



# Allergies alimentaires : les **plantes** génétiquement modifiées

*Food allergies:*  
do genetically  
modified plants have  
an impact?

ont-elles  
un **impact** ?



AGENCE FRANÇAISE  
DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
DES ALIMENTS



AGENCE FRANÇAISE  
DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
DES ALIMENTS

**Allergies alimentaires : les plantes génétiquement modifiées  
ont-elles un impact ?**

*Food allergies: do genetically modified plants have an impact?*

---

**Coordination rédactionnelle / *Drafting coordination***

Céline Le Stunff

Sébastien La Vieille

Ambroise Martin

**Coordination éditoriale / *Editorial coordination***

Carole Thomann

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

## ABBREVIATION LIST

**Int** : international / *international*, **EU** : européen / *European*, **F** : français / *French*, **US** : américain / *American*, **UK** : britannique / *British*, **Can** : canadien / *Canadian*, **Aus** : australien / *Australian*.

<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique / <i>DesoxyriboNucleic Acid</i>
<b>ACIA</b>	Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (Can) / <i>Canadian Food Inspection Agency (Can)</i>
<b>AESA</b>	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments = EFSA (EU) / <i>European Food Safety Authority (EU)</i>
<b>APHIS</b>	Animal and Plant Health and Inspection Service (USDA, US) / <i>Animal and Plant Health and Inspection Service (USDA, US)</i>
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique / <i>RiboNucleic Acid</i>
<b>αAI</b>	Inhibiteur d'alpha-amylase / <i>Inhibitor of alpha-amylase</i>
<b>BN</b>	Brown Norway / <i>Brown Norway</i>
<b>Bt</b>	Bacillus thuringiensis / <i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>CCA</b>	Commission du Codex Alimentarius (Int) / <i>Codex Alimentarius Commission (Int)</i>
<b>CCD</b>	Cross-reactive Carbohydrate Determinants / <i>Cross-reactive Carbohydrate Determinants</i>
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and prevention (US) / <i>Centers for Disease Control and prevention (US)</i>
<b>CE</b>	Communauté Européenne (EU) / <i>European Community (EU)</i>
<b>CICBAA</b>	Centre d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire (F) <i>F/Centre for Clinical and Biological Investigations in Food Allergology</i>
<b>CSIRO</b>	Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (Aus) / <i>Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (Aus)</i>
<b>EAST</b>	Enzyme Allergo Sorbent Test / <i>Enzyme Allergo Sorbent Test</i>
<b>EFSA</b>	European Food Safety Agency = AESA (EU) / <i>European Food Safety Agency = AESA (EU)</i>
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay / <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<b>EPA</b>	Environmental Protection Agency (US) / <i>Environmental Protection Agency (US)</i>
<b>FALCPA</b>	Food Allergen and Consumer Protection Act (US) / <i>Food Allergen and Consumer Protection Act (US)</i>
<b>FARRP</b>	Food Allergy Research and Resource Program (US) / <i>Food Allergy Research and Resource Program (US)</i>
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization (Int) / <i>Food and Agriculture Organization (Int)</i>
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (US) / <i>Food and Drug Administration (US)</i>
<b>FD&amp;C Act</b>	Federal food, Drug and Cosmetic Act (US) / <i>Federal food, Drug and Cosmetic Act (U</i>
<b>FSA</b>	Food Standards Agency (UK) / <i>Food Standards Agency (UK)</i>
<b>GM</b>	Génétiquement Modifié / <i>Genetically Modified</i>
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen / <i>Human Leukocyte Antigen</i>
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography / <i>High Performance Liquid Chromatography</i>

LISTE DES ABRÉVIATIONS  
*LIST OF ABBREVIATIONS*

<b>IFBC</b>	International Food Biotechnology Council (Int) / <i>International Food Biotechnology Council (Int)</i>
<b>Ig</b>	Immunoglobulines / <i>Immunoglobulins</i>
<b>ILSI</b>	International Life Science Institute (Int) / <i>International Life Science Institute (Int)</i>
<b>i.p.</b>	intra-péritonéale [voie] / <i>intra-peritoneal [channel]</i>
<b>IRI</b>	Information Resources, Inc. (UK) / <i>Information Resources, Inc. (UK)</i>
<b>kDa</b>	kiloDalton / <i>kiloDalton</i>
<b>LTP</b>	Lipid Transfer Protein / <i>Lipid Transfer Protein</i>
<b>MG</b>	Modification Génétique / <i>Genetic Modification</i>
<b>MGM</b>	Microorganisme Génétiquement Modifié / <i>Genetically Modified Micro-organism</i>
<b>NCFST</b>	National Center for Food Safety and Technology (US) / <i>National Center for Food Safety and Technology (US)</i>
<b>OCDE</b>	Organisation de Coopération et de Développement Economiques (Int) / <i>Organisation for Economic Co-operation and Development (Int)</i>
<b>OGM</b>	Organisme(s) Génétiquement Modifié(s) / <i>Genetically Modified Organism(s)</i>
<b>OMC</b>	Organisation Mondiale du Commerce (Int) / <i>World Trade Organization (Int)</i>
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale pour la Santé = WHO (Int) / <i>World Health Organization (Int)</i>
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction / <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PGM</b>	Plante(s) Génétiquement Modifiée(s) / <i>Genetically Modified Plant(s)</i>
<b>PIR</b>	Protein Information Resource (US) / <i>Protein Information Resource (US)</i>
<b>PR</b>	Pathogenesis-Related [protein] / <i>Pathogenesis-Related [protein]</i>
<b>RAST</b>	Radio Allergo Sorbent Test / <i>Radio Allergo Sorbent Test</i>
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction / <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
<b>SDAP</b>	Structural Database of Allergenic Proteins (US) / <i>Structural Database of Allergenic Proteins (US)</i>
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis / <i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>TNS</b>	Taylor Nelson Sofres (UK) / <i>Taylor Nelson Sofres (UK)</i>
<b>TPODA</b>	Test de Provocation Orale en Double Aveugle [contre placebo] / <i>Oral Provocation Test, Double Blind [placebo-controlled]</i>
<b>UE</b>	Union Européenne (EU) / <i>European Union (EU)</i>
<b>USDA</b>	United States Department of Agriculture (US) / <i>United States Department of Agriculture (US)</i>
<b>VCN</b>	Végétal / Végétaux à Caractères Nouveaux (Can) / <i>Plant(s) with Novel Traits (Can)</i>
<b>VTA</b>	Virus des Tâches Annulaires / <i>RingSpot Virus</i>
<b>WHO</b>	World Health Organization = OMS (Int) / <i>World Health Organization = OMS (Int)</i>

**PERSONNES AYANT CONTRIBUÉ À LA RÉDACTION DU RAPPORT / CONTRIBUTORS TO THE DRAFTING OF THIS REPORT**

**Louis-Aimé Aumaître**

Institut national de la recherche agronomique, Département élevage des monogastriques (Saint-Gilles).  
*National Institute for Agricultural Research, Department of monogastric animal farming (Saint-Gilles).*

**Pierre Besançon**

Université de Montpellier II, Département agroressources et procédés biologiques et industriels.  
*University of Montpellier II, Department of agro-resources and biological and industrial processes.*

**Emmanuelle Bourgeois**

Afssa – Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires (Maisons-Alfort).  
*Afssa – DERNS (Maisons-Alfort).*

**Francine Casse**

Université de Montpellier II.  
*University of Montpellier II.*

**Patrick Fach**

Afssa – Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et les procédés agroalimentaires (Maisons-Alfort).  
*Afssa – Study and research laboratory for food quality and agri-food processes (Maisons-Alfort).*

**Sophie Gallotti**

Afssa – Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires (Maisons-Alfort).  
*Afssa – DERNS (Maisons-Alfort).*

**Philippe Joudrier**

Institut national de la recherche agronomique – UMR Polymorphismes d'intérêt agronomique (Montpellier).  
*National Institute for Agricultural Research – UMR Polymorphisms of agricultural interest (Montpellier).*

**Henri Malandain**

Centre hospitalier Bretagne Atlantique, Laboratoire de biochimie (Vannes).  
*Bretagne Atlantique Hospital Centre, Biochemistry laboratory (Vannes).*

**Gabriel Peltre**

École supérieure de physique et de chimie industrielles, Laboratoire allergie et environnement (Paris).  
*Higher School of industrial physics and chemistry, Allergy and Environment laboratory (Paris).*

**Fabienne Rancé**

Hôpital des enfants, Allergologie – pneumologie (Toulouse).  
*Children's Hospital, Allergology – pneumology (Toulouse).*

**Maxime Schwartz**

Afssa, Direction de la programmation des laboratoires (Maisons-Alfort).  
*Afssa, Laboratory programming department (Maisons-Alfort).*

**Jean-Pierre Zalta**

Université de Toulouse III.  
*University of Toulouse III.*

***Ce rapport a été validé par le comité d'experts spécialisé « Biotechnologie » de l'Afssa, au cours de sa réunion du 15 juin 2006 / This report has been validated by the Afssa specialist expert committee "Biotechnology" at its meeting of 15 June 2006.***



# SOMMAIRE

## CONTENTS

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	3
<i>LIST OF ABBREVIATIONS</i>	
RÉSUMÉ.....	9
<i>SUMMARY</i>	
INTRODUCTION.....	11
<i>INTRODUCTION</i>	
MALADIES ALLERGIQUES, ATOPIE ET ALLERGIE ALIMENTAIRE.....	15
<i>ALLERGIC ILLNESSES, ATOPIY AND FOOD ALLERGIES</i>	
ALLERGÉNICITÉ DES PROTÉINES .....	17
<i>ALLERGENICITY OF PROTEINS</i>	
CONSÉQUENCES POSSIBLES D'UNE MODIFICATION GÉNÉTIQUE SUR LA COMPOSITION D'UN ALIMENT .....	25
<i>POSSIBLE CONSEQUENCES OF A GENETIC MODIFICATION ON A FOOD'S COMPOSITION</i>	
MÉTHODES D'ÉVALUATION DE L'ALLERGÉNICITÉ D'UNE PGM .....	29
<i>METHODS FOR ASSESSING THE ALLERGENICITY OF A GMP</i>	
LES VARIÉTÉS HYPOALLERGÉNIQUES : UN BÉNÉFICE APPORTÉ PAR LES PGM ?.....	45
<i>HYPOALLERGENIC VARIETIES: A BENEFIT BROUGHT BY GMPS?</i>	
RISQUES POTENTIELS LIÉS À CERTAINES PGM : PROBLÈMES D'ALLERGIE ÉVOQUÉS DANS LA LITTÉRATURE .....	53
<i>POTENTIAL RISKS ASSOCIATED WITH CERTAIN GMPS: ALLERGY PROBLEMS MENTIONED IN THE LITERATURE</i>	
ASPECTS RÉGLEMENTAIRES ET SURVEILLANCE ACCOMPAGNANT LA MISE SUR LE MARCHÉ DES OGM.....	65
<i>REGULATORY ASPECTS AND MONITORING ACCOMPANYING THE MARKETING OF GMOS</i>	
CONCLUSION .....	77
<i>CONCLUSION</i>	
BIBLIOGRAPHIE / REFERENCES.....	83
<i>BIBLIOGRAPHY / REFERENCES</i>	





# RÉSUMÉ

## SUMMARY

Les allergies constituent un problème de santé publique d'importance croissante dans les pays développés. L'allergie alimentaire concerne aujourd'hui environ 3 % de la population générale en France, la prévalence étant plus élevée au sein de la population pédiatrique.

Ces chiffres justifient que l'évaluation de l'allergénicité soit désormais un préalable obligatoire avant la mise sur le marché de tout nouvel aliment. Alors que l'on évalue les risques sur les plantes génétiquement modifiées (PGM) destinées à l'alimentation, il semble important de se pencher également sur les bénéfices éventuels que celles-ci pourraient apporter dans le domaine des allergies alimentaires, notamment grâce à la mise au point de variétés hypoallergéniques. Ce rapport fait donc le bilan des risques et bénéfices potentiels des PGM vis-à-vis des allergies alimentaires. Il évoque :

**1/** les caractéristiques et propriétés physico-chimiques qui peuvent, dans une certaine mesure, être considérées comme des **éléments favorables ou défavorables au caractère allergène d'une protéine** (résistance à la digestion enzymatique, thermostabilité, etc.).

**2/** les risques allergiques potentiels qui peuvent être évoqués lorsqu'il est question de **modification génétique** (introduction de séquences d'ADN conduisant à l'expression de nouveaux allergènes ou à la sur-expression d'allergènes endogènes notamment).

**3/ la démarche actuelle d'évaluation de l'allergénicité** des protéines (dans le cadre de l'évaluation globale d'une PGM) : elle repose sur la comparaison de la structure de la (des) protéine(s) codée(s) par le(s) transgène(s) avec celle d'allergènes connus, des tests de résistance à la digestion enzymatique simulée *in vitro*, ainsi que des tests immunologiques lorsqu'ils sont réalisables. De nouvelles méthodes en développement permettront de mieux prendre en compte l'allergénicité de la PGM en tant que telle, et pas uniquement celle de la (des) protéine(s) codée(s) par le(s) transgène(s).

**4/ les bénéfices** éventuels pouvant être apportés par les PGM, avec la mise au point de certaines variétés "hypoallergéniques" (arachide, riz, soja, blé, pommier). Ces PGM sont au stade de la recherche. La création et l'utilisation de variétés moins allergisantes pourraient peut-être permettre, sur le long terme, de diminuer la sensibilisation de la population à certaines plantes.

**5/ les risques** potentiels liés aux PGM, avec l'étude des exemples évoqués dans la littérature :

■ Le soja enrichi en méthionine (1996), dans lequel a été inséré un gène codant pour un allergène de la noix

*Allergies constitute a growing public health problem in developed countries. Today, food allergy affects around 3% of the general population in France, with a higher prevalence among children.*

*These figures prove that allergenicity assessment is from now on a prerequisite to placing any novel food on the market. While the risks related to genetically modified plants (GMPs) for human consumption are assessed, it seems important to focus also on the possible benefits that they may bring to the field of food allergies, particularly through the development of hypoallergenic varieties. This report thus assesses the risks and benefits associated with GMPs regarding food allergies. It covers the following:*

*1/ physico-chemical characteristics and properties that can, to a certain extent, be considered as **favourable or unfavourable elements in the allergenic character of a protein** (resistance to digestion, thermostability, etc.).*

*2/ potential allergic risks which may occur upon **genetic modification** (introduction of DNA sequences resulting in the expression of new allergens or to the overexpression of endogenic allergens in particular).*

*3/ **the current assessment method of protein allergenicity** (as part of the overall assessment of a GMP): this is based on comparing the structure of the protein(s) coded by transgene(s) with the structure of known allergens, on tests for resistance to enzymatic digestion and on immunological tests when they can be conducted. New methods currently being developed will enable a GMP's allergenicity to be better observed as such, and not simply as that of the protein(s) coded by transgene(s).*

*4/ possible **benefits** that GMOs could bring with the development of certain "hypoallergenic varieties" (peanuts, rice, soybean, wheat, apples). These GMPs are at the research stage. The creation and use of less allergenic varieties could perhaps reduce the sensitization of the population to certain plants over the long term.*

*5/ potential risks of GMPs, identified in the study of examples mentioned in literature:*

■ *Soybean, enriched with methionine* (1996), in which a coding gene for an allergen of brazil nuts was inserted. The allergenicity of this soybean has been proven but this GMP is still at the experimental stage;

du Brésil. L'allergénicité de ce soja a été prouvée mais cette PGM est restée au stade expérimental ;

■ Le maïs *Starlink™* (2000), autorisé aux États-Unis uniquement pour l'alimentation animale, a été retrouvé, suite à un mélange de lots, dans un certain nombre de produits alimentaires destinés à l'homme. Des cas d'allergie ont été rapportés chez des consommateurs de produits contenant du maïs. Mais l'implication du maïs *Starlink™* dans ces cas d'allergie n'a pas pu être démontrée ;

■ La papaye résistante au virus « ringspot » (2002), pour laquelle on a découvert, après sa mise sur le marché, une homologie de séquence de la protéine codée par le transgène avec un allergène répertorié. Aucun cas d'allergie n'a cependant été déclaré à la suite de la mise sur le marché de cette papaye ;

■ Le petit pois résistant à la bruche (2005), dont le développement a été stoppé suite à l'observation d'effets immunogènes chez la souris. L'allergénicité de cette PGM n'a cependant pas été démontrée chez l'animal, ni chez l'homme.

#### **6/ les aspects réglementaires et la surveillance**

accompagnant la mise sur le marché des OGM : réglementation en matière de traçabilité et d'étiquetage des OGMPGM et des allergènes, surveillance épidémiologique de la population et mise en place de sérothèques, surveillance après la mise sur le marché des OGM.

En conclusion de ce rapport, il ressort qu'en l'état actuel des connaissances, les PGM ne présentent pas plus de risque que les plantes obtenues par des méthodes conventionnelles en ce qui concerne le potentiel allergénique. En effet il est important de rappeler que d'autres techniques de culture et de sélection peuvent contribuer à augmenter l'allergénicité de nos aliments : emploi d'activateurs de gènes de résistance, sélection de variétés particulièrement aptes à synthétiser des protéines de stress, qui peuvent être de puissants allergènes.

■ *Starlink™ Corn* (2000), authorised in the United States for animal consumption only, has nevertheless been found, following a mixing of batches, in a certain number of food products for human consumption. Cases of allergy have arisen in consumers of products containing this corn. The implication of *Starlink™ Corn* in these cases of allergy, however, has not been proven.

■ *Papaya resistant to the "ringspot" virus* (2002), for which, after being placed on the market, a homology of sequence was discovered of the protein coded by the transgene with a listed allergen. No cases of allergy have been declared however, following marketing of this papaya.

■ *Pea resistant to the pea weevil* (2005), whose development was interrupted after immunogenic effects were observed in mice. The allergenicity of this GMP has not been proven in animals or humans, however.

**6/ regulatory aspects and monitoring** accompanying the marketing of GMOs: regulations concerning the traceability and labelling of GMOs/GMPs and allergens, epidemiological monitoring of the population and the setting up of serum banks, post-marketing monitoring of GMOs.

*This report concludes that, on the basis of current knowledge, GMPs do not pose a greater risk than plants obtained by conventional methods in terms of the allergenic potential. Indeed, it is important to remember that other cultivation and selection techniques may contribute to increasing the allergenicity of our food: the use of activators of resistance genes and the selection of varieties particularly suited to synthesising stress proteins, both of which could have allergenic powers.*

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

### LES ALLERGIES : UNE PRÉOCCUPATION SANITAIRE MAJEURE

Les maladies allergiques sont aujourd'hui une préoccupation sanitaire majeure, notamment dans les pays les plus développés. Alors qu'elles concernent actuellement 10 à 40 % de la population, selon l'âge et le pays, en 2010 elles pourraient toucher la moitié de la population mondiale, la prévalence des allergies respiratoires augmentant de 50 % tous les 10 ans (Morisset, 2004).

L'allergie alimentaire est observée chez 3,2 % de la population française (Kanny, 2001). Une étude plus récente indique une prévalence cumulée de 6,7 % dans une population d'enfants en âge scolaire (Rancé, 2005). L'augmentation de prévalence des allergies alimentaires semble préoccupante puisque le pourcentage d'admissions aux urgences dans les hôpitaux français pour choc anaphylactique d'origine alimentaire, paraît avoir quintuplé des années 1980 aux années 1995 (Moneret-Vautrin, 1995).

### LE RISQUE D'ALLERGIE EST SOUVENT CITÉ LORSQUE L'ON ÉVOQUE LES RISQUES SANITAIRES LIÉS AUX PLANTES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES

La mise sur le marché d'aliments issus d'organismes génétiquement modifiés (OGM) fait l'objet d'une certaine appréhension sociale : selon le sondage Eurobaromètre de juin 2005, 54 % des Européens et 60 % des Français pensent que les aliments issus d'OGM sont dangereux (Commission Européenne, 2005a). La surveillance et l'évaluation sanitaire des OGM sont pourtant particulièrement rigoureuses.

Parmi les risques sanitaires liés aux plantes génétiquement modifiées (PGM), le problème des allergies est souvent évoqué :

- les aliments issus de PGM pourraient présenter un risque propre de sensibilisation ;
- des allergies respiratoires pourraient survenir si la modification génétique augmentait l'allergénicité des pollens ;
- la sensibilisation des individus par dissémination aérienne du pollen pourrait, par réaction croisée avec des protéines alimentaires, augmenter la fréquence des allergies alimentaires. L'impact sur la santé publique pourrait être important dans un pays très agricole comme la France.

### ALLERGIES: A MAJOR HEALTH CONCERN

*Today, allergy illnesses are a major health concern, particularly in the most developed countries. Although at present they concern 10 to 40% of the population, depending on age and country, in 2010 they could affect half of the world's population, with the prevalence of respiratory allergies increasing by 50% every 10 years (Morisset, 2004).*

*Food allergies are observed in 3.2% of the French population (Kanny, 2001). A recent study shows a cumulated prevalence of 6.7% in a group of school-age children (Rancé, 2005). The increasing prevalence of food allergies seems worrying since the percentage of admissions to A&E departments in French hospitals for anaphylactic shocks caused by food seems to have increased fivefold from the 1980s to 1995 (Moneret-Vautrin, 1995).*

### ALLERGIES ARE OFTEN MENTIONED WHEN TALKING ABOUT HEALTH RISKS ASSOCIATED WITH GENETICALLY MODIFIED PLANTS

*The marketing of foods produced from genetically modified organisms (GMOs) is a social concern: according to the Eurobarometer survey of June 2005, 54% of Europeans and 60% of French people think that foods produced from GMOs are dangerous (European Commission, 2005a). GMO monitoring and assessment are nonetheless particularly rigorous.*

*Of the health risks associated with genetically modified plants (GMPs), the problem of allergies is often raised:*

- *food from GMPs could present its own risk of sensitization;*
- *Respiratory allergies could arise if the genetic modification increased the allergenicity of pollens;*
- *the sensitization of individuals by air dissemination of pollen could, by cross-reaction with food proteins, increase the frequency of food allergies; The impact on public health could be significant in a highly agricultural country like France.*

## LA CULTURE ET LE COMMERCE DES PLANTES GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉES SE DÉVELOPPENT

Les superficies consacrées aux cultures transgéniques dans le monde atteignent aujourd'hui environ 90 millions d'hectares. Cinq pays principaux détiennent la majeure partie des cultures transgéniques : les États-Unis se placent en première position avec 50 millions d'hectares, suivi par l'Argentine, le Canada, le Brésil et la Chine. Les surfaces cultivées en Europe sont très peu importantes (58 000 hectares en Espagne). Globalement, le nombre d'espèces cultivées est très restreint, le soja occupant plus de la moitié des superficies cultivées en PGM (54,4 %), suivi par le maïs (21,2 %), le coton (9,8 %) et le colza (4,6 %). Sous forme transformée ou non, ces quatre espèces, et notamment le soja, font partie des produits agricoles les plus échangés à l'échelle mondiale (Source : site interministériel sur les OGM).

À la demande de la France et d'autres États membres, l'Union européenne a imposé que tous les produits alimentaires contenant plus de 0,9 % d'OGM ou de produits dérivés d'OGM soient étiquetés afin que les consommateurs puissent être correctement informés et faire leurs propres choix. Soucieux de la sensibilité de l'opinion publique, les industriels et les producteurs évitent cependant le recours à des PGM : les produits qui en sont issus sont donc encore peu fréquents dans les aliments destinés à l'homme en Europe, mais font toujours l'objet d'une information complète du consommateur.

Un certain nombre de produits dérivés de PGM sont autorisés pour l'alimentation : on peut les consommer sous la forme d'aliments (semoule de maïs, tofu...), d'ingrédients (amidon de maïs, farine de soja...), d'additifs (caramel, sorbitol, lécithine...), ou encore de supports d'arômes. La seule PGM consommable en tant que telle est le maïs doux. Son autorisation de mise sur le marché, délivrée le 19 mai 2004 par décision de la Commission européenne, a marqué la levée effective du « moratoire de fait »<sup>(1)</sup>.

## LE POINT SUR LES RISQUES ET BÉNÉFICES DES PGM VIS-À-VIS DES ALLERGIES ALIMENTAIRES

Dans ce rapport, les risques et bénéfices liés aux PGM seront discutés uniquement sous l'angle particulier des allergies alimentaires. Mais on ne peut pas apprécier les risques et les bénéfices des PGM en s'intéressant

(1) À la demande de la France et d'autres États membres, l'Europe avait suspendu en 1999 les nouvelles autorisations de mise sur le marché d'OGM destinés à la consommation pour tenir compte des préoccupations manifestées par l'opinion publique, et dans l'attente de la mise en place d'un cadre réglementaire européen complet assurant une traçabilité et un étiquetage des OGM et de leurs produits dérivés.

## THE CULTIVATION AND TRADE OF GENETICALLY MODIFIED PLANTS IS EXPANDING

*Areas devoted to transgenic cultivation in the world amount to around 90 million hectares today. The majority of transgenic crops are found in five main countries: United States is the leader with 50 million hectares, followed by Argentina, Canada, Brazil and China. Cultivated areas in Europe are small (58,000 hectares in Spain). Overall, the number of species cultivated is very limited, soybean taking up over half of the GMP cultivated areas (54.4%), followed by corn (21.2%), cotton (9.8%) and rapeseed (4.6%). Transformed or not, these four species, especially soybean, make up the most traded farming products in the world (Source: interministerial site on GMOs).*

*At the request of France and other Member States, the European Union has demanded that all food products containing more than 0.9% GMO or GMO derived products be labelled so that consumers can receive the correct information and make their own choices. Mindful of the sensitivity of public opinion however, industrial manufacturers and producers avoid using GMPs: GMP-based products are therefore still rarely used in food for human consumption in Europe, although they are still included fully in consumer information.*

*A certain number of GMP derived products are authorised for human consumption: they can be consumed as foods (corn meal, tofu, etc.), ingredients (corn starch, soy flour, etc.), additives (caramel, sorbitol, lecithin, etc.), or flavourings. The only GMP that may be consumed as it is is sweetcorn. Its market authorisation, issued on 19 May 2004 by Decision of the European Commission, marked the lifting of the "de facto moratorium"<sup>(1)</sup>.*

## REVIEW OF THE RISKS AND BENEFITS OF GMPs WITH REGARD TO FOOD ALLERGIES

*In this report, the risks and benefits associated with GMPs are only discussed from the point of view of food allergies. But the risks and benefits of GMPs cannot be assessed with interest solely being taken in this health problem, since other risks and benefits, not covered in this report, may be identified (Afssa, 2002, 2004). Therefore, it is not a matter of studying the benefits/risks relationship of GMPs in the field*

(1) At the request of France and other Member States, Europe suspended the new authorisations for placing GMOs for human consumption on the market in 1999 to take account of the concerns raised by public opinion and pending the establishment of a full European regulatory framework ensuring the traceability and labelling of GMOs and their derived products.

exclusivement à ce problème de santé, puisque d'autres risques et bénéfices, non développés dans ce rapport, peuvent être identifiés (Afssa, 2002, 2004). Il ne s'agit donc pas d'étudier le rapport bénéfices / risques des PGM dans le domaine des allergies alimentaires, mais de discuter d'une part des éventuels bénéfices qui pourraient être apportés par les PGM (création de variétés « hypoallergéniques »), et d'autre part des risques potentiels d'allergie liés à l'introduction de PGM dans l'alimentation.

L'allergénicité des protéines sera d'abord évoquée. Elle est évaluée à partir de certaines caractéristiques de la protéine, notamment la comparaison de sa structure avec celle d'allergènes connus et sa stabilité à la digestion enzymatique simulée *in vitro*. Les limites de ces différentes approches seront identifiées.

Les risques et bénéfices potentiels des PGM vis-à-vis des allergies alimentaires seront ensuite discutés : la littérature scientifique fait en effet mention de PGM qui auraient pu induire des allergies alimentaires. Parallèlement, plusieurs travaux tentent d'utiliser la transgénèse pour diminuer ou éteindre l'expression de certains allergènes, afin d'obtenir des plantes moins allergisantes que les plantes des variétés conventionnelles.

En dernier lieu, les mesures accompagnant la mise sur le marché des OGM, à savoir principalement la réglementation traçabilité / étiquetage et la mise en place d'une surveillance épidémiologique, seront abordées.

