

ACTALIA - AQUIMER

# PROJET CLEANER

## Rapport Final

Rédactrice : Sawsen DEHAINE  
Responsable de projets Hygiène et Procédés  
+33 2 33 06 71 71 / [s.dehaine@actalia.eu](mailto:s.dehaine@actalia.eu)

# TABLE DES MATIERES

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| TABLE DES FIGURES .....                                              | 2  |
| TABLE DES TABLEAUX .....                                             | 2  |
| REMERCIEMENTS .....                                                  | 3  |
| INTRODUCTION .....                                                   | 3  |
| 1. GENERALITES .....                                                 | 4  |
| 1.1. Mécanismes de l'allergie alimentaire.....                       | 4  |
| 1.1.1. Les allergies IgE-dépendantes .....                           | 4  |
| 1.2. Les allergènes des produits de la mer .....                     | 5  |
| 1.2.1. Allergènes de poisson.....                                    | 6  |
| 1.2.2. Allergènes de crustacés.....                                  | 6  |
| 1.2.3. Allergènes de mollusques.....                                 | 6  |
| 1.3. Le nettoyage des ateliers de la filière.....                    | 6  |
| 1.4. Détection des allergènes .....                                  | 7  |
| 2. DEMARCHE EXPERIMENTALE .....                                      | 7  |
| 2.1. Plan expérimental.....                                          | 7  |
| 2.2. Matériel et méthode .....                                       | 8  |
| 2.2.1. Surfaces étudiées .....                                       | 8  |
| 2.2.2. Encrassement des surfaces .....                               | 8  |
| 2.2.3. Nettoyage .....                                               | 10 |
| 2.2.4. Détection des allergènes .....                                | 11 |
| 3. RESULTATS.....                                                    | 11 |
| 3.1. Haute pression.....                                             | 11 |
| 3.2. Nettoyage des allergènes .....                                  | 12 |
| 3.2.1. Plan d'expérience complet.....                                | 12 |
| 4. DISCUSSION .....                                                  | 16 |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....                                    | 19 |
| ANNEXE 1 : Plan d'expérience complet.....                            | 20 |
| ANNEXE 2 : Fiche technique des kits Disp&Flow Poisson (Biotem) ..... | 21 |
| ANNEXE 3 : Fiche pratique .....                                      | 23 |
| REFERENCES .....                                                     | 24 |

## TABLE DES FIGURES

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1. Représentation synthétique des phénomènes liés à l'allergie IgE-dépendante [7].                    | 4  |
| Figure 2. Arbre taxonomique des produits de mer [9].                                                         | 5  |
| Figure 3. Principales espèces déclarées en halles à marée par les bateaux français en 2021 [17].             | 9  |
| Figure 4. Mise en mouvement des parties mobiles des tapis M, chaque position est tenue pendant 10s.          | 10 |
| Figure 5. Catégories de résultats.                                                                           | 11 |
| Figure 6. Représentation schématique des résultats de recherche d'allergènes suite à un prélavage à 46 bars. | 12 |
| Figure 7. Représentation schématique des résultats de recherche d'allergènes suite à un prélavage à 25 bars. | 12 |
| Figure 8. TACT.                                                                                              | 17 |

## TABLE DES TABLEAUX

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1. Protéines des produits de la mer impliqués dans des réactions allergiques IgE dépendantes (adapté de [9]). | 5  |
| Tableau 2. Barèmes d'application des détergents.                                                                      | 10 |
| Tableau 3. Détection d'allergènes résiduels après nettoyage sur surfaces lisses (inox et tapis H (I)).                | 13 |
| Tableau 4. Détection d'allergènes sur les tapis H (c) après nettoyage en position favorable et défavorable.           | 14 |
| Tableau 5. Détection d'allergènes sur les tapis M après nettoyage sur les zones visibles et les zones cachées.        | 14 |
| Tableau 6. Détection d'allergènes après nettoyage dans le cas d'un prélavage unique ou d'un double prélavage.         | 15 |

## REMERCIEMENTS

Cette étude a été soutenue par France Filière Pêche via le projet CLEANER (Cleaning Fish Allergen), dans le cadre de l'appel à projet « Enjeux immédiats Aval 2021 ». Le Projet CLEAN était porté par le pôle AQUIMER, ACTALIA était prestataire.

## INTRODUCTION

Avec une visibilité grandissante, l'allergie alimentaire représente un réel enjeu de santé publique. Bien que les données de prévalence soient considérées par les autorités concernées comme difficiles à interpréter (limites et diversité des méthodes de collection), l'enquête « INCA 3 » [1] menée par l'ANSES entre 2014 et 2015 a recensé 4,3% et 3,9% d'intolérances ou allergies alimentaire chez les enfants et les adultes respectivement. Sur la même période, 105 cas d'anaphylaxie sévère ont été déclarées au Réseau d'AllergoVigilance®. Les produits de la mer font partie des principaux allergènes à déclaration obligatoire (Règlement (EU) n° 1169/2011 [2]) d'origine animale). Ensemble, ils représentent plus de 10% des cas d'anaphylaxie sévère recensés entre 2002 et 2017, avec respectivement 7%, 3% et 2% pour les crustacés, les mollusques et les poissons [3].

Afin de protéger les consommateurs présentant une ou plusieurs allergies alimentaires, la législation européenne stipule que la présence de quatorze allergènes majeurs doit être indiquée lors de l'étiquetage des produits emballés. On les appelle Allergènes à Déclaration Obligatoire (ADO). En cas de présence intentionnelle d'un ADO dans une recette, le nom de l'allergène doit apparaître en toutes lettres et être mis en valeur (police différente, gras, souligné...) [2] dans la liste des ingrédients. Par ailleurs, en cas de possibilité de présence fortuite d'un ADO dans un produit préemballé, une mention supplémentaire peut être ajoutée sur l'étiquette, telle que « peut contenir... » ou « traces éventuelles de... ». Cette pratique, appelée étiquetage de précaution fait l'objet d'aucune réglementation et ne doit en principe être utilisée que lors de la présence avérée, et ne pouvant être maîtrisé, d'un risque de contamination du produit par un allergène.

Les professionnels du secteur agroalimentaire se doivent donc de prendre en compte le danger allergène dans leurs analyses de risques sanitaires et de se mettre en capacité de maîtriser les risques de contamination. Ceci leur permet en effet de mener une politique d'étiquetage appropriée et de permettre aux consommateurs de choisir des aliments sans risque pour leur santé.

Parmi les différents leviers de maîtrise du risque allergène, on peut citer la vigilance et l'exigence de fiches produits détaillées pour les matières premières, le respect des bonnes pratiques de production, l'ordonnancement de la production ainsi que le nettoyage. Ce dernier permet d'éliminer, entre deux lots de production, les allergènes présents sur les équipements. Il est donc essentiel de s'assurer de son efficacité vis-à-vis des allergènes, surtout dans des scénarios de successions de produits avec et sans allergènes sur une même ligne ou un même équipement.

Contrairement à l'élimination des micro-organismes (désinfection), il n'existe pas à ce jour de référentiel normatif de qualification d'efficacité de l'élimination des allergènes (détergence). Le projet CLEANER, faisant suite au projet CLEAN (2020-2021), a donc pour objectif d'apporter des éléments de réponse à la question du nettoyage des allergènes de produits de la mer en prenant l'exemple des allergènes de poisson.

# 1. GENERALITES

## 1.1.Mécanismes de l'allergie alimentaire

Les allergies sont des maladies liées à des dysfonctionnements du système immunitaire. Elles correspondent à une hyperréactivité d'un sujet allergique vis-à-vis d'agents étrangers, les allergènes. Naturellement, le système immunitaire protège l'organisme en reconnaissant les corps étrangers via leurs antigènes et en déclenchant des réactions de défense par la production d'anticorps spécifiques [4]. Dans le cas d'une allergie alimentaire, lorsque l'individu ingère, est en contact, ou même dans certains cas inhale des allergènes, ces derniers, bien qu'inoffensifs, sont identifiés et sont combattus par le système immunitaire.

Les allergies alimentaires sont réparties en deux catégories, en fonction de l'intervention ou non des immunoglobulines E (IgE) dans leur mécanisme.

### 1.1.1. Les allergies IgE-dépendantes

Les réactions allergiques IgE-dépendantes représentent la plupart des allergies recensées. Elles se déroulent en deux phases : une phase de sensibilisation et une phase de déclenchement.

La phase de sensibilisation correspond au premier contact de l'organisme avec l'allergène. Issu de l'environnement ou de l'alimentation, l'allergène traverse la barrière naturelle entre l'organisme et l'extérieur (ex : muqueuse, peau) et déclenche la production d'anticorps spécifiques (IgE) via des cellules appelées plasmocytes qui sont elles-mêmes issues des Lymphocyte B [5]. Les IgE, une fois produites, se répartissent dans l'ensemble de l'organisme via la circulation sanguine et se fixent sur des cellules cibles au niveau des tissus (mastocytes) ou directement dans le sang (leucocytes basophiles).

La phase de déclenchement (ou de réaction) se manifeste après une nouvelle exposition de l'individu à l'allergène. Ce dernier se fixe sur les IgE spécifiques présentes à la surface des cellules de la phase de sensibilisation (mastocytes, basophiles) ce qui induit la libération dans le sang de médiateurs, dits « néoformés », responsables de la réaction anaphylactique immédiate [6]. La Figure 1 synthétise schématiquement les différentes réactions biochimiques impliquées.

