en termes de fonctions (découpe / décorticage / filetage / tri / surgélation / assemblage de produits élaborés / conditionnement...) qu'en termes d'automatisation (opérations manuelles / automatiques).

Il est fréquent que des matières premières allergéniques différentes soient travaillées sur une même machine ou surface, avec un même petit matériel (type couteau, brosse...) ou en forte proximité les unes des autres. Ainsi, le risque de contamination croisée est bien réel.

### 2.2.2. Thématique allergène

Selon le niveau de transformation des produits alimentaires, les enquêteurs ont constaté différents niveaux de sensibilité à la thématique allergène.

En effet, lorsque la matière première n'est pas transformée, comme lors de la manutention de poissons entiers, de crustacés et mollusques non-décoquillés, le risque de contamination croisée est considéré comme minime par les acteurs. La peau, la carapace ou la coquille, souvent lavées et très rarement consommées par les consommateurs, protègent la chair des allergènes indésirables. La vigilance augmente cependant pour les produits découpés qui peuvent être consommés crus (ex. sushi) et dont la préparation dans le foyer du consommateur (ex. cuisson) ne permet pas toujours d'éliminer les traces éventuelles allergènes exogènes. Enfin, le niveau de vigilance culmine autour des produits plus transformés et élaborés qui mettent souvent en jeu d'autres allergènes (lait, œuf, gluten...).

Lorsque des contrôles de validation des procédures de N&D sont réalisés, ils mettent systématiquement en œuvre des kits de détection rapide spécifiques à immunodiffusion. Ces kits permettent en effet l'obtention d'un résultat rapide par le personnel de terrain, à un coût abordable. Les points de prélèvement sont généralement identifiés et répertoriés en amont de l'échantillonnage. Il est cependant important de rappeler que les points de prélèvement devraient idéalement correspondre aux « *worst cases* », c'est-à-dire aux endroits les plus susceptibles d'abriter des résidus et/ou les moins susceptibles d'être nettoyés efficacement. La technique de prélèvement est aussi d'une importance prépondérante (ACTIA - RMT CHLEAN, 2021).

### 2.2.3. Procédures de nettoyage

Unaniment, les responsables qualités et chefs d'entreprise rencontrés font part d'une attention soutenue vis-à-vis de la question du nettoyage et désinfection. L'aspect sécurité microbiologique est de toute évidence très présent, mais la question des allergènes est également souvent évoquée.

Les procédures de N&D utilisées sur le terrain sont également très variables, et ce à plusieurs niveaux. Tout d'abord, la réalisation des opérations de N&D en fin de production est selon les sites, soit confiée à un prestataire de service, soit à une équipe de personnels dédiés, soit au personnel de production. Ces différences sont importantes à considérer dans la gestion du risque allergène. En effet, Jackson *et al.* (2008) insiste sur la nécessité de former et de sensibiliser les équipes responsables du N&D afin de les amener à appliquer de bonnes pratiques. Cette sensibilisation peut être plus ou moins facile à réaliser et à maîtriser pour l'acteur industriel selon les cas de figure.

Les transformations menées dans les sites partenaires ne mettaient pas en œuvre d'équipements à surface fermées (type cuve, tuyau, pompe), et par conséquent ne pratiquaient pas de N&D en CIP (nettoyage par circulation d'un ou plusieurs produits, avec rinçage). L'étude a donc uniquement porté sur les nettoyages de surfaces dites ouvertes (tables, planches de découpe, tapis convoyeurs...).

En termes de modes opératoires, la complexité des procédures est également très variable en termes de nombres d'étapes et de produits utilisés. Cependant, de fortes similitudes ont tout de même été observées et ont pu orienter la mise en place des modes opératoires expérimentaux du projet CLEAN :

- Omniprésence des étapes de dégrossissage à l'eau froide
- Utilisation très répandue de produits moussants alcalins chlorés à chaud ou à froid
- Absence d'action mécanique sur les surfaces ouvertes
- Utilisation d'une action mécanique uniquement sur le petit matériel (couteaux, palettes...) généralement réalisée à la main par l'utilisateur en fin de service.

*N.B. : Il a pu être observé qu'une même brosse pouvait être utilisée pour le nettoyage de petits matériels utilisés sur deux matières premières, ce qui introduit un risque de contamination croisée via ladite brosse. Cette situation peut être maîtrisée avec l'utilisation de brosses de couleurs différentes pour éviter l'emploi sur des produits différents.*

Lors des visites, l'accent a également été mis sur l'importance de la conception hygiénique des équipements. Il est en effet très important que les équipements transformant plusieurs matières premières (ex. doseuses, tapis convoyeurs, tunnels ou cellules de surgélation) soit conçus de manière à pouvoir être nettoyés facilement et de façon efficace. Au nombre des critères de conception hygiénique, on considère, entre autres, la drainabilité (éviter la stagnation de liquide) et l'accessibilité (pouvoir facilement accéder à tous les points critiques de la machine). L'état des surfaces, et donc leur résistance à l'usure est également un paramètre important à prendre en compte.

A l'issue des visites de terrain, les modes opératoires ont pu être mis en place.

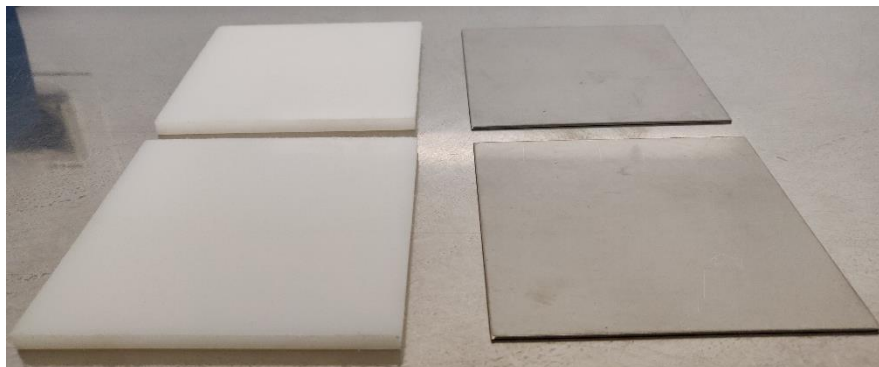
### 2.3. Mise en place des modes opératoires

L'objectif recherché à travers la mise en œuvre de ces modes opératoires était d'évaluer l'efficacité d'une procédure de nettoyage de type industriel pour l'élimination d'allergènes de poisson, mollusques et crustacés sur des surfaces ouvertes. La méthodologie proposée repose sur la contamination de coupons plans avec des jus allergéniques, l'application d'une procédure de nettoyage et la recherche des allergènes résiduels *via* des kits spécifiques de détection rapide.