*of food allergies, but of discussing, on the one hand, the possible benefits which the GMPs could bring (creation of "hypoallergenic" varieties) and, on the other hand, the potential allergy risks associated with the introduction of GMPs in food.*

*First, the allergenicity of proteins will be discussed. This is assessed on the basis of certain characteristics of the protein, especially by comparing its structure with the structure of known allergens and its stability to enzymatic digestion simulated in vitro. The limits of these different approaches will be identified.*

*Next, the potential risks and benefits of GMPs with regard to food allergies will be looked into: indeed, scientific literature states that GMPs could have induced food allergies. At the same time, several projects are trying to use the transgenesis to reduce or eliminate the expression of certain allergens, so as to obtain less allergenic plants than conventional plant varieties.*

*Lastly, the measures accompanying the marketing of GMOs, particularly the traceability/labelling regulations and the establishment of an epidemiological monitoring, will be reviewed.*





# MALADIES ALLERGIQUES, ATOPIE ET ALLERGIE ALIMENTAIRE

## ALLERGIC ILLNESSES, ATOPY AND FOOD ALLERGIES

La définition des maladies allergiques introduit la notion de manifestations cliniques médiées par un mécanisme immunologique et de spécificité de l'agent de provocation appelé **allergène**. Un allergène est défini comme toute substance capable de sensibiliser l'organisme de certains individus et de déterminer, lors de sa réintroduction, des manifestations pathologiques (Godeau, 2004 ; Vervloet, 2003). Les allergènes sont très généralement des protéines.

Les allergies se produisent le plus souvent chez des sujets atopiques. L'**atopie** caractérise un organisme apte à synthétiser des anticorps appelés IgE<sup>(2)</sup>, condition nécessaire mais non suffisante pour l'expression d'une maladie allergique.

L'**allergie alimentaire « vraie »** implique donc des mécanismes immunologiques, et comporte deux phases (Figure 1) :

(2) Immunoglobulines E.

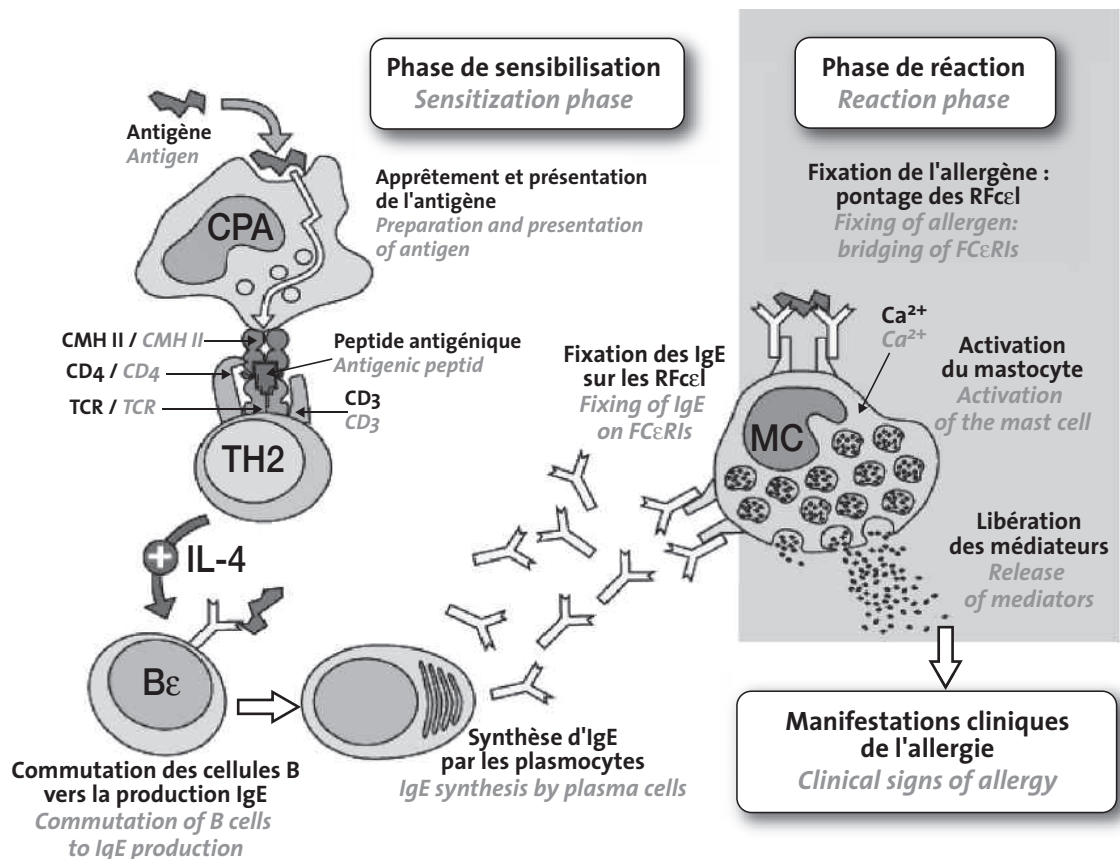
The definition of allergic illnesses introduces the concept of clinical manifestations mediated by an immunological mechanism and of the specific nature of the provocative agent called an **allergen**. An allergen is defined as any substance capable of sensitizing the organism of certain individuals and of determining pathological manifestations when it is reintroduced (Godeau, 2004; Vervloet, 2003). On the whole, allergens are proteins.

Allergies are most commonly produced in atopic subjects. **Atopy** characterises an organism able to synthesise the IgE<sup>(2)</sup> antibody, a necessary but insufficient condition for the expression of an allergic illness.

"**Real**" food allergies thus involve immunological mechanisms and comprise two phases (Figure 1):

(2) Immunoglobulins E.

FIGURE 1. LES PHASES DE SENSIBILISATION ET DE RÉACTION ALLERGIQUE  
SENSITIZATION PHASES AND ALLERGIC REACTION



(SOURCE : PELTRE G, COMMUNICATION PERSONNELLE) / (SOURCE: PELTRE G, PERSONAL COMMUNICATION)



- **la sensibilisation** : elle a lieu lors d'un contact préalable du sujet avec l'allergène, et se caractérise par la synthèse d'anticorps IgE capables de se lier à certaines parties de l'allergène appelées épitopes. Cette première phase est asymptomatique ;
- **la réaction allergique proprement dite** : elle se produit lorsque le sujet rencontre à nouveau l'allergène. La reconnaissance de celui-ci par les IgE entraîne la libération de médiateurs chimiques, dont le principal est l'histamine. Le sujet déclenche alors des manifestations cliniques plus ou moins graves : asthme, urticaire, œdème, voire choc anaphylactique (parfois mortel).

Les **allergies croisées** sont des manifestations cliniques allergiques dues à des allergènes différents sans qu'il y ait eu, au préalable, un premier contact sensibilisant avec chacun de ces allergènes. En pratique, le sujet s'est sensibilisé à une protéine A, a donc produit des anticorps anti-A, peut développer une réaction allergique lorsqu'il rencontre A, mais aussi lorsqu'il rencontre une protéine B, si A et B ont des épitopes homologues.

La **réaction croisée** est observée *in vitro* : l'anticorps anti-A est capable de se lier à A mais aussi à B. Cependant, la présence d'une réaction croisée *in vitro* ne présume pas de l'existence d'une allergie croisée chez l'homme.

Étant donné l'existence de telles réactions et allergies croisées, les IgE, souvent dénommées IgE « spécifiques », sont donc plus spécifiques d'un épitope que d'une protéine.

**NB** : D'autres types de réactions ressemblent cliniquement aux réactions allergiques mais ne font pas intervenir de mécanismes immunologiques : elles ne sont pas considérées comme étant des allergies alimentaires « vraies ».

**L'intolérance alimentaire** peut être due à un déficit enzymatique comme c'est le cas pour l'intolérance au lactose (due à un déficit en lactase) qu'il faut différencier de l'allergie alimentaire au lait, bien que dans certains cas les symptômes soient proches.

**Les « fausses » allergies** sont quant à elles dues à l'ingestion d'aliments riches en amines biogènes (histamine, tyramine notamment) ou d'aliments provoquant la libération d'histamine (fraises, blanc d'œuf...).

■ **sensitization**: this occurs when the subject has prior contact with the allergen and is characterised by the synthesis of IgE antibodies able to bond with certain parts of the allergen called epitopes. This initial phase is asymptomatic.

■ **the actual allergic reaction**: this occurs when the subject comes into contact again with the allergen. The recognition of this allergen by the IgEs releases chemical mediators, the main one being histamine. The subject then displays clinical manifestations of varying degrees of gravity: asthma, urticaria, oedema, even an anaphylactic shock (sometimes fatal).

**Cross-allergies** are clinical allergic manifestations caused by different allergens without there having been prior sensitizing contact with each of these allergens. In practice, the subject has become sensitive to protein A, and so produces anti-A antibodies and may develop an allergic reaction when he or she encounters A, or when he or she encounters protein B if A and B have homologous epitopes.

**Cross-reactions** are observed *in vitro*: anti-A antibody is capable of bonding with A as well as B. However, the presence of a cross-reaction *in vitro* does not assume the existence of a cross-allergy in humans.

Given the existence of such reactions and cross-allergies, IgE, often called "specific" IgE, are therefore more specific than an epitope or protein.

**NB**: Other types of reactions clinically resemble allergic reactions but do not involve immunological mechanisms: they are not considered as "real" food allergies.

**Food intolerance** may be due to an enzymatic deficit that, as is the case for lactose intolerance (caused by a lactase deficit), should be distinguished from a food allergy to milk, although some symptoms are similar.

**"False" allergies** are caused by the ingestion of food rich in biogenic amines (histamine, and tyramine in particular) or food that releases histamine (strawberries, egg white, etc.).

# ALLERGÉNICITÉ DES PROTÉINES

## ALLERGENICITY OF PROTEINS

Les allergènes, agents de provocation des maladies allergiques, sont très généralement des protéines.

L'**allergénicité** est la capacité d'une substance à induire chez un sujet (le plus souvent atopique) une réponse immunitaire caractérisée par la synthèse d'IgE, et, par la suite, des manifestations pathologiques.

**Immunogénicité** et allergénicité sont deux notions différentes : les protéines immunogènes peuvent induire une production d'anticorps et/ou une réponse immunitaire cellulaire, alors que les protéines allergènes peuvent induire la production d'IgE et, après ré-exposition, provoquer une réaction allergique. L'immunogénicité fait donc partie des caractéristiques qui, *a priori*, augmentent la probabilité qu'une protéine soit allergénique. Cependant ce n'est pas une condition suffisante pour affirmer que la protéine est un allergène.

Les **épitopes** sont des fragments limités de la protéine qui sont reconnus par les IgE. On considère le plus souvent qu'un épitope comporte 8 à 12 acides aminés. On distingue les épitopes conformationnels, détruits en cas de perte de la structure tertiaire de la protéine, et les épitopes séquentiels, qui dépendent de l'enchaînement des acides aminés (structure primaire). Certains auteurs préfèrent parler d'épitopes continus et d'épitopes discontinus, considérant que les épitopes séquentiels ont aussi une conformation dans l'espace.

*A priori*, si un allergène alimentaire peut sensibiliser un individu via le tractus gastro-intestinal, il possède vraisemblablement certaines propriétés structurelles et biologiques qui le préservent d'une destruction lors de la digestion (Mills, 2004). Il est donc supposé être résistant aux pH acides, à la protéolyse, aux surfactants comme les sels biliaires. Il doit aussi pouvoir traverser la barrière intestinale, conserver suffisamment longtemps son intégrité structurelle *in vivo*, et être présent en quantité suffisante pour interagir avec le système immunitaire et provoquer la synthèse d'IgE chez l'individu. Certaines caractéristiques et propriétés physico-chimiques d'une protéine peuvent donc, dans une certaine mesure, être considérées comme des éléments favorables ou défavorables à son caractère allergénique.

### QUANTITÉ PRÉSENTE DANS L'ALIMENT

Les allergènes peuvent être présents en quantité importante dans l'aliment, ou se trouver seulement à l'état de traces (quelques µg/kg).

*Allergens, provocative agents of allergic illnesses, are generally proteins.*

***Allergenicity** is a substance's capacity to induce an immune response, characterised by the synthesis of IgE, in a subject (most often atopical), followed by pathological manifestations.*

***Immunogenicity** and allergenicity are two different concepts: immunogenic proteins can induce the production of antibodies and/or a cellular immune response, while allergenic proteins can induce the production of IgE and, after reexposure, provoke an allergic reaction. Immunogenicity is therefore one of the characteristics which, a priori, increase the probability that a protein is allergenic. However, it is not sufficient to affirm that a protein is an allergen.*

***Epitopes** are limited fragments of the protein that are recognised by the IgE. An epitope is most often considered to contain 8 to 12 amino acids. Conformational epitopes, destroyed if the tertiary structure of the protein is lost, and sequential epitopes which depend on amino acids forming a chain (primary structure) can be distinguished. Some authors prefer to speak of continuous epitopes and discontinuous epitopes, believing that sequential epitopes are also a conformation in the space.*

*A priori, if a food allergen can sensitize an individual via the gastro-intestinal tract, it is likely to possess certain structural and biological qualities that protect it from being destroyed during digestion (Mills, 2004). It is thus assumed to be resistant to acid pH, proteolysis and surfactants such as bile salts. It should also be able to cross the intestinal barrier, maintain its structural integrity for a sufficiently long time in vivo, and be present in a sufficient quantity to interact with the immune system and provoke the synthesis of IgE in the individual. Certain physico-chemical properties and characteristics of a protein may therefore, to a certain extent, be considered as favourable or unfavourable elements to its allergenic character.*

### QUANTITY PRESENT IN FOOD

*Allergens can be present in significantly high quantities in food, or only traces of them may be found (a few µg/kg).*

Certains allergènes peuvent se concentrer plus spécifiquement dans certains tissus, sans pour autant être considérés comme abondants dans l'aliment entier : Pru p 3, allergène majeur<sup>(3)</sup> de la pêche, se trouve en quantité sept fois plus importante dans la peau que dans la pulpe du fruit (Carnes, 2002).

## MASSE MOLÉCULAIRE

La plupart des allergènes auraient une masse moléculaire comprise entre 10 et 70 kDa<sup>(4)</sup>. 70 kDa serait la limite supérieure liée à la capacité de passage au travers de la barrière intestinale. Il existe cependant des allergènes ayant une masse moléculaire supérieure : Ara h 1 (63,5 kDa) et Ara h 2 (17 kDa), notamment, existent dans la graine d'arachide sous forme de polymères de 200 à 300 kDa ; ils seraient dégradés lors de la digestion (Burks, 1998).

Il existe aussi des allergènes ayant une masse moléculaire inférieure à 10 kDa. Une étude a notamment montré que chez des enfants allergiques aux protéines de lait de vache, les tests cutanés réalisés avec des peptides de seulement 1400 Da pouvaient être positifs. *In vitro*, la masse moléculaire minimale pour observer des liaisons avec les IgE de ces patients était située entre 970 et 1400 Da (Van Hoeyveld, 1998). Une autre étude a montré qu'avec des peptides issus de la digestion artificielle de Prs a 1 (allergène de l'avocat) non détectés par immunotransfert (immunoblot), les tests cutanés étaient positifs chez 5 des 8 patients allergiques à l'avocat inclus dans l'étude. Ces allergènes, séparés en HPLC<sup>(5)</sup>, avaient une masse moléculaire comprise entre 1400 et 5100 Da (Diaz-Perales, 2003).

Les méthodes utilisées pour étudier la liaison aux IgE *in vitro* (immunotransfert notamment) sélectionnent d'emblée une certaine gamme de kDa : en effet les masses moléculaires faibles ne sont pas bien visibles, et les masses moléculaires fortes sont difficilement résolues. Il est donc assez logique de retrouver, dans la littérature, une grande majorité d'allergènes de masse moléculaire comprise entre 10 et 70 kDa. De plus, les migrations électrophorétiques sont généralement effectuées dans des conditions qui dénaturent les protéines (SDS-PAGE<sup>(6)</sup>) : ce sont alors des sous-unités de la molécule initiale qui sont visualisées.

(3) Un allergène majeur est un antigène purifié contre lequel au moins 50% des patients testés présentent des IgE spécifiques. Il donne aussi des tests cutanés immédiatement positifs chez au moins 90% des sujets ayant la maladie allergique en relation avec cet allergène. Cette définition peut cependant varier selon les auteurs : ainsi Aalberse, dans une autre approche, considère qu'un allergène majeur pourrait être un allergène qui, retiré de l'extrait, ferait considérablement chuter la réactivité de celui-ci (Aalberse RC, 2000).

(4) kiloDalton.

(5) High Performance Liquid Chromatography.

(6) Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

*Some allergens may be concentrated more specifically in certain tissues, without, however, being considered as abundant throughout the food: Pru p 3, a major allergen<sup>(3)</sup> in peaches, is found in quantities seven times higher in the skin than in the pulp (Carnes, 2002).*

## MOLECULAR MASS

*Most allergens would have a total molecular mass between 10 and 70 kDa<sup>(4)</sup>. 70 kDa would be the upper limit linked to the passing capacity across the intestinal barrier. However, there are allergens with a high molecular mass: Ara h 1 (63.5 kDa) and Ara h 2 (17 kDa) in particular, that exist in peanut seeds in the form of polymers from 200 to 300 kDa; they are degraded during digestion (Burks, 1998).*

*There are also allergens that have a molecular mass lower than 10 kDa. One study in particular has shown that, in children who are allergic to cow's milk proteins, the skin prick tests conducted with peptides of only 1400 Da could be positive. In vitro, the minimum molecular mass for observing bonds with the IgE of these patients was between 970 and 1400 Da (Van Hoeyveld, 1998). Another study showed that, with peptides produced by artificial digestion of Prs a 1 (avocado allergen) undetected by immunotransfer (immunoblot), the skin prick tests were positive in 5 of the 8 patients allergic to avocado involved in the study. These allergens, separated in HPLC<sup>(5)</sup>, had a total molecular mass between 1400 and 5100 Da (Diaz-Perales, 2003).*

*The methods used to study bonding with IgE in vitro (immunotransfer in particular) immediately select a certain range of kDa: since low molecular masses are not easily seen, and high molecular masses are resolved with difficulty. It is thus fairly logical to find, in literature, a large majority of allergens with a total molecular mass ranging between 10 and 70 kDa. Moreover, electrophoretic migrations are generally conducted in conditions which denature proteins (SDS-PAGE<sup>(6)</sup>): it is sub-units of the initial molecule that are then visualised.*

(3) A major allergen is a purified antigen against which at least 50% of patients tested present specific IgEs. It also immediately gives positive skin tests in at least 90% of subjects who have an allergic illness relating to this allergen. This definition can, however, vary depending on the authors: accordingly, Aalberse, in another approach, considers that a major allergen could be an allergen which, withdrawn from the extract, would considerably reduce its reactivity (Aalberse RC, 2000).

(4) kiloDalton.

(5) High Performance Liquid Chromatography.

(6) Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

## STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE

La connaissance actuelle de la structure primaire (enchaînement des acides aminés) des allergènes alimentaires ne permet pas de dégager des caractéristiques communes d'allergénicité. Bien que l'on connaisse encore mal la structure spatiale des protéines, il semblerait que certains facteurs puissent leur conférer une certaine stabilité, et par là même augmenter leur potentiel allergénique (Mills, 2004 ; Breiteneder, 2005) :

- présence de nombreux ponts disulfure (la relation étant toutefois complexe) (Zavodszky, 2001) ;
- modifications post-traductionnelles (ci-après) ;
- présence de liaisons ligands-protéines : avec des lipides, des ions métalliques, des stéroïdes... ;
- autres types d'interactions avec les lipides (liaison avec les lipides membranaires en particulier) (Taneva, 2000) ;
- structure tridimensionnelle relativement compacte.

Une étude met par ailleurs en évidence un point commun qui serait la forme sphérique des protéines allergènes (Bredehorst, 2001). Toutefois la structure de certains allergènes comme les prolamines et les tropomyosines ne répond pas à ces caractéristiques.

La présence de séquences répétées, ainsi que la tendance des protéines à s'agréger (dans des conditions physiologiques particulières ou suite à un traitement technologique) et donc à former des structures répétitives, seraient également des facteurs influant sur l'allergénicité (Breiteneder, 2005).

## MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES

Généralement, les allergènes se présentent non comme des composés uniques, mais comme des groupes d'isoformes d'une même protéine, c'est-à-dire des formes moléculaires dont la structure varie légèrement en raison, notamment, de modifications post-traductionnelles. Des modifications telles que la glycosylation, la phosphorylation (Wal, 2001), la déamidation, intervenant après la synthèse de la chaîne polypeptidique, pourront donc donner lieu à des protéines différentes, alors que la protéine initiale était la même.

Les allergènes sont souvent, mais pas exclusivement, des protéines glycosylées. Malandain relève, sur 404 allergènes végétaux, la présence de 20 % de glycoprotéines (Malandain, 2005). Des IgE « anti-carbohydate », c'est-à-dire se liant aux épitopes glucidiques des allergènes, ont été mises en évidence dans le sérum de certains patients (Van Ree, 2002). Pour l'instant, l'idée prévaut que ces épitopes glucidiques n'ont pas d'impact clinique, même

## TRIDIMENSIONAL STRUCTURE

*Current knowledge about the primary structure (amino acids chain) of food allergens does not allow for common characteristics of allergenicity to be identified. Although little is still known about the spatial structure of proteins, it would appear that certain factors can give them a certain stability, and thus increase their allergenic potential (Mills, 2004; Breiteneder, 2005):*

- *presence of numerous disulfide bonds (although the relation is complex) (Zavodszky, 2001);*
- *post-translational modifications (below);*
- *presence of ligand-protein bonds: with lipids, metallic ions, steroids, etc;*
- *other types of interactions with lipids (bonding with membranous lipids in particular) (Taneva, 2000);*
- *relatively compact tridimensional structure.*

*Furthermore, one study reveals a common point which would be the spherical form of allergenic proteins (Bredehorst, 2001). However, the structure of certain allergens, such as prolamines and tropomyosins, does not have these characteristics.*

*The presence of repeated sequences, as well as the tendency of proteins to aggregate (in particular physiological conditions or following a technological treatment) and thus to form repetitive structures, would also be factors influencing allergenicity (Breiteneder, 2005).*

## POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS

*In general, allergens do not exist as single components, but as isoform groups of the same protein, i.e. molecular forms, the structure of which varies slightly due to post-translational modifications. Modifications such as glycosylation, phosphorylation (Wal, 2001) and deamidation, taking place after synthesis of the polypeptidic chain, may therefore give rise to different proteins, when the initial protein was the same.*

*Allergens are often, but not exclusively, glycosylated proteins. Malandain reveals, on 404 plant allergens, the presence of 20% of glycoproteins (Malandain, 2005). "Anti-carbohydrate" IgE, i.e. which bond with glucidic epitopes of allergens, have been revealed in the serum of certain patients (Van Ree, 2002). At present, the prevailing idea is that these glucidic epitopes do not have a clinical impact, even if recent arguments tend to qualify this position*

si des arguments récents tendent à nuancer cette position (Kochuyt, 2005). Le problème des IgE « anti-carbohydate » provient de la fréquence des réactions croisées observées *in vitro* entre épitopes glucidiques, d'où le nom de « CCD »<sup>(7)</sup> qui leur a été attribué.

## RÉSISTANCE AUX PH ACIDES ET À LA DIGESTION ENZYMATIQUE

Les protéines allergènes supportent généralement une acidité modérée. Certaines (comme l'ovalbumine) ne sont pas dénaturées à pH 3,0 (Taylor, 1996).

La plupart du temps, celles-ci sont résistantes à la digestion enzymatique. Il est possible d'évaluer expérimentalement la résistance à la protéolyse dans les modèles de digestion artificielle, qui recréent les conditions physiologiques de digestion gastro-intestinale (p. 33).

De petits peptides peuvent toutefois conserver une certaine allergénicité, comme le montrent les allergies aux hydrolysats poussés de protéines de lait (Van Hoeyveld, 1998 ; Dupont, 2003).

## THERMOSTABILITÉ

Les protéines dites globulaires ont, outre leur structure primaire (enchaînement des acides aminés), une structure secondaire (présence d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$ ), et tertiaire (agencement dans l'espace des structures secondaires), voire quaternaire (assemblage de plusieurs molécules protéiques). En première analyse, on pourrait définir des plages de températures en fonction des principales modifications que peuvent subir ces protéines lors d'un traitement thermique (Lee, 1992 ; Sanchez, 2003) :

- de 55 à 70 °C, dépliement des chaînes polypeptidiques et perte de la structure tertiaire ;
- de 70 à 80 °C, clivage de ponts disulfure et perte de la structure secondaire ;
- de 80 à 90 °C, clivage de tous les ponts disulfure ;
- de 90 à 100 °C, création de nouvelles interactions, de nouveaux ponts disulfure ;
- de 100 à 125 °C, agrégation et réactions chimiques sur les chaînes latérales (formation de lysinoalanine, réactions de Maillard).

Le niveau de dénaturation et d'agrégation subi par une protéine dépend de sa structure initiale et de sa concentration, de la température, du temps et du mode de chauffage utilisés, de paramètres environnementaux (pH, force ionique), et de la présence d'autres molécules avec lesquelles peuvent se produire des interactions.

(7) Cross-reactive Carbohydrate Determinants.

(Kochuyt, 2005). The problem of "anti-carbohydrate" IgE arises with the frequency of cross-reactions observed *in vitro* between glucidic epitopes, from where they get their name: "CCD"<sup>(7)</sup>.

## RESISTANCE TO ACID PH AND ENZYMATIC DIGESTION

Allergenic proteins generally withstand a moderated acidity. Some of them (like ovalbumine) are not denatured at pH 3.0 (Taylor, 1996).

Most of the time, they are resistant to enzymatic digestion. Through tests, it is possible to test the resistance to proteolysis in models of artificial digestion, which recreate the physiological conditions of gastro-intestinal digestion (p. 33).

Small peptides can, nonetheless, maintain a certain allergenicity, as shown by allergies to hydrolysates cultivated from milk proteins (Van Hoeyveld, 1998; Dupont, 2003).

## THERMOSTABILITY

As well as their primary structure (amino acid sequence), globular proteins also have a secondary structure (presence of  $\alpha$  helixes and  $\beta$  sheets), a tertiary structure (arrangement of secondary structures in the space) and even a quaternary structure (assembly of several proteic molecules). In a first analysis, temperature ranges could be defined on the basis of the main modifications that these proteins could undergo during thermal treatment (Lee, 1992; Sanchez, 2003):

- from 55 to 70°C, unfolding of polypeptidic chains and loss of tertiary structure;
- from 70 to 80°C, segmentation of SS bridges and loss of secondary structure;
- from 80 to 90°C, segmentation of all SS bridges;
- from 90 to 100°C, creation of new interactions and new SS bridges;
- from 100 to 125°C, aggregation and chemical reactions on lateral chains (formation of lysinoalanine, Maillard reactions)

The level of denaturation and aggregation undergone by a protein depends on its initial structure and concentration, the temperature, time and method of heating used, environmental parameters (pH value, ionic force), and the presence of other molecules with which interactions may take place.

(7) Cross-reactive Carbohydrate Determinants.



La résistance à la dénaturation thermique pourrait jouer un rôle important dans l'allergénicité. Elle rendrait compte de la stabilité des épitopes et conférerait à certaines protéines, comme *Ara h 1* de l'arachide (Koppelman, 1999), *Pru av 3* de la cerise (LTP<sup>(8)</sup> non spécifique présente dans un très grand nombre de fruits) (Scheurer, 2004), la tropomyosine de crevette (Hoffman, 1981), ou l'ovomucoïde de l'œuf (Hirose, 2004), une capacité de liaison aux IgE constante quelles que soient les modalités et l'intensité du traitement thermique.

Certains allergènes sont en revanche très labiles et ne sont plus reconnus en tant que tels lorsque le produit est cuit. C'est le cas notamment des homologues de *Bet v 1* (allergène du pollen de bouleau) présents dans les fruits des rosacées : pomme (*Mal d 1*), poire (*Pyr c 1*), cerise (*Pru av 1*), etc. (Vieths, 2002). Cependant, ces mêmes homologues de *Bet v 1* (protéines PR10<sup>(9)</sup>) présents dans le soja et l'arachide (plantes oléagineuses) sont encore capables de déclencher des réactions systémiques après chauffage des produits allergisants (Mittag, 2004a, 2004b) : l'étude de la thermolabilité sur protéines pures peut donc être biaisée par ces interactions possibles entre molécules lors du chauffage.

Des allergènes thermostables et thermolabiles coexistent dans un même aliment. Les variations interindividuelles de sensibilisation expliquent que certains patients tolèrent un aliment lorsqu'il est cuit, alors que d'autres ne le tolèrent ni cru ni cuit.