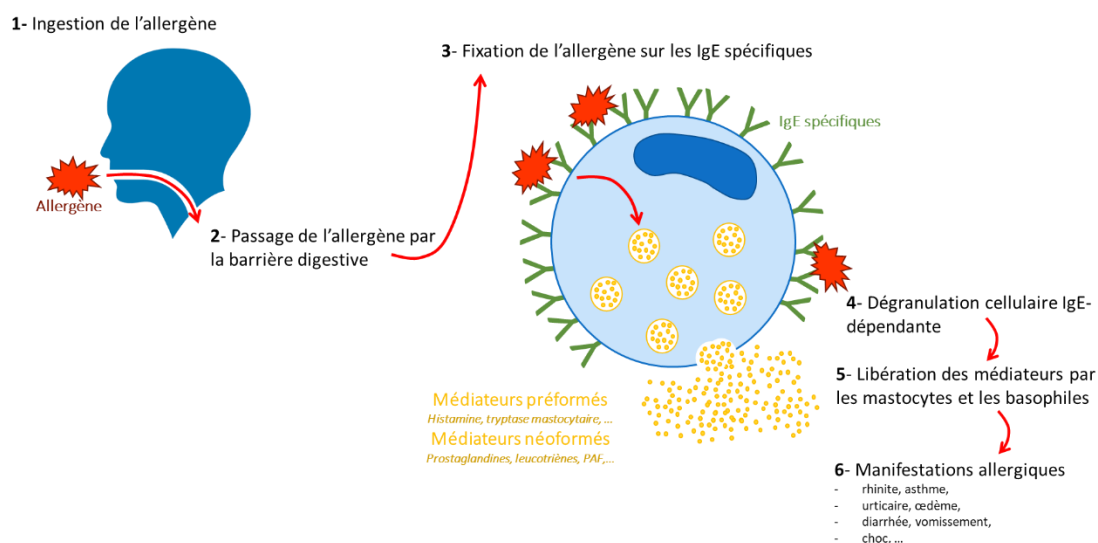


Figure 1. Représentation synthétique des phénomènes liés à l'allergie IgE-dépendante [7].

### 1.2.2. Les allergies non IgE-dépendantes

Les allergies non IgE-indépendantes concernent principalement les enfants et apparaissent plus tardivement, c'est-à-dire dans les heures ou les jours suivants l'ingestion de l'aliment allergène.

Le syndrome de l'entérocolite induite par les protéines alimentaires (SEIPA), la proctocolite allergique, l'entéropathie induite par les protéines alimentaires et la maladie cœliaque se classent parmi les allergies non induites par les IgE qui affectent le système digestif [8].

## 1.2. Les allergènes des produits de la mer

Le vocable « produits de la mer » regroupe de nombreuses espèces de poissons (osseux et cartilagineux), de crustacés et de mollusques marins (Figure 2). Chez les organismes de chacun de ces groupes, on retrouve de nombreux allergènes de nature protéique. Il faut toutefois préciser que les organismes marins peuvent également provoquer des réactions physiologiques défavorables n'étant pas des allergies. Par exemple, on peut citer les empoisonnements par les toxines du poisson-globe ou l'intoxication à l'histamine lors de la consommation de poissons scromboïdes.

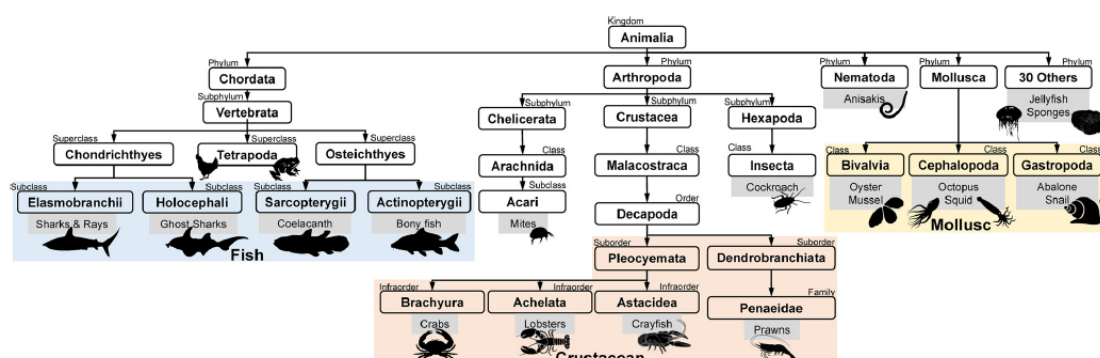


Figure 2. Arbre taxonomique des produits de mer [9].

Le Tableau 1 reprend les principaux allergènes recensés chez les produits de la mer.

Tableau 1. Protéines des produits de la mer impliqués dans des réactions allergiques IgE dépendantes (adapté de [9]).

| PROTEINE                                 | POISSON | CRUSTACES | MOLLUSQUES |
|------------------------------------------|---------|-----------|------------|
| Aldéhyde phosphate déshydrogénase        | X       | -         | -          |
| Aldolase A                               | X       | X         | -          |
| Arginine kinase                          | -       | X         | X          |
| Collagène                                | X       | -         | -          |
| Créatine kinase                          | X       | -         | -          |
| β-éolase                                 | X       | X         | -          |
| Glyceraldéhyde-3-phosphate hydrogénase   | X       | -         | -          |
| Hémocyanine                              | -       | X         | -          |
| Myosine à chaîne légère 1                | -       | X         | -          |
| Myosine à chaîne légère 2                | -       | X         | -          |
| Paramyosine                              | -       | -         | X          |
| <b>α-parvalbumine</b>                    | X       | -         | -          |
| <b>β-parvalbumine</b>                    | X       | -         | -          |
| Protéine sarcoplasmique liant le calcium | -       | X         | -          |
| Triosephosphate isomérase                | X       | X         | X          |
| <b>Tropomyosine</b>                      | X       | X         | X          |
| Troponine C                              | -       | X         | -          |
| Troponine I                              | -       | X         | -          |
| Vitellogénine                            | X       | X         | -          |

#### 1.2.1. Allergènes de poisson

Les allergènes du poisson peuvent provenir de toutes les parties de l'animal, y compris le liquide séminal et le sang [9].

Généralement, les parvalbumines – petites protéines musculaires de 10 à 13 kDa – sont considérées comme les allergènes majeurs du poisson. Présentes chez la plupart des espèces, ces protéines jouent un rôle majeur dans la relaxation du muscle et sont considérées comme extrêmement stables vis-à-vis de la température, de la digestion enzymatique et des procédés de transformation alimentaire [10], [11]. Néanmoins, Kubota et al. (2016) [12] rapportent une diminution de la réactivité allergique des parvalbumines après un traitement de 20 min à 140°C (barème relativement supérieur aux gammes habituellement employées pour la transformation alimentaire).

Les aldolases et la  $\beta$ -énolase, des enzymes, font également partie des allergènes bien connus du poisson. Ces deux protéines semblent présenter une résistance à la chaleur moindre que celle des parvalbumines (perte d'activité enzymatique induite par un chauffage à 90°C au-dessus d'une minute), mais une étude approfondie serait nécessaire pour pouvoir pleinement caractériser leur comportement à la chaleur. Il est ici important de préciser que la dénaturation partielle des protéines n'est pas forcément synonyme de perte d'allergénicité. En effet, les modifications liées à la température peuvent ne pas endommager des sites réactifs pour l'allergie.

Enfin, les tropomyosines, protéines structurales et pan-allergènes<sup>1</sup> chez les crustacés, sont également reconnues comme des allergènes du poisson. Il est intéressant de noter que les tropomyosines constituent la cible des kits de détection d'allergènes de poisson (immunodiffusion) disponibles sur le marché.

#### 1.2.2. Allergènes de crustacés

Les principaux allergènes des crustacés sont les tropomyosines. Ce type de protéine est un pan-allergène, qui plus est avec un très haut degré d'homologie (98%, [13]). Les tropomyosines sont les molécules cibles des kits d'auto-détection des allergènes de crustacés par immunodiffusion. De par leur structure primaire, secondaire et tertiaire, ce sont des molécules très stables, qui résistent bien à la chaleur et conservent leur allergénicité après une exposition à 100°C pendant 20 min [14].

D'autres molécules des crustacés peuvent également causer des réactions allergiques, comme la myosine à chaîne légère ou encore l'hémocyanine, mais elles sont moins représentées.

Il est intéressant de noter qu'un risque élevé de réactivité croisée existe entre les crustacés et les insectes [15], [16]. Déjà bien connu dans les zones où l'utilisation des insectes pour l'alimentation humaine est courante, ce risque doit être pris en compte dès lors que les insectes peuvent être nouvellement introduit dans le régime alimentaire.

#### 1.2.3. Allergènes de mollusques

Comme dans le cas des crustacés, les tropomyosines sont les principaux allergènes des mollusques marins [9].

### 1.3. Le nettoyage des ateliers de la filière

En production alimentaire, les opérations de nettoyage et de désinfection sont particulièrement importantes car elles permettent d'éliminer les contaminants de l'environnement de production.

---

<sup>1</sup> Un pan-allergène est un type de protéine retrouvé chez tous les organismes du groupe considéré.

L'aspect microbiologique de la question est souvent prépondérant (élimination des flores d'altération et des flores pathogènes), cependant, le nettoyage est également crucial pour la gestion du risque allergène. En effet, la présence non désirée d'allergènes résiduels entre deux cycles de production risque de générer des contaminations croisées<sup>2</sup>.

Dans l'industrie agroalimentaire, les procédures de nettoyage des surfaces ouvertes sont classiquement organisées comme suit :

- Pré-lavage (dégrossi) pour éliminer les souillures macroscopiques (ex. écailles, morceaux de chair, antennes et pattes)
- Détergence pour éliminer la souillure non biologique. Cette étape peut être réalisée en deux fois avec une première phase alcaline pour hydrolyser la matière organique et une seconde phase ciblant la matière inorganique (tartre)
- Désinfection avec l'emploi d'un produit biocide visant à inactiver les micro-organismes.

La nature protéique des allergènes induit que leur élimination est réalisée au cours de la détergence. En effet, il n'est pas possible de considérer que les allergènes puissent être détruits lors de la phase de désinfection. Certains produits biocides pourraient, de par leur pH et leur force ionique, dénaturer les molécules allergènes, mais aucune étude scientifique n'a pu mettre en évidence une perte d'allergénicité liée à l'exposition aux produits désinfectants.

L'étude de terrain réalisée lors du projet CLEAN (2020-2021) a montré une forte diversité des pratiques de nettoyage dans les entreprises de la filière « produits de la mer », ce qui peut rendre difficile l'émission de recommandations générales.

#### 1.4.Détection des allergènes

Suite au nettoyage, il est pertinent de réaliser des tests de détection des allergènes pour s'assurer de l'efficacité de la procédure et, le cas échéant, autoriser la reprise de production.