#### 2.3.1. Choix des Matériaux

Le choix des matériaux pour les coupons à contaminer a été réalisé à l'aide des enquêtes de terrain. L'acier inoxydable (316L, 2B), omniprésent dans les industries alimentaires et le PEHD (polyéthylène haute densité) très représenté au niveau des surfaces ouvertes comme les planches de découpe et les bacs de transport, ont été sélectionnés.

Des coupons plans de 10 \* 10 cm ont été réalisés pour l'étude (Figure 3). Ces coupons ont été utilisés à l'état neuf pour les essais. En effet, même si un état d'usure (présence d'impacts, de rayures) est considéré comme plus proche de la réalité industrielle, les partenaires du projet ont conclu que l'usure réelle ou artificielle introduirait une trop grande variabilité dans les résultats, compliquant ainsi leur interprétation.



**Figure 3.** Coupons PEHD (gauche) et acier inoxydable (droite).

L'orientation des coupons lors des essais de nettoyage était horizontale, pour mieux correspondre aux observations de terrain. De plus, la position horizontale correspond au « *worst case* » vis-à-vis de la drainabilité.

### 2.3.2. Jus allergènes

Les coupons doivent être souillés avec un contaminant mimant les résidus de poissons, crustacés ou mollusques déposés sur les surfaces en applications réelles. Cependant, les contaminants doivent être produits de manière standardisée pour assurer la robustesse des résultats.

Ainsi, un protocole a été élaboré pour préparer des jus allergéniques à partir d'un poisson, d'un crustacé et d'un mollusque sélectionnés pour leur représentativité du point de vue du potentiel allergique et emploi dans les entreprises visitées. Le cabillaud (*Gadus morhua*), la crevette rose (*Palaemon serratus*) et la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*) sans corail ont ainsi été sélectionnés (Figure 4).



**Figure 4.** Matières premières sélectionnées.

Pour la préparation des jus, 100 g de matières premières crues sont finement hachées puis broyées avec 200 ml d'eau distillée au Stomacher (INTERSCIENCE) pendant 2 min. Le broyat obtenu est filtré sur papier filtre et aliquoté par 20 ml puis conservé à -18°C jusqu'à utilisation et dans la limite de 112 jours. En effet, la littérature montre que les allergènes comme les parvalbumines sont stables en congélation sur cette durée (Lee *et al.*, 2012).

### 2.3.3. Conditionnement et souillure des coupons

Les coupons sont systématiquement conditionnés avant usage, afin que leur état de surface de départ soit identique. Ils sont ainsi dégraissés à l'éthanol absolu puis immergés dans une solution de RBS (détergent) à 5% pendant 60 min à température du réseau (~12°C). Ils sont ensuite rincés à l'eau distillée pendant 5 s et séchés sous flux laminaire. Ils sont ensuite stockés à l'abri de la poussière jusqu'à leur utilisation.

La souillure des coupons est faite par dépôt et étalement unique ou répété de 1 ml de jus allergène sur leur surface. Entre chaque dépôt, ils séchent une nuit sous flux laminaire.

### 2.3.4. Nettoyage des coupons

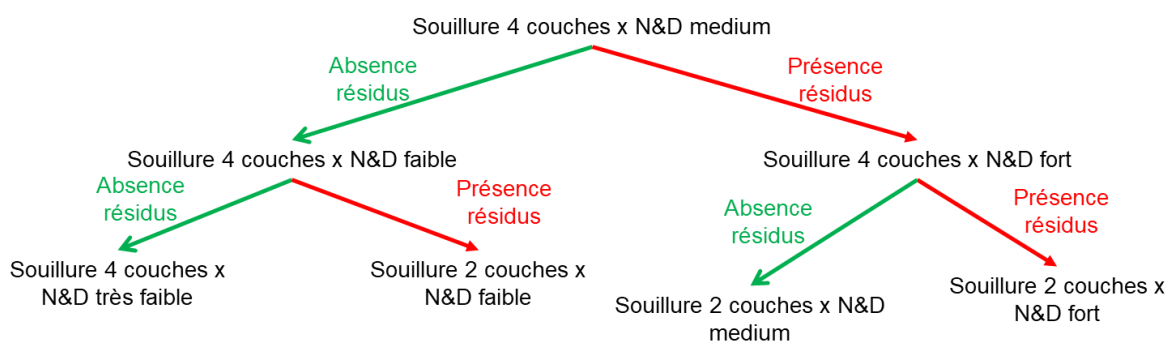
La procédure de nettoyage « medium » définie après l'enquête de terrain s'articule en 3 phases :

- Un dégrossissage à l'eau froide (12°C) et à la pression du réseau (~3 bars) pendant 10 s / coupon
- Une détergence avec une solution de produit moussant alcalin chloré (Topaz CL1, ECOLAB) à 2%, 40°C, pendant 10 min (recommandations fournisseur) appliquée en utilisant une station de lavage (TopMater, ECOLAB) à environ 6 bars.
- Un rinçage à l'eau froide (12°C) et à la pression du réseau (~3 bars) jusqu'à élimination visuelle de la mousse.