Dans certains cas, le chauffage peut augmenter l'allergénicité de l'aliment, en conduisant à la formation de nouveaux épitopes ou en démasquant des épitopes allergènes normalement inaccessibles pour les anticorps. C'est par exemple le cas du lait ayant subi un traitement thermique modéré (chauffage, pasteurisation). En revanche, dans le cas d'un traitement thermique sévère (séchage), des protéines modifiées par formation de liaisons covalentes apparaissent et pourraient se révéler allergisantes (Wal, 2003 ; Sanchez, 2003).

## FONCTION AU SEIN DE L'ORGANISME VIVANT

Il n'y a pas de lien étroit entre la fonction d'une protéine et son caractère allergisant. Cependant, il a été constaté que les allergènes ont souvent une activité enzymatique (Bredehorst, 2001). Malandain relève 211 enzymes sur 818 allergènes, soit environ 25 % (Malandain, 2005).

(8) Lipid Transfer Protein.  
(9) Pathogenesis-Related.

*Resistance to thermal denaturation may play a significant role in allergenicity. It would take account of the stability of epitopes and grant certain proteins, such as Ara h 1 in peanuts (Koppelman, 1999), Pru av 3 in cherries (LTP<sup>(8)</sup> non specific, present in a large number of fruit) (Scheurer, 2004), tropomyosin in prawns (Hoffman, 1981), or ovomucoid in eggs (Hirose, 2004), a constant capacity to bond with IgEs regardless of the modalities and intensity of the thermal treatment.*

*Certain allergens are, on the other hand, very labile and no longer recognised as such when the product is cooked. This is particularly the case for homologues of Bet v 1 (allergen in birch pollen) present in Rosaceae fruit: apples (Mal d 1), pears (Pyr c 1), cherries (Pru av 1), etc. (Vieths, 2002). However, these homologues of Bet v 1 (proteins PR10<sup>(9)</sup>) present in soybean and peanuts (oleaginous plants) are still capable of provoking systematic reactions after allergenic products are heated (Mittag, 2004a, 2004b): the thermolability study in pure proteins may therefore be biased by these possible interactions between molecules during heating.*

*Thermostable and thermolabile allergens coexist in the same food. Inter-individual sensitization variations explain that certain patients tolerate a food when it is cooked, while others cannot tolerate it when it is cooked or raw.*

*In some cases, heating may increase a food's allergenicity, by provoking the formation of new epitopes or by revealing allergenic epitopes that are normally inaccessible for antibodies. For example, this is the case for milk which has undergone a moderate thermal treatment (heating, pasteurisation). On the other hand, in the case of severe thermal treatment (drying), proteins modified by the formation of covalent bonds appear and could manifest themselves as allergenic (Wal, 2003; Sanchez, 2003).*

## BIOLOGICAL FUNCTION

*The function of a protein and its allergenic character are not closely related. However, it has been observed that allergens often have an enzymatic activity (Bredehorst, 2001). Malandain quotes 211 enzymes out of 818 allergens, i.e. around 25% (Malandain, 2005).*

(8) Lipid Transfer Protein.  
(9) Pathogenesis-Related.

Les allergènes végétaux sont présents aussi bien dans les fruits et légumes aqueux que dans les graines et oléagineux. Les allergies croisées entre des fruits et des légumes phylogénétiquement éloignés sont nombreuses, car les allergènes sont souvent des protéines fonctionnellement indispensables, conservées à quelques modifications près au cours de l'évolution. Les familles de panallergènes végétaux<sup>(10)</sup> peuvent être réparties en trois groupes (Mills, 2004) :

■ **les protéines structurelles et métaboliques** : enzymes impliquées dans la biosynthèse et le catabolisme, protéines présentes dans les membranes cellulaires, transporteurs... ;

*Ex : les profilines, qui contrôlent la polymérisation de l'actine dans les cellules eucaryotes (Gly m 3 du soja, Lyc e 1 de la tomate, Api g 4 du céleri notamment)*

■ **les protéines de stress**, qui permettent à la plante de résister aux parasites (nématodes, insectes...), à différents microorganismes pathogènes (champignons, bactéries, virus) et aux agressions chimiques et physiques (stress hydrique, salin...). Actuellement, 17 familles de protéines PR ont été identifiées (Van Loon, 1999 ; Hoffmann-Sommergrüber, 2002 ; Christensen, 2002) ;

*Ex : Pru p 3 de la pêche, Jug r 3 de la noix, Mal d 3 de la pomme sont des protéines de transfert des lipides (LTP) appartenant à la famille PR-14.*

■ **les protéines de réserve**, utilisées lors de la germination (2S-albumines, 7S/8S-globulines, 11S/12S-globulines, prolamines).

*Ex : Ara h 1, 2, 3, 4, 6, 7 de l'arachide, Ses i 1, 2, 3 du sésame, Fag e 1 du sarrasin sont des protéines de stockage.*

Cependant, les connaissances concernant les protéines végétales se sont considérablement améliorées depuis les vingt dernières années, les nouvelles techniques permettant désormais de mieux connaître leur séquence en acides aminés et leur structure tridimensionnelle : ainsi peut-on les classer différemment, sur la base des modifications structurelles qui se sont produites au cours de l'évolution.

On distingue de cette façon des « superfamilles » de protéines, parmi lesquelles celle des protéases à cystéines, celle des prolamines et celle des cupines. Les deux dernières sont à l'origine de la plupart des protéines de réserve (prolamines, inhibiteurs d' $\alpha$ -amylase et de trypsine, 2S-albumines et LTP non spécifiques pour la superfamille des prolamines ; 7S-globulines et 11S-globulines pour la superfamille des cupines).

Cependant, si certaines familles de protéines sont plus souvent retrouvées que d'autres parmi les allergènes connus à l'heure actuelle (Malandain, 2004a), la très grande majorité des allergènes présents dans les produits naturels ne sont pas encore répertoriés, comme le montrent certains immunotransferts en deux dimensions (Sander, 2001 ; Fujimura, 2004).

(10) Panallergènes végétaux : allergènes présents dans une très grande variété de végétaux.

*Plant allergens are present in both aqueous fruit and vegetables and seeds and oleaginous plants. Cross-allergies between phylogenetically separated fruit and vegetables are manifold, since allergens are often functionally essential proteins, preserved, save for a few modifications, during development. The families of plant panallergens<sup>(10)</sup> can be divided up into three groups (Mills, 2004):*

■ **structural and metabolic proteins**: enzymes involved in biosynthesis and catabolism, proteins present in cellular membranes, carriers, etc. E.g.: profilins, which control the polymerisation of actin in eukaryotic cells (Gly m 3 from soybean, Lyc e 1 from tomatoes, Api g 4 from celery in particular)

■ **stress proteins**, which enable plants to resist parasites (nematodes, insects, etc.), various pathogenic micro-organisms (mushrooms, bacteria, viruses) and chemical and physical aggressions (hydric stress, salts, etc.). At present, 17 families of PR proteins have been identified (Van Loon, 1999; Hoffmann-Sommergrüber, 2002; Christensen, 2002). E.g.: Pru p 3 in fish, Jug r 3 in walnuts, Mal d 3 in apples are lipid-transfer proteins (LTP) belonging to the PR-14 family.

■ **reserve proteins**, used during germination (2S-albumins, 7S/8S-globulins, 11S/12S-globulins, prolamins) E.g.: Ara h 1, 2, 3, 4, 6, 7 in peanuts, Ses i 1, 2, 3 in sesame seeds, Fag e 1 in buckwheat are storage proteins.

*However, knowledge regarding plant proteins has often greatly improved over the last twenty years, since new techniques have given a better insight into their amino acid sequence and their tridimensional structure: they can thus be categorised differently, on the basis of the structural modifications which occurred during development.*

*In this way, "superfamilies" of proteins can be distinguished, including cysteine proteases, prolamin and cupines. The latter two are at the root of most reserve proteins (prolamins, inhibitors of  $\alpha$ -amylase and trypsin, 2S-albumins and non-specific LTPs for the prolamin superfamily; 7S-globulins and 11S-globulin for the superfamily of cupines).*

*However, although certain families are more commonly found than others among the known allergens at present (Malandain, 2004a), the greatest majority of allergens in natural products have not yet been listed, as shown by certain immunotransfers in two dimensions (Sander, 2001; Fujimura, 2004).*

(10) Plant panallergens: allergens present in a very wide variety of plants.

## INFLUENCE DES TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES

Il est important de tenir compte des traitements technologiques (physico-chimiques, mécaniques ou thermiques), qui interviennent après la récolte. Ceux-ci peuvent contribuer à augmenter ou diminuer l'allergénicité des aliments.

Une réduction de l'allergénicité est notamment observée :

- lors de la fabrication d'une huile ou de l'extraction d'un amidon hautement purifiés (élimination presque totale des protéines) ;
- lors de l'hydrolyse des protéines pour la fabrication de formules infantiles hypoallergéniques : les protéines dénaturées ont perdu beaucoup de leur immunogénicité.

Inversement, l'allergénicité peut augmenter avec certains facteurs. Les risques sont principalement liés à :

- **l'ajout d'additifs et d'auxiliaires de fabrication**, qui peuvent être eux-mêmes allergisants (ex : caséinates employés comme texturants), ou interagir avec les protéines de l'aliment et modifier son allergénicité (« adjuvants » à l'allergénicité) ;
- **le stockage** : le taux de certains allergènes peut augmenter et de nouveaux allergènes peuvent apparaître. De nouveaux déterminants allergisants apparaissent lors du stockage de la noix de pécan (Malanin, 1995) ;
- **le chauffage** des aliments (p. 20).

## INFLUENCE OF TECHNOLOGICAL TREATMENTS

*It is important to take account of the technological treatments (physico-chemical, mechanical or thermal) that are applied after harvesting, since they can contribute to increasing or decreasing the allergenicity of food.*

*A reduction of the allergenicity is observed particularly:*

- *During the manufacture of an oil or the extraction of a highly purified starch (elimination of proteins is almost total);*
- *During the hydrolysis of proteins for the manufacture of hypoallergenic formulas for infants: denatured proteins lose much of their immunogenicity.*

*On the contrary, allergenicity can increase with certain factors. The risks are mainly associated with:*

- **The addition of additives and manufacturing add-ins**, which can themselves be allergenic (e.g.: caseinates used as texturising agents), or interact with the food proteins, thus modifying its allergenicity ("adjuvants" to allergenicity);
- **Storage**: the rate of certain allergens may increase and new allergens may appear. New allergenic determinants appear when pecan nuts are stored (Malanin, 1995);
- **Heating** of food (p. 20).





# CONSÉQUENCES POSSIBLES D'UNE MODIFICATION GÉNÉTIQUE SUR LA COMPOSITION D'UN ALIMENT

## POSSIBLE CONSEQUENCES OF A GENETIC MODIFICATION ON A FOOD'S COMPOSITION

### LA MODIFICATION GÉNÉTIQUE

La MG<sup>(11)</sup> consiste à introduire un nouveau gène dans le patrimoine génétique d'un organisme vivant, afin d'améliorer ses performances agronomiques ou ses qualités nutritionnelles. Pour cela, on identifie la ou les protéines responsables du caractère d'intérêt, ainsi que le gène qui en est à l'origine. Une construction génétique est réalisée, qui comporte :

- le gène d'intérêt constitué de la séquence codant la protéine d'intérêt, sous contrôle d'un promoteur et d'un terminateur de transcription (séquences d'ADN<sup>(12)</sup> qui permettent d'amorcer et d'arrêter la transcription) ;
- éventuellement un gène marqueur (par exemple, un gène de fonction métabolique définie) avec ses propres signaux de régulation, qui permet d'identifier les organismes ayant intégré le gène d'intérêt (présence de la protéine « marqueur »).

Cette construction génétique est transférée dans le génome de l'organisme hôte (la PGM) soit par l'intermédiaire d'une bactérie, soit par projection de microbilles métalliques sur lesquelles on a fixé les copies de la construction génétique (dans ce dernier cas, l'insertion dans le génome nucléaire est non contrôlée).

Les plantes issues de cellules dans lesquelles la MG a bien été introduite sont sélectionnées sur le fait qu'elles expriment la protéine codée par le gène marqueur.

### EFFETS DIRECTS DE L'INSERTION DE GÈNES ET DE LEURS PRODUITS

Lors de la MG, on essaie d'introduire dans la construction génétique uniquement le gène codant la protéine désirée (avec éventuellement un gène marqueur). Du point de vue de l'allergénicité, le risque se situe donc :

- au niveau de la protéine d'intérêt : celle-ci peut présenter un caractère allergène. Ex : introduction par MG de l'albumine 2S de la noix du Brésil dans le soja (p. 53) ;
- au niveau des protéines codées par l'ADN plasmidique introduit en plus de la séquence codant la protéine désirée, ces protéines pouvant être potentiellement allergéniques ;

(11) Modification Génétique.

(12) Acide DésoxyriboNucléique.

### GENETIC MODIFICATION

GMn<sup>(11)</sup> involves the introduction of a new gene in the genetic heritage of a living organism, with the aim of improving its agronomic performances or nutritional qualities. For this, the protein(s) responsible for the character of interest is identified, as well as the gene at its origin. A genetic construction is carried out, comprising:

- The constituted gene of interest of the sequence coding the protein of interest, controlled by a promoter and transcription terminator (DNA<sup>(12)</sup> sequences which start up or end the transcription),
- Possibly a marker gene (for example, a gene of defined metabolic function) with its own regulatory signals, enabling the identification of organisms that have integrated the gene of interest (presence of the "marker" protein).

This genetic construction is then transferred in the genome of the host organism (the GMP) either through a bacteria or through projecting metallic microbeads on which copies of the genetic construction are fixed (in the latter case, insertion in the nuclear genome is not controlled).

Plants obtained from cells in which the GMn was introduced are selected on the basis that they express the protein coded by the marker gene.

### DIRECT EFFECTS OF THE INSERTION OF GENES AND THEIR PRODUCTS

During genetic modification, attempts are made only to introduce the gene coding the desired protein into the genetic construction (with possibly a marker gene). In allergenicity terms, the risk therefore lies in:

- the protein of interest: this may present an allergenic character. E.g.: introduction by GMn of the albumin 2S in brazil nuts into soybean (p. 53);
- the proteins coded by plasmidic DNA introduced in addition to the sequence coding the desired protein, these proteins may be potentially allergenic;

(11) Genetic Modification.

(12) DesoxyriboNucleic Acid.

■ au niveau de l'intégration du transgène dans le génome : si la région où s'insère le transgène est codante, on ne peut exclure la possibilité de formation d'une « protéine de fusion », résultant de la traduction du transgène avec une partie du génome hôte qui l'encadre.

Il faut souligner ici que les méthodes de sélection traditionnelles peuvent elles aussi conduire, entre espèces et même entre genres, au transfert de vastes portions d'ADN non caractérisées, qui peuvent être supérieures de plusieurs ordres de grandeur à celles transférées par MG (Robinson, 2003). Des changements au niveau des caractéristiques nutritionnelles, de la toxicité et du potentiel allergénique peuvent donc survenir quel que soit le mode d'obtention de la nouvelle plante (Kleter, 2003).

### **EFFETS INDIRECTS ET INATTENDUS DE L'EXPRESSION D'UN GÈNE : LE PLÉIOTROPISME**

Les mécanismes par lesquels les voies biochimiques sont contrôlées dans les plantes et les micro-organismes ne sont pas complètement élucidés.

Un certain nombre de gènes introduits par MG codent des enzymes, le but d'une MG étant souvent d'augmenter la quantité d'un produit particulier d'une réaction enzymatique. Par modification de certaines voies métaboliques, on peut faire varier le niveau d'expression d'autres produits de réaction et obtenir ainsi des augmentations ou des diminutions inattendues de ces produits. Ce phénomène pourrait conduire à l'apparition ou à l'augmentation du taux de certains allergènes dans l'aliment. Ces effets, dits pléiotropiques, ne sont toutefois pas spécifiques de l'état d'OGM.

### **MUTATIONS INATTENDUES RÉSULTANT DE L'INSERTION DE GÈNES OU DU RÉARRANGEMENT DE GÈNES**

Les mécanismes par lesquels les gènes sont inhibés ou activés commencent à être mieux compris. L'insertion non contrôlée d'une séquence d'ADN peut soit être neutre, soit inactiver l'expression de gènes propres à la plante d'origine, soit activer l'expression de certains gènes normalement « silencieux » (Robinson, 2003).

Il se pourrait que l'expression de certains gènes codant pour des allergènes soit involontairement activée suite à une MG. Mais ce risque, qui n'a pas été mis en évidence jusqu'à présent sur les PGM, existe également avec les méthodes de sélection conventionnelles (Kleter, 2003), tout particulièrement lors de la phase de transposition.

■ *the integration of the transgene into the genome: if the region where the transgene is inserted is coding, the possibility of a "fusion protein" forming, as a result of the translation of the transgene with part of the host genome supporting it, cannot be excluded.*

*It should be emphasised that traditional methods of selection can also, between species and even between genders, lead to the transfer of vast non-characterised portions of DNA, which may be larger by significant degrees than those transferred by GMn (Robinson, 2003). Changes regarding nutritional characteristics, toxicity and the allergenic potential may thus arise regardless of the means by which the new plant is obtained (Kleter, 2003).*

### **INDIRECT AND UNEXPECTED EFFECTS OF THE EXPRESSION OF A GENE: PLEIOTROPISM**

*The mechanisms by which biochemical ways are controlled in plants and micro-organisms are not entirely clear.*

*A certain number of genes introduced by GMn code enzymes, since the aim of a GMn is often to increase the quantity of a particular product of an enzymatic reaction. By modifying certain metabolic ways, it is possible to vary the level of expression of other reaction products and thus to obtain unexpected increases or decreases of these products. This phenomenon may lead to the appearance or increase in the rate of certain allergens in food. These "pleiotropic" effects are not specific to the state of a GMO, however.*

### **UNEXPECTED MUTATIONS RESULTING FROM THE INSERTION OF GENES OR THE REARRANGEMENT OF GENES**

*A better understanding of the mechanisms by which genes are inhibited or activated is dawning. The uncontrolled insertion of a DNA sequence may either be neutral, or inactivate the expression of genes in the plant of origin, or activate the expression of certain genes that are normally "silent" (Robinson, 2003).*

*It is possible that the expression of certain coding genes for allergens are involuntarily activated following a GMn. But this risk, which has not yet been revealed on GMPs, also exists with conventional methods of selection (Kleter, 2003), particularly during the transposition phase.*

## RISQUES ALLERGIQUES THÉORIQUES LIÉS À LA MODIFICATION GÉNÉTIQUE

Actuellement, les transgènes sont des constructions relativement simples : il s'agit souvent d'un gène codant une protéine d'intérêt. Mais il existe déjà des constructions avec deux ou trois transgènes, voire quatre (cas du riz doré). Il est probable que des constructions plus complexes puissent voir le jour à des fins agronomiques (pour obtenir une résistance aux stress abiotiques, notamment). Mais la présence d'un seul transgène peut déjà, à elle seule, entraîner une modification de l'expression de plusieurs protéines (notion de pléiotropisme, p. 26). La mise au point de PGM à visée nutritionnelle pourrait, quant à elle, peut-être impliquer des modifications génétiques plus complexes, et modifier de façon plus importante certaines voies métaboliques, étant donné que le but recherché est de faire varier significativement la composition en nutriments de la plante (par exemple pour réaliser un enrichissement en protéines ou en acides aminés dits indispensables).

Si aujourd'hui, on sait quel est le nombre de copies du transgène insérées, leur localisation dans le génome, les régions bordures de l'insertion, etc., les effets de la MG sur l'expression de l'ensemble du génome restent mal connus. Certains gènes fonctionnent en effet en interaction les uns avec les autres, peuvent devenir silencieux ou être activés suite à une MG (ce qui peut être également le cas suite à un croisement par exemple). Idéalement, il ne faudrait donc pas s'intéresser uniquement aux effets directs de la MG (synthèse d'une protéine d'intérêt codée par un transgène), mais également aux effets sur le métabolisme de la plante hôte dans son ensemble.

Si l'on considère les **risques potentiels** d'allergie qui pourraient résulter d'une MG, on peut donc identifier (Lehrer, 2005) :

- le risque de provoquer de **nouvelles sensibilisations** puis de nouvelles allergies au sein de la population, du fait de la présence de nouveaux allergènes dans les aliments et/ou dans le pollen. Ces nouveaux allergènes peuvent être :
  - des protéines codées par les transgènes,
  - des protéines « de fusion »,
  - des protéines dont l'expression résulte de l'activation ou de l'inactivation involontaire de gènes par la modification génétique ;
- le risque d'induire des **allergies croisées** dues à une homologie entre ces nouveaux allergènes et des allergènes existants, auxquels certains individus sont déjà sensibilisés ;
- le risque d'**augmenter les sensibilisations** d'une part, et d'**aggraver les manifestations cliniques de l'allergie** d'autre part, du fait d'une sur-expression des allergènes existant en faible quantité dans la plante non GM.

## THEORETIC ALLERGIC RISKS ASSOCIATED WITH GENETIC MODIFICATION

*At present, transgenes are relatively simple constructions: they are normally genes coding a protein of interest. But there are already constructions with two, three, and even four transgenes (in the case of golden rice). It is very likely that more complex constructions could emerge for agronomic purposes (to gain resistance to abiotic stress, in particular). But the presence of a single transgene can well suffice to modify the expression of various proteins (concept of pleiotropism, p. 26). Developing GMPs for nutritional purposes could involve more complex genetic modifications and modify certain metabolic ways more significantly, given that the aim sought is to considerably vary the nutritional composition of the plant (for example by so-called essential amino acid or protein fortification).*

*Although at present we know the number of copies of the transgene inserted, their location in the genome, the bordering regions of the insertion, etc., little is still known about the effects of GMn on the expression of the whole genome. Indeed, certain genes function in interaction with each other and may become silent or be activated following a GMn (which may also be the case after crossing for example). Ideally, interest should not just be taken in the direct effects of GMn then (synthesis of a protein of interest coded by a transgene), but also in the effects on the metabolism of the host plant in its entirety.*

*If the **potential allergic risks** which could result from a GMn are considered, the following can be identified (Lehrer, 2005):*

- *The risk of provoking **new sensitizations** and thus new allergies in the population, due to the presence of new allergens in food and/or in pollen. These new allergens may be:*
  - *proteins coded by transgenes,*
  - *“fusion” proteins,*
  - *new proteins whose expression results from the involuntary inactivation or activation of genes by the genetic modification;*
- *The risk of inducing **cross-allergies** due to a homology between these new allergens and existing allergens, to which certain people are already sensitized;*
- *The risk of **increasing sensitizations** on the one hand, and of **aggravating the clinical manifestations of the allergy** on the other, due to an over-expression of the existing allergens in a low quantity in the non-GM plant.*



# MÉTHODES D'ÉVALUATION DE L'ALLERGÉNICITÉ D'UNE PGM

## METHODS FOR ASSESSING THE ALLERGENICITY OF A GMP

### PRINCIPE DE L'ÉQUIVALENCE SUBSTANTIELLE

La comparaison d'une plante GM avec la plante non GM la plus proche peut être un outil de l'évaluation sécuritaire. Le but de l'évaluation ne peut pas être d'établir une sécurité absolue, il est de montrer que la PGM est « équivalente en substance » à un témoin isogénique (plante la plus proche obtenue par des méthodes conventionnelles). L'équivalence en substance est estimée en comparant la composition chimique des deux organismes, notamment au niveau des allergènes.

Les limites de cette méthode sont liées à la grande variabilité des plantes (Robinson, 2003). Il y a en effet d'importantes différences de composition entre deux variétés d'une même plante. Ces variations sont dues aux conditions agroenvironnementales (culture, milieu, climat) et de parcours de la variété (récolte, stockage). Par ailleurs, les différentes étapes de transformation font également varier la complexité chimique des aliments.

### LES MÉTHODES ACTUELLES

Les recommandations du Comité d'experts FAO/WHO<sup>(13)</sup> concernant l'évaluation du risque allergénique d'un OGM ont été publiées en janvier 2001 (FAO/WHO, 2001). Une approche par arbre de décision, en quatre étapes, a été proposée (Annexe 3). D'autres arbres de ce type avaient déjà été établis auparavant : l'IFBC<sup>(14)</sup>/ILSI<sup>(15)</sup> en 1996 (Metcalf, 1996) avait imaginé un processus décisionnel basé sur les mêmes tests, mais dont le cheminement était différent (Annexe 1). La FAO/WHO elle-même en 2000 avait établi un arbre (Annexe 2), qui a évolué pour donner celui présenté en Annexe 3.

Ce dernier n'a cependant pas été repris par le Codex Alimentarius dans l'annexe sur l'évaluation de l'allergénicité potentielle, qui figure dans le Projet de directives régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné (CCA, 2002). L'EFSA<sup>(16)</sup> n'a pas non plus retenu l'arbre décisionnel dans son rapport sur l'évaluation des risques liés aux OGM (EFSA, 2004).

(13) Food and Agriculture Organization / World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé).

(14) International Food Biotechnology Council.

(15) International Life Science Institute.

(16) European Food Safety Agency (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments).

### PRINCIPLE OF SUBSTANTIAL EQUIVALENCE

*The comparison of a GM plant with the closest related non-GM plant may be a security assessment tool. The aim of the assessment cannot be to establish absolute safety, but rather to prove that the GMP is "equivalent in substance" to an isogenic control (the most similar plant obtained through conventional methods). The equivalence in substance is estimated by comparing the chemical composition of the two organisms, particularly in terms of allergens.*

*The limits of this method are associated with the wide variability of plants (Robinson C, 2003), since there are significant composition differences between two varieties of the same plant. These variations are due to agroenvironmental conditions (cultivation, environment, climate) and variety processes (harvesting, storage). Moreover, the various processing phases also cause the chemical complexity of food to vary.*

### CURRENT METHODS

*The recommendations of the FAO/WHO<sup>(13)</sup> Expert Committee regarding the allergenic risk assessment of a GMO were published in January 2001 (FAO/WHO, 2001). An approach based on a decision tree, in four phases, was proposed (Annex 3). Other trees of this type have already been established previously: The IFBC<sup>(14)</sup>/ILSI<sup>(15)</sup> in 1996 (Metcalf, 1996) devised a decisional process based on the same tests, but with a different development (Annex 1). In 2000, the FAO/WHO itself established a decision tree (Annex 2), which developed into the one featured in Annex 3.*

*This version was not selected, however, by the Codex Alimentarius in the annex on the assessment of a potential allergenicity featuring in the Draft of directives governing the management of the safety assessment of food derived from recombinant-DNA plants (CCA, 2002). The EFSA<sup>(16)</sup> did not select the decision tree either in its report on the assessment of genetically modified plants and derived food and feed (EFSA, 2004).*

(13) Food and Agriculture Organization / World Health Organization.

(14) International Food Biotechnology Council.

(15) International Life Science Institute.

(16) European Food Safety Agency.



Il existe à ce jour peu d'applications publiées du protocole d'évaluation FAO/WHO : on relève l'étude d'une *ice structuring protein* (Bindslev-Jensen, 2003) et l'étude d'une transglutaminase (Pedersen, 2004), qui ne sont ni l'une ni l'autre des protéines présentes dans des plantes GM.

Dans la pratique, les sociétés de biotechnologie réalisent tous les tests disponibles (digestion par des protéases, homologie de séquence...) indépendamment des résultats obtenus pour l'un ou l'autre des tests. L'allergénicité est ainsi évaluée au cas par cas. C'est pourquoi l'approche par arbre décisionnel n'a pas été reprise par le Codex Alimentarius, ni par l'EFSA. Dans les paragraphes qui suivent, l'intérêt et les limites des tests actuellement effectués sont discutés :

- allergénicité de la source du transgène ;
- homologie de séquence entre la protéine issue du transgène et des allergènes connus ;
- digestibilité *in vitro* de la protéine ;
- tests immunologiques sur sérums humains « spécifiques » et « ciblés » ;
- tests *in vivo*.

### Étude de l'allergénicité de l'espèce à l'origine du transgène

#### Principe

La première étape consiste à étudier l'allergénicité de l'organisme source du transgène : celui-ci a-t-il déjà été à l'origine de réactions allergiques suite à une exposition orale, respiratoire ou cutanée ?

Tous les cas documentés d'allergie doivent être répertoriés, avec des informations sur le type, la gravité et la fréquence des réactions. Lorsqu'elles sont disponibles, la caractérisation structurale, la séquence en acides aminés, les propriétés immunologiques et physicochimiques des protéines allergènes impliquées doivent être renseignées.