Sur le terrain, les kits à flux latéral (immunodiffusion) sont largement utilisés. Ces dispositifs prêts à l'emploi permettent en effet de détecter les résidus d'allergènes in situ et d'obtenir en quelques minutes un résultat qualitatif (détecté / non détecté) à partir d'une surface, d'une eau de rinçage ou encore d'un échantillon d'aliment. Néanmoins, la qualité des résultats issus de ces kits repose sur celle du plan de prélèvement et de l'échantillonnage. En outre, une vigilance doit être accordée aux possibles perturbations des résultats, par exemple la présence de matière interférente.

D'autres méthodes permettent également la détection des allergènes. La méthode ELISA ainsi que la méthode PCR sont couramment employées, et proposées par des laboratoires spécialisés.

Une discussion sur les différentes méthodes de détection peut être consultée dans le rapport du projet CLEAN.

## 2. DEMARCHE EXPERIMENTALE

### 2.1.Plan expérimental

L'objectif des essais menés dans le cadre du projet CLEANER était de mieux appréhender les effets de différents paramètres sur le nettoyage des allergènes de poisson.

---

<sup>2</sup> Contamination fortuite d'un aliment à un autre via l'environnement de production

Dans un premier temps, un plan d'expérience complet (voir Annexe 1) a permis d'étudier l'effet de la température, du type de détergent, du type de poisson et du type de surface. Sur la base des résultats issus de cette première phase d'autres modalités ont pu être testées.

Tous les essais du projet CLEANER ont suivi ce déroulé :

- Préparation d'une solution encrassante à base de poisson,
- Encrassement des surfaces-modèles,
- Séchage,
- Nettoyage,
- Séchage,
- Contrôle des surfaces (recherche d'allergènes résiduels).

En parallèle de ces essais de nettoyage, une série d'expérimentations ont été menées afin d'évaluer la diffusion des allergènes par les étapes de prélavage à haute pression souvent retrouvées sur le terrain.

## 2.2. Matériel et méthode

### 2.2.1. Surfaces étudiées

La sélection des surfaces étudiées a été réalisée sur la base des conclusions et perspectives du projet CLEAN.

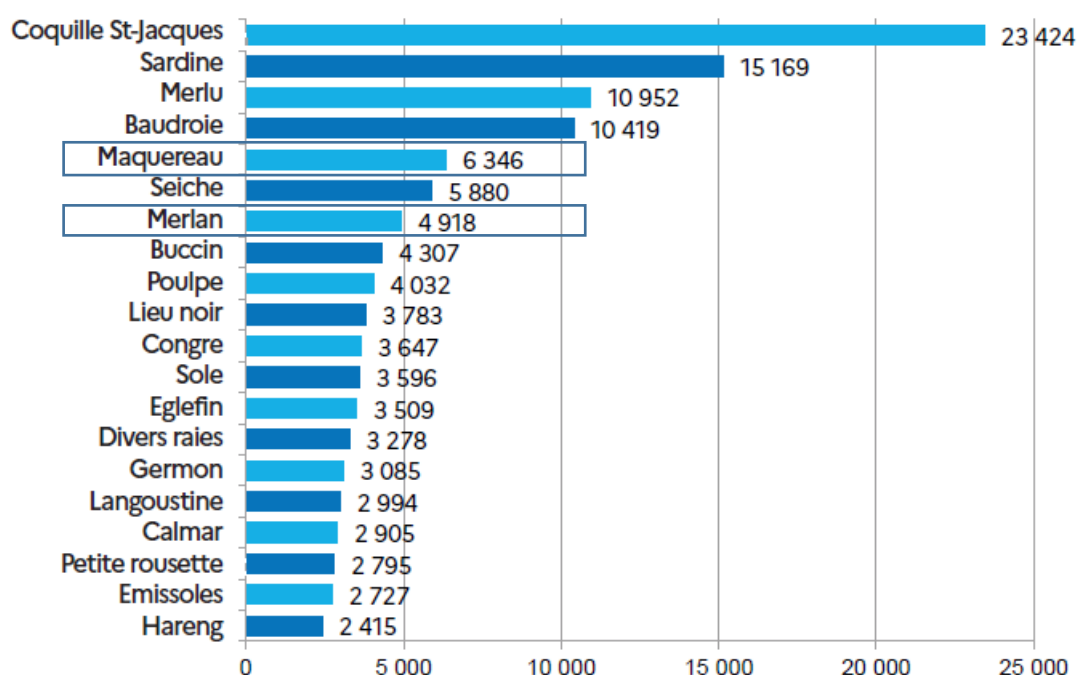
La surface de référence choisie est l'acier inoxydable 316L 2B en coupons plan de 10 cm de côté. Afin de représenter des surfaces plus complexes, moins faciles à nettoyer, des coupons de tapis convoyeurs de différentes sortes ont été employées :

- Tapis monobloc de référence hygiénique, présentant une face lisse (l) et une face crénelée (c) (pour entraînement positif), nommé ci-après « Tapis H » (16.3\*15.2 cm) Bien que dans la pratique, seule la face lisse soit exposée directement aux produits alimentaires, il a semblé intéressant dans la cadre de ce projet d'étudier également la face crénelée.
- Tapis modulaire, formé de modules encastrés et reliés par des pins
  - o Matériau 1, nommé ci-après « Tapis M 1 » (15.3\*15.2 cm)
  - o Matériau 2, nommé ci-après « Tapis M 2 » (15.3\*15.2 cm)

### 2.2.2. Encrassement des surfaces

#### Fabrication des jus de poisson

Le choix des espèces de poisson utilisées pour cette démarche expérimentale a été réalisé en fonction de leur représentativité dans la pêche française (Figure 3), ainsi que pour leur facilité d'approvisionnement sur la majeure partie de l'année.



**Figure 3.** Principales espèces déclarées en halles à marée par les bateaux français en 2021 [17].

Un poisson maigre, le merlan (*Merlangius merlangus*) et un poisson gras, le maquereau (*Scomber scombrus*) ont été achetés entiers, vidés et écaillés en grande surface. Après retrait de la tête et de la queue, les poissons sont grossièrement découpés puis broyés dans un blender professionnel pendant 1 min. Après raclage des parois, le broyage est poursuivi pendant 30 s.

Après dilution des purées dans de l’eau distillée, les suspensions obtenues ont de nouveau été passées au blender pour homogénéisation. Après filtration, les jus obtenus sont aliquotés dans des flacons de 30 ml et conservés au congélateur (-20°C). Une étude ayant montré que les protéines allergisantes du poisson conservaient leur intégrité pendant 112 jours à -20°C, les jus ont été conservés 3 mois au maximum [18]. L’étude ne précise pas si une perte d’allergénicité était constatée au-delà de ce délai, cependant il a semblé judicieux de le respecter.

#### Ajouts dosés

Après décongélation et homogénéisation au vortex, les jus sont ajoutés aux surfaces à raison de 0,1 ml/cm<sup>2</sup>. Après l’ajout, le jus est étalé à l’aide d’un cône de pipette, par dix aller-retour verticaux suivis de dix aller-retours horizontaux, afin de répartir la souillure de façon homogène.

Pour les surfaces à géométrie complexe, des ajustements doivent être réalisés, comme le passage dans les angles des créneaux du tapis H ainsi que la mise en mouvement des parties mobiles des tapis M pendant 10 s (Figure 4).



**Figure 4.** Mise en mouvement des parties mobiles des tapis M, chaque position est tenue pendant 10s.

Selon la méthodologie développée lors du projet CLEAN, cette procédure a été répétée jusqu'à trois fois avec un séchage de 24h entre chaque application selon les modalités d'essai.

### 2.2.3. Nettoyage

#### Essais « Haute pression »

Pour les essais visant à évaluer la dissémination des allergènes dû au prélavage à haute pression, des surfaces d'un mètre carré ont été encrassées comme stipulé ci-dessus (3 couches). Après séchage, l'équivalent d'un pré-lavage de type industriel, c'est-à-dire le balayage de la surface selon des stries verticales puis horizontales a été réalisé à l'aide d'un nettoyeur haute pression (Gloria Multijet ME38513073) jusqu'à l'obtention d'une propreté visuelle. Deux niveaux de pression ont été testés : 46 bar et 25 bar.

#### Essais de nettoyage

Pour ces expérimentations, une procédure standard de type industriel a été reproduite. La première étape consiste à un prélavage suivant la procédure ci-dessus (pression de travail de 25 bars), les différents coupons étant immobilisés sur une pailleasse. Selon les essais, cette procédure a été réalisée une ou deux fois pour évaluer l'effet d'une action mécanique renforcée et de la pré-hydratation de la souillure.

Par la suite, un produit détergent, alcalin chloré ou enzymatique, est appliqué au canon à mousse, suivant les recommandations des fournisseurs en termes de dilution et de temps de contact (Tableau 2). Deux conditions de température ont été testées : 15°C (application « eau froide ») et 50°C (application « eau chaude »).

**Tableau 2.** Barèmes d'application des détergents.

| Formulation    | Concentration | Temps de contact |
|----------------|---------------|------------------|
| Alcalin chloré | 2% (v/v)      | 15 min           |
| Enzymatique    | 3% (v/v)      | 15 min           |

A l'issue du temps de contact, un rinçage à l'eau du réseau (6 bars) est pratiqué, jusqu'à disparition totale de la mousse.

Selon les essais, diverses positions favorables ou défavorables au nettoyage ont été étudiées pour les surfaces complexes. Pour les coupons de tapis H, la position défavorable consistait à orienter les créneaux de façon perpendiculaire au jet afin de créer des « zones d'ombre », moins accessibles. La position favorable consistait à orienter les créneaux de façon parallèle au jet. Pour les tapis M, la position défavorable consistait à les disposer à plat, mailles fermées, tandis que la position favorable présentait les mailles ouvertes.

Chaque essai contenait trois réplicats techniques par condition.