Autour de cette procédure « medium », le mode opératoire prévoit des variations pour apprécier les effets des différents facteurs sur l'élimination des allergènes :

- **N&D fort** : Dégrossissage à froid + Topaz 2%, 40°C, **20 min** + rinçage froid
- **N&D faible** : Dégrossissage à froid + Topaz 2%, **12°C**, 10 min + rinçage froid
- **N&D très faible** : Dégrossissage à froid + Topaz 2%, **12°C**, **5 min** + rinçage froid

L'approche « pas-à-pas » mise au point pour caractériser l'efficacité de ces procédures N&D est présentée sur la Figure 5.



**Figure 5.** Approche expérimentale.

Après nettoyage, les coupons sont inclinés et séchés pendant 1 h sous flux laminaire avant analyse.

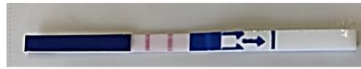
### 2.3.5. Recherche des allergènes

Les allergènes résiduels post-nettoyage sont recherchés *via* l'utilisation de kits de détection rapide. Les coupons contaminés au poisson et à la crevette sont analysés avec des dispositifs spécifiques à immunodiffusion Disp&Flow (BIOTEM), respectivement « Poisson » et « Crevette » (Figure 6).

Test négatif :



Test positif :



**Figure 6.** Tests Disp&Flow.

En revanche, il n'existe pas sur le marché de kits similaires pour les mollusques. Les coupons contaminés avec le jus de mollusque seront donc analysés avec des kits de recherche de protéines totales (ProClean, HYGENA)(Figure 7).



**Figure 7.** Tests ProClean.

### 2.3.6. Essais préliminaires.

Les essais préliminaires ont pour objectifs :

- La vérification des faux-positifs par réactivité croisée (ex. un test poisson peut-il détecter un allergène de crustacé ?)
- La vérification des faux positifs liés aux produits de nettoyage
- L'évaluation du seuil de détection des kits sélectionnés

#### 2.3.6.1. Vérification de l'absence de faux-positifs

La présence de certaines substances, telles que les produits de nettoyage, peut interférer avec le fonctionnement des kits à immunodiffusion et induire l'apparition de faux positifs. De même, il est important de vérifier la spécificité des kits à l'allergène désigné. Les kits ont donc été testés sur les jus allergènes purs ainsi que sur des solutions de produits nettoyants (à leurs concentrations d'usage) utilisés dans le projet CLEAN. Le Tableau 1 reprend les résultats obtenus.

**Tableau 1. Vérification de l'absence de faux positifs**

| Produit testé       |                                 | Kits              |                    |          |
|---------------------|---------------------------------|-------------------|--------------------|----------|
|                     |                                 | Disp&Flow Poisson | Disp&Flow Crevette | ProClean |
| Produits de la mer  | Poisson                         | P                 | A                  | P        |
|                     | Crevette                        | A                 | P                  | P        |
|                     | St Jacques                      | A                 | A                  | P        |
| Produits nettoyants | RBS (standardisation coupons)   | A                 | A                  | A        |
|                     | TOPAZ CL1 (procédure nettoyage) | A                 | A                  | A        |
|                     | Hypracid (détartrant acide)     | A                 | A                  | A        |

P : Présence / A : Absence / NT : Non-testé

Ces essais ont donné des résultats satisfaisants. En effet, les kits spécifiques Disp&Flow détectent uniquement leur matière première cible, tandis que les kits ProClean détectent les protéines dans tous les jus allergènes. Aucun produit nettoyant n'a généré de faux-positif.

#### 2.3.6.2. Evaluation des seuils de détection.

Les kits commerciaux précisent dans leur documentation des seuils de détection. Cependant, ces derniers ne sont pas toujours exprimés de façon très intelligible selon les usages prévus pour les kits (analyse de surface, d'eau, de matrice alimentaire).

Ainsi, les écouvillons prêts à l'emploi ProClean revendiquent un seuil de détection de 20 µg, sans autre précision. Les kits Disp&Flow Poisson et Crevette revendiquent des seuils de 1 et 7 mg/L respectivement. Afin de qualifier les seuils de détection dans les conditions opératoires du projet CLEAN, des dilutions des jus allergènes purs ont été réalisées et les kits ont été testés sur ces dilutions. Cette approche est restée semi-quantitative, car les molécules allergènes présentes dans les jus allergènes purs n'ont pas pu être dosées (nécessité de mettre au point une méthodologie de dosage par chimie analytique (type HPLC), non compatible avec la durée et le budget du projet CLEAN). Cependant, elle a permis de valider le bon fonctionnement des kits et de les positionner les uns par rapport aux autres. Le Tableau 2 reprend les résultats obtenus.

**Tableau 2.** Evaluation des seuils de détection des kits ProClean et Disp&Flow

|           | Dilution      | Pur | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 10 <sup>-1</sup> | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-4</sup> | 10 <sup>-5</sup> |
|-----------|---------------|-----|-----|-----|-----|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Pro-Clean | Poisson       | P   | P   | P   | P   | P                | PL               | A                | NT               | NT               |
|           | Saint Jacques | P   | P   | P   | P   | P                | A                | A                | NT               | NT               |
|           | Crevette      | P   | P   | P   | P   | P                | A                | A                | NT               | NT               |
| Disp&Flow | Poisson       | P   | P   | P   | P   | P                | P                | P                | PL               | A                |
|           | Crevette      | P   | P   | P   | P   | P                | P                | P                | A                | A                |

*P : Présence / PL : Présence limite / A : Absence / NT : Non-testé*

Les kits ProClean détectent avec succès les protéines – et donc les allergènes – dans tous les jus, jusqu'à la dilution au dixième pour les Saint-Jacques et la crevette, au centième pour le poisson. Les kits Disp&Flow détectent correctement les allergènes dans leurs jus spécifiques, jusqu'à la dilution au millième pour la crevette, au dix-millième pour le poisson. Ces résultats permettent la validation de l'utilisation des kits pour les essais de nettoyage.