Pour ce faire, une étude de la littérature scientifique et une recherche dans les bases de données regroupant les allergènes connus sont nécessaires. Il existe un certain nombre de bases de données :

- UniProt/Swiss-Prot<sup>(17)</sup> - Université de Genève et European Bioinformatic Institute, UK
- PIR<sup>(18)</sup> (Protein Information Resource) - National Biomedical Research Foundation et Georgetown University Medical Center, USA
- SDAP<sup>(19)</sup> (Structural Database of Allergenic Proteins) - Université du Texas, USA
- Allergen Database du CSL<sup>(20)</sup> - Central Science Laboratory, UK

(17) <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>

(18) <http://pir.georgetown.edu/>

(19) [http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap\\_src.html](http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_src.html)

*To date, there have been few applications published of the FAO/WHO assessment protocol: we note the study of an ice structuring protein (Bindslev-Jensen, 2003) and the study of a transglutaminase (Pedersen, 2004), neither of which are proteins found in GM plants.*

*In practice, biotechnology companies are conducting all the available tests (peptic digestion, sequence homology, etc.) independently of the results obtained for one or other of the tests. Allergenicity is therefore assessed on a case by case basis. This is why the decision tree approach was not chosen by the Codex Alimentarius, or the EFSA. In the following paragraphs, the interest and limits of the tests currently being carried out are discussed:*

- *allergenicity of the source of the transgene;*
- *sequence homology between the protein coded by the transgene and known allergens;*
- *digestibility in vitro of the protein;*
- *immunological tests with "specific" and "targeted" human sera;*
- *tests in vivo.*

### Study of the allergenicity of the transgene source

#### Principe

*The first phase involves studying the allergenicity of the source organism of the transgene: has it already been the cause of allergic reactions following oral, respiratory or skin exposure?*

*All the documented allergy cases must be listed, with information on the type, gravity and frequency of the reactions. When it is available, information must also be given on the structural characterisation, the amino acid sequence and the immunological and physico-chemical properties of the allergenic proteins involved.*

*A study of the scientific literature and research into the databases covering the known allergens are necessary to obtain this information. There are a certain number of databases:*

- *UniProt/Swiss-Prot<sup>(17)</sup> - University of Geneva and European Bioinformatic Institute, UK*
- *PIR<sup>(18)</sup> (Protein Information Resource) - National Biomedical Research Foundation and Georgetown University Medical Center, USA*
- *SDAP<sup>(19)</sup> (Structural Database of Allergenic Proteins) - University of Texas, USA*
- *Allergen Database of the CSL<sup>(20)</sup> - Central Science Laboratory, UK*

(17) <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>

(18) <http://pir.georgetown.edu/>

(19) [http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap\\_src.html](http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_src.html)

- Allergen Database de l'I2R<sup>(20)</sup> - Institute for Infocomm Research, Singapour
- Allergen Sequence Database du NCFST<sup>(22)</sup> - National Center for Food Safety and Technology, Illinois Institute of technology, USA
- Allergen Database du FARRP<sup>(23)</sup> - Food Allergy Research and Resource Program, USA
- Allergome<sup>(24)</sup> : nouvelle base de données financée par un programme européen et pilotée par un organisme à but non lucratif. Cette base, régulièrement mise à jour, est actuellement l'une des plus exhaustives.

Les experts internationaux recommandent par ailleurs de prendre en compte le fait que la protéine codée par le transgène appartient ou non à une famille d'allergènes végétaux proches d'un point de vue structurel (FAO/WHO, 2001).

### Limites

Tous les aliments contenant des protéines peuvent potentiellement déclencher des réactions allergiques. Il n'est pas exclu que l'allergénicité de protéines introduites volontairement dans une PGM soit mise en évidence par l'existence de réactions chez un certain nombre de consommateurs après la mise sur le marché de la PGM. Ceci est d'autant plus vrai qu'actuellement, les protéines codées par les gènes qui ont été transférés peuvent provenir de microorganismes dont le potentiel allergène est mal connu, ou d'organismes n'ayant jamais été intégrés au régime alimentaire de l'homme.

À titre d'exemple, une transgénèse a été effectuée en 1999 sur une pomme de terre, avec un inhibiteur d'invertase issu du tabac (Greiner, 1999). Un enzyme de la même famille (*Pla a 1*, allergène du pollen de platane) a été montré IgE-réactif quatre ans plus tard (Asturias, 2003).

## Homologie de séquence avec des allergènes connus

### Principe

Des banques de données répertoriant les allergènes connus et leur séquence sont disponibles sur internet (p. 30). Connaissant la séquence de la protéine introduite dans la PGM, il est possible, grâce à des programmes informatiques de comparaison (algorithmes FASTA, BLASTP), d'évaluer le degré d'homologie (pourcentage d'identité, pourcentage de similitude) entre cette protéine et un ou plusieurs allergènes connus.

(20) <http://allergen.csl.gov.uk/>

(21) <http://sdmc.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/Allergen/>

(22) <http://www.iit.edu/~sgendel/fa.htm>

(23) <http://allergenonline.com>

(24) <http://allergome.org>

- Allergen Database of the I2R<sup>(20)</sup> - Institute for Infocomm Research, Singapore
- Allergen Sequence Database of the NCFST<sup>(22)</sup> - National Center for Food Safety and Technology, Illinois Institute of technology, USA
- Allergen Database of the FARRP<sup>(23)</sup> - Food Allergy Research and Resource Program, USA
- Allergome<sup>(24)</sup> : new database funded by a European programme and run by a non-profitmaking organisation. At present, this is one of the most exhaustive databases available and is regularly updated.

International experts also recommend taking account of the fact that the protein coded by the transgene may or may not belong to a family of plant allergens that resemble each other from a structural viewpoint (FAO/WHO, 2001).

### Limits

All foods containing proteins have the potential to trigger allergic reactions. It cannot be excluded that the allergenicity of proteins introduced voluntarily into a GMP be proven by the existence of reactions in a certain number of consumers after the GMP is put on the market. This is all the more the case since, at present, the proteins coded by the genes which have been transferred can come from micro-organisms whose potential allergens are little known, or from organisms which have never been integrated into human diet.

As an example, a transgenesis was carried out in 1999 on potatoes, with an invertase inhibitor from tobacco (Greiner, 1999). An enzyme from the same family (*Pla a 1*, an allergen from the pollen from plane trees) was shown to be IgE-reactive four years later (Asturias, 2003).

## Sequence homology with known allergens

### Principe

Databases listing the known allergens and their sequence are available on the internet (p. 30). By knowing the sequence of the protein introduced into the GMP, it is possible, using comparison computer programs (FASTA, BLASTP algorithms), to assess the homology degree (percentage of identity, percentage of similarity) between this protein and one or several known allergens.

(20) <http://allergen.csl.gov.uk/>

(21) <http://sdmc.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/Allergen/>

(22) <http://www.iit.edu/~sgendel/fa.htm>

(23) <http://allergenonline.com>

(24) <http://allergome.org>



On distingue « identité » et « similitude » :

■ il y a identité lorsque tous les acides aminés sont les mêmes et que les fragments peuvent parfaitement se superposer :

Ala – Pro – Met – Lys – Cys – Met – His – Thr – Ala – Leu – Asp – Val – Gln – Asn – Tyr

Lys – Ala – Leu – Lys – Cys – Met – His – Thr – Ala – Leu – Asp – Val – Gln – Thr – Cys

■ il y a similitude lorsqu'un ou plusieurs acides aminés ont été remplacés par des acides aminés chimiquement proches :

Ala – Pro – Met – Lys – Cys – Met – His – Thr – Ala – Leu – Asp – Val – Gln – Asn – Tyr

Lys – Ala – Leu – Lys – Cys – Met – His – Thr – Gly – Leu – Glu – Val – Gln – Thr – Cys

Les experts de la consultation FAO/WHO de 2001 estiment qu'une succession d'au moins six acides aminés identiques peut suffire à conférer un caractère allergénique à la protéine (FAO/WHO, 2001). Cependant, ce nombre semble ne pas être assez discriminant car beaucoup de « faux positifs » sont retrouvés (Hileman, 2002 ; Goodman, 2005). La recherche d'une succession de huit acides aminés serait peut-être plus pertinente (critère choisi par l'OCDE).

Une autre approche consiste à observer le pourcentage d'identité sur un fragment d'au moins 80 acides aminés. Si celui-ci est supérieur à 35 %, la protéine serait « à risque allergénique » (FAO/WHO, 2001). Bien que l'allergénicité puisse parfois être concentrée dans une portion de moins de 80 acides aminés (c'est notamment le cas du domaine hévéine des chitinases (Diaz-Perales, 2003)), certains auteurs pensent que ces 35 % d'identité ne sont peut-être pas assez discriminants (Hileman, 2002 ; Goodman, 2005).

### Limites

L'absence de séquences communes ou voisines ne constitue pas une garantie formelle d'innocuité : peu d'informations sont actuellement disponibles dans les banques de données, et trop peu d'allergènes y sont répertoriés.

D'autre part, la comparaison ne porte que sur des épitopes séquentiels (ou continus), puisque seules les similitudes au niveau de la séquence des acides aminés sont recherchées. Or beaucoup de réactions croisées sont dues à des épitopes conformationnels (discontinus) (Wal, 1998b) : de petites séquences homologues, de moins de six acides aminés, peuvent se rapprocher lors du repliement tertiaire de la molécule, ce qui peut conduire à la formation d'entités immunoréactives.

### Perspectives

Sur l'initiative de plusieurs sociétés de biotechnologie, une base de données en accès libre sur Internet, regroupant toutes les données des bases précédemment

*“Identity” and “similarity” are distinguished as follows:*

■ *there is identity when all the amino acids are the same and the fragments may be superposed perfectly:*

*Ala – Pro – Met – Lys – Cys – Met – His – Thr – Ala – Leu – Asp – Val – Gln – Asn – Tyr*

*Lys – Ala – Leu – Lys – Cys – Met – His – Thr – Ala – Leu – Asp – Val – Gln – Thr – Cys*

■ *there is similarity when one or several amino acids have been replaced by chemically similar amino acids:*

*Ala – Pro – Met – Lys – Cys – Met – His – Thr – Ala – Leu – Asp – Val – Gln – Asn – Tyr*

*Lys – Ala – Leu – Lys – Cys – Met – His – Thr – Gly – Leu – Glu – Val – Gln – Thr – Cys*

*Experts at the 2001 FAO/WHO consultation believe that a succession of at least six identical amino acids is enough to give the protein an allergenic character (FAO/WHO, 2001). However, this number does not seem to be discriminating enough as many “false positives” are discovered (Hileman, 2002; Goodman, 2005). Research into a succession of eight amino acids would perhaps be more pertinent (criterion selected by the OECD).*

*Another approach consists in observing the percentage of identity on a fragment of at least 80 amino acids. If this is higher than 35%, the protein would have an “allergenic risk” (FAO/WHO, 2001). Although the allergenicity can often be concentrated in one portion of less than 80 amino acids (this is particularly the case in the hevein field of chitinases (Diaz-Perales, 2003)), some authors think that this 35% of identity is perhaps not discriminating enough (Hileman, 2002; Goodman, 2005).*

### Limits

*The absence of common or neighbouring sequences is not a formal guarantee of innocuity: little information is currently available in databases, and too few allergens are listed in them.*

*Moreover, comparison is only made with sequential (or continuous) epitopes, since only similarities concerning the sequence of amino acids are studied. Many cross-reactions are due, however, to conformational (discontinuous) epitopes (Wal, 1998b): short homologous sequences, of at least six amino acids, can draw closer together during the tertiary folding of the molecule, which can lead to the formation of immuno-reactive entities.*

### Prospects

*On the initiative of several biotechnology companies, a freely-accessible online database, gathering all the aforementioned databases, is due to be created. It*

citées, devrait être créée. Elle rassemblerait entre 2000 et 3000 allergènes connus, soit environ 800 séquences si l'on tient compte des redondances.

D'autres approches sont étudiées afin d'améliorer la prédiction des tests de comparaison de séquences (Kleter, 2002 ; Stadler, 2003 ; Ivanciuc, 2003 ; Zorzet, 2002). Cependant, ces méthodes ne semblent pas, pour l'instant, être plus efficaces que celle exposée précédemment.

## Digestion enzymatique *in vitro*

### Principe

Les protéines sont également étudiées dans des modèles de digestion artificielle. La résistance à la digestion pepsique a été observée pour différents allergènes alimentaires. Il y aurait une corrélation entre la résistance à la digestion pepsique et le potentiel allergénique (Astwood, 1996).

Les protéines non allergéniques sont en général rapidement détruites. Si, après incubation d'une heure avec de la pepsine, on constate la présence résiduelle de fragments supérieurs à 3,5 kDa, on estime que la protéine est à risque allergénique (FAO/WHO, 2001).

Un protocole standardisé de dégradation par la pepsine, validé par une étude inter-laboratoires (9 au total) a récemment été publié (Thomas, 2004). Cependant les experts FAO/WHO reconnaissent d'autres protocoles de sensibilité aux enzymes, si leur utilisation est correctement documentée (FAO/WHO, 2001).

### Limites

La digestion peut parfois faire apparaître de nouveaux épitopes (Wal, 2002). Certaines études ont aussi montré que de petits peptides pouvaient encore donner des tests cutanés positifs (Van Hoeyveld, 1998 ; Diaz-Perales, 2003).

Par ailleurs, les modèles de digestion *in vitro* sont loin d'approcher la complexité de la réalité. Dans le modèle de digestion gastrique, l'incubation se fait en présence de pepsine à pH 2. Or durant la phase de digestion postprandiale, le pH intragastrique chez l'homme est très supérieur et n'atteint une valeur de 2 à 3 que deux à trois heures après le début du repas (Tyssandier, 2003) : les tests habituellement pratiqués ont donc plutôt tendance à surévaluer la dégradation gastrique. Ceci est d'autant plus gênant qu'une autre étude (Scholl, 2005) a montré que la prise d'anti-acides chez la souris et chez l'homme modifiait profondément la réponse *in vivo*, en favorisant les sensibilisations et les réactions allergiques (à la noisette, en l'occurrence).

*will assemble between 2000 and 3000 known allergens, or around 800 sequences if redundancies are taken into account.*

*Other approaches are being studied in order to improve the prediction of sequence comparison tests (Kleter, 2002; Stadler, 2003; Ivanciuc, 2003; Zorzet, 2002). However, for the time being, these methods do not appear to be more effective than the method mentioned earlier.*

## *In vitro enzymatic digestion*

### *Principe*

*Proteins are also studied in models of artificial digestion. Resistance to pepsin digestion has been observed for various food allergens, and a correlation has been shown to exist between resistance to pepsin digestion and the allergenic potential (Astwood, 1996).*

*Non-allergenic proteins are generally destroyed quickly. If, after being incubated for one hour with pepsin, a residual presence of fragments higher than 3.5 kDa is noted, the protein is considered to carry an allergenic risk (FAO/WHO, 2001).*

*A standardised protocol of degradation by pepsin, validated by an inter-laboratory study (9 in total), has recently been published (Thomas, 2004). However, the FAO/WHO experts recognise sensitivity to enzymes in other protocols, if their use is correctly documented (FAO/WHO, 2001).*

### *Limits*

*Digestion can sometimes produce new epitopes (Wal, 2002). Certain studies have also shown that small peptides could still give positive skin prick-tests (Van Hoeyveld, 1998; Diaz-Perales, 2003).*

*Moreover, models of in vitro digestion are a long way from representing the complexity of reality. In models of gastric digestion, incubation is carried out in the presence of pepsin at pH 2. But during the postprandial digestion phase, the intragastric pH in humans is very high and only reaches a value of 2 to 3 two to three hours after the start of the meal (Tyssandier, 2003): the tests usually conducted thus tend to over-assess gastric degradation. This is all the more embarrassing since another study (Scholl, 2005) has proved that the consumption of anti-acids by mice and humans considerably altered the response in vivo, favouring sensitizations and allergic reactions (to hazelnuts, in this case).*

Des essais ont été tentés pour se rapprocher davantage des conditions réelles de digestion, en utilisant notamment du liquide gastrique de porc (Kopper, 2004). Les auteurs reconnaissent que l'expérience devrait être renouvelée avec l'allergène inclus dans un bol alimentaire normal, les conditions de digestibilité étant alors différentes (présence d'un effet matrice notamment (Teuber, 2002)).

Enfin, les tests de dégradabilité intestinale sont peu pratiqués. Certaines protéines se sont pourtant révélées très résistantes aux enzymes intestinales.

### Tests immunologiques

Il existe un grand nombre et une grande variété de tests immunochimiques. Dérivés des tests radioimmunologiques (RAST<sup>(25)</sup>), ils sont aujourd'hui souvent basés sur des réactions immunoenzymatiques (réactions colorimétriques : ELISA<sup>(26)</sup>, EAST<sup>(27)</sup>), ou une détection par luminescence (Immulite DC, Centaur Bayer) ou par fluorescence (CAP, Pharmacia).

#### **Dépistage sur sérums humains « spécifique »**

Lorsque l'organisme source du transgène est connu pour avoir provoqué des réactions allergiques, un dépistage sur sérums humains « spécifiques » devrait être pratiqué, afin d'évaluer le potentiel de liaison de la protéine codée par la transgène avec des IgE de patients allergiques à l'organisme source.

Il est nécessaire de disposer d'un maximum de sérums spécifiques pour réaliser ces tests : 14 sérums sont statistiquement suffisants pour prédire qu'une protéine n'est pas un allergène majeur, avec une probabilité de détection de 99,9 % (6 sérums assurant une probabilité de 95 %). La détection d'un allergène mineur réagissant avec 20 % de sérums spécifiques nécessite 24 sérums pour une probabilité de 99 % et 17 pour une probabilité de 95 %.

#### **Dépistage sur sérums humains « ciblés »**

Si le premier dépistage sur sérums spécifiques ne met pas en évidence un potentiel allergénique pour la protéine, un dépistage sur sérums « ciblés » peut être pratiqué (recherche élargie). Ce dépistage peut également être effectué lorsque le transgène provient d'un organisme qui n'est pas connu comme étant allergénique, sans qu'il y ait eu de dépistage sur sérums spécifiques au préalable (Cf. Annexe 3).

Les dépistages sur sérums « ciblés » doivent être réalisés avec des sérums provenant de patients allergiques à certaines catégories d'allergènes. On peut ainsi mettre

*Trials have been tested to bring them more into line with the real conditions of digestion, by using gastric liquid from pigs in particular (Kopper, 2004). The authors recognise that the experience should be repeated with the allergen included in a normal food bowl, with different digestibility conditions in this case (presence of a matrix effect in particular [Teuber, 2002]).*

*Lastly, intestinal degradability tests are rarely conducted. Certain proteins have nonetheless proved very resistant to intestinal enzymes.*

### **Solid phase immunoassay**

*There are a significant number and wide variety of immuno-chemical tests. Derived from radioimmunological tests (RAST<sup>(25)</sup>), today they are often based on immunoenzymatic reactions (colorimetric reactions: ELISA<sup>(26)</sup>, EAST<sup>(27)</sup>), or a detection by luminescence (Immulite DC, Centaur Bayer) or fluorescence (CAP, Pharmacia).*

#### **“Specific” serum screening**

*When the source organism of the transgene is known to have triggered allergic reactions, screening on “specific” human sera must be conducted to assess the potential of the protein coded by the transgene binding with the IgE of patients allergic to the source organism.*

*It is necessary to have a maximum of specific sera to carry out these tests: 14 sera are statistically enough to predict that a protein is not a major allergen, with a detection probability of 99.9% (6 sera guarantee a probability of 95%). The detection of a minor allergen reacting with 20% of specific sera requires 24 sera for a 99% probability and 17 for a 95% probability.*

#### **“Targeted” serum screening**

*If the first screening on specific sera does not reveal an allergenic potential for the protein, screening on “targeted” sera may be carried out (expanded research). This screening can also be carried out when the transgene comes from an organism that is known to be allergenic and when there has not previously been screening on specific sera (Cf. Annex 3).*

*“Targeted” serum screenings must be carried out with sera taken from patients who are allergic to certain categories of allergens. A possible*

(25) Radio Allergo Sorbent Test.

(26) Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

(27) Enzyme Allergo Sorbent Test.

(25) Radio Allergo Sorbent Test.

(26) Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

(27) Enzyme Allergo Sorbent Test.

en évidence une éventuelle réactivité croisée de la protéine avec d'autres allergènes. Six séries de sérums « ciblés » sont nécessaires :

- Monocotylédones (pollens de graminées, riz...);
- Dicotylédones (pollens d'arbres, d'herbacées, fruits secs oléagineux, latex...);
- Moisissures (*Alternaria*, *Aspergillus*...);
- Invertébrés (acariens, crevette...);
- Vertébrés (épithelia d'animaux, protéines sériques de lait...).

Dans chaque série, il est recommandé de tester 25 sérums spécifiques de pneumallergènes et 25 sérums spécifiques de trophallergènes (allergènes alimentaires).

La qualité des sérums et la procédure de mise à l'essai (notamment le choix des réactivités dans chacune des séries) doivent être normalisées pour donner des résultats de tests valides.

### Limites

La principale limite de ces tests immunologiques consiste en l'absence d'une banque de sérums indépendante. En effet, certains auteurs mettent en doute la bonne caractérisation des sérums, lorsque ceux-ci dépendent de banques de sérums privées (Taylor, 2001).

En pratique, les sérums nécessaires à la mise en œuvre des tests ne sont pas toujours disponibles, et s'ils le sont, les quantités ne sont pas toujours suffisantes : il est souvent techniquement impossible de les réaliser. Dans rapport (EFSA, 2004), l'EFSA ne reprend pas les exigences de la FAO/WHO (FAO/WHO, 2001) concernant ces tests.

Les tests sur sérums ciblés peuvent mettre en évidence des réactions croisées, mais en général celles-ci ont déjà été observées lors de la recherche de séquences homologues : les résultats obtenus ont, dans ce cas, un intérêt limité. Les recherches de séquences homologues ne permettent cependant pas de mettre en évidence les modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation. Or certains épitopes glucidiques peuvent être reconnus par les IgE de patients allergiques (p. 19). Il reste à déterminer si ces épitopes, qui donnent lieu à de nombreuses réactions croisées *in vitro*, ont un réel impact clinique. Le cas échéant, il faudrait envisager l'utilisation de sérums contenant des IgE « anti-carbohydates » lors de ces tests immunologiques.

Le principal handicap de ces tests reste leur incapacité de détecter de nouveaux allergènes et de prédire qu'une nouvelle molécule puisse devenir un allergène (Afssa, 2003).

*cross-reactivity of the protein with other allergens can therefore be proven. Six series of "targeted" sera are necessary:*

- *Monocotyledons (grass pollens, rice, etc.)*
- *Dicotyledons (tree or herb pollens, oleaginous nuts, latex, etc.)*
- *Moulds (Alternaria, Aspergillus, etc.)*
- *Invertebrates (acarids, prawns, etc.)*
- *Vertebrates (animal epithelia, milk serum proteins, etc.)*

*In each series, it is recommended that 25 specific sera of pneumallergens be tested and 25 specific sera of trophallergens (food allergens).*

*The quality of sera and testing procedure (particularly the choice of reactivities in each of the series) must be standardised to give valid test results.*

### Limits

*The main limit of these immunological tests consists in the absence of an independent serum bank, due to the fact that certain authors doubt the right characterisation of sera when they depend on private serum banks (Taylor, 2001).*

*In practice, the sera needed to implement the tests are not always available, and if they are, the quantities are not always sufficient: it is often technically impossible to carry them out. In its report (EFSA, 2004), the EFSA does not include the requirements of the FAO/WHO (FAO/WHO, 2001) concerning these tests.*

*The target serum tests may give proof of cross-reactions, but these have generally already been observed in the research on homologous sequences. The results obtained are, in this case, of limited interest. Research on homologous sequences does not allow, however, for post-translational modifications such as glycosylation to be revealed. Nevertheless, certain glucidic epitopes can be recognised by the IgE in allergic patients (p. 19). It remains to be seen if these epitopes, which give rise to numerous cross-reactions in vitro, have a real clinical impact. If necessary, the use of sera containing "anti-carbohydrate" IgE should be envisaged in immunological tests.*

*The main drawback of these tests is their inability to detect new allergens and to predict if a new molecule can become an allergen (Afssa, 2003).*



## Autres tests

D'autres tests peuvent compléter les tests sérologiques effectués *in vitro*. Ils ne font cependant pas partie du protocole FAO/WHO de 2001.

### Principes et limites des tests *in vivo*

**L'intra-dermo réaction** consiste à injecter dans le derme une solution allergénique diluée. L'observation d'une papule parfois érythémateuse, 10 à 20 minutes après l'injection, détermine la positivité du test (qui s'apprécie par rapport à un témoin positif et un témoin négatif). Cette méthode est très sensible mais parfois difficile à pratiquer car potentiellement dangereuse pour l'individu allergique en cas de surdosage d'allergène.

**Le prick-test** est réalisé en plaçant une goutte d'extrait allergénique à la surface de la peau. L'extrait est ensuite introduit dans l'épiderme en piquant avec une petite pointe à travers la gouttelette. La lecture du résultat s'effectue selon le même principe que pour l'intra-dermo réaction. Le prick-test est souvent préféré à l'intra-dermo réaction car il est bien toléré par le patient. Il est cependant moins sensible (d'un facteur de 100 à 1000).

**Le test de provocation labiale** est applicable à la plupart des allergènes alimentaires. Il consiste à mettre en contact l'aliment testé avec la muqueuse des lèvres du patient. Il est souvent pratiqué avant d'envisager un **test de provocation orale**, ce dernier étant toujours effectué sous surveillance médicale stricte (en milieu hospitalier).

Les limites de ces tests sont globalement les mêmes que celles des tests immunologiques. Leur mise en œuvre est encore plus difficile car elle nécessite l'accord et la disponibilité de patients allergiques. Ces tests posent aussi des problèmes éthiques, en particulier lorsque le bénéfice attendu pour le patient n'est pas évident.

## Autres tests

**Le test de relargage d'histamine** consiste à mesurer l'histamine libérée par les cellules polynucléaires basophiles de sujets allergiques, stimulées par des concentrations croissantes d'allergène. Le test est assez sensible et peut s'appliquer à une vaste gamme d'allergènes (Afssa, 2003). Cependant il est de plus en plus souvent remplacé par le **test d'activation des basophiles par cytométrie en flux** (Ebo, 2004).

Un essai a été également réalisé en testant des protéines codées par des transgènes vis-à-vis d'un répertoire de cellules immuno-compétentes provenant d'une centaine de sujets humains (Stickler, 2003). Il a été possible de repérer des épitopes T dans certaines protéines (allergènes) et pas dans d'autres (non allergènes). Cette méthode permet donc de mieux appréhender le potentiel sensibilisant d'une protéine

## Other tests

Other tests can complement the serological tests conducted *in vitro*, although they are not part of the 2001 FAO/WHO protocol.

### Principles and limits of tests *in vivo*

**Intra-dermo reaction** involves injecting a diluted allergenic solution into the skin. The observation of a papule, sometimes erythematous, 10 to 20 minutes after the injection, determines the positivity of the test (which is assessed in relation to a positive and negative control). This method is very sensitive but sometimes difficult to carry out as it is potentially dangerous for the allergic person in the event of an allergen overdose.

**The skin prick-test** is carried out by placing a drop of the allergenic extract on the surface of the skin. The extract is then introduced into the skin, pricking with a small point across the droplet. The result is read on the basis of the same principle as for the intra-dermo reaction. The prick-test is often favoured over intra-dermo reaction as it is well-tolerated by the patient. It is, however, less sensitive (of a factor from 100 to 1000).

**The labial provocation test** is applicable for most food allergens. It involves putting the tested food in contact with the mucosa of the patient's lips. It is often practised before anticipating an **oral provocation test**, which is always conducted under strict medical surveillance (in a hospital environment).

The limits of these tests are globally the same as those for immunological tests. They are more difficult to implement as they require the agreement and availability of allergic patients. These tests also pose ethical problems, particularly when the expected benefit for the patient is unclear.

## Other tests

**The histamine release test** consists in measuring the histamine released by basophilic polynuclear cells of allergic subjects stimulated by increasing concentrations of allergen. The test is fairly sensitive and may be applied to a wide range of allergens (Afssa, 2003). However, it is increasingly replaced by the **basophil activation test by flow cytometry** (Ebo, 2004).