#### 2.2.4. Détection des allergènes

Pour les essais « haute pression », des surfaces de 10 cm<sup>2</sup> ont été écouvillonnées dans le local d'essai (murs, sol, équipements à proximité) après application de la haute pression. A l'issue des tests de nettoyage, les coupons ont été séchés à l'air libre pendant une heure, puis écouvillonnés. Les prélèvements ont été réalisés en suivant les bonnes pratiques décrites dans le guide diffusé par le RMT CHLEAN et l'ACTIA en 2021 [19]. Les surfaces sont écouvillonnées en 10 passages horizontaux, verticaux et en diagonale. Pour certains essais, un écouvillonnage séparé des zones facilement accessibles et peu accessibles des tapis M a été réalisé.

La détection des allergènes est réalisée sur la base de ces écouvillonnages, via des kits prêts à l'emploi (détection rapide par immunodiffusion). La fiche technique de la référence utilisée est disponible en Annexe 2. Comme précisé précédemment, le type de test permet l'obtention d'un résultat qualitatif. Afin de donner plus de nuances à l'interprétation, quatre catégories de résultat ont été différenciées en fonction de l'intensité de la coloration de la bande positive ( Figure 5): non détection (-), faible détection (-+), détection (+), forte détection (++)

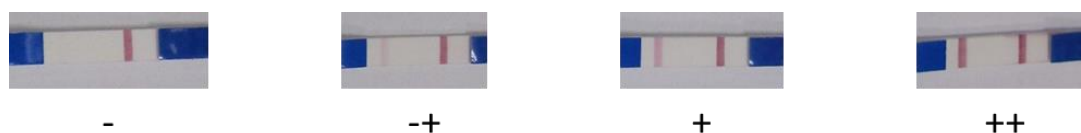
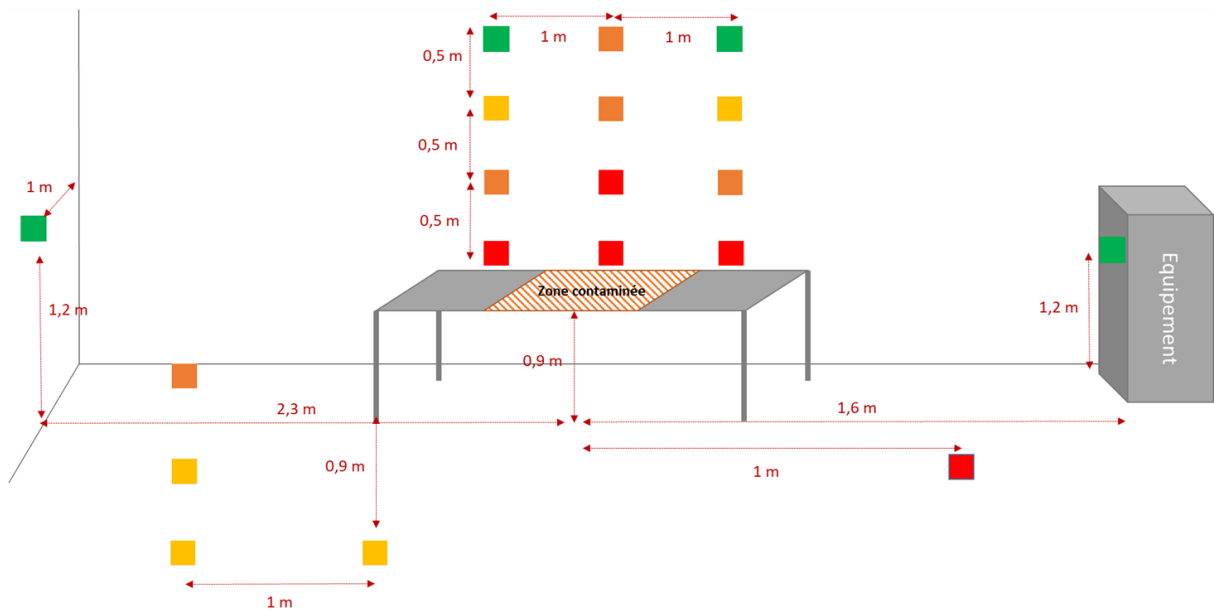


Figure 5. Catégories de résultats.

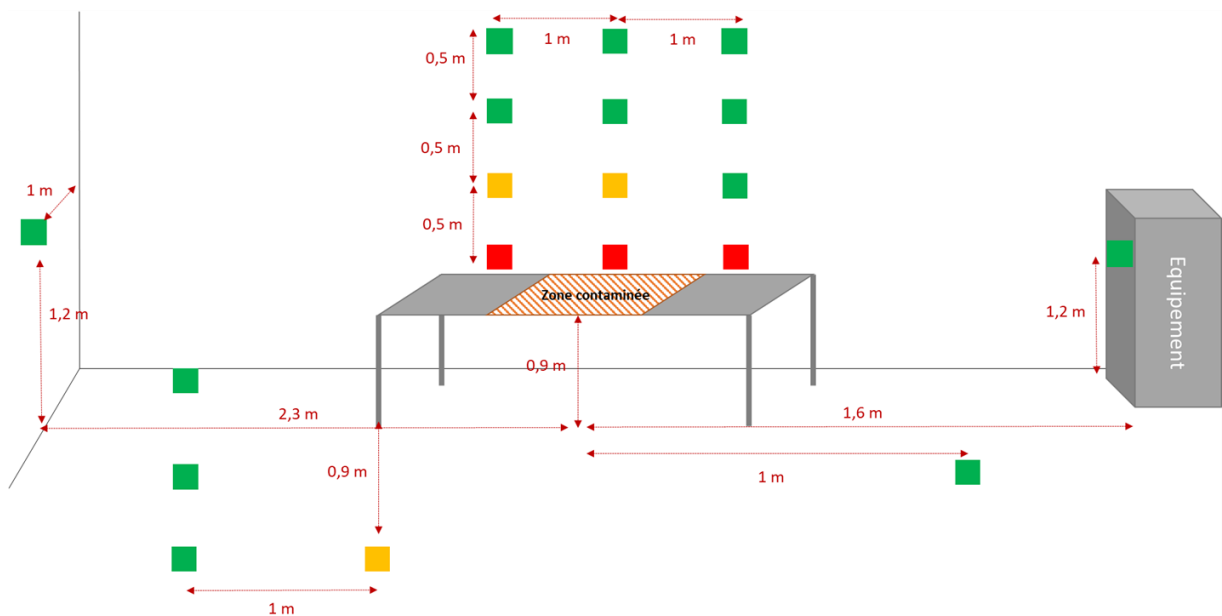
### 3. RESULTATS

#### 3.1. Haute pression

L'analyse de surfaces placées à différentes distances de la zone encrassée et prélevée à différentes pressions a permis de réaliser une cartographie de la dissémination des allergènes. La Figure 6 et la Figure 7 présentent les résultats obtenus. La couleur verte signifie une absence de détection, la couleur jaune une présence faible, la couleur orange une présence normale et la couleur rouge une présence forte.



**Figure 6. Représentation schématique des résultats de recherche d'allergènes suite à un prélavage à 46 bars.**



**Figure 7. Représentation schématique des résultats de recherche d'allergènes suite à un prélavage à 25 bars.**

Les essais réalisés ont permis de mettre en évidence une diffusion des allergènes lors d'un pré-lavage par haute pression, dans un rayon d'un mètre pour une pression de 45 bar et dans un rayon de 50 cm pour une pression de 25 bar.

### 3.2. Nettoyage des allergènes

#### 3.2.1. Plan d'expérience complet

Le plan d'expérience complet (Annexe 1) a permis de comparer le nettoyage des différentes surfaces avec différentes modalités. Dans un premier temps, trois couches d'encrassement ont été réalisées sur tous les coupons.

Sur les coupons d'inox, matériau de référence en agroalimentaire, on observe une différence d'efficacité de nettoyage liée à la présence de matière grasse à froid. En effet, les coupons contaminés au poisson gras présentent de moins bons résultats que les coupons inoculés au poisson maigre à 15°C. En revanche, à chaud (50°C), tous les coupons d'inox présentent un nettoyage satisfaisant avec une absence de détection des allergènes de poisson (Tableau 3). Les essais menés sur le tapis H du côté lisse (l) on conduit, à des conclusions similaires avec des résultats de légère détection d'allergènes résiduels à 15°C avec inoculation au poisson gras. Les autres modalités ont donné des résultats satisfaisant avec absence de détection. Ces essais n'ont pas permis de mettre en évidence un effet de type de détergent sur les résultats de nettoyage

**Tableau 3. Détection d'allergènes résiduels après nettoyage sur surfaces lisses (inox et tapis H (l)).**

| Surface     | Poisson | Détergent   | Température | Résultat |
|-------------|---------|-------------|-------------|----------|
| Inox        | Gras    | Chloré      | 50°C        | -        |
| Inox        | Gras    | Chloré      | 15°C        | +        |
| Inox        | Gras    | Enzymatique | 50°C        | -        |
| Inox        | Gras    | Enzymatique | 15°C        | -+       |
| Inox        | Maigre  | Chloré      | 50°C        | -        |
| Inox        | Maigre  | Chloré      | 15°C        | -        |
| Inox        | Maigre  | Enzymatique | 50°C        | -        |
| Inox        | Maigre  | Enzymatique | 15°C        | -        |
| Tapis H (l) | Gras    | Chloré      | 50°C        | -        |
| Tapis H (l) | Gras    | Chloré      | 15°C        | -+       |
| Tapis H (l) | Gras    | Enzymatique | 50°C        | -        |
| Tapis H (l) | Gras    | Enzymatique | 15°C        | -+       |
| Tapis H (l) | Maigre  | Chloré      | 50°C        | -        |
| Tapis H (l) | Maigre  | Chloré      | 15°C        | -        |
| Tapis H (l) | Maigre  | Enzymatique | 50°C        | -        |
| Tapis H (l) | Maigre  | Enzymatique | 15°C        | -        |

Les essais menés sur les tapis modulaires présentent à des détections systématiques d'allergènes résiduels post-nettoyage (de détection normale à forte détection) quelles que soient les conditions opératoires. Dans ce cas de figure, l'hypothèse prioritaire met en cause la géométrie des coupons, avec des zones inter-modulaires peu accessibles au nettoyage.