Les résultats des essais préliminaires ont tous été satisfaisants et ont permis de mettre en œuvre les essais de nettoyage dans de bonnes conditions.

## 2.4. Essais de nettoyage

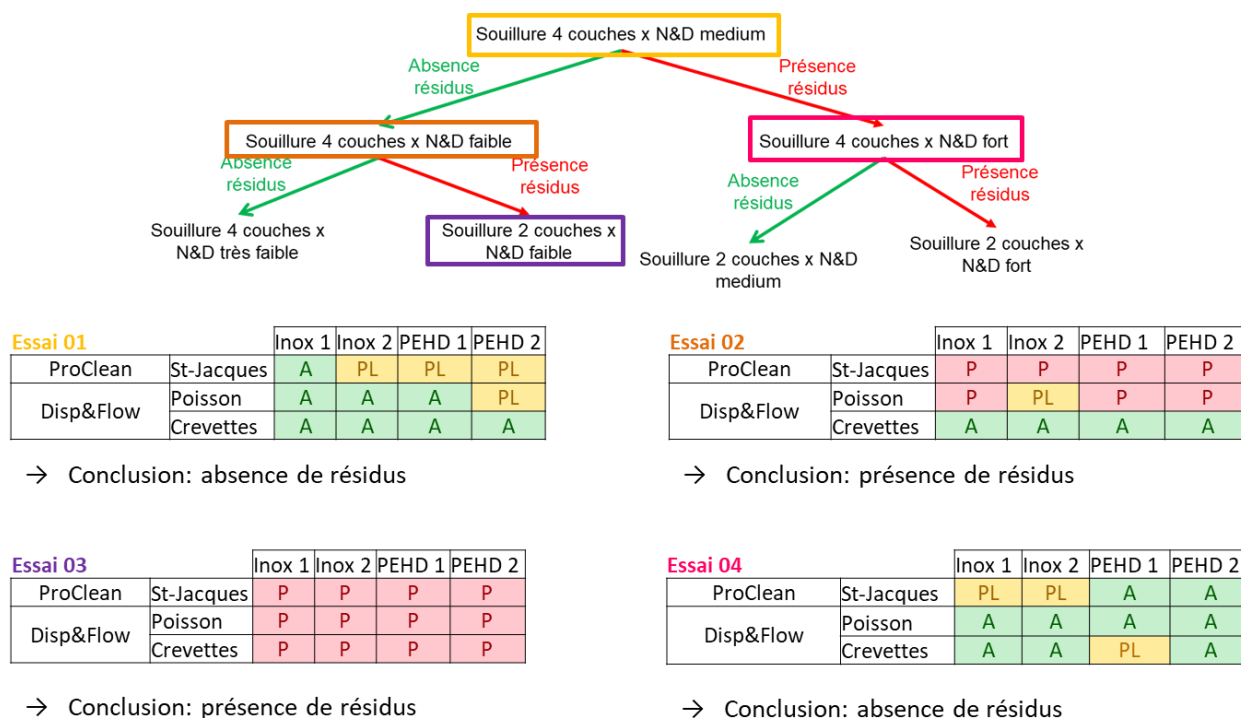
Les objectifs des essais de nettoyage étaient d'étudier :

- L'efficacité des procédures de N&D pour l'élimination des allergènes ;
- L'importance des différentes étapes du N&D, plus particulièrement les importances relatives de l'action mécanique du dégrossissage et de l'action chimique de la détergence ;
- L'impact chimique des produits de nettoyage sur les molécules allergènes ;
- Le cas du poisson gras dont la teneur en matière grasse peut impacter le nettoyage.

### 2.4.1. Efficacité des procédures de N&D

Ces essais ont pour base l'arbre décisionnel présenté au paragraphe 2.3.4. Les résultats de ces essais sont synthétisés sur la Figure 8. Tous les essais ont été réalisés en duplicat.





**Figure 8.** Résultats des essais de N&D.

L'essai 01 a confronté une souillure forte (4 couches) avec la procédure de N&D medium. Les résultats étaient globalement satisfaisants avec une élimination des allergènes de crevette sur toutes les surfaces et quelques présences résiduelles limite.

L'essai 02 avait donc pour but de voir si ces bons résultats pouvaient également être obtenus en diminuant la température de la solution de détergent. La diminution de température a entraîné une baisse drastique de performance avec une majorité de coupons montrant une forte présence d'allergène résiduel.

L'essai 03 explorait le potentiel d'efficacité du N&D faible confronté à une souillure réduite (2 couches), mais les résultats ne sont guère plus concluants que ceux de l'essai 02. L'essai 03 met aussi en lumière un phénomène intéressant concernant l'impact possible de l'épaisseur d'une couche de souillure. En effet, les coupons souillés avec 4 couches de jus de crevette ont été mieux nettoyés que les coupons souillés avec deux couches. Ce type de résultat peut indiquer que la couche de souillure, passé une certaine épaisseur, est plus cohésive « avec elle-même » qu'avec la surface sur laquelle elle est déposée. Ainsi, sous l'effet d'une contrainte mécanique (dégrossissage), elle se décolle d'autant plus facilement qu'elle est épaisse (Gleich, Van Tooren and Beukers, 2001). La filmogénicité des jus allergènes riches en protéines colloïdes peut rendre ce type de phénomène possible. Cependant, des analyses poussées sur les caractéristiques physico-chimiques des couches de souillure seraient nécessaire pour confirmer ou infirmer cette interprétation.

L'essai 04 a été réalisé pour évaluer la possibilité d'obtenir de meilleurs résultats de nettoyage sur une souillure forte en augmentant le temps de contact entre les coupons souillés et la solution détergente. Les résultats de l'essai 04 ne différant pas significativement de ceux de l'essai 01, on peut conclure que l'augmentation du temps de contact n'a pas d'impact majeur sur l'efficacité du nettoyage dans le cas étudié.