A test has also been conducted on proteins coded by transgenes via a repertory of immuno-competent cells from approximately one hundred human subjects (Stickler, 2003). It was possible to identify T epitopes in certain proteins (allergens) and not in others (non allergens). This method thus gives a better insight into the sensitizing potential of a given protein, which is impossible with

donnée, ce qui est impossible avec les tests précédemment cités, et qui reste difficile avec les modèles animaux (p. 38), plus ou moins bien représentatifs du système immunitaire humain.

### À propos de l'utilisation de protéines recombinantes

L'évaluation du risque allergique nécessite de disposer d'une quantité relativement importante de protéines. Or les protéines codées par les transgènes ne sont présentes qu'en très faible quantité dans les plantes GM : leur extraction en quantité suffisante directement à partir des plantes est donc relativement difficile. Pour cette raison, le transgène est cloné dans une bactérie, qui va produire la protéine d'intérêt en quantité plus importante.

La protéine recombinante ainsi obtenue, peut cependant ne pas être tout à fait identique à celle qui est réellement présente dans la PGM. En effet, chez les eucaryotes, certaines protéines subissent des modifications post-traductionnelles après la synthèse de la chaîne peptidique (p. 19). Ces modifications, en particulier la glycosylation, peuvent avoir un rôle important sur l'allergénicité des protéines. Or les bactéries, organismes procaryotes, sont incapables d'effectuer ces modifications. Il est donc intéressant, dans certains cas, d'utiliser d'autres vecteurs d'obtention de la protéine qui peuvent assurer une glycosylation (certaines levures notamment).

Grâce aux données fournies par spectrométrie de masse, il est possible de savoir si la protéine recombinante testée est différente de celle présente dans la PGM. Cette caractérisation est indispensable (EFSA, 2004) car elle permet d'éviter la remise en cause des résultats obtenus lors des tests, comme cela s'est produit pour la recherche d'IgE spécifiques de Cry9C dans le cas du maïs *Starlink*<sup>TM</sup> (p. 55).

L'extraction de la protéine codée par le transgène directement à partir de la PGM pourrait également modifier son potentiel allergénique. En effet, les techniques d'extraction dénaturent plus ou moins les protéines. Par ailleurs, il convient de garder à l'esprit qu'on ne peut pas reproduire expérimentalement les conditions dans lesquelles la protéine sera consommée. Or le potentiel allergénique d'une protéine dépend aussi de la matrice alimentaire dans laquelle elle se trouve, des traitements mécaniques, thermiques, chimiques, biologiques, qui ont été appliqués à l'aliment. Idéalement, il faudrait donc, lors de l'évaluation de l'allergénicité d'une PGM, tenir compte de ses futures utilisations et des traitements technologiques qui lui seront appliqués. Cependant, il est impossible de tester les multiples variantes de ce qui peut être finalement présenté au système immunitaire des consommateurs, étant donné la multitude et la complexité des traitements technologiques appliqués aux aliments.

*the aforementioned tests, and which remains difficult with animal models (p. 38), representative to varying degrees of the human immune system.*

### Regarding the use of recombinant proteins

*Allergic risk assessment requires a relatively high quantity of proteins, when proteins coded by transgenes are only present in very low quantities in GM plants: they are therefore relatively difficult to extract directly from plants in sufficient quantities. As a result, the transgene is cloned in a bacteria which will produce the protein of interest in greater quantities.*

*The recombinant protein thus obtained may not be 100% identical, however, to the protein actually present in the GMP, since, in eucaryotes, certain proteins undergo post-translational modifications after synthesis of the peptidic chain (p. 19). These modifications, particularly glycosylation, can play a significant role in the allergenicity of proteins. But bacteria, procaryotic organisms, are unable to undergo these modifications and it is therefore interesting, in some cases, to use other vectors for obtaining the protein which can ensure glycosylation (certain yeasts in particular).*

*Using the data provided by mass spectrometry, it is possible to know if the tested recombinant protein is different to the one present in the GMP. This characterisation is essential (EFSA, 2004) as it prevents doubt from being cast on the test results, which is what happened for the research into specific IgE of Cry9C in the case of Starlink<sup>TM</sup> corn (p. 55).*

*The extraction of the protein coded by the transgene directly from a GMP could also modify its allergenic potential since the extraction techniques denature the proteins to varying degrees. Moreover, it must be borne in mind that the conditions in which the protein will be consumed cannot be reproduced in an experimental environment. The allergenic potential of a protein also depends on the food matrix in which it is located, as well as on mechanical, thermal, chemical and biological treatments that have been applied to the food. Ideally, when assessing a GMP's allergenicity, its future uses and the technological treatments to be applied to it should therefore also be taken into account. However, it is impossible to test multiple variants of what could eventually be present in the immune system of consumers, given the multitude and complexity of technological treatments applied to food.*

## LES MÉTHODES EN DÉVELOPPEMENT

### Modèles animaux

Le recours à des modèles animaux est nécessaire car les études de sensibilisation ne peuvent pas être effectuées sur l'homme, et les tests *in vitro* ne permettent pas de prendre en compte la complexité du système immunitaire. Notamment, la question du potentiel sensibilisant des nouvelles protéines est éludée avec les tests disponibles actuellement (homologie de séquences, tests sérologiques...), qui visent plutôt à éviter les réactions allergiques chez des sujets déjà sensibilisés. Pour évaluer l'allergénicité des nouvelles protéines, un modèle animal devrait donc fournir des éléments de réponse à ces deux questions (Adel-Patient, 2004) :

- la protéine a-t-elle un **pouvoir sensibilisant**, c'est-à-dire, possède-t-elle des propriétés intrinsèques qui lui permettent de sensibiliser des sujets prédisposés ?
- la protéine a-t-elle un **pouvoir déclenchant**, c'est-à-dire est-elle capable de provoquer une réaction allergique chez les sujets sensibilisés à une protéine apparentée ?

Idéalement, un modèle animal devrait permettre de reproduire les mêmes mécanismes et caractéristiques de la phase de sensibilisation et/ou de la réaction allergique, que ceux observés chez l'homme. Le modèle « parfait » devrait donc permettre une sensibilisation par voie orale et ne pas nécessiter l'utilisation d'un adjuvant<sup>(28)</sup>, présenter des manifestations cliniques semblables à celles de l'allergie alimentaire chez l'homme (anaphylaxie, symptômes gastro-intestinaux...), produire des IgE en quantité significative...

Actuellement il n'existe pas de modèle animal validé pour évaluer l'allergénicité d'une protéine. Cependant plusieurs modèles murins<sup>(29)</sup> sont en cours de développement (Tryphonas, 2003 ; Kimber, 2003 ; Adel-Patient, 2004) :

- **le rat Brown Norway (BN)** : différentes lignées de rats ont été testées (*Wistar, PVG, hooded Lister*), mais la lignée BN s'est avérée être la plus adaptée lors des études de sensibilisation par voie orale, avec ou sans présence d'adjuvant. Les rats BN sont en effet de bons producteurs d'immunoglobulines, en particulier d'IgE (Knippels, 2003). Une étude a montré que les mêmes protéines étaient reconnues par les sérums de rats BN sensibilisés oralement au blanc d'œuf et au lait de vache, et par les sérums de patients allergiques à ces aliments (Knippels, 2000). Les études de sensibilisation doivent être réalisées

(28) Substance amplifiant la réponse immunitaire : sels d'aluminium, toxine cholérique...

(29) Modèles expérimentaux faisant appel au rat ou à la souris.

## METHODS BEING DEVELOPED

### Animal models

Recourse to animal models is necessary as sensitization studies cannot be carried out on humans, and tests *in vitro* do not allow the complexity of the immune system to be taken into account. Of note, the issue of the sensitizing potential of new proteins is evaded with the tests available at present (sequence homology, serological tests, etc.), which aim rather at preventing allergic reactions in subjects who are already sensitized. To assess the allergenicity of new proteins, an animal model must therefore supply the elements that respond to these two questions (Adel-Patient, 2004):

- does the protein have a **sensitizing potential**, i.e., does it have intrinsic qualities enabling it to sensitize predisposed subjects?
- does the protein have a **triggering potential**, i.e., is it capable of triggering an allergic reaction in subjects who are sensitized to a related protein?

Ideally, an animal model should enable the reproduction of the same mechanisms and characteristics of the sensitization and/or allergic reaction phase as those observed in humans. The "perfect" model should thus allow an oral sensitisation, not requiring the use of an adjuvant<sup>(28)</sup>, present clinical manifestations similar to those of food allergies in humans (anaphylaxis, gastro-intestinal symptoms, etc.) and produce IgE in significant quantities.

At present, there is no animal model validated to assess the allergenicity of a protein. However, various murine<sup>(29)</sup> models are currently being developed (Tryphonas, 2003; Kimber, 2003; Adel-Patient, 2004):

- **Brown Norway (BN) rats**: various breeds of rat have been tested (*Wistar, PVG, hooded Lister*), but the BN breed has proved to be the most suitable during oral sensitization tests, with or without the presence of an adjuvant. This is because BN rats are high producers of immunoglobulins, particularly IgE (Knippels, 2003). One study has shown that the same proteins were recognised by the sera from BN rats who were sensitized orally to egg white and cow's milk, as by sera from patients who are allergic to these foods (Knippels, 2000). Sensitization studies must be carried out on "naive" animals: their diets,

(28) Substance increasing the immune response: aluminium salts, choleraic toxin, etc.

(29) Experimental models using rats or mice.

sur des animaux « naïfs » : le régime alimentaire de ceux-ci, ainsi que celui de la génération parentale, ne doit pas avoir contenu la protéine testée, afin d'éliminer toute présence d'anticorps avant la mise en œuvre du protocole de sensibilisation (Knippels, 1998) ;

■ **la souris BALB/c** : les souris sont sensibilisées par voie i.p.<sup>(30)</sup> ou par voie orale. L'observation d'une réponse immune avec production significative d'IgE chez une proportion importante d'animaux traités permet de mettre en évidence le potentiel sensibilisant de la protéine testée. La voie i.p. permettrait d'obtenir des réponses IgE plus importantes (Kimber, 2003; Dearman, 2001). Par ailleurs des sensibilisations par inhalation (voie intra-nasale) ont été observées sur ce modèle (Hilton, 1997), ce qui indique que le risque allergique des PGM ne doit pas être considéré comme un risque uniquement alimentaire, mais que des sensibilisations via le pollen des plantes GM et les poussières produites lors de leur transformation, pourraient se produire chez des sujets atopiques ;

■ **la souris transgénique HLA classe II<sup>(31)</sup>** : cette souris est un excellent modèle pour étudier les bases génétiques et moléculaires de l'allergie. Elle serait notamment utile pour identifier les épitopes allergéniques pour l'homme, ainsi que pour développer d'éventuelles immunothérapies (Chapoval, 2003).

Une étude chez la souris (souche C57B1/6, en i.p., avec adjuvant) a par ailleurs tenté de montrer un « parallélisme » entre allergénicité chez l'homme et allergénicité chez la souris (Birmingham, 2002). Sept aliments allergisants et sept autres qui le sont peu ou pas ont été testés. Les réponses chez la souris sont, par ordre décroissant : amande (+++)<sup>(32)</sup>, noisette (+++) > épinard (o) > arachide (+++), patate douce (+) > cerise (+) > laitue (+) > noix (+++) > œuf (+++) > carotte (+), pomme de terre (+) > blé (+++), café (+), soja (+++). Les auteurs n'ont donc pas trouvé de parallélisme souris/ homme au niveau de l'allergénicité, ce qui montre que ce modèle n'est pas très représentatif du système immunitaire humain.

Les considérations d'ordre pratique font que les modèles murins sont tout de même privilégiés par un grand nombre de laboratoires. Cependant d'autres modèles pourraient être utiles dans le cadre d'une évaluation de l'allergénicité, le porc et le chien atopique notamment (Helm, 2003). Un de leurs principaux avantages est qu'ils développent des symptômes cliniques d'allergie alimentaire (principalement gastro-intestinaux et dermatologiques) particulièrement proches de ceux observés chez l'homme.

*as well as their parents' diets, must not have contained the tested protein, so that all presence of anti-body is eliminated before the sensitization protocol is implemented (Knippels, 1998).*

■ **BALB/c mice**: the mice are sensitized by i.p.<sup>(30)</sup> or orally. The observation of an immune response with a significant production of IgE in a significant proportion of animals treated enables the sensitizing potential of the tested protein to be brought to light. The i.p. route gives higher IgE responses (Kimber, 2003; Dearman, 2001). Moreover, sensitizations by inhalation (intra-nasal route) have been observed on this model (Hilton, 1997), which indicates that the allergic risk of GMPs should not be considered as simply a food risk, but that sensitizations, via the pollen of GM plants and dust released during their processing, could occur in atopic subjects.

■ **HLA class II<sup>(31)</sup> transgenic mice**: these mice are excellent models for studying the genetic and molecular bases of allergies. They would be particularly useful for identifying allergenic epitopes for humans, as well as for developing possible immunotherapies (Chapoval, 2003).

*A study in mice (strain C57B1/6, in i.p., with adjuvant) has also attempted to show a "parallelism" between allergenicity in humans and allergenicity in mice (Birmingham, 2002). Seven allergenic foods and seven others which are slightly or not at all for human allergenic have been tested. Responses in the mice are, in descending order: almond (+++)<sup>(32)</sup>, hazelnut (+++) > spinach (o) > peanut (+++), sweet potato (+) > cherry (+) > lettuce (+) > walnut (+++) > egg (+++) > carrot (+), potato (+) > wheat (+++), coffee (+), soybean (+++). The authors have thus not found a parallelism between mice and humans regarding allergenicity, which proves that this model is not very representative of the human immune system.*

*Murine models are nonetheless favoured by a large number of laboratories. However, other models may be useful for assessing allergenicity, pigs and atopic dogs in particular (Helm, 2003). One of their main advantages is that they develop clinical symptoms of food allergy (mainly gastro-intestinal and dermatological) that are notably similar to those observed in humans.*

(30) Voie Intra-péritonéale.

(31) Souris génétiquement modifiée qui présente à la surface de certaines de ses cellules des antigènes d'histocompatibilité (molécules HLA) de classe II, reconnues notamment par les lymphocytes T CD4+, et auxquelles sont associés des fragments antigéniques exogènes.

(32) (+++) : aliment souvent allergisant chez l'homme,  
(+) : aliment rarement allergisant chez l'homme,  
(o) : aliment non-allergisant chez l'homme.

(30) Intra-peritoneal route.

(31) Genetically modified mice that present, on the surface, some of their cells of histocompatible antigens (HLA molecules) from class II, recognised in particular by T CD4+ lymphocytes, and with which exogenous antigenic fragments are associated.

(32) (+++) : often allergenic food in humans,  
(+) : rarely allergenic food in humans,  
(o) : non-allergenic food in humans.



■ **Les porcelets** (porcs nouveaux-nés), comme les nourrissons humains, ont parfois tendance à présenter des symptômes allergiques provoqués par les protéines de soja ou de lait de vache. Les tests de provocation orale sur des porcelets sensibilisés par voie i.p. conduisent à des symptômes gastro-intestinaux et dermatologiques, mesurables par tests cutanés (Herman, 2003) ou par examen morphologique de l'intestin (observation d'œdème, d'hémorragie...). Une des limites de ce modèle est le manque d'anticorps anti-IgE de porc, qui fait que la présence d'IgE spécifiques chez les porcs sensibilisés n'a pas encore pu être confirmée ;

■ **Le chien** : l'allergie alimentaire chez les chiens n'est pas rare puisqu'elle affecterait environ 8 % d'entre eux. Le chien spontanément allergique, c'est-à-dire atopique, se rapprocherait assez bien du modèle « idéal » évoqué précédemment (Buchanan, 2002). Les animaux utilisés en expérimentation sont de bons producteurs d'IgE. L'avantage du chien est que les symptômes cliniques (semblables à ceux du porc) peuvent être corrélés à une augmentation du taux d'IgE spécifiques circulantes. Par ailleurs, la taille de l'animal permet de réaliser certains examens gastro-intestinaux sans devoir le sacrifier. En revanche, l'entretien des chiens a un coût non négligeable. La réponse immunitaire sur ce modèle est moins bien caractérisée que pour les modèles murins, et la période de sensibilisation est assez longue (environ 18 mois pour obtenir une réponse stable). Le chien a notamment été utilisé dans une étude évaluant le potentiel allergénique d'une farine de blé « hypoallergénique » (p. 49).

Remarque : il n'a pas été possible d'induire des IgE chez le lapin qui est pourtant très fréquemment utilisé en recherche en immunologie (Peltre G, communication personnelle).

La mise au point d'un protocole de sensibilisation conduit à toujours à s'interroger sur la quantité d'allergène à utiliser (fortes doses / faibles doses), la voie et la durée d'exposition, l'âge de l'animal (nouveau-né, jeune, adulte), sa prédisposition génétique à produire des IgE, l'emploi ou non d'adjuvants... Différentes méthodes peuvent être employées pour entraver le processus naturel de développement d'une tolérance à l'allergène, afin que l'animal développe une hypersensibilité, et éventuellement une réaction allergique lorsqu'il est de nouveau exposé à l'allergène.

Plusieurs modèles animaux (de laboratoire ou animaux cibles) sont donc en développement pour évaluer l'allergénicité des aliments. Même si d'importants progrès ont été accomplis ces dernières années, aucun de ces modèles ne s'avère pour l'instant idéal pour évaluer le potentiel allergénique des nouvelles protéines. Chacun d'eux possède ses propres avantages et limites. L'allergie alimentaire chez l'homme, est une pathologie complexe et multifactorielle (prédisposition

■ **Piglets**, like new-born babies, often tend to present allergic symptoms provoked by soybean or cow's milk proteins. Oral provocation tests on piglets sensitized by i.p. trigger gastro-intestinal and dermatological symptoms, measured by skin tests (Herman, 2003) or morphological examination of the intestine (observation of oedema, haemorrhage, etc.). One of the limits of this model is the lack of pig anti-IgE antibodies, which means that it has still not been possible to confirm the presence of specific IgE in sensitized pigs.

■ **Dogs**: food allergy in dogs is not rare since it affects about 8% of them. Spontaneously allergic dogs, i.e. atopic dogs, fit the aforementioned "ideal" model fairly well (Buchanan, 2002). The animals used in experiments are strong producers of IgE. The advantage of dogs is that clinical symptoms (similar to the pigs' symptoms) can be correlated to an increase in the rate of specific IgE in circulation. Moreover, the size of the animal enables certain gastro-intestinal examinations to be conducted without having to kill it. On the other hand, dogs are very expensive to look after. The immune response of this model is less well-characterised than for murine models, and the sensitization period is fairly long (around 18 months to obtain a stable response). Dogs are used particularly in a study assessing the allergenic potential of a "hypoallergenic" wheat flour (p. 49).

Note: It was not possible to induce IgE in rabbits, although they are frequently used in immunological research (Peltre G, personal communication).

The development of a sensitization protocol leads to the questioning of the amount of allergen to use (high doses/low doses), the exposure duration and route, the age of the animal (new-born, young, adult), its genetic predisposition to produce IgE, the use or otherwise of adjuvants, etc. Various methods may be used to hamper the natural development process of an allergen tolerance, so that the animal develops a hypersensitivity, and possibly an allergic reaction when it is re-exposed to the allergen.

Various animal models (laboratory or target animals) are therefore being developed to assess food allergenicity. Even if significant progress has been made over recent years, none of these models have currently proved ideal for assessing the allergenic potential of new proteins. Each of them has its own advantages and limits. Food allergy in humans is a complex and multi-factor illness (predisposition of certain individuals, role of environmental factors, exposure conditions, etc.), and no animal model can take

de certains individus, rôle des facteurs environnementaux, conditions d'exposition...). Aucun modèle animal ne pourra prendre en compte la totalité de ces facteurs, ni fournir une prédiction absolument fiable de la prévalence et de la sévérité des réactions allergiques qui résulteraient d'une exposition à une nouvelle protéine. Cependant, l'utilisation combinée de plusieurs modèles pour étudier les différentes phases de l'allergie alimentaire pourrait permettre d'obtenir des informations utiles à l'évaluation de l'allergénicité d'une nouvelle protéine.

### Protéomique et « allergomique »

Un phénomène de pléiotropie (Cf. 3.3, 3.4) peut se produire suite à une modification génétique. L'évaluation de l'allergénicité d'une PGM devrait donc prendre en compte, si possible, l'étude et la comparaison de son profil protéique avec celui de l'aliment conventionnel correspondant. Or les expériences précédemment décrites ciblent uniquement la protéine issue du transgène. Idéalement, il faudrait donc aussi s'intéresser à l'allergénicité des protéines nouvelles et des protéines surexprimées.

**La protéomique** est une technique combinant la séparation des protéines puis leur caractérisation grâce à la spectrométrie de masse et leur identification grâce à l'outil bioinformatique. Les protéines sont d'abord préparées « sur mesure » selon le problème étudié (extraction, purification, fractionnement). Elles sont ensuite séparées par électrophorèse (une dimension, deux dimensions, quantitative, en conditions natives...). Une fois séparées, les protéines sont caractérisées par spectrométrie de masse. Leur masse moléculaire peut ainsi être déterminée. Les spectres de masse sont ensuite analysés par informatique, et les résultats sont comparés aux bases de données existantes, puis archivés.

L'électrophorèse bi-dimensionnelle permet d'obtenir en quelque sorte une cartographie des protéines de l'aliment étudié. Si des spots apparaissent ou sont surexprimés lorsque l'on étudie le profil protéique d'une PGM, il faudrait s'intéresser à l'allergénicité des protéines représentées par ces spots, tout autant qu'à l'allergénicité de la protéine volontairement introduite dans la PGM.

L'interprétation d'un protéome est cependant très difficile, du fait du grand nombre de protéines qui y sont représentées. Dans le cadre de l'évaluation de l'allergénicité d'une PGM, il est sans doute plus pertinent de ne révéler que les protéines allergènes. À la suite de l'électrophorèse bidimensionnelle, un immunotransfert peut être réalisé avec des sérums de patients allergiques à l'aliment conventionnel. Les sérums seront choisis de façon à ce qu'ils réagissent fortement avec le plus grand nombre d'allergènes possible. Cette technique, qui permet d'obtenir

*account of all these factors, nor can it provide a fully reliable prediction of the prevalence and severity of allergic reactions which would result from a new protein. However, the combined use of several models to study the different phases of food allergy could provide useful information on the assessment of the allergenicity of a new protein.*

### Proteomics and "allergomics"

*The phenomenon of pleiotropism (Cf. 3.3, 3.4) may occur following a genetic modification. The assessment of the allergenicity of a GMP should thus take into account, if possible, the study and comparison of its proteic profile with the one in the corresponding conventional food. The experiments described above only target the protein produced by the transgene, however. Ideally, interest should therefore also be paid to the allergenicity of new proteins and over-expressed proteins.*

*Proteomics is a technique combining the separation of proteins and then their characterisation through mass spectrometry with their identification using a bioinformatics tool. The proteins are first "made-to-measure" depending on the problem being studied (extraction, purification, splitting up). They are then separated by electrophoresis (one dimension, two dimensions, quantitative, in native conditions, etc.). Once separated, the proteins are characterised by mass spectrometry, and their molecular mass can thus be determined. The mass spectra are then analysed on a computer and the results are compared to existing databases before being archived.*

*Through bi-dimensional electrophoresis, a sort of mapping of the proteins in the food studied can be obtained. If spots appear or are over-expressed when the proteic profile of a GMP is being studied, attention should be given to the allergenicity of proteins represented by these spots, as well as to the allergenicity of the protein voluntarily introduced into the GMP.*

*The interpretation of a proteome is very difficult, however, due to the large number of proteins represented in it. As part of the allergenicity assessment of a GMP, it is definitely more appropriate to reveal the allergenic proteins only. After the bi-dimensional electrophoresis, an immunotransfer may be carried out with sera from patients who are allergic to the conventional food. The sera are chosen so that they react strongly with the greatest possible number of allergens. This technique, which produces an "allergome", could show that certain allergens present*

un « allergome », pourra montrer que certains allergènes existant dans la plante non GM sont sur-exprimés (ou sous-exprimés) dans la plante GM. Mais elle nécessite d'avoir à disposition des sérums de patients allergiques à la plante non GM : cela est possible pour le soja, mais plus difficile pour le maïs ou la pomme de terre par exemple.

### Représentation différentielle

La technique dite de « differential display », ou représentation différentielle est l'une des méthodes de choix pour identifier et isoler rapidement des gènes différentiellement exprimés dans plusieurs systèmes expérimentaux (Liang, 1992). Simple et puissante, elle permet la comparaison simultanée, avec de petites quantités de matière première, des gènes sur- et sous-exprimés. Le principe est de comparer des niveaux d'expression génique dans deux conditions physiologiques ou physiopathologiques distinctes. Pour cela, des amplifications aléatoires après transcription inverse (RT-PCR<sup>(33)</sup>) sont réalisées à partir des ARN<sup>(34)</sup> messagers, permettant ainsi d'obtenir des profils d'expression génique spécifiques de chaque situation, dont l'analyse comparative permet la mise en évidence de gènes ayant des expressions différentielles.

Cette méthode pourrait permettre, dans le cas des PGM, de détecter des changements d'expression au niveau de l'ARN messager (pour des gènes autres que le transgène) entre la plante témoin et la plante génétiquement modifiée.

La fiabilité de ces deux derniers types d'analyse (protéome/allergome et transcriptome) repose sur des études qui auront préalablement déterminé quelles sont les variations « naturelles » au niveau des protéines et des ARNm, car il existe des différences d'expression liées aux conditions environnementales : lieu, année, conditions de culture, stress biotiques et abiotiques, etc. Par ailleurs, si le niveau de transcription (ARNm) est un bon indicateur, il faut encore vérifier que le niveau de transcription élevé est suivi d'un niveau de traduction élevé, car ce n'est pas toujours le cas.

## DISCUSSION

Les méthodes actuellement utilisées dans l'évaluation de l'allergénicité d'une PGM ne prennent probablement pas assez en compte l'organisme dans son ensemble : on évalue le potentiel allergénique d'une protéine purifiée d'origine microbienne ayant les mêmes propriétés que la protéine issue du transgène, mais on ne sait pas si d'autres allergènes sont apparus

*in the non-GM plant are over-expressed (or under-expressed) in the GM plant. But it requires the availability of sera from patients allergic to the non-GM plant: this is possible for soybean, but more difficult for corn or potato, for example.*

### Differential display

*The technique called "differential display", or differential representation, is one of the preferred methods for the quick identification and isolation of differentially expressed genes in various experimental systems (Liang P, 1992). Simple and powerful, it enables the simultaneous comparison, with small quantities of raw material, of over- and under-expressed genes. The principle is to compare the levels of genic expression in two distinct physiological or physiopathological conditions. For this, random amplifications after inverse transcription (RT-PCR<sup>(33)</sup>) are carried out from mRNAs<sup>(34)</sup>, thus enabling specific profiles of genic expression to be obtained of each situation, the comparative analysis of which reveals those genes which have differential expressions.*

*In the case of GMPs, this method could lead to the detection of changes in expression with regard to the mRNAs (for other genes than the transgene) between the control plant and the GM plant.*

*The reliability of these two types of analysis (proteome/allergome and transcriptome) lies in the studies which will have previously determined which are the "natural" variations with regard to proteins and mRNAs, as there are differences of expression relating to environmental conditions: place, year, cultivation conditions, biotic and abiotic stresses, etc. Moreover, if the transcription level (mRNA) is a good indicator, it is still necessary to check that the high transcription level is followed by a high translation level, since this is not always the case.*

## DISCUSSION

*The methods currently used in the allergenicity assessment of a GMP probably do not take account of the organism in its entirety: the allergenic potential of a purified protein of microbial origin with the same properties as the protein from the transgene is studied, but it is not known if other allergens have appeared in the proteic fraction, nor if*

(33) Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction.

(34) Acide RiboNucléique.

(33) Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction.

(34) RiboNucleic Acid.

dans la fraction protéique, ou si des allergènes existant dans la plante témoin non GM en faibles quantités sont surexprimés (Spök, 2005). Des approches plus globales existent, mais dans l'état actuel des connaissances, elles ne permettraient pas de conclure sur le potentiel allergénique de l'organisme étudié, étant donné les difficultés d'interprétation qui subsistent.

Cela dit, le problème de pouvoir évaluer l'allergénicité de façon plus globale n'est pas du tout spécifique aux PGM, car de tels changements (apparition ou disparition, sur- ou sous-expression de protéines) peuvent également se produire avec les méthodes de sélection conventionnelles.