La suite des expérimentations a eu pour but d'approfondir les résultats de cette première phase, à savoir d'étudier :

- L'effet du positionnement des surfaces complexes
- L'effet de la zone échantillonnée
- L'effet d'un renforcement de l'action mécanique
- L'effet de l'intensité de la souillure initiale

Le changement de position des surfaces complexes (tapis H côté crénelé (c) et tapis M) a permis d'obtenir une légère amélioration des résultats de nettoyage sur le tapis H, avec une diminution de la détection d'allergènes résiduels : absence de détection avec le poisson maigre quels que soient le détergent et la température ; et détection faible avec le poisson gras dans les mêmes conditions (Tableau 4).

**Tableau 4. Détection d'allergènes sur les tapis H (c) après nettoyage en position favorable et défavorable.**

| Surface | Poisson | Détergent   | Température | Position défavorable | Position favorable |
|---------|---------|-------------|-------------|----------------------|--------------------|
| Tapis H | Maigre  | Enzymatique | 15°C        | -                    | -                  |
| Tapis H | Maigre  | Enzymatique | 50°C        | -                    | -                  |
| Tapis H | Maigre  | Chloré      | 15°C        | -+                   | -                  |
| Tapis H | Maigre  | Chloré      | 50°C        | -                    | -                  |
| Tapis H | Gras    | Enzymatique | 15°C        | +                    | -+                 |
| Tapis H | Gras    | Enzymatique | 50°C        | +                    | -+                 |
| Tapis H | Gras    | Chloré      | 15°C        | +                    | -+                 |
| Tapis H | Gras    | Chloré      | 50°C        | +                    | -+                 |

En revanche, l'ouverture des mailles des tapis M n'a pas permis d'obtenir une amélioration des résultats de détection d'allergènes résiduels. Cela est probablement dû au fait que, malgré l'augmentation de la surface accessible au nettoyage, la proportion de surface « cachée » reste suffisante pour entraîner une détection normale à forte des allergènes.

L'écouvillonnage différentiel des surfaces visibles et cachées des tapis modulaires après nettoyage en position favorable a pu donner des renseignements à ce sujet. En effet, pour les deux modèles de tapis M, les surfaces visibles ont présenté des résultats améliorés, allant de l'absence de détection à une faible détection avec une souillure de poisson maigre (Tableau 5). Les résultats obtenus dans les mêmes conditions avec une souillure de poisson gras étaient moins satisfaisants (détection faible à normale). En revanche, les tests réalisés sur les surfaces cachées révèlent des résultats qualitativement moins bons avec une majorité de détection normale à forte.

**Tableau 5. Détection d'allergènes sur les tapis M après nettoyage sur les zones visibles et les zones cachées.**

| Surface   | Poisson | Détergent   | Température | Zone visible | Zone cachée |
|-----------|---------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| Tapis M 1 | Maigre  | Enzymatique | 15°C        | -            | ++          |
| Tapis M 1 | Maigre  | Enzymatique | 50°C        | -+           | ++          |
| Tapis M 1 | Maigre  | Chloré      | 15°C        | -            | ++          |
| Tapis M 1 | Maigre  | Chloré      | 50°C        | -            | ++          |
| Tapis M 1 | Gras    | Enzymatique | 15°C        | -+           | +           |
| Tapis M 1 | Gras    | Enzymatique | 50°C        | -+           | -+          |
| Tapis M 1 | Gras    | Chloré      | 15°C        | -+           | -+          |
| Tapis M 1 | Gras    | Chloré      | 50°C        | -+           | +           |
| Tapis M 2 | Maigre  | Enzymatique | 15°C        | -            | ++          |
| Tapis M 2 | Maigre  | Enzymatique | 50°C        | -+           | ++          |
| Tapis M 2 | Maigre  | Chloré      | 15°C        | -            | +           |
| Tapis M 2 | Maigre  | Chloré      | 50°C        | -+           | ++          |
| Tapis M 2 | Gras    | Enzymatique | 15°C        | +            | +           |
| Tapis M 2 | Gras    | Enzymatique | 50°C        | +            | +           |
| Tapis M 2 | Gras    | Chloré      | 15°C        | +            | +           |
| Tapis M 2 | Gras    | Chloré      | 50°C        | +            | +           |

Afin d'explorer un possible effet de la pré-hydratation des souillures et d'un renforcement de l'action mécanique, des essais ont été menés en doublant l'étape de prélavage (Tableau 6). Dans les cas du

tapis H (c), ce doublement n'a pas permis d'amélioration notable sur le nettoyage du poisson gras, hormis à chaud avec usage du détergent alcalin chloré. Sur les tapis M encrassés avec du poisson maigre, aucun changement n'a été observé suite au doublement du prélavage (détection forte dans tous les cas). Avec encrassement au poisson gras, les résultats sont plus ardues à interpréter et paraissent dans certains cas incohérents (meilleurs résultats à froid qu'à chaud). Une hypothèse est que le biais opérateur lié au prélavage manuel est ici cause de ce constat.

**Tableau 6. Détection d'allergènes après nettoyage dans le cas d'un prélavage unique ou d'un double prélavage.**

| Surface     | Poisson | Détergent   | Température | Simple | Double |
|-------------|---------|-------------|-------------|--------|--------|
| Tapis H (c) | Maigre  | Enzymatique | 15°C        | -      | -      |
| Tapis H (c) | Maigre  | Enzymatique | 50°C        | -      | -      |
| Tapis H (c) | Maigre  | Chloré      | 15°C        | -      | -      |
| Tapis H (c) | Maigre  | Chloré      | 50°C        | -      | -      |
| Tapis H (c) | Gras    | Enzymatique | 15°C        | -+     | -+     |
| Tapis H (c) | Gras    | Enzymatique | 50°C        | -+     | -+     |
| Tapis H (c) | Gras    | Chloré      | 15°C        | -+     | -+     |
| Tapis H (c) | Gras    | Chloré      | 50°C        | -+     | -      |
| Tapis M 1   | Maigre  | Enzymatique | 15°C        | ++     | ++     |
| Tapis M 1   | Maigre  | Enzymatique | 50°C        | ++     | ++     |
| Tapis M 1   | Maigre  | Chloré      | 15°C        | ++     | ++     |
| Tapis M 1   | Maigre  | Chloré      | 50°C        | ++     | ++     |
| Tapis M 1   | Gras    | Enzymatique | 15°C        | +      | -+     |
| Tapis M 1   | Gras    | Enzymatique | 50°C        | +      | +      |
| Tapis M 1   | Gras    | Chloré      | 15°C        | +      | +      |
| Tapis M 1   | Gras    | Chloré      | 50°C        | +      | +      |
| Tapis M 2   | Maigre  | Enzymatique | 15°C        | ++     | ++     |
| Tapis M 2   | Maigre  | Enzymatique | 50°C        | ++     | ++     |
| Tapis M 2   | Maigre  | Chloré      | 15°C        | ++     | ++     |
| Tapis M 2   | Maigre  | Chloré      | 50°C        | ++     | ++     |
| Tapis M 2   | Gras    | Enzymatique | 15°C        | +      | -+     |
| Tapis M 2   | Gras    | Enzymatique | 50°C        | +      | +      |
| Tapis M 2   | Gras    | Chloré      | 15°C        | +      | -+     |
| Tapis M 2   | Gras    | Chloré      | 50°C        | +      | -+     |

L'effet d'une variation de l'intensité de l'encrassement (1 ou 2 couches, espacées d'un séchage d'une nuit) a également été étudiée sur les tapis modulaires. Dans un certain nombre des cas, l'intensité de l'encrassement n'a pas eu d'impact important sur la détection des allergènes post-nettoyage.

| Surface   | Poisson | Détergent   | Température | 1 couche | 2 couches |
|-----------|---------|-------------|-------------|----------|-----------|
| Tapis M 1 | Maigre  | Enzymatique | 15°C        | ++       | +         |
| Tapis M 1 | Maigre  | Enzymatique | 50°C        | ++       | ++        |
| Tapis M 1 | Maigre  | Chloré      | 15°C        | ++       | ++        |
| Tapis M 1 | Maigre  | Chloré      | 50°C        | ++       | ++        |
| Tapis M 1 | Gras    | Enzymatique | 15°C        | -+       | -+        |
| Tapis M 1 | Gras    | Enzymatique | 50°C        | -        | -+        |
| Tapis M 1 | Gras    | Chloré      | 15°C        | -        | -         |
| Tapis M 1 | Gras    | Chloré      | 50°C        | -        | +         |
| Tapis M 2 | Maigre  | Enzymatique | 15°C        | ++       | ++        |
| Tapis M 2 | Maigre  | Enzymatique | 50°C        | ++       | ++        |
| Tapis M 2 | Maigre  | Chloré      | 15°C        | ++       | ++        |
| Tapis M 2 | Maigre  | Chloré      | 50°C        | ++       | ++        |
| Tapis M 2 | Gras    | Enzymatique | 15°C        | -+       | ++        |
| Tapis M 2 | Gras    | Enzymatique | 50°C        | +        | ++        |
| Tapis M 2 | Gras    | Chloré      | 15°C        | ++       | ++        |
| Tapis M 2 | Gras    | Chloré      | 50°C        | ++       | ++        |

Il paraît difficile de conclure sur l'effet exact du niveau d'encrassement, en revanche, il apparaît que la réduction du niveau de souillure ne permet pas d'obtenir un nettoyage satisfaisant dans toutes les conditions.

#### 4. DISCUSSION

Les essais expérimentaux menés dans le projet CLEANER ainsi que les acquis du projet CLEAN ont permis d'étudier l'élimination des allergènes de produits aquatiques par le nettoyage dans différents cas de figure. Cette discussion a pour objectif de dégager des recommandations à destination des professionnels.

En premier lieu, il est important de rappeler que la maîtrise des contaminations croisées en allergènes doit impérativement passer par l'intégration de ce danger dans la démarche HACCP mis en place au sein de l'entreprise [20]. Cela permet, de façon systématique et sur la base des diagrammes de production et de flux, d'identifier les potentiels croisements entre aliments avec et sans allergènes et de pouvoir, dans chacun des cas, d'identifier les points critiques pour la maîtrise (CCP) afin de mettre en place des moyens de maîtrise adaptés. Dans les cas où le risque ne pourrait pas être ramené à un niveau acceptable, cette démarche permet également de bien expliciter les raisons de l'impossibilité de maîtrise, pouvant justifier, le cas échéant, l'emploi d'un étiquetage de précaution.