Ces essais ont montré :



- Que la procédure de N&D médium permet d'obtenir un résultat satisfaisant en termes d'élimination des allergènes sur des surfaces planes et neuves d'acier inoxydable et de PEHD ;
- Que l'augmentation du temps de contact ne permet pas d'atteindre de meilleures performances ;
- Qu'il n'est pas recommandé de diminuer la température de la solution de détergent.

#### 2.4.2. Action mécanique vs. Action chimique

Les procédures de N&D de surfaces ouvertes mettent en jeu différents types d'actions visant à nettoyer les surfaces. Les jets d'eau utilisés à l'étape de dégrossissage et de détergence infligent une contrainte mécanique aux couches de souillure, ce qui contribue à les éliminer. Les produits détergents agissent quant à eux au niveau chimique, par lyse des molécules organiques et inorganiques de la souillure. Les essais décrits ici avaient pour but d'étudier, le plus indépendamment possible, l'un et l'autre de ces effets.

Pour caractériser l'impact de l'action mécanique, des coupons d'acier inoxydable et de PEHD souillés avec 4 couches de jus allergènes ont été soumis à un jet d'eau chaude (40°C) ou froide (12°C) perpendiculaire à la surface, avec balayage pendant 20 s par coupon. Pour caractériser l'action chimique, des coupons souillés de la même façon ont été exposés à une solution de produit détergent (alcalin chloré à 2%) versée délicatement à 40°C pendant 10 min. Les Tableaux 3, Tableau 4 et Tableau 5 reprennent les résultats obtenus.

**Tableau 3.** Action mécanique à froid.

| <b>Action mécanique à froid</b> |            | <b>Inox 1</b> | <b>Inox 2</b> | <b>PEHD 1</b> | <b>PEHD 2</b> |
|---------------------------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| ProClean                        | St-Jacques | P             | P             | P             | P             |
| Disp&Flow                       | Poisson    | P             | P             | P             | P             |
|                                 | Crevettes  | P             | P             | P             | P             |

P : Présence / PL : Présence limite / A : Absence / NT : Non-testé

**Tableau 4.** Action mécanique à chaud.

| <b>Action mécanique à chaud</b> |            | <b>Inox 1</b> | <b>Inox 2</b> | <b>PEHD 1</b> | <b>PEHD 2</b> |
|---------------------------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| ProClean                        | St-Jacques | P             | P             | P             | P             |
| Disp&Flow                       | Poisson    | P             | P             | P             | P             |
|                                 | Crevettes  | P             | P             | P             | P             |

P : Présence / PL : Présence limite / A : Absence / NT : Non-testé

**Tableau 5.** Action chimique.

| <b>Action chimique</b> |            | <b>Inox 1</b> | <b>Inox 2</b> | <b>PEHD 1</b> | <b>PEHD 2</b> |
|------------------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| ProClean               | St-Jacques | P             | P             | P             | P             |
| Disp&Flow              | Poisson    | P             | PL            | P             | P             |
|                        | Crevettes  | PL            | PL            | PL            | PL            |

P : Présence / PL : Présence limite / A : Absence / NT : Non-testé

Ces essais montrent la synergie existant entre les deux types d'action rencontrés dans les procédures de N&D. En effet, indépendamment l'une de l'autre, l'action mécanique et l'action chimique ne permettent pas d'obtenir de résultats de nettoyage satisfaisants. En revanche, le cumul des deux actions (essai 01, Figure 8) permet une meilleure élimination des allergènes.

### 2.4.3. Impact chimique des produits de nettoyage sur les allergènes

Les produits détergents permettent de décomposer les molécules des couches de souillures, dont les allergènes, pour en faciliter le nettoyage. De plus, la première partie de ce rapport relate les effets des conditions environnementales (température, pH, etc.) sur les allergènes et leur intégrité moléculaire. Les essais présentés ici avaient pour but d'appréhender de manière empirique des possibles effets des produits détergents sur les allergènes en solution.

Ainsi, les jus d'allergènes ont été mélangés à des solutions de détergent alcalin chloré (Topaz CL1, ECOLAB) et de détergent acide (Hypracid, KERSIA) à différentes concentrations pendant 10 min. Les mélanges ont ensuite été testés avec les kits de détection rapide. Le Tableau 6 présente les résultats obtenus.

**Tableau 6.** Impact des produits de nettoyage sur les allergènes.

|            |           | Topaz CL1 |       |    | Hypracid |      |      |
|------------|-----------|-----------|-------|----|----------|------|------|
|            |           | 2%        | 4%    | 6% | 0,50%    | 1%   | 2%   |
| Allergènes | pH        | 12,6      | 12,93 | 13 | 2,15     | 1,64 | 1,46 |
|            | Poisson   | A         | A     | A  | P        | P    | P    |
|            | Crustacé  | P         | P     | A  | P        | P    | P    |
|            | Mollusque | P         | P     | A  | P        | P    | P    |

*P : Présence / PL : Présence limite / A : Absence / NT : Non-testé*

Ces essais semblent indiquer que les pH acides n'affectent pas les allergènes et protéines, alors que les pH basiques semblent impacter les allergènes ou leur détectabilité par les kits. Il est possible que les protéines allergènes subissent une hydrolyse en milieu basique. Cependant, en l'absence d'analyse biochimique fine, il n'est pas possible de conclure de façon certaine sur ces résultats.

### 2.4.4. Cas du poisson gras

Le poisson modèle choisi pour le projet CLEAN est le cabillaud, un poisson maigre. Cependant, la matière grasse tend à compliquer les opérations de nettoyage et à protéger les autres molécules des dégradations. Aussi a-t-il semblé intéressant de confronter les procédures de N&D medium et fort à une souillure obtenue avec un jus émulsionné de saumon, riche en matières grasses. Le Tableau 7 présente les résultats obtenus.