Des études comparant l'allergénicité de sojas GM avec des équivalents non-GM ont été réalisées (Burks, 1995 ; Sten, 2004). Ce type d'étude est envisageable pour les plantes bien connues comme étant sources d'allergies (soja, blé, arachide), mais plus difficilement réalisable avec les plantes pour lesquelles peu de cas d'allergie ont été rapportés. L'étude de l'allergénicité peut être effectuée au moyen d'immunotransferts ou de prick-tests ; toutefois ceux-ci ne permettent pas de mettre en évidence la présence éventuelle de néo-allergènes (Moneret-Vautrin, 1996).

Il faudrait donc encourager le développement des nouvelles méthodes permettant de considérer l'allergénicité de la PGM dans son ensemble et non plus seulement celle de la ou des protéines codées par le(s) transgène(s) (Spök, 2005). Ces méthodes se trouvant encore à un stade de développement relativement précoce, des recherches complémentaires, ainsi que des travaux de validation sont encore nécessaires pour pouvoir les utiliser systématiquement dans l'évaluation sanitaire, et/ou à des fins réglementaires.

*the allergens present in the non-GM control plant in low quantities are over-expressed (Spök, 2005). More global approaches do exist, but on the basis of current knowledge, they would not enable a conclusion to be drawn on the allergenic potential of the studied organism given the persisting interpretation difficulties.*

*That said, the problem of being able to assess allergenicity in a more comprehensive manner is not at all specific to GMPs, as such changes (appearance or disappearance, over- or under-expression of proteins) may also occur with conventional selection methods.*

*Studies comparing the allergenicity of GM soybeans with the equivalent non-GM soybeans have been conducted (Burks, 1995; Sten, 2004). This type of study is conceivable for plants that are well-known sources of allergies (soybeans, wheat, peanuts), but is more difficult to carry out with plants for which there have been few cases of allergy reported. The allergenicity study may be conducted using immunotransfers or prick-tests; however, these do not reveal the possible presence of neo-allergens (Moneret-Vautrin, 1996).*

*The development of new methods allowing consideration to be given to the allergenicity of a GMP in its entirety, and not just to the allergenicity of the protein(s) coded by the transgene(s), should therefore be encouraged (Spök, 2005). These methods, that are still at a relatively early development stage, additional research, as well as validation work are still necessary to be able to use them systematically in health assessment and/or for regulatory purposes.*





# LES VARIÉTÉS HYPOALLERGÉNIQUES : UN BÉNÉFICE APPORTÉ PAR LES PGM ?

## HYPOALLERGENIC VARIETIES: A BENEFIT BROUGHT BY GMPS?

La seule solution actuellement disponible pour prévenir les réactions allergiques est d'éliminer du régime alimentaire du patient le ou les aliments responsables de ces réactions. Ceci n'est pas sans conséquences lorsque l'aliment est présent dans de nombreux produits transformés : le patient a, de ce fait, un choix diététique réduit, pouvant même engendrer des carences. Sa qualité de vie en est aussi affectée : difficultés pour effectuer ses achats alimentaires, problème d'intégration à la cantine pour les enfants...

La transgénèse pourrait également être utilisée comme un moyen de diminuer l'allergénicité d'un aliment. Des recherches ont été menées, notamment au Japon sur le riz et aux États-Unis sur le soja, afin de diminuer, voire éliminer les principaux allergènes de ces espèces. Deux grands axes de recherche sont explorés : l'un vise à dénaturer les allergènes de l'aliment afin de diminuer leur caractère allergisant, l'autre consiste à éliminer les allergènes en inhibant l'expression des gènes qui les codent.

### ARACHIDE HYPOALLERGÉNIQUE

L'allergie à l'arachide est une des plus fréquentes allergies alimentaires. En France elle représentait en 2003 11,7 % des accidents graves recensés par le réseau d'Allergovigilance (Morisset, 2004). Aux États-Unis, cette allergie est encore plus répandue, du fait de la forte consommation d'arachide : plus de 1 % de la population américaine, soit environ trois millions d'individus, seraient allergiques aux arachides (Sicherer, 2003).

#### ■ Dénaturation des épitopes de trois allergènes de l'arachide par substitution d'un acide aminé au niveau des épitopes immunogènes

Des allergènes d'arachide recombinants modifiés ont été produits par mutagenèse dirigée (Rabjohn, 1999 ; Bannon, 2001). La capacité de liaison des allergènes (Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 3) avec les IgE de patients allergiques a été réduite en substituant l'acide aminé alanine au niveau des épitopes immunogènes. Des essais ont été réalisés sur des souris (lignée C3H/HeJ) (Li, 2000) sensibilisées à Ara h 2 par la lignée conventionnelle, et désensibilisées grâce à la protéine Ara h 2 recombinante: les taux d'IgE et d'IgG2 augmentaient quand on leur administrait la protéine Ara h 2 non modifiée, et diminuaient lorsqu'elles recevaient la protéine Ara h 2 recombinante. Par ailleurs, la libération d'histamine était plus faible et les symptômes cliniques étaient moins importants avec Ara h 2 recombinante.

*The only solution currently available to prevent allergic reactions is to remove from patients' diets the food(s) which is(are) responsible for these reactions. This is not without consequences when the food is present in numerous processed products: patients subsequently have a reduced choice regarding what they eat, which may lead to deficiencies. Their quality of life is also affected: difficulties when buying food, children can face problems fitting into school canteens, etc.*

*Transgenesis could also be used as a way of reducing the allergenicity of a food. Research has been conducted, especially in Japan on rice and in the United States on soybean, so as to reduce and even remove the main allergens of these foods. Two main research axes are studied: one aims to denature the allergens of a food so as to reduce their allergenic character, the other involves the removal of allergens by inhibiting the expression of the genes which code them.*

### HYPOALLERGENIC PEANUTS

*Peanut allergy is one of the most common food allergies. In France it represented 11.7% of the serious accidents compiled by the Allergovigilance network in 2003 (Morisset, 2004). In the United States, this allergy is even more widespread due to the high consumption of peanuts: more than 1% of the American population, or around three million persons, are allergic to peanuts (Sicherer, 2003).*

#### ■ Denaturation of epitopes of three peanut allergens by substituting an amino acid in immunogenic epitopes

*Modified recombinant peanut allergens have been produced through directed mutagenesis (Rabjohn, 1999; Bannon, 2001). The capacity of the allergens (Ara h 1, Ara h 2 and Ara h 3) to bond with the IgE in allergic patients has been reduced by substituting the amino acid alanine in immunogenic epitopes. Tests have been conducted on mice (C3H/HeJ line) (Li, 2000), sensitized to Ara h 2 by the conventional line, and desensitized using the recombinant protein Ara h 2: the IgE and IgG2 rates increased when they were given the non-modified protein Ara h 2, and reduced when they received the recombinant protein Ara h 2. Moreover, the release of histamine was lower and the clinical symptoms less evident with recombinant Ara h 2.*



L'interaction avec les lymphocytes T reste effective, ce qui permet, chez les souris, une immunothérapie efficace. Ce système pourrait être transposable à l'homme étant donné que les épitopes se liant à *Ara h 2* sont les mêmes chez l'homme et la souris.

Ces résultats pourraient ouvrir la voie à la création d'une arachide GM « hypoallergénique », qui contiendrait à la place de trois de ses allergènes, des protéines modifiées ayant une capacité de liaison aux IgE plus faible.

#### ■ Extinction post-transcriptionnelle du gène codant *Ara h 2*

L'introduction de copies multiples d'un gène étranger ou la sur-expression d'un gène endogène chez une plante conduit souvent à la mise en place d'un mécanisme de régulation connu sous le nom de « post-transcriptional gene silencing ». Ce mécanisme conduit à la dégradation des ARN messagers du gène ciblé (ou de l'ARNm introduit) et donc à l'absence de production de la protéine correspondante. Un tel mécanisme a été utilisé pour réduire l'expression d'*Ara h 2* dans l'arachide, en intégrant au génome de la plante une partie de la séquence codant cet allergène (Konan, 2003 ; Dodo, 2005). Les auteurs ont pu vérifier l'intégration stable du transgène par Southern blot et l'expression de l'ARNm correspondant par northern blot dans les callos, les feuilles et les racines des plantes GM. Le promoteur utilisé (CaMV 35S) est constitutif et s'exprime dans tous les tissus, ce qui laisse supposer une expression du transgène également dans les graines. Il conviendra d'amener à maturité ces plantes GM afin d'obtenir des graines et de déterminer ensuite la quantité d'*Ara h 2* qui s'y exprime.

Quelques réserves sont cependant émises par les scientifiques. L'arachide contient en effet de multiples protéines potentiellement allergènes, dont bon nombre restent inconnues<sup>(35)</sup>. Il est peu réaliste de parvenir à toutes les éliminer ou les modifier, tout en conservant une plante viable.

## RIZ HYPOALLERGÉNIQUE

L'allergie au riz est particulièrement fréquente en Asie, où cette céréale constitue la base de l'alimentation. Au Japon, Tada et al. (1996) ont tenté de mettre au point un riz transgénique hypoallergénique.

#### ■ Inhibition du gène codant un allergène majeur du riz par la technique ARN anti-sens

La technologie ARN anti-sens consiste à insérer dans le génome une construction génique dans laquelle la partie codante du gène que l'on veut inactiver est en orientation inverse. Ce gène anti-sens conduit

*Interaction with the T lymphocytes remains effective, which, in mice, allows for an effective immunotherapy. This system could be transposed to humans given that the epitopes combining to Ara h 2 are the same in humans and mice.*

*These results could pave the way to the creation of a "hypoallergenic" GM peanut, which, in the place of three of its allergens, would contain modified proteins with a lower IgE binding capacity.*

#### ■ Post-transcriptional silencing of the gene coding *Ara h 2*

*The introduction of multiple copies of a foreign gene or the over-expression of an endogenous gene in a plant often leads to the establishment of a regulation mechanism known under the name of "post-transcriptional gene silencing". This mechanism causes the degradation of mRNAs of the target gene (or of the mRNA introduced) and thus the absence of production of the corresponding protein. Such a mechanism has been used to reduce the expression of Ara h 2 in peanuts by integrating, into the plant genome, part of the sequence coding this allergen (Konan, 2003; Dodo, 2005). The authors were able to check the stable integration of the transgene by Southern blot and the expression of the corresponding mRNA by Northern blot in the calluses, leaves and roots of the GM plants. The promoter used (CaMV 35S) is constitutive and expressed in all tissues, which assumes that the transgene is also expressed in the seeds. These GM plants need to reach full growth so that the seeds can be obtained and the Ara h 2 quantity expressed can be determined.*

*Scientists have a few reservations, however, since peanuts contain many potentially allergenic proteins, a considerable number of which are still unknown<sup>(35)</sup>. It is unrealistic to envisage being able to remove or modify them all while maintaining a viable plant.*

## HYPOALLERGENIC RICE

*Rice allergy is particularly common in Asia, where this cereal forms the staple of the population's diet. In Japan, Tada et al. (1996) have tried to develop a hypoallergenic transgenic rice.*

#### ■ Inhibition of the gene coding a major allergen in rice using the antisense technique

*Antisense RNA technology involves inserting in the genome a genetic construction in which the coding part of the gene that is to be inactivated is the opposite way round. This antisense gene*

(35) Actuellement huit protéines allergènes sont répertoriées dans la base Allergome.

(35) At present, eight allergenic proteins are listed in the Allergome base.

à la synthèse d'un ARN anti-sens, qui va s'hybrider avec l'ARNm sens du gène codant pour l'allergène que l'on souhaite éliminer, et donc empêcher sa traduction dans la PGM.

Un ADN anti-sens de l'ADN codant une globuline considérée comme allergène majeur du riz a été inséré dans le génome du riz (Tada, 1996). La plante GM contient effectivement moins de globuline que le riz conventionnel (le contenu en allergène passe de 300 µg/grain à 60-70 µg/grain), mais :

- la globuline en question, ainsi que les protéines présentant une forte identité avec la globuline, reste toujours présente en petite quantité dans le grain. Étant donné qu'une quantité infime de protéine allergène peut induire des réactions chez les personnes sensibilisées, le riz hypoallergénique risque de ne pas être toléré par certains patients allergiques ;
- d'autres allergènes dits mineurs, présentant une homologie moindre avec les allergènes majeurs, n'ont pas été éliminés.

Il n'existe pas de preuve quant au bénéfice pour la santé apporté par ce riz transgénique (Nakamura, 1996). Tada (1996) a d'ailleurs bien mentionné qu'aucun test médical n'avait été effectué avec ce riz. Il admet par ailleurs que la réduction de toutes les protéines allergènes par la technologie ARN anti-sens est techniquement impossible (Meyer, 1998). On se heurte inévitablement à la diversité de sensibilité des patients allergiques, tant du point de vue du nombre de protéines allergisantes, que des quantités susceptibles de déclencher une réaction chez les patients allergiques.

Par ailleurs, la stabilité du phénotype recherché n'est pas optimale : les plantes de deuxième et troisième génération ne présentaient qu'une réduction de 20 à 30 % du taux de globuline.

La littérature scientifique présumait déjà de la complexité d'une telle approche pour réduire l'allergénicité du riz. Urisu et al. (1991) avaient mis en évidence 22 allergènes dans le riz. Les protéines de 14 à 16 kDa (globuline et protéines homologues) étaient apparues comme étant les plus allergènes. Cependant, seuls 22 % des sérums ont réagi uniquement avec ces protéines, 41 % des sérums ayant réagi avec six protéines ou plus.

## SOJA HYPOALLERGÉNIQUE

L'utilisation accrue de protéines de soja dans nos produits alimentaires industrialisés (sauces, substituts de viande, formules infantiles, desserts, etc.) pose problème à de nombreux consommateurs allergiques aux protéines de soja. Si la sécurité passe avant tout par l'étiquetage rigoureux des produits, la mise au point d'une variété de soja hypoallergénique peut apparaître comme une solution complémentaire.

*provokes the synthesis of an antisense RNA, which will hybridise with the mRNA sense of the coding gene for the allergen to be removed, thus preventing its translation in the GMP.*

*An antisense DNA of the DNA coding a globulin considered as the major allergen of rice was inserted in the rice genome (Tada, 1996). The GM plant actually contains less globulin than conventional rice (the allergenic content passes from 300 µg/grain to 60-70 µg/grain), but:*

- the globulin in question, as well as the proteins presenting a strong identity with globulin, is still present in the grain in a small quantity. Given that a tiny quantity of allergenic protein can induce reactions in sensitized people, hypoallergenic rice could not be tolerated by certain allergic patients;*
- other so-called minor allergens, with a slight homology with major allergens, were not removed.*

*There is no evidence with regard to the health benefit brought by this transgenic rice (Nakamura, 1996). Tada (1996) clearly mentioned, however, that no medical test has been conducted with this rice. He admits that the reduction of all the allergenic proteins using RNA antisense technology is technically impossible (Meyer, 1998) in view of the inevitable confrontation with the diverse sensitization of allergic patients, from the point of view of both the number of allergenic proteins and the quantities likely to trigger a reaction in allergic patients.*

*Moreover, the stability of the studied phenotype is not optimal: second- and third-generation plants only presented a reduction of 20 to 30% in the rate of globulin.*

*Scientific literature already presumed the complexity of such an approach for reducing the allergenicity of rice. Urisu et al. 1991 had revealed 22 allergens in rice. The proteins of 14 to 16 kDa (globulin and homologous proteins) appeared as the most allergenic. However, only 22% of sera reacted solely with these proteins, 41% of sera reacted with six or more proteins.*

## HYPOALLERGENIC SOYBEAN

*The increased use of soybean proteins in our processed food products (sauces, meat substitutes, infant formulas, desserts, etc.) poses a problem for numerous consumers who are allergic to soybean proteins. While safety is above all ensured by the rigorous labelling of products, the development of a variety of hypoallergenic soybean may emerge as an additional solution.*

Herman *et al.* (2003) ont cherché à éliminer de la graine la protéine P34, de 30 kDa, appartenant à la famille des papainés protéases. Celle-ci, bien que représentant moins de 1 % de la fraction protéique totale, est un des trois allergènes majeurs de la graine de soja (Ogawa, 2000).

Bien que plusieurs protéines soient allergisantes, il semble que pour un certain nombre de patients allergiques au soja, *Gly m Bd 30 kDa* soit la seule protéine responsable de l'allergie (Ogawa, 1991, 1993 ; Helm, 1998, 2000).

Une équipe de l'université de Kyoto avait déjà mis au point une lignée hypoallergénique de soja, le *Tohoku 124*, par sélection génétique. Les deux autres allergènes majeurs étaient éliminés, mais *Gly m Bd 30 kDa* était toujours présent. Il ne pouvait être retiré que par des procédés limitant l'utilisation du produit par la suite (Samoto, 1997 ; Ogawa, 2000).

L'introduction dans le génome du soja d'un transgène inhibant la traduction du gène codant *Gly m Bd 30 kDa* a permis d'éliminer de la graine cet allergène (non détectable par les méthodes d'analyse). Il n'a pas été constaté de différences – dans la composition, le développement, la reproduction notamment – entre la plante transgénique et la plante conventionnelle. L'analyse protéomique a montré la suppression de l'allergène, ainsi que l'absence de toute autre modification significative dans le profil protéique de la graine. Ceci laisse supposer que la protéine éliminée n'a pas de rôle majeur dans la maturation de la graine. Selon les auteurs, il y a équivalence substantielle entre la plante transgénique et la plante conventionnelle (Herman, 2003).

La combinaison de cette variété transgénique exempte de *Gly m Bd 30 kDa* avec la lignée hypoallergénique *Tohoku 124* mise au point par Samoto et son équipe, pourrait bien donner lieu à une variété de soja ne comportant aucun des trois allergènes majeurs.

L'hypoallergénicité de la variété transgénique a été confirmée *in vitro* par une électrophorèse SDS-PAGE suivie d'un immunotransfert, en utilisant des IgG spécifiques provenant de lapins et des IgE spécifiques contenus dans le sérum de sujets sensibilisés au soja. Le caractère « hypoallergénique » doit cependant être confirmé par d'autres expériences :

- des tests *in vivo* sur animaux sensibilisés (expériences en cours sur le porcelet (Suszkiw, 2002)) ;
- des tests cutanés sur des sujets allergiques ;
- et des tests de provocation orale chez des sujets allergiques.

Ce n'est qu'une fois que toutes ces conditions seront remplies (et que ce soja GM aura été évalué comme n'importe quelle autre PGM) que l'on pourrait éventuellement envisager l'utilisation de ce soja en substitution du soja conventionnel dans l'alimentation de certains patients allergiques.

*Herman et al. (2003) have sought to remove from the seed the protein P34, of 30 kDa, belonging to the family of protease papains. Although representing less than 1% of the total proteic fraction, this is one of the three major allergens in soybean seeds (Ogawa, 2000).*

*Despite several proteins being allergenic, it seems that, for a certain number of patients who are allergic to soybean, Gly m Bd 30 kDa is the only protein responsible for this allergy (Ogawa, 1991, 1993; Helm, 1998, 2000).*

*A team from the university of Kyoto had already developed a hypoallergenic soybean range, Tohoku 124, by genetic selection. The two other major allergens were removed, but Gly m Bd 30 kDa remained. It could only be removed by processes limiting the use of the product afterwards (Samoto, 1997; Ogawa, 2000).*

*The introduction in the soybean genome of a transgene inhibiting the translation of the gene coding Gly m Bd 30 kDa enabled the removal of this allergen from the seed (undetectable by analysis methods). No differences were noted – in terms of composition, development and reproduction in particular – between the transgenic plant and the conventional plant. The proteomic analysis showed the suppression of the allergen and the absence of any other significant modification in the proteic profile of the seed. This supposes that the protein removed does not have a major role to play in the growth of the seed. According to the authors, there is a substantial equivalence between the transgenic plant and the conventional plant (Herman, 2003).*

*The combination of this transgenic variety exempt of Gly m Bd 30 kDa with the hypoallergenic range Tohoku 124 developed by Samoto and his team, could well give rise to a soybean variety not containing any of the three major allergens.*

*The hypoallergenicity of the transgenic variety was confirmed in vitro by an electrophoresis SDS-PAGE followed by an immunotransfer, by using specific IgG taken from rabbits and specific IgE contained in the serum of people sensitized to soybean. The "hypoallergenic" character must be confirmed, however, by other experiments:*

- *in vivo tests on sensitized animals (experiments in pigs are under way (Suszkiw, 2002));*
- *skin tests on allergic people;*
- *lastly, oral provocation tests in allergic people.*

*It is only once all these conditions are fulfilled (and that this GM soybean has been assessed as any other GMP) that the use of this soybean instead of conventional soybean could be envisaged in the food of certain allergic patients.*

## BLÉ HYPOALLERGÉNIQUE

Les réactions allergiques au blé sont provoquées par un certain nombre de protéines allergènes telles que les  $\alpha$ -gliadines, les inhibiteurs d' $\alpha$ -amylase, les protéines de transfert des lipides (LTP).

Buchanan et al. (1997) ont tenté de diminuer l'allergénicité du blé en traitant la farine de blé à la thiorédoxine *h*. La thiorédoxine *h* a la propriété de réduire les ponts disulfures des protéines riches en cystine (elle convertit les liaisons S-S en SH). Si des allergènes en contiennent, ils sont donc dénaturés et cela peut les rendre plus digestibles. Leur immunogénicité peut donc, théoriquement, être atténuée après action de cette protéine.

Le potentiel allergénique de la farine de blé traitée par la thiorédoxine *h* a été mesuré *in vivo* chez le chien en pratiquant des tests cutanés. Une diminution significative de la réponse a été observée avec la farine traitée sur 15 des 16 animaux testés (Buchanan, 1997). La thiorédoxine *h* a dénaturé les gliadines et les gluténines (représentant la plus grande partie de la fraction protéique), mais les résultats ont été moins convaincants sur le reste des protéines (albumines, globulines notamment). Certains sujets allergiques au blé pourraient donc moins réagir avec du blé traité par la thiorédoxine *h*, ou avec du blé GM dans lequel l'expression de la thiorédoxine *h* serait augmentée.

Quelques publications évoquent la mise au point de blé et d'orge GM dans lesquels des copies supplémentaires du gène codant la thiorédoxine *h* auraient été insérées (Frick, 1996 ; Cho, 1999 ; Joudrier, 2005). Des lignées dont les grains contiennent plusieurs fois la quantité « normale » de thiorédoxine *h* auraient ainsi été créées. Cependant, aucune étude ne relate des tests d'allergénicité effectués directement avec ce blé GM sur un modèle animal ou sur des patients allergiques.

La thiorédoxine *h* peut aussi être utilisée pour réduire l'allergénicité d'autres aliments. Une étude a montré qu'elle avait un effet sur deux des allergènes majeurs de l'arachide, *Ara h 2* et *Ara h 3*, et un des allergènes mineurs, *Ara h 6* (Yano, 2001). Son effet sur la bêta-lactoglobuline, allergène majeur du lait de vache, a également été démontré (Del Val, 1999).

**NB** : la maladie cœliaque (ou intolérance au gluten) n'est pas une allergie : il s'agit d'une entéropathie caractérisée par une malabsorption et une atrophie de la muqueuse intestinale causées par la présence dans le blé (ainsi que dans la plupart des céréales) de protéines immunogènes : les prolamines. Les effets d'un enrichissement en thiorédoxine *h* sur cette pathologie n'ont pas encore été étudiés, car on ne dispose pas de modèle animal adéquat : les tests devraient être menés sur des malades

## HYPOALLERGENIC WHEAT

Allergic reactions to wheat are triggered by a certain number of allergenic proteins such as  $\alpha$ -gliadins,  $\alpha$ -amylase inhibitors and the lipid transfer proteins (LTP).

Buchanan et al. (1997) tried to reduce the allergenicity of wheat by treating wheat flour with thioredoxin *h*. Thioredoxin *h* is able to reduce the disulfide bonds of cystin-rich proteins (it converts the SS links into SH). If allergens contain it, they are thus denatured, which may make them easier to digest. Their immunogenicity can thus, in theory, be mitigated after action of this protein.

The allergenic potential of wheat flour treated with thioredoxin *h* was measured *in vivo* in dogs on which skin tests were conducted. A significant reduction of the response was observed with the treated flour on 15 of the 16 animals tested (Buchanan, 1997). Thioredoxin *h* denatured the gliadins and glutenins (representing the greatest part of the proteic fraction), but the results were less convincing for the rest of the proteins (albumins and globulins in particular). Therefore, certain people who are allergic to wheat could react less with thioredoxin *h*-treated wheat flour, or with GM wheat in which the expression of thioredoxin *h* would be higher.

A few publications mention the development of GM wheat and barley in which additional copies of the gene coding thioredoxin *h* has been inserted (Frick, 1996; Cho, 1999; Joudrier, 2005). Types in which the seeds contain several times more thioredoxin *h* than "normal" have thus been created. However, no study relates to allergenicity tests conducted directly with this GM wheat on an animal model or on allergic patients.

Thioredoxin *h* can also be used to reduce the allergenicity of other foods. One study has shown that it has an effect on two of the major allergens in peanuts, *Ara h 2* and *Ara h 3*, and one of the minor allergens, *Ara h 6* (Yano, 2001). Its effect on beta-lactoglobulin, a major allergen in cow's milk, has also been proved (Del Val, 1999).

**NB**: cœeliac disease (or gluten intolerance) is not an allergy: it is an enteropathy characterised by poor absorption and an atrophy of the intestinal mucosa caused by the presence of immunogenic proteins in wheat (and most cereals) called prolamins. The effects of enriched thioredoxin *h* in this disease have still not been examined, as a suitable animal model is unavailable: tests should be conducted on voluntary cœeliac patients. In addition, the T epitopes characterised in cœeliac disease



œliaques volontaires. De plus, les épitopes T caractérisés dans la maladie œliaque se situeraient dans le domaine répétitif des prolamines (Dieterich, 2003), qui est dépourvu de cystéines et donc de ponts disulfures. L'utilisation de la thiorédoxine *h* pour dénaturer ces épitopes ne semble donc pas pertinente.

## POMMIER HYPOALLERGÉNIQUE

L'allergie à la pomme, dans les régions où le pollen de bouleau est endémique, est caractérisée par la prédominance d'IgE dirigées contre *Mal d 1*, allergène de 18 kDa croisant avec *Bet v 1* du bouleau. *Mal d 1* est thermolabile (Vieths, 1998) et très peu résistant à la digestion (Jensen-Jarolim, 1999). Le but d'une étude néerlandaise récente (Gilissen, 2005), menée par une équipe de Wageningen (Pays-Bas) a été d'inhiber l'expression de cet allergène dans les plants de pommiers, de façon à obtenir des fruits consommables par la plupart des individus allergiques.

### ■ Inhibition du gène codant un allergène majeur de la pomme par la technique d'interférence ARN

Des plants de pommier cultivés *in vitro* ont été transformés avec un intron contenant une séquence spécifique de *Mal d 1* répétée et inversée. Cette technique dite d'interférence ARN suit le même principe que la technique ARN anti-sens, mais la totalité du gène n'est pas transférée : en effet, l'introduction d'une partie du gène sous forme anti-sens est souvent suffisante, voire plus efficace, pour inhiber l'expression du gène. Après transformation, les plants ont été sélectionnés sur la base d'un phénotype et d'un taux de croissance normaux. La vérification de la modification a ensuite été effectuée par PCR : 6 des 9 plants présentaient la construction rendant le gène « silencieux ».

L'expression de *Mal d 1* dans les feuilles des plants a été suivie par des prick-tests chez trois patients allergiques aux pommes. Les plants non GM avaient une allergénicité significativement plus élevée ( $p < 0,05$ ) que les plants GM. L'immunotransfert effectué d'une part avec un anticorps monoclonal, et d'autre part avec des anticorps IgE (les deux types d'anticorps pouvant de lier à *Mal d 1*), a également confirmé la réduction de l'expression de *Mal d 1* dans les feuilles des plants GM : pour les plants sauvages et les plants pour lesquels la transformation a échoué, une bande de 18 kDa a été détectée. Cette bande était pratiquement absente pour les plants GM.