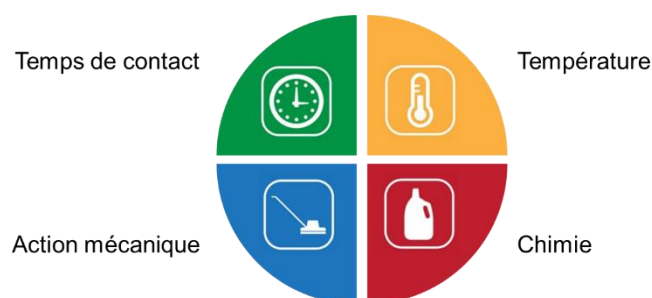
En parallèle, un certain nombre de « bonnes pratiques » générales sont propices à la réduction du risque de contamination fortuite. Par exemple, la séparation spatiale ou temporelle des productions et moyens de production (stockage, transformation, petit matériel, petit matériel de nettoyage, équipement du personnel) de lots avec et sans allergènes peut, lorsqu'elle est possible, permettre une bonne maîtrise du risque [21]. L'ordonnancement de la production a également un rôle important dans ce cadre, avec production des lots sans allergènes avant les lots avec allergènes.

Le nettoyage constitue quant à lui, lorsqu'il est réalisé dans de bonnes conditions, un levier puissant pour la maîtrise du risque de contamination fortuite par les allergènes. En amont, la qualification de la

procédure employée vis-à-vis de l'élimination des allergènes ciblés issus d'une matrice définie, est essentielle. Cette qualification revient à faire la preuve que, dans les conditions d'usage, le nettoyage est efficace pour atteindre un niveau de propreté prédéfini. On retrouve ici la notion de seuil technologique, qui en l'absence de cadre réglementaire, correspondra par défaut à la limite de détection de la méthode de contrôle usitée.

La première étape est donc de définir ce seuil de propreté puis de mener des essais de nettoyage afin d'en évaluer l'efficacité. Afin que ces essais et leur résultat soient pertinents, il convient de les réaliser dans un cadre strict.

Définition et documentation des différentes étapes (TACT, Figure 8) de la procédure.



**Figure 8. TACT.**

Les résultats expérimentaux montrent qu'il est essentiel d'adapter le TACT au cas de figure considéré. En effet, la présence de matière interférente telle que la matière grasse peut perturber l'élimination des allergènes et demander un ajustement de paramètres, notamment de la température. On a ainsi montré que l'élimination des allergènes en présence de matière grasse peut nécessiter une température plus élevée.

De plus, la géométrie des surfaces et des équipements peut faciliter ou compliquer le nettoyage. La notion de conception hygiénique (équipements conçus de façon à limiter la rétention de souillure et à faciliter le N&D) prend dès lors une importance certaine. En effet, outre le gain d'efficacité d'élimination des contaminants, une installation bien conçue permet de réduire significativement le temps et les coûts de nettoyage.

Dans le cas d'un équipement préexistant présentant une géométrie peu propice au nettoyage, il est recommandé d'adapter les modalités de nettoyage (orientation du jet par rapport aux obstacles, démontage partiel, action mécanique manuelle ciblée) afin de garantir de bons résultats. Sur ce type d'équipement, il est important de repérer les zones correspondant aux cas les plus défavorables afin de les employer comme points de contrôle (voir ci-dessous).

L'action mécanique, souvent apportée sur les surfaces ouvertes par l'utilisation de jets à haute pression, joue un rôle certain dans l'amélioration des performances de nettoyage via l'élimination des souillures macroscopiques. Cependant, les essais réalisés ont montré que cette pratique peut également être vectrice de contamination via la génération d'un aérosol chargé en allergènes. Le périmètre de dissémination dépend de la pression employée. Il est donc important de prévenir le risque de recontamination, par exemple en protégeant les équipements sensibles ou en les déplaçant. En cas de doute, le contrôle des surfaces avec détection d'allergènes peut constituer une sécurité supplémentaire.

Acquisition des résultats pour la qualification du nettoyage

Afin de pouvoir déterminer le niveau de propreté post-nettoyage et le comparer au seuil préalablement défini, il est nécessaire de contrôler les surfaces pour détecter la présence d'allergènes résiduels.

La qualité des résultats obtenus dépend directement de la rigueur et de la pertinence des processus de prélèvement et d'analyse ainsi que de l'adéquation de la méthode employée avec le cas d'usage.

La localisation ainsi que la fréquence des prélèvements doivent être définis en amont. Les points de prélèvements devront correspondre aux cas les plus défavorables pour le nettoyage. En effet, les résultats expérimentaux ont montré que les zones peu accessibles étaient plus susceptibles de retenir les allergènes, à nettoyage égal. Ces zones doivent donc faire foi du succès ou de l'échec de la procédure de nettoyage. La méthode d'écouvillonnage doit également faire l'objet d'une attention particulière. Le RMT CHLEAN a récemment publié un guide des prélèvements de surface à destination des industries agroalimentaires [19]. Centré sur les analyses microbiologiques, ce guide peut toutefois servir de référence pour le prélèvement des allergènes.

Dans le cas d'autocontrôles, les kits prêts à l'emploi de type flux latéral (immunodiffusion) sont largement usités. Prisés pour leur coût relativement faible et la rapidité d'obtention des résultats, ces kits doivent cependant être choisis avec soin. Une lecture attentive de la fiche technique, et le cas échéant une discussion avec le fournisseur sont recommandées. En effet, des éléments clés tels que la ou les molécules détectées, la limite de détection ou la sensibilité à une matière interférente doivent être connus avant utilisation. Dans le cas de contrôles par prestation, la traçabilité des échantillons avant et après envoi est primordiale. Il est également recommandé de choisir des prestataires présentant des garanties de qualité (accréditation COFRAC par exemple).

#### Lecture des résultats et suites

La lecture des résultats doit être réalisée dans un cadre prédéfini. Un résultat négatif ne signifie en aucun cas l'absence totale d'allergènes résiduels, mais une absence de détection. En d'autres termes, des allergènes peuvent être présents dans l'échantillon mais dans une quantité inférieure à la limite de détection. Un résultat négatif est cependant usuellement considéré comme satisfaisant et autorise la reprise de production (dans le cas de contrôles post-nettoyage) ou la commercialisation du lot analysé (dans le cas de contrôles sur le produit).

Un résultat positif indique la détection d'allergène dans l'échantillon dans une quantité supérieure à la limite de détection. En l'absence de seuils réglementaires, ce type de résultat est considéré comme insatisfaisant et conduit à des actions curatives : renouvellement du nettoyage, élimination de tout ou partie du lot de production...

Dans le cadre d'une qualification de procédure de N&D, ces résultats doivent être soigneusement consignés et interprétés. Ils permettent en effet soit l'adoption de la méthodologie en cas de succès ou la modification du TACT en cas d'échec.

Les résultats des contrôles « de routine » doivent également faire l'objet d'un archivage, car ils permettent sur le long terme d'évaluer l'adéquation des pratiques avec les résultats recherchés. Cet historique constitue une base de données pouvant être utilisée lors des audits.

Une fois les procédures de nettoyage et de contrôles bien définies, il est essentiel :

- De s'assurer de leur bonne réalisation via une surveillance et des enregistrements
- De permettre au personnel en charge de ces opérations de les réaliser dans de bonnes conditions (temps alloué suffisant, mise à disposition d'équipement en bon état et des

équipements de protection individuelle (EPI), sensibilisation au danger allergène, formation et fourniture de documents de référence).

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le projet CLEANER a permis, à la suite du projet CLEAN, d'étudier le nettoyage des allergènes dans la filière des produits aquatiques.

Les essais menés en halle technologiques ont permis d'approfondir les connaissances sur la diffusion des allergènes par l'emploi de la haute pression ainsi que d'identifier les points-clés permettant un nettoyage des allergènes de la meilleure qualité possible.

En résumé, il convient :

- De qualifier soigneusement les procédures de nettoyage au regard des allergènes
- D'adapter le TACT à la situation rencontrée (présence de matière interférente, géométrie peu nettoyable...)
- De veiller à la régularité des nettoyages et à l'observance stricte du TACT
- D'identifier par avance les points critiques du nettoyage
- De mettre en place des contrôles réguliers et pertinents
- De correctement dimensionner les créneaux et les équipes affectées au N&D

Ces notions sont regroupées dans une fiche pratique (Annexe 3), destinée à être diffusée par le pôle AQUIMER.

A l'issue de ce projet, des perspectives restent ouvertes. D'un point de vue général, il apparaît que la détermination de seuils réglementaires d'étiquetage (comme il en existe pour le gluten et les sulfites) permettrait d'harmoniser les pratiques d'étiquetage parmi les professionnels. L'intégration de tels seuils dans les démarches HACCP permettrait également une maîtrise du risque de contamination plus étayée. La détermination de ces seuils nécessite cependant qu'un nombre suffisant de données cliniques soient disponibles. Concernant les produits aquatiques, notamment les mollusques, un effort de recherche clinique devrait donc être entrepris. De plus, les instances compétentes doivent également être saisies de la problématique, et cela ne peut s'effectuer que par de nombreuses remontées de la part des professionnels, des organisations interprofessionnelles et des structures de recherche.

D'autre part, l'étude du devenir des allergènes pendant les transformations agroalimentaires et les procédés de nettoyage, d'un point de vue biochimique et allergénique mériterait d'être étudiée. Cela permettrait, le cas échéant, d'identifier de nouvelles mesures de maîtrise du danger allergène.

Enfin, il semble également intéressant de développer des méthodes standardisées de qualification de la détergence, analogues aux méthodes de validation des activités biocides, afin de mieux encadrer les pratiques.