**Tableau 7.** Nettoyage comparés du jus de saumon et de cabillaud.

|            |           | Inox 1 | Inox 2 | PEHD 1 | PEHD 2 |
|------------|-----------|--------|--------|--------|--------|
| N&D medium | Saumon    | P      | P      | PL     | P      |
|            | Cabillaud | A      | A      | A      | PL     |
| N&D fort   | Saumon    | P      | P      | PL     | PL     |
|            | Cabillaud | A      | A      | A      | A      |

*P : Présence / PL : Présence limite / A : Absence / NT : Non-testé*

Le poisson gras présente de toute évidence plus de résistance à l'élimination des allergènes que le poisson maigre. La présence de matières grasses hydrophobes complique en effet le bon déroulement de la détergence.

Ces résultats sont intéressants dans la mesure où le poisson gras semble représenter le « pire cas », donnant des perspectives pour la poursuite des recherches sur la thématique.

## Conclusion

La partie expérimentale du projet CLEAN a permis, en premier lieu, d'établir des modes opératoires permettant de souiller des coupons avec des allergènes et de les nettoyer de façon contrôlée et répétable.

Les essais de nettoyage ont permis d'établir :

- Que la procédure N&D médium, représentative des pratiques industrielles, donne satisfaction pour l'élimination des allergènes sur des surfaces modèles, planes et à l'état neuf,
- Que les différentes étapes des procédures de N&D (action chimique, action mécanique) sont complémentaires et que leur synergie est nécessaire pour obtenir un résultat de nettoyage satisfaisant,
- Que les produits de nettoyage basiques semblent impacter et dégrader les allergènes dans une certaine mesure,
- Que la présence de matières grasses (cas du poisson gras) complique l'élimination des allergènes par voie aqueuse.

## CONCLUSION GENERALE

Le projet CLEAN représente une première étape dans l'étude et la caractérisation du nettoyage des allergènes de produits de la mer en milieu industriel. L'articulation des phases bibliographiques et expérimentales avec les visites de terrain a permis de générer des conclusions intéressantes et pertinentes sur la thématique de l'élimination des allergènes par le nettoyage.

En premier lieu, cette étude a mis en lumière un défaut certain de littérature scientifique sur le sujet. L'avancement de la thématique nécessite de poursuivre et d'approfondir les efforts de recherche fondamentale, notamment concernant la biochimie et la quantification des allergènes. Cela permettrait de mieux comprendre le comportement des allergènes pendant les opérations de transformation alimentaires ainsi que lors de leur adhésion aux surfaces des équipements, afin de pouvoir mettre en œuvre des moyens de maîtrise les plus pertinents.

D'autre part, le projet CLEAN confirme la place prépondérante de la gestion du risque allergène parmi les enjeux de la filière des produits de la pêche. Ce risque peut être géré à plusieurs niveaux, notamment par la prévention, l'application de bonnes pratiques de production, la planification et la réalisation de contrôles qualité et bien entendu la mise en œuvre de procédures de nettoyage adaptées. L'élimination des allergènes est un phénomène complexe multifactoriel. Notamment, les procédures de nettoyage, les caractéristiques de la souillure, la présence de matières interférentes telles que la matière grasse ainsi que l'état d'usure des surfaces et la conception des équipements ont tous un impact sur le résultat final.

Des recommandations ont également émergé du projet CLEAN pour la bonne gestion du risque allergène en atelier de transformation. L'application des bonnes pratiques à plusieurs niveaux est en effet conseillée.

- Bonnes pratiques préventives :
  - Travailler en zone
  - Ségréger le petit matériel et le matériel de nettoyage (ex. utilisation d'un code couleur)
  - Former, sensibiliser et accompagner les opérateurs
- Bonnes pratiques de nettoyage :
  - Réaliser des nettoyages fréquents
  - Limiter le recours aux hautes pressions qui, si elles permettent d'éliminer les souillures macroscopiques, risquent de diffuser les allergènes en brouillard dans l'atelier
  - Limiter la température de l'eau (<45°C) sous peine de voir les protéines être dénaturées et de potentiellement augmenter leur adhésion aux surfaces
  - Veiller à la bonne conception hygiénique des équipements
- Bonnes pratiques de contrôle
  - Réaliser des contrôles pour valider l'absence d'allergènes résiduels en fin de nettoyage et/ou en début de production
  - Sélectionner les kits de test de façon pertinente et en adéquation avec le cas concret au regard des molécules détectées et des seuils de détection
  - Préparer un plan d'échantillonnage pertinent, notamment au regard de la localisation des prélèvements qui doivent correspondre au « *worst case* »
  - Prêter attention à la méthode d'écouvonnage

Le projet CLEAN a également permis de générer des perspectives de recherche, tant au niveau académique (étude de l'adhésion et adsorption des allergènes sur les surfaces, effet de la dénaturation

par les détergents, étude des transferts d'allergènes de la surface vers l'aliment...) qu'au niveau appliqué. Il serait pertinent de profiter des acquis méthodologiques du projet CLEAN pour construire un plan d'expérience, explorer l'impact de la matière grasse sur l'élimination des allergènes, étudier des surfaces plus complexes (ex. tapis maille, tapis modulaire) et/ou en état d'usage.