En théorie, il serait donc possible de produire des pommes hypoallergéniques. La diminution de l'allergénicité des plants GM a pu être démontrée *in vivo* : ce n'est pas le cas pour tous les PGM hypoallergéniques précédemment évoqués. L'allergénicité n'a pour l'instant été étudiée qu'au niveau des feuilles des pommiers, alors que c'est le fruit qui est consommé. Il est donc

*would be found in the repetitive domain of prolamins (Dieterich, 2003), which is lacking in cysteines and hence disulfide bonds. The use of thioredoxin h to denature these epitopes does not seem appropriate in this case.*

## HYPOALLERGENIC APPLES

*Allergy to apples, in regions where birch pollen is endemic, is characterised by the predominance of IgE directed against Mal d 1, an allergen of 18 kDa cross-reacting with Bet v 1 of the birch tree. Mal d 1 is thermolabile (Vieths, 1998) and poorly resistant to digestion (Jensen-Jarolim, 1999). The aim of a recent dutch study (Gilissen, 2005) conducted by a team from Wageningen (Netherlands) was to inhibit the expression of this allergen in apple trees so as to obtain fruit that can be eaten by most people allergic to apples.*

### ■ Inhibition of the gene coding a major allergen in apples using the RNA interference technique

*Apple trees grown in vitro were transformed with an intron containing a specific sequence of Mal d 1 repeated and inverted. This technique called RNA interference follows the same principle as the RNA antisense technique, only the whole of the gene is not transferred: since the introduction of part of the antisense gene is often enough, even more effective, for inhibiting the expression of the gene. After transformation, the plants were selected on the basis of a normal phenotype and growth rate. The modification was then checked by PCR: 6 of the 9 plants presented the construction rendering the gene "silent".*

*The expression of Mal d 1 in the plant leaves was monitored by prick-tests in three patients allergic to apples. The non-GM plants had a significantly higher allergenicity ( $p < 0.05$ ) than the GM plants. The immunotransfer carried out firstly with a monoclonal antibody, and secondly with IgE antibodies (both types of antibodies can bond with Mal d 1), also confirmed the reduction of the expression of Mal d 1 in the GM plant leaves: for wild plants and plants in which the transformation failed, a strip of 18 kDa was detected. This strip was practically absent in the GM plants.*

*In theory, it would be possible to produce hypoallergenic apples. The reduction of the allergenicity of GM plants could be proved in vivo: this is not the case for all the aforementioned hypoallergenic GMPs. Allergenicity has, for the moment, been studied in the leaves of apple trees only, whereas it is the fruit that is consumed.*

souhaitable de réaliser par la suite des prick-tests avec les fruits issus de ces plants GM. En effet, rien ne garantit que l'on observera les mêmes résultats avec une autre partie de la plante. Il est également important de souligner que des prick-tests négatifs ne suffisent pas à garantir que l'ingestion du fruit GM sera sans danger pour les patients allergiques : la réalisation de tests de provocation orale semble indispensable pour parvenir à de telles conclusions.

Enfin, on ne sait rien de l'expression d'autres allergènes de la pomme (*Mal d 2*, *Mal d 3*, *Mal d 4* notamment) : un fruit appauvri en *Mal d 1* ne sera profitable qu'aux personnes allergiques réagissant uniquement à cette protéine.

## DISCUSSION

Si des plantes GM étaient cultivées spécifiquement pour les consommateurs allergiques, une traçabilité extrêmement rigoureuse serait requise afin d'éviter tout mélange avec les variétés conventionnelles et tout accident allergique qui pourrait en découler (nécessité de pureté absolue de la culture hypoallergénique). Il sera sans doute assez difficile de cultiver, transporter, transformer et commercialiser ces plantes GM hypoallergéniques, sans risquer le moindre contact avec des plantes non GM. En imaginant que cela soit tout de même possible, la mise en place de ces filières spécialisées aurait probablement un coût très important.

Quoi qu'il en soit, les plantes obtenues pour l'instant ne semblent pas être « suffisamment hypoallergéniques » pour pouvoir être consommées par toutes les personnes d'ores et déjà allergiques. En effet, de petites quantités d'allergènes peuvent être suffisantes pour déclencher des symptômes, et il existe de grandes variations interindividuelles de sensibilisation aux différents allergènes d'un même aliment, et aux différents épitopes d'un même allergène (Shewry, 2001).

Il faut enfin reconnaître que pour un consommateur qui se sait allergique à un aliment, l'ingestion de ce dernier, si hypoallergénique soit-il, ne va pas sans poser problème. La consommation de l'aliment devra nécessairement être effectuée une première fois en milieu hospitalier, surtout si le patient a des antécédents d'allergie grave. En outre, l'acceptabilité « psychologique » – on pourra faire le parallèle avec les tests de provocation orale – est rarement évidente pour certains patients qui suivent un régime d'éviction depuis de nombreuses années et qui ont une grande appréhension de l'aliment auquel ils sont allergiques.

En supposant que la consommation d'un aliment dont l'allergénicité a été diminuée rend moins probable la sensibilisation des individus à cet aliment, on pourrait

*It is thus desirable to conduct prick-tests on the fruit produced by these GM plants, since nothing guarantees that the same results would be obtained with another part of the plant. It is also important to stress that negative prick-tests are not enough to guarantee that ingesting GM fruit would not pose any danger for allergic patients: it seems essential to carry out oral provocation tests in order to reach such conclusions.*

*Lastly, nothing is known of the expression of other apple allergens (Mal d 2, Mal d 3 and Mal d 4 in particular): a fruit lacking in Mal d 1 will only benefit those allergic people who react solely to this protein.*

## DISCUSSION

*If GM plants were cultivated specifically for allergic consumers, an extremely rigorous traceability would be necessary to avoid any mixing with conventional varieties and any allergic accident which could result (a need for absolute purity in hypoallergenic cultivation). It would undoubtedly be quite difficult to grow, transport, process and market these hypoallergenic GM plants without risking the slightest contact with non-GM plants. Imagining that all of this is nonetheless possible, the establishment of these specialised sectors would probably cost a considerable amount.*

*Nevertheless, the plants obtained at present do not seem to be "hypoallergenic enough" to be able to be eaten by everyone who is already allergic. In effect, small quantities of allergens may suffice to trigger symptoms, and there are substantial inter-individual variations of sensitization to different allergens in the same food and to different epitopes of the same allergen (Shewry, 2001).*

*Lastly, it must be acknowledged that, for a consumer who knows that he or she is allergic to a particular food, swallowing this food, however hypoallergenic it may be, is not without problems. It is crucial that the food is consumed, for the first time, in a hospital environment, especially if the patient has a serious history of the allergy. Moreover, "psychological" acceptance – a parallel could be made with the oral provocation tests – is rarely easy for certain patients who have been following a diet of eviction for a number of years and are very apprehensive of the food they are allergic to.*

*Supposing that consumption of a food whose allergenicity has been reduced makes sensitization in individuals to this food less likely, it could also be possible to conceive hypoallergenic GMPs as a means of preventing sensitization of atopic individuals*



également concevoir les PGM hypoallergéniques comme un moyen de prévenir la sensibilisation des individus atopiques à diverses plantes. On peut imaginer que de telles lignées puissent remplacer, au moins en partie, et à plus ou moins long terme, les lignées conventionnelles. Pour pouvoir constater une diminution de la sensibilisation de la population à certaines plantes (ce qui serait déjà, en soi, un véritable progrès), il faudrait probablement que les PGM hypoallergéniques soient consommées par une très large part de la population étudiée, et que par ailleurs les autres facteurs favorisant l'allergie (encore mal connus) ne soient pas aggravés. Le bénéfice en matière de santé publique pourrait se révéler important, surtout si des recherches visant à diminuer l'allergénicité des pollens étaient menées en parallèle.

Pour l'instant, une seule société semble s'être intéressée de près aux PGM hypoallergéniques en collaborant aux travaux de Herman sur le soja. La plante serait cultivée depuis l'été 2003 à Hawaï (Borde, 2004). Selon cette société, il faudrait encore attendre 10 à 15 ans avant qu'une entreprise puisse mettre sur le marché une PGM hypoallergénique. Les bénéfices de plantes spécifiquement conçues pour minimiser les allergies restent donc à l'heure actuelle hypothétiques. Par ailleurs, les autres moyens disponibles pour diminuer l'allergénicité des aliments (traitements thermiques, digestions enzymatiques notamment) méritent tout autant l'attention des technologues.

*to various plants. It can be imagined that such lines could replace, at least partly, conventional lines in the more or less long term. To be able to observe a reduction in the population's sensitization to certain plants (which would be real progress in itself), hypoallergenic GMPS would probably have to be consumed by a very wide section of the population studied, without the aggravation of other allergy triggering factors (poorly known at present). The benefit with regard to public health could be considerable, especially if research aiming to reduce the allergenicity of pollens were conducted at the same time.*

*For the time being, only one company seems to show a keen interest in hypoallergenic GMPS by working in partnership with Herman on soybean. The plant has been cultivated since summer 2003 in Hawaii (Borde, 2004). According to this company, it will still be 10 to 15 years before a company can market a hypoallergenic GMPS for the first time. The benefits of plants specifically designed to minimise allergies remain hypothetical at the present time. Moreover, the other means available for reducing the allergenicity of food (thermic treatments and enzymatic digestions in particular) are just as deserving of technological attention.*

# RISQUES POTENTIELS LIÉS À CERTAINES PGM : PROBLÈMES D'ALLERGIE ÉVOQUÉS DANS LA LITTÉRATURE

## POTENTIAL RISKS ASSOCIATED WITH CERTAIN GMPS: ALLERGY PROBLEMS MENTIONED IN THE LITERATURE

### LE SOJA ENRICHI EN MÉTHIONINE (1996)

#### L'étude de Nordlee *et al.* (1996)

La qualité nutritionnelle du soja est limitée par une déficience relative de la fraction protéique en acides aminés soufrés : méthionine, cystéine. Afin d'en augmenter la teneur dans le soja, un gène de la noix du Brésil codant une albumine 2S riche en acides aminés soufrés a été introduit dans le génome du soja.

Cette protéine s'est avérée être un allergène majeur de la noix du Brésil (Pastorello, 1998 ; Arshad, 1991). Nordlee *et al.* (1996) ont cherché à savoir si l'albumine 2S exprimée par le soja transgénique pouvait se lier aux anticorps de sujets allergiques à la noix du Brésil, et donc présenter un risque allergique pour ces sujets. Trois types de tests ont été menés :

- RAST : pour les quatre sérums de patients allergiques à la noix du Brésil testés, l'extrait protéique de soja transgénique a inhibé la liaison des IgE aux protéines de noix du Brésil ;
- Electrophorèse SDS-PAGE suivie d'immunotransfert : pour huit des neuf sérums de patients allergiques à la noix du Brésil testés, les IgE se sont liées à la fois à l'albumine 2S de noix du Brésil purifiée, et à une protéine de soja transgénique de même poids moléculaire ;
- test cutanés : les trois patients testés ont présenté des tests positifs avec les extraits de noix du Brésil et de soja transgénique, et des tests négatifs avec l'extrait de soja témoin.

Il existe donc un risque de transférer par modification génétique un gène codant un allergène, en l'occurrence *Ber e 1*, dans une autre plante. Il a d'autre part été montré qu'une modification du métabolisme de la protéine introduite par MG conduisait à l'accumulation d'une protéine IgE-réactive de 12 kDa quasi inexistante dans la noix du Brésil. Ceci montre l'intérêt de faire porter l'évaluation de l'allergénicité sur l'ensemble de la fraction protéique afin d'obtenir une analyse plus globale du résultat de la transgénèse.

### SOYBEAN, ENRICHED WITH METHIONINE (1996)

#### The study by Nordlee *et al.* (1996)

The nutritional quality of soybean is limited by a deficiency relating to the proteic fraction in sulphur amino acids: methionin and cysteine. To increase its content in soybean, a Brazil nut gene coding an albumin 2S, rich in sulphur amino acids, has been introduced into the genome of the soybean.

This protein has proved to be a major allergen of the Brazil nut (Pastorello, 1998; Arshad, 1991). Nordlee *et al.* (1996) sought to find out if the albumin 2S expressed by transgenic soybeans could combine with the antibodies in people allergic to Brazil nuts, and thus present an allergic risk for them. Three types of tests were conducted:

- RAST: for all four sera taken from patients allergic to brazil nuts, the proteic extract of transgenic soybeans inhibited the IgE-binding with brazil nut proteins;
- SDS-PAGE electrophoresis followed by immunotransfer: for eight of the nine sera tested from patients allergic to Brazil nuts, the IgE combined with both the purified albumin 2S of the Brazil nut, and a transgenic soybean protein of the same molecular weight;
- Skin tests: the three patients tested presented positive tests with transgenic soybean and Brazil nut extracts, and negative tests with the soybean extract.

Thus there is a risk of transferring, by genetic modification, a gene coding an allergen (in this case *Ber e 1*) into another plant. Moreover, it has proved that a modification of the metabolism of the protein introduced by GMn led to an accumulation of an IgE-reactive protein of 12 kDa, almost non-existent in Brazil nuts. This shows the interest to carry allergenicity assessment over to the whole of the proteic fraction so as to obtain a more global analysis of the transgenesis result.

Il s'agit ici en quelque sorte d'un « cas d'école » : l'espèce source du transgène était connue pour être allergénique et des sérums de patients allergiques à la source du transgène étaient disponibles. Au vu de ces résultats, le société interrompit son programme de recherche en avril 1993. Selon la firme (Pioneer Hi-Bred, 2003), tout le matériel végétal concerné a été détruit. Ce soja transgénique n'a jamais fait l'objet d'une demande de dissémination (il n'a donc jamais été commercialisé, que ce soit pour l'alimentation animale ou humaine).

## Discussion

Le soja entre dans la composition de très nombreux produits transformés de notre alimentation : substituts de viande, sauces, mais aussi formules infantiles, substituts des produits laitiers, etc. Étant donné les qualités nutritionnelles de cette graine, sa consommation, qui est traditionnelle en Extrême-Orient, est en augmentation dans les pays occidentaux.

La réglementation américaine de l'époque (FDA, 1992) aurait simplement obligé la société à étiqueter la présence de l'allergène de la noix du Brésil sur les produits contenant ce soja transgénique. Cependant l'obteneur (Pioneer Hi-Bred) a choisi de mettre un terme à son programme de recherche avant même d'avoir consulté la FDA. En prenant les devants par rapport à une réglementation insuffisante, la société a pu mettre en avant sa capacité à évaluer l'allergénicité du produit préalablement à la mise sur le marché (Nestle, 1996). Or, dans ce cas précis, toutes les conditions étaient réunies pour que l'allergénicité du produit puisse être démontrée : la noix du Brésil, source du transgène, était connue pour être allergénique, et l'on disposait de sérums pour effectuer les tests immunologiques. C'est loin d'être toujours le cas. L'industrie biotechnologique utilise très souvent des transgènes provenant de microorganismes. Le potentiel allergénique des protéines codées par ces gènes est encore mal connu.

Par ailleurs, on peut noter que les essais menés sur les souris afin d'évaluer l'allergénicité des protéines de la noix du Brésil (Melo, 1994) n'avaient pas identifié l'albumine 2S comme étant un allergène majeur : en effet la capacité à induire une réponse IgG1 chez l'animal n'est pas toujours un bon indicateur de la capacité à induire une réponse IgE chez l'homme. Dans le cas où des sérums humains ne sont pas disponibles, l'évaluation de l'allergénicité basée sur un ou des modèles animaux se révèle donc, pour l'instant, insuffisante.

Au final, ces observations ont donné lieu à un processus de renforcement de la réglementation aux États-Unis concernant les tests précédant la dissémination des OGM (p. 70).

*This is a "textbook case" in a way: the source species of the transgene was known for being allergenic and sera from patients allergic to the transgene source were available. In view of these results, the company interrupted its research programme in April 1993. According to the company (Pioneer Hi-Bred, 2003), all plants concerned were destroyed. This transgenic soybean was never the subject of a dissemination request (thus it has never been sold, whether for animal feed or human food).*

## Discussion

*Soybean is used in the composition of countless processed food products: meat substitutes, sauces, infant formulas, substitutes for dairy products, etc. Given the nutritional qualities of this seed, its consumption, which is traditional in the Far East, is on the rise in western countries.*

*American regulations at the time (FDA, 1992) would simply have required the company to label the presence of the Brazil nut allergen on the products containing the transgenic soybean. However, the breeder (Pioneer Hi-Bred) chose to end its research programme before even having consulted the FDA. Taking the initiative with regard to inadequate regulations, the company could highlight its capacity to assess the allergenicity of the product before it was placed on the market (Nestle, 1996). In this specific case, all the conditions were ripe for the product allergenicity to be proved: brazil nuts, the source of the transgene, were known to be allergenic, and sera were available to conduct the immunological tests. This is far from being the case every time. The biotechnological industry often uses transgenes taken from micro-organisms. Little is still known about the allergenic potential of proteins coded by these genes.*

*Moreover, it can be noted that the tests conducted on mice with a view to assessing the allergenicity of Brazil nut proteins (Melo, 1994) did not identify the albumin 2S as a major allergen: in effect, the ability to induce an IgG1 response in the animal is still not a good indicator of the ability to induce an IgE response in humans. In the event that human sera are unavailable, allergenicity assessment based on one or more animal models is thus insufficient for the time being.*

*In the end, these observations have given rise to a reinforcement process of the United States regulations concerning tests prior to the dissemination of GMOs (p. 70).*

## LE MAÏS STARLINK™ (2000)

### Rappels

La société Aventis (ex-AgrEvo) a mis au point le maïs *Starlink™*, porteur d'un gène codant la protéine insecticide Cry9C. Ce gène provient d'une bactérie vivant dans le sol, *Bacillus thuringiensis* (Bt) subsp. *tolworthi*. Ce maïs a été autorisé aux États-Unis par l'EPA<sup>(36)</sup> en 1998 uniquement pour l'alimentation animale. Il subsistait un doute sur l'allergénicité pour l'homme de la protéine Cry9C (dégradation lente en milieu gastrique).

L'épisode *Starlink™* est survenu en septembre 2000, lorsque des traces de maïs *Starlink™* ont été retrouvées dans plus de 300 produits destinés à la consommation humaine, notamment des chips et des corn-flakes vendus aux États-Unis, ainsi que des gâteaux vendus au Japon. Cette présence peut être expliquée par un mélange accidentel fait après récolte entre le maïs *Starlink™* et les maïs conventionnels. Cette épisode a été largement couvert par les médias. Dans ce contexte, plusieurs cas d'allergie chez des personnes ayant consommé des produits susceptibles de contenir du maïs *Starlink™* ont été rapportés à la FDA<sup>(37)</sup> et à l'EPA (deux cas, en particulier, ont été rapportés avant que l'épisode ne soit rendu public dans la presse). L'EPA et la FDA ont alors décidé d'entreprendre des recherches, dont les résultats principaux sont explicités ci-dessous. Aventis a pour sa part été contraint de dédommager l'ensemble de la filière (Howie, 2001). La quantité de maïs *Starlink™* entrée dans l'alimentation humaine n'a jamais pu être estimée.

### Études menées par les autorités américaines

#### ■ Évaluation de l'allergénicité de la protéine Cry9C du maïs *Starlink™* pour l'alimentation humaine

Quatre critères ont été pris en compte par l'EPA pour évaluer le potentiel allergène de la protéine Cry9C (Bucchini, 2000) :

- l'homologie de séquence avec des allergènes connus ;
- la résistance à la dégradation enzymatique en milieu acide (digestion gastrique) ;
- la résistance et la stabilité à la chaleur ;
- le poids moléculaire.

Deux autres critères ont également été pris en compte, en considérant une utilisation de la PGM pour l'alimentation animale : la quantité de protéine Cry9C présente dans la plante, et l'exposition professionnelle à la plante<sup>(38)</sup>.

(36) Environmental Protection Agency.

(37) Food and Drug Administration.

(38) Inhalation de particules de plante par des personnes très exposées par le biais de leur profession (agriculteurs, personnes travaillant dans les usines d'aliments pour animaux). L'EPA a cherché à savoir si des réactions allergiques s'étaient manifestées chez ces personnes.

## STARLINK™ CORN (2000)

### Reviews

*The company Aventis (ex-AgrEvo) developed Starlink™ corn, carrying a gene coding the insecticide protein Cry9C. This gene comes from a living bacteria in the soil, Bacillus thuringiensis (Bt) subsp. tolworthi. The corn was authorised in the United States by the EPA<sup>(36)</sup> in 1998 solely for use in animal feed. There remained some doubt over the allergenicity for humans of the protein Cry9C (slow degradation in the gastric milieu).*

*The Starlink™ episode took place in September 2000 when traces of Starlink™ corn were discovered in more than 300 products intended for human consumption, particularly in crisps and cornflakes sold in the United States, as well as in cakes sold in Japan. This presence may be explained by an accidental mixing that occurred after harvesting between the Starlink™ corn and conventional corn. It was covered widely in the media. In this context, several cases of allergy in people who had eaten products likely to contain Starlink™ corn were reported to the FDA<sup>(37)</sup> and the EPA (two cases, in particular, were reported before the episode became public through the press). The EPA and the FDA thus decided to undertake research, the main results of which are explained below. Aventis was forced to compensate the whole agricultural sector (Howie, 2001). The quantity of Starlink™ corn that entered human food has never been estimated.*

### Studies conducted by the American authorities

#### ■ Assessment of the allergenicity of the protein Cry9C in *Starlink™* corn for human consumption

Four criteria were considered by the EPA to assess the allergenic potential of the Cry9C protein (Bucchini, 2000):

- sequence homology with known allergens;
- resistance to enzymatic degradation in the acidic milieu (gastric digestion);
- resistance and stability to heat;
- molecular weight.

Two other criteria were also taken into account, by considering a use of the GMP in animal feed: the quantity of the Cry9C protein present in the plant, and professional exposure to the plant<sup>(38)</sup>.

(36) Environmental Protection Agency.

(37) Food and Drug Administration.

(38) Inhalation of plant particles by people who are very exposed through their profession (farmers, people working in animal feed factories). The EPA sought to find out if allergic reactions had occurred in these people.

La protéine Cry9C est apparue comme potentiellement allergène selon au moins deux de ces quatre critères :

- résistance à la dégradation *in vitro* et partiellement à la digestion *in vivo* ;
- stabilité à la chaleur (90 °C, sur de longues durées<sup>(39)</sup>).

Il n'a pas été trouvé d'homologie de séquence avec des allergènes connus, ce qui ne permet pas d'affirmer l'absence de risque sanitaire. Par ailleurs, le faible poids moléculaire de la protéine (68 kDa) laissait penser que celle-ci pouvait peut-être franchir la barrière intestinale.

L'étude déterminant la quantité de protéine exprimée au niveau de la plante conclut à de « faibles quantités » (0,012 % des protéines du grain, soit 0,0012 % du poids du grain). Cependant, aucun seuil de danger n'a pu être défini pour l'instant. De plus, dans un autre contexte (capacité de résistance du maïs *Starlink*<sup>TM</sup> aux attaques d'insectes), l'EPA et Aventis ont argumenté sur le fait que le maïs exprimait « une forte dose de toxine » dans tous les tissus de la plante excepté le pollen.

Mais la quantité de protéine exprimée ne peut pas être considérée comme un critère d'allergénicité, étant donné que certaines protéines présentes en très petites quantités peuvent se révéler très allergisantes (p. 17).

L'exposition professionnelle a été estimée négligeable par l'EPA car la protéine Cry9C n'est pas toxique pour l'homme. Cependant, un certain nombre d'auteurs ont décrit des allergies professionnelles à la poussière de graine (Van Kampen, 2000). L'asthme du boulanger en est l'exemple le plus classique. Il n'est donc pas impossible que la protéine Cry9C, potentiellement allergène, soit véhiculée par la poussière de maïs. Bernstein (1999) soutient cette hypothèse en montrant que l'exposition professionnelle des agriculteurs à la toxine Cry9C conduit à la synthèse d'IgE et d'IgG spécifiques. Le protocole de cette étude est cependant discutable sur certains points (exposition des sujets à la bactérie entière et non à la protéine Cry9C seule, absence de témoins négatifs, absence de symptômes cliniques).

Les seules informations concernant l'exposition professionnelle fournie par la société Aventis sont des courriers d'employés ayant beaucoup manipulé de maïs *Starlink*<sup>TM</sup>, et attestant qu'ils n'ont pas eu d'effet secondaire directement attribuable à ces manipulations.

Ces deux « critères » additionnels (quantité de protéine exprimée et exposition professionnelle), tels qu'ils ont été argumentés, ne semblent pas pertinents pour évaluer l'allergénicité de la protéine Cry9C, et les courriers des employés sus-cités ne sont appuyés par aucune constatation médicale.

*The Cry9C protein appeared to be potentially allergenic in at least two of these four criteria:*

- resistance to degradation in vitro and partially to digestion in vivo;*
- stability to heat (90 °C, over long periods<sup>(39)</sup>).*

*No sequence homology with known allergens was found, which does not confirm the absence of a health risk. In addition, the protein's low molecular weight (68 kDa) suggests that it could cross the intestinal barrier.*

*The study determining the quantity of protein expressed in the plant concluded that this was "low" (0.012% of proteins of the grain, i.e. 0.0012% of the grain weight). However, no danger threshold has been defined for the time being. Furthermore, in another context (the ability of Starlink<sup>TM</sup> corn to resist insect attacks), the EPA and Aventis debated the fact that the corn expressed "a high dose of toxin" in all the plant tissues except the pollen.*

*But the quantity of protein expressed cannot be considered as a criterion of allergenicity, given that certain proteins present in very small quantities can prove to be highly allergenic (p. 17).*

*Occupational exposure was estimated as insignificant by the EPA as the Cry9C protein is not toxic for humans. However, a certain number of authors have described occupational allergies to the seed dust (Van Kampen, 2000), baker's asthma being the most classic example. It is thus possible that the Cry9C protein, potentially allergenic, is transported by the corn dust. Bernstein (1999) upholds this hypothesis by showing that the occupational exposure of farmers to the Cry9C toxin leads to the synthesis of specific IgE and IgG. The protocol of this study is, however, debateable on certain points (exposure of individuals to the whole bacteria and not to the Cry9C protein alone, absence of negative controls, absence of clinical symptoms).*

*The only information concerning occupational exposure provided by Aventis are letters from employees who frequently handled Starlink<sup>TM</sup> corn, stating that they did not experience any side effects directly due to this work.*

*These two additional "criteria" (quantity of protein expressed and occupational exposure), such as they have been argued, do not seem relevant for assessing the allergenicity of the Cry9C protein, and the aforementioned employees' letters are not backed up by any medical report.*

(39) La durée précise n'est pas mentionnée dans l'article consulté (Bucchini L, 2000).

(39) The precise period is not mentioned in the referred article (Bucchini L, 2000).



■ **Recherche de maïs *Starlink*<sup>TM</sup> dans les produits incriminés par les patients**

Selon le rapport du CDC<sup>(40)</sup> (CDC, 2001), 28 personnes (cas définis par le CDC) auraient développé une réaction allergique suite à l'ingestion de produits à base de maïs : corn flakes, tortillas, tacos... 11 échantillons de produits ont pu être collectés par la FDA (FDA, 2001b). Sur les 11 échantillons analysés par PCR et ELISA, aucun ne s'est révélé positif<sup>(41)</sup> à la présence d'ADN ou de protéine Cry9C. Il faut cependant noter que les produits tels que les corn flakes ou les chips de maïs subissent des traitements qui compliquent notablement la détection de l'ADN et des protéines.

Pour trois des échantillons, les résultats sont indisponibles ou inutilisables. Un d'entre eux n'a pas pu être analysé par ELISA, la quantité de produit disponible étant insuffisante. Pour un autre, la FDA ne disposait pas du produit du consommateur : le même produit a été acheté dans le commerce puis analysé mais le numéro de lot était différent. Enfin, pour un autre échantillon, l'analyse ELISA n'a pas permis de conclure étant donné que la valeur obtenue était trop proche de la limite de détection.

■ **Recherche d'IgE spécifiques de la protéine Cry9C dans le sérum des patients**

Par ailleurs, le CDC a analysé par ELISA le sérum de 17 patients ayant déclaré à la FDA une réaction allergique suite à l'ingestion de produits à base de maïs. Aucun de ces sérums ne contenait d'IgE spécifiques de la protéine Cry9C. Malgré ces résultats négatifs, la possibilité que ces réactions allergiques soient associées à la consommation de maïs *Starlink*<sup>TM</sup> ne peut pas être écartée, car des réactions peuvent se produire sans pour autant que des IgE dirigées contre la protéine Cry9C ne soient détectables dans le sérum des patients (Ogura, 1993).

La méthodologie du laboratoire de la FDA a été contestée aussi parce que seule la protéine recombinante non glycosylée a fait l'objet d'une recherche d'IgE spécifiques, alors que la protéine produite par la plante GM est glycosylée (p. 37) : la possibilité d'une sensibilisation *de novo* à des épitopes glucidiques, ou la reconnaissance de ces épitopes par des sujets préalablement sensibilisés aux déterminants glucidiques, ne peut donc être exclue (Raybourne, 2003).