## ANNEXE 1 : Plan d'expérience complet

| Condition | Matériau  | Poisson | Détergent   | N&D  |
|-----------|-----------|---------|-------------|------|
| 1         | Inox      | Gras    | Chloré      | 50°C |
| 2         | Inox      | Gras    | Chloré      | 15°C |
| 3         | Inox      | Gras    | Enzymatique | 50°C |
| 4         | Inox      | Gras    | Enzymatique | 15°C |
| 5         | Inox      | Maigre  | Chloré      | 50°C |
| 6         | Inox      | Maigre  | Chloré      | 15°C |
| 7         | Inox      | Maigre  | Enzymatique | 50°C |
| 8         | Inox      | Maigre  | Enzymatique | 15°C |
| 9         | Tapis H   | Gras    | Chloré      | 50°C |
| 10        | Tapis H   | Gras    | Chloré      | 15°C |
| 11        | Tapis H   | Gras    | Enzymatique | 50°C |
| 12        | Tapis H   | Gras    | Enzymatique | 15°C |
| 13        | Tapis H   | Maigre  | Chloré      | 50°C |
| 14        | Tapis H   | Maigre  | Chloré      | 15°C |
| 15        | Tapis H   | Maigre  | Enzymatique | 50°C |
| 16        | Tapis H   | Maigre  | Enzymatique | 15°C |
| 17        | Tapis M 1 | Gras    | Chloré      | 50°C |
| 18        | Tapis M 1 | Gras    | Chloré      | 15°C |
| 19        | Tapis M 1 | Gras    | Enzymatique | 50°C |
| 20        | Tapis M 1 | Gras    | Enzymatique | 15°C |
| 21        | Tapis M 1 | Maigre  | Chloré      | 50°C |
| 22        | Tapis M 1 | Maigre  | Chloré      | 15°C |
| 23        | Tapis M 1 | Maigre  | Enzymatique | 50°C |
| 24        | Tapis M 1 | Maigre  | Enzymatique | 15°C |
| 25        | Tapis M 2 | Gras    | Chloré      | 50°C |
| 26        | Tapis M 2 | Gras    | Chloré      | 15°C |
| 27        | Tapis M 2 | Gras    | Enzymatique | 50°C |
| 28        | Tapis M 2 | Gras    | Enzymatique | 15°C |
| 29        | Tapis M 2 | Maigre  | Chloré      | 50°C |
| 30        | Tapis M 2 | Maigre  | Chloré      | 15°C |
| 31        | Tapis M 2 | Maigre  | Enzymatique | 50°C |
| 32        | Tapis M 2 | Maigre  | Enzymatique | 15°C |

## ANNEXE 2 : Fiche technique des kits Disp&Flow Poisson (Biotem)



IFU-BIO.032.1-FRv20200427

Page: 1/2

### Disp&FLOW® – Poisson

Test rapide de détection de protéine spécifique

N° cat. : BIO.032.1

Nombre de test : 1



Test immuno-chromatographique rapide pour la détermination qualitative de l'antigène spécifique du poisson présent dans les aliments, la cuisine et les installations de production de denrées alimentaires.

Le test Disp&FLOW – Poisson a été conçu pour la détection de l'antigène cible dans deux grands types de spécimens :

1. **Les échantillons solides** à base de nourriture / produits alimentaires solides / ustensiles de cuisine / surface techniques dédiées à la découpe, au traitement et au stockage des produits alimentaires.
2. **Les échantillons liquides** de types : potages ; boissons ; eaux de rinçage des outils de préparation des aliments, eaux de rinçage des ustensiles de cuisine.

Disp&FLOW – Poisson peut être également utilisé pour s'assurer des conditions de stockage et de conservation du poisson. Il permet en effet de détecter la fuite de l'antigène spécifique du poisson sur la surface et les contenants, synonyme de rupture de la chaîne du froid et donc d'une probable avarie de l'aliment à base de poisson.

### Principe de fonctionnement

Les protéines de poisson sont parmi les principaux allergènes alimentaires. En raison de l'utilisation accrue des fruits de mer dans l'industrie agroalimentaire, les consommateurs allergiques au poisson prennent de plus en plus de risques de réactions graves, voire mortelles, en raison du mauvais étiquetage des produits. La présence potentielle des allergènes alimentaires doit obligatoirement être indiquée sur l'emballage.

Ce test est basé sur le principe de l'immuno-chromatographie rapide sur bandelette (migration à flux latéral ou *lateral flow*). L'antigène cible (muscle strié du poisson) présent dans l'échantillon est absorbé par la bandelette puis est reconnu par des anticorps spécifiques conjugués à des microparticules colorées et libres de se déplacer ; une fois formé, ce complexe migre le long de la bandelette jusqu'à une zone très focalisée où il va rencontrer un autre anticorps spécifique fixé au support. L'accumulation des microparticules forme rapidement une ligne colorée qui indique un résultat positif. La présence d'une seconde ligne témoin garantit le bon fonctionnement du test.

### Spécificité et sensibilité du test

Disp&FLOW – Poisson utilise une combinaison unique d'anticorps qui permet de détecter un antigène commun présent chez TOUS les poissons vertébrés.

Disp&FLOW – Poisson détecte aussi un antigène présent chez les poissons cartilagineux (requins et les esturgeons), mais avec une sensibilité nettement moindre.

Disp&FLOW – Poisson ne détecte pas les antigènes des fruits de mer, ainsi que ceux des crevettes, du homard et du crabe. Des données détaillées et actualisées sur la spécificité du test Disp&FLOW – Poisson peuvent être demandées sur notre messagerie [info@biotem.fr](mailto:info@biotem.fr).

La sensibilité du test Disp&FLOW – Poisson est de 1 milligramme par kilogramme dans les préparations alimentaires

Disp&FLOW®

solides et de 1 milligramme par litre dans les préparations alimentaires solides ou liquides (1ppm).

Cette valeur est néanmoins variable en fonction des différentes espèces testées (ex : 5ng/ml pour l'espèce gadus (morue)).

La sensibilité du test Disp&FLOW – Poisson peut être aussi influencée par la dilution de la préparation, l'échauffement préalable de la matière à tester et par sa teneur en matières grasses.

Si le résultat du test est une ligne faiblement colorée ou difficilement interprétable, BIOTEM recommande de tester de nouveau l'échantillon avec une méthode différente, de type ELISA quantitatif ou PCR.

Lorsque le test Disp&FLOW – Poisson est utilisé sur des homogénats apparents de poisson ou du jus/bouillon/soupe de poisson, le test peut montrer un résultat paradoxalement négatif en raison d'une concentration d'antigène trop importante (phénomène de l'effet Hook). Dans ce cas, tester de nouveau l'échantillon, en réalisant une dilution préalable.

### Contenu du kit

Le test Disp&FLOW – Poisson contient les éléments suivants :

- Une bandelette-test emballée dans un sachet aluminium contenant un dessiccant et hermétiquement scellé.
- Un écouvillon de prélèvement d'échantillon.
- Un tube-test en polypropylène contenant 3 mL de tampon d'extraction permettant la préparation de l'échantillon et l'étape de migration du test.
- Une pipette de transfert.
- Une notice d'utilisation.

### Conservation et stabilité

- Le kit doit être conservé entre +18 et +25°C en atmosphère sèche et à l'abri de l'exposition du soleil.
- **Les bandelettes ne doivent pas être congelées et se conservent dans leur sachet hermétiquement fermé.**
- Le kit doit être utilisé avant la date de péremption indiquée sur l'emballage.

### Matériel nécessaire mais non fourni

- Spatule de prélèvement, de préférence à usage unique.
- Paire de gants.

### Précautions

- Les composants du kit sont à usage *in vitro* uniquement.
- Le kit peut être utilisé jusqu'à sa date de péremption s'il a été conservé dans les conditions indiquées dans cette notice.
- Ne pas utiliser le test au-delà de sa date de péremption.
- Les sachets thermo-scellés contenant les bandelettes doivent être conservés à température ambiante (entre +18 et +25°C).
- Toutes les manipulations liées à l'utilisation de ce test doivent être effectuées dans le respect strict des conditions de non-contamination des échantillons ; en particulier, porter des gants pendant la manipulation.
- Les bandelettes doivent être manipulées par leur partie supérieure de couleur. Ne pas toucher directement la partie centrale de la bandelette composée de nitrocellulose ni son extrémité absorbante.
- **Les bandelettes doivent être conservées dans leur sachet hermétiquement fermé** (les bandelettes sont très sensibles à l'humidité) – ne pas utiliser une bandelette plus de 10 minutes après l'ouverture du sachet.
- Ne pas utiliser le test si le sachet aluminium a été déchiré.

- Procéder avec précaution lors de l'ouverture de ce sachet (voir procédure d'essai), afin de ne pas couper ou endommager la bandelette.
- Utiliser uniquement le tube contenant le tampon d'extraction fourni dans le kit. Ne jamais utiliser de constituants provenant de kits différents.
- **Veiller à ne pas immerger la bandelette plus profondément que la ligne placée sous les flèches.**
- Le test Disp&FLOW – Poisson ne contient que des éléments à usage unique ; ne pas réutiliser.

### Élimination des déchets

- Éliminer tous les consommables utilisés conformément à la réglementation des déchets biomédicaux.
- Chaque utilisateur est responsable de la gestion des déchets qu'il produit et doit s'assurer de l'élimination de ces derniers en fonction de la réglementation applicable.

### Préparation des échantillons

Préalablement au test, les échantillons doivent être amenés à une température comprise entre +18°C et +35°C ; l'analyse d'échantillons plus froids diminue la sensibilité du test ; l'analyse d'échantillons plus chauds n'est pas possible du fait du risque de dégradation des anticorps présents dans la bandelette.

S'assurer que le matériel à tester soit un mélange de tous les ingrédients qui composent le produit alimentaire solide final.

**Les échantillons liquides** peuvent être testés directement.

La limitation de la détection du test pour les échantillons liquides est fonction de leur viscosité et de leur turbidité (présence de particules).

Si l'échantillon est visqueux et ne peut pas atteindre la zone de test, il doit être dilué dans le tampon de dilution / extraction. Dans ce cas, le niveau de sensibilité du test doit être ajusté par le facteur de dilution.

Les spécimens troubles doivent être filtrés à travers un filtre textile ou un filtre de papier.