## REFERENCES

- ACTIA - RMT CHLEAN (2021) *Guide sur les bonnes pratiques de prélèvement de surfaces en industries agro-alimentaires*. Available at: <https://www.actia-asso.eu/wp-content/uploads/RMT-Actia-Chlean-Methodes-de-prelevements-2021.pdf>.
- Allen, K. J. *et al.* (2014) 'Allergen reference doses for precautionary labeling (VITAL 2.0): clinical implications', *Journal of allergy and clinical immunology*. Elsevier, 133(1), pp. 156–164.
- Anibarro, B., Seoane, F. J. and Mugica, M. V (2007) 'Involvement of hidden allergens in food allergic reactions', *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. Citeseer, 17(3), p. 168.
- Bernhisel-Broadbent, J., Strause, D. and Sampson, H. A. (1992) 'Fish hypersensitivity. II: Clinical relevance of altered fish allergenicity caused by various preparation methods', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier, 90(4), pp. 622–629.
- Besler, M., Steinhart, H. and Paschke, A. (2001) 'Stability of food allergens and allergenicity of processed foods', *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. Elsevier, 756(1–2), pp. 207–228.
- Carnés, J. *et al.* (2007) 'The use of raw or boiled crustacean extracts for the diagnosis of seafood allergic individuals', *Annals of allergy, asthma & immunology*. Elsevier, 98(4), pp. 349–354.
- Dzwolak, W. (2017) 'Assessment of food allergen management in small food facilities', *Food control*. Elsevier, 73, pp. 323–331.
- EAACI (2015) *Food Allergy and Anaphylaxis Public Declaration*.
- Faeste, C. K. *et al.* (2003) 'Hidden shellfish allergen in a fish cake', *Allergy*. Wiley Online Library, 58(11), pp. 1204–1205.
- Fernández de Corres, L. *et al.* (1996) 'Anisakis simplex induces not only anisakiasis: report on 28 cases of allergy caused by this nematode.', *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 6(5), pp. 315–319.
- Food and Drug Administration (2011) *Fish and fishery products hazards and controls guidance*. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration ....
- Gendel, S. M. and Zhu, J. (2013) 'Analysis of US Food and Drug Administration food allergen recalls after implementation of the food allergen labeling and consumer protection act', *Journal of food protection*. International Association for Food Protection, 76(11), pp. 1933–1938.
- Gleich, D. M., Van Tooren, M. J. L. and Beukers, A. (2001) 'Analysis and evaluation of bondline thickness effects on failure load in adhesively bonded structures', *Journal of adhesion science and technology*. Taylor & Francis, 15(9), pp. 1091–1101.
- Gonzalez-Delgado, P. *et al.* (2019) 'Food protein-induced enterocolitis-like syndrome in a population of adolescents and adults caused by seafood', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. Elsevier, 7(2), pp. 670–672.
- Gultekin, F. and Doguc, D. K. (2013) 'Allergic and immunologic reactions to food additives', *Clinical reviews in allergy & immunology*. Springer, 45(1), pp. 6–29.
- Hagiwara, T. *et al.* (2015) 'Temperature effect on pink shrimp (*pandalus eous*) protein adsorption onto a stainless steel surface', *Food Science and Technology Research*. Japanese Society for Food Science and Technology, 21(3), pp. 341–345.

- Hansen, T. K. *et al.* (1994) 'Allergenic activity of processed fish', *Allergy Clin Immunol News*, 2.
- Jackson, L. S. *et al.* (2008) 'Cleaning and other control and validation strategies to prevent allergen cross-contact in food-processing operations', *Journal of Food Protection*. International Association for Food Protection, 71(2), pp. 445–458.
- Ji, K. *et al.* (2009) 'Anaphylactic shock and lethal anaphylaxis caused by food consumption in China', *Trends in food science & technology*. Elsevier, 20(5), pp. 227–231.
- De Jongh, H. H. J. *et al.* (2013) 'Digestibility and IgE-binding of glycosylated codfish parvalbumin', *BioMed research international*. Hindawi, 2013.
- Jordakieva, G. *et al.* (2019) 'Country-wide medical records infer increased allergy risk of gastric acid inhibition', *Nature communications*. Nature Publishing Group, 10(1), pp. 1–8.
- Journal Officiel de l'Union Européenne (2012) *Règlement UE No 528/2012 Règlement (UE) no 528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides*.
- Journal Officiel de la République Française (2008) *Décret n° 2008-1153 du 7 novembre 2008 modifiant l'annexe IV mentionnée à l'article R. 112-16-1 du code de la consommation, concernant la liste des ingrédients allergènes majeurs devant figurer sur l'étiquetage des denrées alimentaires*.
- Kalic, T. *et al.* (2019) 'Patients allergic to fish tolerate ray based on the low allergenicity of its parvalbumin', *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. Elsevier, 7(2), pp. 500–508.
- Kamath, S. D. *et al.* (2013) 'Impact of heat processing on the detection of the major shellfish allergen tropomyosin in crustaceans and molluscs using specific monoclonal antibodies', *Food chemistry*. Elsevier, 141(4), pp. 4031–4039.
- Kamath, S. D. *et al.* (2014) 'Effect of heat processing on antibody reactivity to allergen variants and fragments of black tiger prawn: A comprehensive allergenomic approach', *Molecular nutrition & food research*. Wiley Online Library, 58(5), pp. 1144–1155.
- Kanny, G. *et al.* (2001) 'Population study of food allergy in France', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier, 108(1), pp. 133–140.
- Kanny, G. *et al.* (2015) 'Information des consommateurs allergiques et étiquetage: actualités', *Revue Française d'Allergologie*. Elsevier, 55(7), pp. 483–491.
- Kourani, E. *et al.* (2020) 'What we know about fish allergy by the end of the decade?', *J Investig Allergol Clin Immunol*, 30(1).
- Kuehn, A. *et al.* (2014) 'Fish Allergens at a Glance: Variable Allergenicity of Parvalbumins, the Major Fish Allergens', *Frontiers in Immunology*, p. 179. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00179>.
- Lee, A. J. *et al.* (2012) 'Shellfish allergy-an Asia-Pacific perspective', *Asian Pacific journal of allergy and immunology*. The Allergy and Immunology Society, 30(1), p. 3.
- Lee, P.-W. *et al.* (2012) 'Measuring parvalbumin levels in fish muscle tissue: relevance of muscle locations and storage conditions', *Food chemistry*. Elsevier, 135(2), pp. 502–507.
- Lees-Miller, J. P. and Helfman, D. M. (1991) 'The molecular basis for tropomyosin isoform diversity', *Bioessays*. Wiley Online Library, 13(9), pp. 429–437.
- Lefèvre, S., Astier, C. and Kanny, G. (2017) 'Intolérance à l'histamine ou fausses allergies alimentaires de mécanisme histaminique', *Revue Française d'Allergologie*. Elsevier, 57(1), pp. 24–34.

- Leung, P. S. C. *et al.* (1996) 'IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacea and mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier, 98(5), pp. 954–961.
- Marsh, D. G. *et al.* (1986) 'Allergen nomenclature.', *Bulletin of the World Health Organization*. World Health Organization, 64(5), p. 767.
- Mata, E. *et al.* (1994) 'Surimi and native codfish contain a common allergen identified as a 63-kDa protein', *Allergy*. Wiley Online Library, 49(6), pp. 442–447.
- Maulitz, R. M., Pratt, D. S. and Schocket, A. L. (1979) 'Exercise-induced anaphylactic reaction to shellfish', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier, 63(6), pp. 433–434.
- Moneret-Vautrin, D. A. (1997) 'Les allergènes alimentaires, et leurs modifications par les technologies agro-alimentaires', *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*. Elsevier, 37(1), pp. 21–28.
- Moonesinghe, H. *et al.* (2016) 'Prevalence of fish and shellfish allergy: a systematic review', *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. Elsevier, 117(3), pp. 264–272.
- Morisset, M. *et al.* (2012) 'Anaphylaxis to pork kidney is related to Ig E antibodies specific for galactose-alpha-1, 3-galactose', *Allergy*. Wiley Online Library, 67(5), pp. 699–704.
- Musmand, J. J., Helbling, A. and Lehrer, S. B. (1996) 'Surimi: something fishy', *Journal of allergy and clinical immunology*. Elsevier, 98(3), pp. 697–699.
- Nakamura, A. *et al.* (2005) 'Effect of Maillard reaction on allergenicity of scallop tropomyosin', *Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications, 53(19), pp. 7559–7564.
- Nowak-Węgrzyn, A. and Muraro, A. (2009) 'Food protein-induced enterocolitis syndrome', *Current opinion in allergy and clinical immunology*. LWW, 9(4), pp. 371–377.
- Pagès, A.-S. *et al.* (2015) 'Allergie aux œufs de saumon sans allergies croisées au poisson, trois cas pédiatriques', *Revue Française d'Allergologie*. Elsevier, 55(4), pp. 301–304.
- Pali-Schöll, I. *et al.* (2019) 'Edible insects: Cross-recognition of IgE from crustacean-and house dust mite allergic patients, and reduction of allergenicity by food processing', *World Allergy Organization Journal*. Elsevier, 12(1), p. 100006.
- Pascal, M. *et al.* (2012) 'A sea urchin roe tropomyosin-like protein is recognized in vitro by shrimp-allergic individuals', *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. ESMON PUBLICIDAD SA.
- Prester, L. (2016) 'Seafood allergy, toxicity, and intolerance: a review', *Journal of the American College of Nutrition*. Taylor & Francis, 35(3), pp. 271–283.
- Raksakulthai, N., Aksnes, A. and Njaa, L. R. (1983) 'Effects of hydrogen peroxide and of sulphite and humidity on the amino acid composition and digestibility of fish protein', *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Wiley Online Library, 34(6), pp. 619–626.
- Ratanasumawong, S., Hagiwara, T. and Sakiyama, T. (2015) 'Effect of sodium chloride on the adsorption of proteins from pink shrimp (*Pandalus eous*) onto stainless steel surfaces', *Food Science and Technology Research*. Japanese Society for Food Science and Technology, 21(3), pp. 327–331.
- Reese, I. *et al.* (2015) 'Allergen and allergy risk assessment, allergen management, and gaps in the European Food Information Regulation (FIR)', *Allergo journal international*. Springer, 24(6), pp. 180–184.
- Rolland, J. M. *et al.* (2018) 'Effect of Heat Processing on IgE Reactivity and Cross-Reactivity of



Tropomyosin and Other Allergens of Asia-Pacific Mollusc Species: Identification of Novel Sydney Rock Oyster Tropomyosin Sac g 1', *Molecular nutrition & food research*. Wiley Online Library, 62(14), p. 1800148.

Ruethers, T. *et al.* (2020) 'Commercial fish ELISA kits have a limited capacity to detect different fish species and their products', *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Wiley Online Library, 100(12), pp. 4353–4363.

Sletten, G. *et al.* (2010) 'Effects of industrial processing on the immunogenicity of commonly ingested fish species', *International archives of allergy and immunology*. Karger Publishers, 151(3), pp. 223–236.

Tanaka, K. *et al.* (2014) 'Allergen analysis of sea urchin roe using sera from five patients', *International archives of allergy and immunology*. Karger Publishers, 164(3), pp. 222–227.

Taylor, A. V. *et al.* (2000) 'Detection and quantitation of raw fish aeroallergens from an open-air fish market', *Journal of allergy and clinical immunology*. Elsevier, 105(1), pp. 166–169.

Thammathongchat, S., Hagiwara, T. and Sakiyama, T. (2010) 'Adsorption of tropomyosin from pink shrimp (*Pandalus eous*) on stainless steel surface', *Food Control*. Elsevier, 21(9), pp. 1250–1253.

Untersmayr, E. *et al.* (2005) 'The effects of gastric digestion on codfish allergenicity', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier, 115(2), pp. 377–382.

Vejborg, R. M. *et al.* (2008) 'Anti-adhesive properties of fish tropomyosins', *Journal of applied microbiology*. Wiley Online Library, 105(1), pp. 141–150.

La Vieille, S. (2008) *Allergies alimentaires et étiquetage de précaution*.

Ward, R. *et al.* (2010) 'A vision for allergen management best practice in the food industry', *Trends in food science & technology*. Elsevier, 21(12), pp. 619–625.

Yunginger, J. W. *et al.* (1988) 'Fatal food-induced anaphylaxis', *Jama*. American Medical Association, 260(10), pp. 1450–1452.

Zouaghi, S. (2018) 'Dairy fouling on stainless steel and design of antifouling surfaces'. Lille 1.