1. À l'aide de la pipette de transfert fournie, insérer l'échantillon liquide (1-2mL) dans le tube-test contenant le tampon de dilution/extraction.
2. Sceller hermétiquement le tube avec le bouchon.
3. Agiter vigoureusement le tube manuellement ou à l'aide de vortex à vitesse maximale pendant 20-30 secondes.
4. Poser le tube à la verticale sur un support et laisser sédimenter le contenu du tube ou centrifuger à faible vitesse dans une centrifugeuse, le surageant est alors prêt pour les essais.

**Pour l'essai des matériaux solides, ustensiles ou autres tests de surfaces**, nous recommandons la procédure suivante:

1. À l'aide d'outils propres bien aiguisés (de préférence jetables), couper un petit morceau (0.1 à 0.5 g) de la matière à tester et l'introduire dans le tube contenant le tampon de dilution/extraction.
2. Pour les ustensiles ou les autres tests de surfaces, se munir de l'écouvillon fourni et le passer sur la surface de l'objet à analyser en effectuant un mouvement croisé, dans un sens puis dans l'autre, puis en diagonale. Insérer ensuite l'écouvillon dans le tube-test et l'agiter pendant 10 à 15 secondes dans le tampon d'extraction.
3. Sceller hermétiquement le tube avec le bouchon.

4. Agiter vigoureusement le tube manuellement ou à l'aide de vortex à vitesse maximale pendant 25-30 secondes.
5. Poser le tube à la verticale sur un support et laisser sédimenter le contenu du tube ou centrifuger à faible vitesse dans une centrifugeuse, le surageant est alors prêt pour les essais.

Les différents échantillons peuvent être conservés entre +2 °C et +8 °C pour une période de 24 heures. Pour une conservation prolongée, nous recommandons de congeler le spécimen.

### Procédure d'essai

Amener le tampon d'extraction à température ambiante (entre +18 et +25°C) et les échantillons à une température comprise entre +18 et +35°C.

1. Ouvrir le sachet contenant la bandelette-test en prenant garde de ne pas couper la bandelette.
2. Saisir la bandelette par la partie supérieure de couleur et tremper l'autre extrémité verticalement dans le surageant du tube-test. **Attention :** s'assurer que la bandelette n'est pas immergée trop profondément – voir le schéma ci-contre →
3. Laisser tremper la bandelette pendant 10 à 15 secondes puis la placer sur une surface PROPRE et horizontale ; ne pas toucher ou déplacer la bandelette pendant 5 à 10 minutes, le temps de la migration de l'échantillon.
4. Lire le résultat et l'interpréter conformément aux schémas et instructions ci-dessous.



### Interprétation des résultats

Le test est positif si 2 lignes rouges apparaissent clairement dans la zone centrale de la bandelette (ligne test et ligne témoin, voir ci-dessous). Ne pas tenir compte de l'ordre d'apparition des 2 lignes ainsi que des nuances éventuelles d'intensité de la couleur.



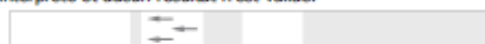
Le test est négatif si une seule ligne rouge apparaît (voir ci-dessous) : il s'agit de la ligne témoin qui garantit le bon fonctionnement du test.



Si uniquement la ligne test apparaît (voir ci-dessous), le test ne peut être interprété et aucun résultat n'est validé.



Si aucune ligne n'apparaît (voir ci-dessous), le test ne peut être interprété et aucun résultat n'est validé.



Dans ces deux derniers cas, avant de recommencer avec un autre test Disp&FLOW – Poisson, il convient de s'assurer que l'ensemble des instructions de préparation, de conservation et de mise en œuvre du test ont bien été respectées, ainsi que la date de péremption.

## ANNEXE 3 : Fiche pratique

Fiche réalisée dans le cadre des projets CLEAN (2020-2021) et CLEANER (2022)

# NETTOYAGE DES ALLERGENES DE PRODUITS DE LA MER

Les produits de la mer font partie des principaux allergènes à déclaration obligatoire d'origine animale. Les crustacés, les mollusques et le poisson représentent respectivement 7%, 3% et 2% des cas d'anaphylaxie sévère recensés entre 2011 et 2017. Le nettoyage est un levier puissant pour la maîtrise du risque allergène en atelier agro-alimentaire.

# 1.

AVANT LE NETTOYAGE

### Je qualifie les procédures de nettoyage

- Définition des objectifs de propreté
- Identification des zones critiques
- Intégrité des équipements nettoyés
- Choix et vérification du matériel de nettoyage

### J'adapte mon équipe de nettoyage au travail nécessaire

- Dimensionnement des équipes et du temps alloué
- Formation et accompagnement du personnel : fiches procédures, affichages
- Sensibilisation au risque allergène

# 2.

PENDANT LE NETTOYAGE



### J'observe rigoureusement le TACT

#### Je suis les bonnes pratiques

- Dégrossi à l'eau, P < 20 bar pour éliminer les résidus en limitant la diffusion des allergènes
- T° < 80°C pour éviter l'adhésion des protéines sur les surfaces
- Actionnement des parties mobiles pour favoriser l'accessibilité
- Application de type mousse pour visualiser les zones traitées et favoriser le contact sur toutes les surfaces

### Je surveille et j'enregistre les données de suivi

### Je remonte les éventuels problèmes rencontrés

# 3.

APRES LE NETTOYAGE

### Je contrôle l'efficacité du nettoyage

- Autocontrôle in situ / contrôles ex situ
- Vigilance sur les points et la méthode de prélèvement
- Interprétation des résultats (qualitatifs, quantitatifs)

### J'enregistre les résultats et les compare aux objectifs recherchés

### J'engage les actions nécessaires

- Reprise de production si résultats satisfaisants
- Actions correctives si résultats non satisfaisants



## REFERENCES

- [1] ANSES, "Etude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA 3)," 2017.
- [2] Parlement européen et Conseil, "Règlement (UE) n°1169/2011 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires, modifiant les règlements (CE) n° 1924/2006 et (CE) n°1925/2006 du Parlement européen et du Conseil e," 2011.
- [3] ANSES, "Avis de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation et du travail relatif à l'actualisation des données du rapport « Allergies alimentaires : état des lieux et propositions d'orientations »." 2018.
- [4] B. Evrard, "Physiopathologie de l'allergie IgE-dépendante," *Rev. Francoph. des Lab.*, vol. 2020, no. 521, pp. 20–31, 2020.
- [5] L. Deneuve, *Gestion du risque "Allergènes alimentaires". Guide méthodologique d'application HACCP*. 2009.
- [6] C. Ponvert and J.-P. Jacquier, "Mécanismes de la réaction allergique du type immédiat: les connaissances indispensables," *Rev. française d'allergologie d'immunologie Clin.*, vol. 43, no. 5, pp. 327–329, 2003.
- [7] S. Zouaghi, B. Picoche, and G. Kanny, "Influence des technologies agro-alimentaires sur l'allergénicité des produits de la mer," *Rev. IAA*, no. 73, pp. 15–22, 2021.
- [8] F. Rance, "Lymphocytes T et allergie alimentaire," *Rev. française d'allergologie d'immunologie Clin.*, vol. 47, no. 3, pp. 214–218, 2007.
- [9] T. Ruethers *et al.*, "Seafood allergy: A comprehensive review of fish and shellfish allergens," *Mol. Immunol.*, vol. 100, pp. 28–57, 2018.
- [10] U. Griesmeier *et al.*, "Physicochemical properties and thermal stability of Lep w 1, the major allergen of whiff," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 54, no. 6, pp. 861–869, 2010.
- [11] S. R. Saptarshi, M. F. Sharp, S. D. Kamath, and A. L. Lopata, "Antibody reactivity to the major fish allergen parvalbumin is determined by isoforms and impact of thermal processing," *Food Chem.*, vol. 148, pp. 321–328, 2014.
- [12] H. Kubota, A. Kobayashi, Y. Kobayashi, K. Shiomi, and N. Hamada-Sato, "Reduction in IgE reactivity of Pacific mackerel parvalbumin by heat treatment," *Food Chem.*, vol. 206, pp. 78–84, 2016.
- [13] A. J. Lee, I. Gerez, L. P.-C. Shek, and B. W. Lee, "Shellfish allergy-an Asia-Pacific perspective," *Asian Pacific J. allergy Immunol.*, vol. 30, no. 1, p. 3, 2012.
- [14] S. D. Kamath, A. M. A. Rahman, T. Komoda, and A. L. Lopata, "Impact of heat processing on the detection of the major shellfish allergen tropomyosin in crustaceans and molluscs using specific monoclonal antibodies," *Food Chem.*, vol. 141, no. 4, pp. 4031–4039, 2013.
- [15] I. Pali-Schöll *et al.*, "Edible insects: Cross-recognition of IgE from crustacean-and house dust mite allergic patients, and reduction of allergenicity by food processing," *World Allergy Organ. J.*, vol. 12, no. 1, p. 100006, 2019.
- [16] J. C. Ribeiro, L. M. Cunha, B. Sousa-Pinto, and J. Fonseca, "Allergic risks of consuming edible insects: A systematic review," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 62, no. 1, p. 1700030, 2018.
- [17] FranceAgriMer, "Chiffres-clés des filières pêche et aquaculture en France en 2022," 2022.

- [18] P.-W. Lee, J. A. Nordlee, S. J. Koppelman, J. L. Baumert, and S. L. Taylor, "Measuring parvalbumin levels in fish muscle tissue: relevance of muscle locations and storage conditions," *Food Chem.*, vol. 135, no. 2, pp. 502–507, 2012.
- [19] ACTIA - RMT CHLEAN, "Guide sur les bonnes pratiques de prélèvement de surfaces en industries agro-alimentaires," 2021.
- [20] R. Ward, R. Crevel, I. Bell, N. Khandke, C. Ramsay, and S. Paine, "A vision for allergen management best practice in the food industry," *Trends food Sci. Technol.*, vol. 21, no. 12, pp. 619–625, 2010.
- [21] W. Dzwolak, "Assessment of food allergen management in small food facilities," *Food Control*, vol. 73, pp. 323–331, 2017.