Pour effectuer ces tests avec sérums, l'utilisation d'une protéine Cry9C purifiée et produite à partir d'une bactérie, et non pas d'un extrait de la protéine issue de la PGM, est justifiée : l'extraction à partir de la PGM ne permettrait pas d'obtenir une quantité suffisante de protéine. Cependant des réactions

(40) Centers for Disease Control and prevention.

(41) Le résultat est cependant resté indéterminé pour l'un des échantillons analysés par ELISA (la valeur obtenue était proche de la limite de détection du test). L'analyse par PCR n'a toutefois rien détecté sur cet échantillon.

■ **Search on *Starlink*<sup>TM</sup> corn in the products called into question by patients**

According to the CDC<sup>(40)</sup> report (CDC, 2001), 28 people (defined cases by the CDC) developed an allergic reaction after swallowing products made from this corn: cornflakes, tortillas, tacos, etc. 11 samples of products were collected by the FDA (FDA, 2001b). Out of the 11 samples analysed by the PCR and ELISA, none of them proved positive<sup>(41)</sup> to having the Cry9C protein or DNA. However, it should be noted that products such as cornflakes or corn crisps undergo treatments which complicate the detection of DNA and proteins in particular.

For three of the samples, the results are unavailable or unuseable. One of them could not be analysed by ELISA as the quantity of the product available was insufficient. For another, the FDA did not have the consumer product: the same product had been bought in a shop and then analysed, but the batch number was different. Lastly, for another sample, the ELISA analysis could not be concluded given that the value obtained was too close to the detection limit.

■ **Search for specific IgE directed against the Cry9C protein in patients' serum**

Furthermore, the CDC analysed, by ELISA, the serum of 17 patients who had announced to the FDA an allergic reaction after swallowing products made from the corn. None of these sera contained specific IgE of the Cry9C protein. In spite of these negative results, the possibility that these allergic reactions are associated with eating *Starlink*<sup>TM</sup> corn cannot be excluded, as reactions can occur without the specific IgE being detectable in patients' sera (Ogura, 1993).

The methods used by the FDA laboratory were called into question as well, since only the non-glycosylated recombinant protein was subject to research, when the protein produced by the GM plant is glycosylated (p. 37): hence, the possibility of a sensitization *de novo* to glucidic epitopes, or the recognition of these epitopes by individuals who were previously sensitized to carbohydrate determinants, cannot be excluded (Raybourne, 2003).

To conduct these tests with sera, the use of a purified Cry9C protein produced from a bacteria and not from an extract of the GMP's total proteins is justified: extraction from the GMP would not enable enough of the protein to be obtained. But allergic reactions associated with the glycosylation of the protein coded by the transgene

(40) Centers for Disease Control and prevention.

(41) The result is still undetermined, nonetheless, for one of the samples analysed by ELISA (the value obtained was close to the test detection limit). The PCR analysis did not detect anything on this sample though.



allergiques liées à la glycosylation de la protéine codée par le transgène (chez la PGM), auraient pu se produire. L'utilisation d'un extrait protéique total aurait quant à elle peut-être permis de mettre en évidence la présence d'une nouvelle protéine allergène dans le maïs GM, ou d'une protéine allergène endogène surexprimée en raison de la MG effectuée.

## Autres études

*A posteriori* des recherches entreprises par les autorités américaines, les résultats d'autres études effectuées sur le maïs *Starlink*<sup>TM</sup> ont été publiés.

### ■ Étude de l'immunotoxicité du maïs *Starlink*<sup>TM</sup> sur des modèles murins

Une étude a comparé le maïs GM *Starlink*<sup>TM</sup> et son équivalent non-GM sur le plan de l'immunotoxicité (Teshima, 2002). Des souris B10A et des rats BN (lignées choisies pour leur aptitude particulière à développer des réponses allergiques), ont été nourris pendant 13 semaines avec des portions alimentaires contenant 50 % de farine de maïs cuite, le maïs étant GM pour les cas et non-GM pour les témoins. Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes au niveau de l'histopathologie des organes afférents au système immunitaire, au niveau de la biochimie sérique, de l'hématologie ou du taux d'histamine sanguin. La production d'IgE et d'IgA spécifiques de Cry9C n'a pas été observée chez les animaux nourris avec du maïs *Starlink*<sup>TM</sup>. La production d'IgG et d'IgG1 spécifiques de Cry9C a très légèrement augmenté chez les rats BN nourris avec le maïs GM, sans que l'on puisse pour autant envisager que cela ait un impact clinique (hypersensibilité de type III). Les auteurs concluent que cette étude n'a pas détecté d'activité immunotoxique chez les animaux nourris avec le maïs GM.

Cependant, il n'existe pas de parallélisme entre allergénicité chez la souris ou le rat et allergénicité chez l'homme (Birmingham, 2002). Il est donc difficile d'extrapoler ces résultats et de conclure que la protéine Cry9C n'est pas immunogène chez l'homme, même si cette étude rend cela moins probable.

### ■ Étude sur animaux cibles

L'étude de Yonemochi (2003) a été réalisée au Japon sur des vaches laitières (8 animaux, 5 semaines, rations alimentaires comportant 35 % de maïs GM ou non-GM). Elle visait à évaluer leur état de santé et la possibilité de transfert de la protéine et/ou du gène Cry9C dans le sang, le lait, le foie et les muscles des animaux. L'état de santé et la lactation n'étaient pas différents entre les deux groupes. La protéine Cry9C n'a pas été retrouvée dans le lait, le sang, le foie ou les muscles des animaux ayant consommé du maïs *Starlink*<sup>TM</sup>.

*(in the GMP), could have occurred. The use of a total proteic extract would perhaps have revealed the presence of a new allergenic protein in the GM corn, or an overexpressed endogenous allergenic protein due to the genetic modification that had taken place.*

## Other studies

*After the research undertaken by the American authorities, results of other studies conducted on Starlink<sup>TM</sup> corn have been published.*

### ■ Study of the immunotoxicity of *Starlink*<sup>TM</sup> corn in murine models

*A study was conducted to compare the GM Starlink<sup>TM</sup> corn and its non-GM equivalent with regard to immunotoxicity (Teshima, 2002). B10A mice and BN rats (strains chosen for their special aptitude to develop allergic responses), were fed, over 13 weeks, with food portions containing 50% cooked corn flour, the corn being GM for the subjects and non-GM for the control animals. No difference was noted between the two groups in terms of the histopathology of organs relating to the immune system, seric biochemistry, haematology or the rate of histamine in the blood. Specific IgE and IgA of Cry9C were not produced in the animals fed with the Starlink<sup>TM</sup> corn. The production of specific IgG and IgG1 of Cry9C slightly increased in the BN rats fed with the GM corn, without this pre-empting a clinical impact (hypersensitivity type III). The authors concluded that this study did not detect immunotoxic activity in the animals fed with the GM corn.*

*However, there is no parallelism between allergenicity in mice or rats and allergenicity in humans (Birmingham, 2002), and it is therefore difficult to extrapolate these results and to conclude that the Cry9C protein is non-immunogenic for humans, even if this study makes this less likely.*

### ■ Study on target animals

*The study of Yonemochi (2003) was conducted in Japan on dairy cows (8 animals, 5 weeks, food rations containing 35% of GM or non-GM corn). It aimed to assess their state of health and the transfer possibility of the protein and/or the Cry9C gene into the blood, milk, liver and muscles of the animals. The state of health and lactation did not differ between the two groups. The Cry9C protein was not found in the milk, blood, liver or muscles of the animals who had eaten Starlink<sup>TM</sup> corn.*

■ **TPODA<sup>(42)</sup> effectué avec du maïs *Starlink*<sup>TM</sup> sur un patient déclarant des symptômes allergiques**

Des prick-tests ainsi qu'un TPODA ont été effectués sur un patient de 58 ans s'étant plaint d'au moins trois réactions allergiques suite à la consommation de produits contenant du maïs potentiellement GM (Sutton, 2003). Les prick-tests ont été réalisés avec un extrait allergénique « commercial » de maïs (Hollister-Stier), un extrait de maïs non GM et un extrait de maïs *Starlink*<sup>TM</sup> préparés sur place. Tous les prick-tests étaient négatifs. Le TPODA a été réalisé avec du maïs non GM et du maïs *Starlink*<sup>TM</sup> broyés. La dose totale de farine de maïs administrée (pour chacun des deux maïs testés) était de 21 g, soit l'équivalent de la quantité présente dans une tortilla. Le patient n'a développé aucun symptôme lors du TPO, que ce soit avec le maïs non GM ou le maïs *Starlink*<sup>TM</sup>.

Le TPODA est reconnu comme étant la méthode de référence pour déterminer un lien de cause à effet entre une nourriture absorbée et les symptômes observés. Dans le cas évoqué ci-dessus, cette relation n'a pas pu être démontrée. Mais il aurait sans doute été intéressant d'effectuer ces tests sur l'ensemble des patients s'étant plaints de symptômes allergiques (le CDC avait pu analyser le sérum de 17 patients).

## Conclusion

Les investigations qui ont été menées n'ont pas permis d'associer la consommation de maïs *Starlink*<sup>TM</sup> aux accidents allergiques rapportés aux autorités américaines. Cependant, les limites méthodologiques des études menées (liées aux méthodes d'évaluation de l'allergénicité, aux difficultés pour recueillir des échantillons, à la définition de la période « cas ») ne permettent pas de conclusions définitives. L'épisode *Starlink*<sup>TM</sup>, au travers des difficultés que les autorités américaines ont eu à mener leurs investigations, aura montré l'importance que représente l'évaluation de l'allergénicité potentielle des PGM avant l'autorisation de leur dissémination.

En Europe, le règlement 1829/2003/CE garantit que de telles situations ne peuvent se produire : les OGM susceptibles d'être utilisés comme denrées alimentaires et aliments pour animaux doivent être autorisés pour ces deux usages (Commission Européenne, 2005b). Il est en effet difficile, voire impossible, de garantir « l'imperméabilité » entre ces deux filières, qui peuvent utiliser les mêmes modes de collecte, de transport et de stockage.

(42) Test de Provocation Orale en Double Aveugle.

■ **DBPCFC<sup>(42)</sup> carried out with *Starlink*<sup>TM</sup> corn on a patient declaring allergic symptoms**

Prick-tests as well as an DBPCFC were carried out on a patient aged 58 years who had complained of at least three allergic reactions after eating products containing potentially GM corn (Sutton, 2003). The prick-tests were conducted with an allergenic extract of "commercial" corn (Hollister-Stier), an extract of non-GM corn and an extract of *Starlink*<sup>TM</sup> corn prepared on site. All the prick-tests were negative. The DBPCFC was carried out with ground non-GM corn and *Starlink*<sup>TM</sup> corn. The total dose of corn flour administered (for each of the two corns tested) was 21g, or the equivalent of the quantity present in a tortilla. The patient did not develop any symptom during the food challenge, with the non-GM or the *Starlink*<sup>TM</sup> corn.

The DBPCFC is recognised as being the benchmark method for determining a cause-effect link between a food absorbed and the symptoms observed. In the aforementioned case, this relation could not be proven. Nevertheless, it would certainly be interesting to conduct these tests on a number of patients who had complained of allergic symptoms (the CDC was able to analyse sera from 17 patients).

## Conclusion

The investigations led did not allow for an association to be made between the consumption of *Starlink*<sup>TM</sup> corn and the allergic incidents reported to the American authorities. However, the methodological limits of the studies conducted (relating to the allergenicity assessment methods, difficulty in gathering samples and definition of the "case" period) do not allow definitive conclusions. The *Starlink*<sup>TM</sup> episode, through the difficulties that the American authorities had when conducting their investigations, will have shown the importance of assessing the potential allergenicity of GMPs before authorising their dissemination.

In Europe, the regulation 1829/2003/EC ensures that such situations cannot occur: the GMOs likely to be used as foodstuffs and feed for animals must be authorised for both uses (European Commission, 2005b). Indeed, it is difficult, impossible even, to guarantee the "impermeability" between two sectors which may use the same means of collection, transport and storage.

(42) Double-blind placebo controlled food challenge.

## LA PAPAYE RÉSISTANTE AU VIRUS « RINGSPOT » (2002)

### ■ Découverte d'une homologie de séquence après la mise sur le marché

La papaye SunUp a été génétiquement modifiée pour résister au VTA<sup>(43)</sup> (virus « ringspot »). Ce virus est transmis principalement par des pucerons en contact avec des plantes infectées. L'homme peut aussi servir d'intermédiaire en transportant le virus d'une plante infectée à une plante saine. Le virus inhibe la photosynthèse et arrête la croissance de la plante. L'infestation par le VTA a dévasté des plantations entières de papayes au Brésil, à Taiwan et dans certaines parties des îles hawaïennes.

Un gène de la capsid virale a été introduit dans le génome de la papaye (Tennant, 2001). L'expression de ce transgène inhibe la réplication du virus, ce qui confère à la plante GM son caractère résistant.

Il a été découvert, après la mise sur le marché de cette papaye, que la protéine codée par le transgène présentait une homologie de séquence de 6 acides aminés avec un allergène répertorié dans les bases de données (Kleter, 2002). En l'occurrence, il s'agirait de *Asc s 1*, allergène majeur du nématode *Ascaris (A.suum, A.lumbricoides)* (McGibbon, 1990). La recherche de séquences communes de 6 ou 7 acides aminés avec des allergènes est cependant peu discriminante ; elle aboutit très souvent à des « faux positifs ». Il serait donc nécessaire d'étudier de plus près les protéines présentant des homologies, afin de déterminer s'il existe bien une allergénicité potentielle.

### ■ L'autorisation de mise sur le marché de la papaye SunUp

L'autorisation de la papaye SunUp pour l'alimentation humaine aux États-Unis date de 1997. L'EPA avait décidé de ne pas fixer de seuil de tolérance pour la présence de la protéine codée par le transgène dans la papaye GM. L'exposition d'ores et déjà importante de la population aux protéines virales par l'alimentation (les papayes non GM pouvant être contaminées par le VTA), ainsi que l'absence de toxicité de ces protéines, laissaient raisonnablement penser qu'aucun effet adverse ne se produirait suite à la consommation de cette PGM (EPA, 1997).

Estimant que la culture de cette papaye ne présentait pas de risque particulier (propriétés pathogènes éventuelles, effets indésirables sur l'environnement notamment), l'USDA-APHIS<sup>(44)</sup>, avait pour sa part décidé de ne plus considérer la papaye SunUp comme étant soumise au règlement 7 CFR part 340<sup>(45)</sup> en lui accordant un statut « non réglementé » (USDA-APHIS, 1996).

(43) Virus des Tâches Annulaires.

(44) United States Department of Agriculture – Animal and Plant Health Inspection Service.

(45) "Introduction of organisms and products altered or produced through genetic engineering which are plant pests or which there is a reason to believe are plant pests", réglementant entre autres l'importation, les mouvements et la dissémination dans l'environnement de ces produits GM.

## PAPAYA RESISTANT TO THE "RINGSPOT" VIRUS (2002)

### ■ Discovery of a sequence homology after the papaya was marketed

The SunUp papaya was genetically modified to resist PRSVs<sup>(43)</sup> (RingSpot Viruses). This virus is transmitted mainly by greenflies in contact with infected plants. Humans may also act as intermediaries by carrying the virus from an infected plant to a healthy plant. The virus inhibits photosynthesis and stops plant growth. Infestation by the PRSV has devastated entire papaya plantations in Brazil, Taiwan and certain areas of the Hawaiian islands.

A gene from the viral capsid was introduced in the papaya genome (Tennant, 2001). The expression of this transgene inhibits replication of the virus, which is what gives the GM plants its resistant character.

After this papaya was marketed, it was discovered that the protein coded by the transgene presented a sequence homology of 6 amino acids with an allergen listed in the databases (Kleter, 2002). In this case, it concerned *Asc s 1*, a major allergen in *Ascaris nematodes (A.suum, A.lumbricoides)* (McGibbon, 1990). Research on common sequences of 6 or 7 amino acids with allergens is however not very discriminating; it very often results in "false positives". It would therefore be necessary to study proteins presenting homologies in greater detail, so as to determine if there really is a potential allergenicity.

### ■ Authorisation to market the SunUp papaya

Authorisation to market the SunUp papaya for human consumption was given in the United States in 1997. The EPA had decided not to fix the tolerance threshold for the presence of the protein coded by the transgene in the GM papaya. Already considerable exposure of the population to viral proteins through food (non-GM papayas can become contaminated by the PRSV), as well as the absence of toxicity of these proteins, led to the reasonable assumption that no adverse effect would appear after eating this GMP (EPA, 1997).

Believing that cultivation of this papaya did not present any particular risk (possible pathogenic qualities, undesirable effects on the environment in particular), the USDA-APHIS<sup>(44)</sup> had decided not to consider the SunUp papaya as subject to regulation 7 CFR part 340<sup>(45)</sup> any longer, and to grant it "non-regulated" status (USDA-APHIS, 1996).

(43) RingSpot Virus.

(44) United States Department of Agriculture – Animal and Plant Health Inspection Service.

(45) "Introduction of organisms and products altered or produced through genetic engineering which are plant pests or which there is a reason to believe are plant pests", regulating, amongst other things, the importation, movements and dissemination of these GM products in the environment.

Au moment de la mise sur le marché de la papaye, l'allergénicité potentielle de la protéine codée par le transgène ne semble pas avoir été évoquée (FDA, 1997).

#### ■ La difficulté d'évaluer le risque allergique

Dans des documents ultérieurs à l'autorisation, il est toutefois mentionné que la protéine est rapidement détruite dans les modèles de digestion *in vitro* : après 10 secondes, elle ne serait plus détectable par immunotransfert (communication personnelle de Manshardt R, Université de Hawaï). Elle est également thermolabile (Agbios, 2001). Aucune homologie de séquence avec un allergène connu n'a pu être mise en évidence au moment où la recherche a été effectuée (Agbios, 2001). A titre indicatif, l'entrée de *Asc s 1* dans la base de données *Swiss-prot* date de novembre 1997, mais rien n'indique que cette base ait été utilisée pour l'évaluation des risques.

Par ailleurs un doute existe quant au réel caractère allergène de la protéine *Asc s 1*, avec laquelle une homologie a été constatée. En effet, une étude montre, contre toute attente, que cette protéine seule (isolée du reste du fluide cœlomique du parasite) n'a pas induit la production d'IgE ou d'interleukine-4 chez un modèle animal (souris) (Paterson, 2002). L'homologie de séquence n'a donc plus grande signification si l'allergénicité de la protéine de nématode n'est pas avérée.

Enfin, nous n'avons pas de données sur la prévalence de l'allergie à *Ascaris spp.* Les seuls chiffres dont nous disposons concernent la prévalence de la maladie parasitaire<sup>(46)</sup>, qui n'est que rarement accompagnée de réactions allergiques. Lorsque celles-ci se produisent elles restent très localisées.

Aucun cas d'allergie à cette papaye n'aurait été recensé après plusieurs années de consommation. Cependant aucun système de surveillance n'a été mis en place, ce qui limite la portée de cet argument.

#### ■ Conclusion

Dans l'état actuel des connaissances, le risque d'allergie lié à cette papaye n'a pas été démontré et est vraisemblablement faible. Cet exemple souligne l'importance et illustre la complexité de la question de l'évaluation du risque allergique avant la mise sur le marché des PGM.

Cependant, il n'est pas impossible que d'autres cas de ce type se produisent, étant donné que la plupart des allergènes ne sont pas encore répertoriés, et que les connaissances évoluent en permanence dans ce domaine (p. 30-31).

(46) Parasitose cosmopolite d'origine alimentaire, endémique dans les pays chauds et humides du tiers monde ; la prévalence peut atteindre 70% des enfants ; prévalence mondiale hors Europe: 22% en 1987 ; prévalence en pays tempérés: 1% (Duriez T, 2002).

*At the time that the papaya was placed on the market, the potential allergenicity of the protein coded by the transgene did not seem to have been identified (FDA, 1997).*

#### ■ The difficulty in assessing the allergic risk

*However, documents subsequent to the authorisation reported that the protein is rapidly destroyed in models of in vitro artificial digestion: after 10 seconds, it is no longer detectable by immunotransfer (a personal letter from Manshardt R, University of Hawaii). The protein is also thermolabile (Agbios, 2001). No sequence homology with a known allergen could be identified at the time that research was underway (Agbios, 2001). For information, the entry of *Asc s 1* into the Swiss-prot database dates back to November 1997, but nothing indicates that this base was used for risk assessment.*

*Furthermore, there was doubt over the real allergenic character of the *Asc s 1* protein with which a homology was reported, as one study showed that, contrary to expectations, this protein alone (isolated from the rest of the cœlomonic fluid of the parasite) did not induce the production of IgE or interleukine-4 in an animal model (mice) (Paterson, 2002). The sequence homology is thus no longer of any great significance if the allergenicity of the nematode protein is not proven.*

*Lastly, we do not have any data on the prevalence of the allergy to *Ascaris spp.* The only figures available concern the prevalence of parasitosis<sup>(46)</sup>, which is only rarely accompanied by allergic reactions. When the latter occur, they remain very localised.*

*No cases of allergy to this papaya were reported after several years of consumption. However, no monitoring system was set up, which limits the scope of this argument.*

#### ■ Conclusion

*In the current state of knowledge, the allergy risk associated with this papaya has not been proven and seems small in all likelihood. This example stresses the importance and illustrates the complexity of the issue of assessing the allergic risk before marketing GMPs.*

*However, it is not impossible that other cases of this type will arise, given that most allergens have still not been listed, and that knowledge is constantly growing in this field. (p. 30-31).*

(46) Cosmopolitan parasitosis of food origin, endemic in hot and humid countries in the Third World; prevalence may reach 70% in children; prevalence worldwide excluding Europe: 22% in 1987; prevalence in temperate countries: 1% (Duriez T, 2002).



## LE PETIT POIS RÉSISTANT À LA BRUCHE (2005)

### ■ Développement d'un pois résistant à la bruche

La bruche (*Bruchus pisorum*) est un insecte parasite des légumineuses, dont fait partie le petit pois (*Pisum sativum*). Sa présence peut conduire à des diminutions des rendements de l'ordre de 30 %. Des recherches menées en Australie par le CSIRO Plant Industry ont abouti à l'obtention d'un petit pois GM dans lequel un gène issu du haricot (*Phaseolus vulgaris*) et codant un inhibiteur d' $\alpha$ -amylase ( $\alpha$ AI) a été transféré (Schroeder HE, 1995). Cette protéine inhibe l'activité d'une amylase nécessaire à la digestion des polysaccharides par les parasites, qui ne peuvent donc plus se nourrir et meurent avant d'avoir pu endommager les graines. La présence de cet inhibiteur d' $\alpha$ -amylase, à hauteur de 4 % du total des protéines (Schroeder HE, 1995), confère à ce petit pois GM une résistance au parasite (99,5 % de plants résistants lors des essais en champ (Morton RL, 2000)).

### ■ Étude *in vivo* des effets immunogènes chez la souris BALB/c

L' $\alpha$ AI ne présente pas de risque toxicologique pour la santé animale ou humaine (Pusztai A, 1999). Il n'a pas de caractère allergène connu, ni de séquence homologue avec des allergènes connus. Sa nature même (protéine de graine riche en acides aminés soufrés (Franco OL, 2002)) pourrait cependant le rapprocher, d'un point de vue biochimique, de certains allergènes de la superfamille des prolamines (Breiteneder H, 2005). Dans le cadre de l'évaluation des risques effectuée par le CSIRO, l'immunogénicité de l' $\alpha$ AI synthétisé par le petit pois GM a été étudiée chez la souris BALB/c (Prescott VA, 2005).

Les souris nourries avec des haricots ou des petits pois non GM n'ont développé aucune réaction immunitaire particulière. En revanche le régime à base de petit pois GM a provoqué à la fois une hypersensibilité retardée<sup>(47)</sup>, une inflammation des voies respiratoires<sup>(48)</sup>, une production de cytokines inflammatoires par les lymphocytes des ganglions péribronchiques, et une augmentation du taux d'IgG1 dans le sang (mais pas du taux d'IgE).

L'expérience a été répétée avec une farine de petits pois GM ébouillantés pendant 20 minutes, et une inflammation respiratoire a pu être constatée : l'immunogénicité de l' $\alpha$ AI du petit pois n'a pas été altérée par la chaleur.

L'hypersensibilité retardée a également été étudiée chez des souris nourries avec une farine de pois chiche GM portant le même transgène codant l' $\alpha$ AI du haricot.

(47) Réaction cutanée observée 24h après injection d' $\alpha$ AI.

(48) Hyperréactivité bronchique, production de mucus et d'éosinophiles après introduction d' $\alpha$ AI dans la trachée.

## PEA RESISTANT TO PEA WEEVIL (2005)

### ■ Development of a pea resistant to pea weevil

The pea weevil (*Bruchus pisorum*) is a parasite found in legumes, including the pea (*Pisum sativum*). Its presence may lead to reductions in yields of around 30%. Research conducted in Australia by the CSIRO Plant Industry has resulted in the breeding of a GM pea in which a gene from the bean (*Phaseolus vulgaris*), coding an  $\alpha$ -amylase inhibitor ( $\alpha$ AI), was transferred (Schroeder HE, 1995). This protein inhibits the activity of an amylase required for digestion of polysaccharides by parasites, which can therefore no longer feed and die before having a chance to damage the seeds. The presence of this  $\alpha$ -amylase inhibitor, making up to 4% of total proteins (Schroeder HE, 1995), makes this GM pea resistant to the parasite (99.5% of plants resistant during the field tests (Morton RL, 2000)).

### ■ Study *in vivo* of the immunogenic effects in BALB/c mice

The  $\alpha$ AI does not pose a toxicological risk for animal or human health (Pusztai A, 1999). It has no known allergenic character, or homologous sequence with any known allergens. Its very nature (seed protein rich in sulphur amino acids (Franco OL, 2002)) may nevertheless relate it, from a biochemical point of view, to certain allergens of the prolamine superfamily (Breiteneder H, 2005). As part of the risk assessment performed by the CSIRO, the immunogenicity of  $\alpha$ AI synthesised by the GM pea was studied in BALB/c mice (Prescott VA, 2005).

The mice fed with beans or non GM peas developed no particular immune reaction. But the GM pea based diet provoked a delayed hypersensitivity<sup>(47)</sup>, an inflammation of respiratory tracts<sup>(48)</sup>, a production of inflammatory cytokines by lymphocytes of the peribronchial ganglions and an increase in the level of IgG1 in the blood (but not the IgE level).

The experiment was repeated with a flour of GM peas blanched for 20 minutes, and respiratory inflammation was observed: the  $\alpha$ AI immunogenicity of the pea was not modified by heat.

Delayed hypersensitivity was also studied in mice fed with a GM chickpea flour containing the same transgene coding the bean  $\alpha$ AI.

(47) Skin reaction observed 24 hours after the  $\alpha$ AI injection.

(48) Bronchial hyperreactivity, production of mucus and eosinophiles after introducing the  $\alpha$ AI in the trachea.

Aucune réaction n'a été constatée : les effets immunogènes observés précédemment sont donc spécifiques de l' $\alpha$ AI du petit pois GM.

D'autres expériences non détaillées ici ont montré que l' $\alpha$ AI du petit pois GM avait un effet immunomodulateur (augmentation du taux d'IgG1) vis-à-vis d'autres antigènes alimentaires (ovalbumine et autres protéines du petit pois).

#### ■ Étude de la structure moléculaire de l' $\alpha$ AI

L'étude des protéines purifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF montre des différences de masse moléculaire entre la structure de l' $\alpha$ AI naturellement synthétisé dans le haricot, et la structure de l' $\alpha$ AI synthétisé dans le petit pois GM : la protéine extraite du petit pois est glycosylée différemment de celle produite par le haricot.

Les structures glucidiques sont directement responsables des nouvelles propriétés immunogènes de la protéine. Ce phénomène a déjà été observé (p. 19). Les cellules de petit pois ne sont probablement pas dotées des mêmes enzymes de glycosylation que celles du haricot.

#### ■ Discussion

Du fait de l'existence de modifications post-traductionnelles qui diffèrent selon les organismes, il est possible qu'une protéine codée par un transgène et exprimée par une plante hôte puisse avoir une structure différente de celle de la protéine native. Cependant ces modifications (si elles existent) n'ont pas toujours les mêmes conséquences que dans le cas du petit pois, puisque Prescott et al. (2005) ont constaté qu'avec un pois chiche porteur du même transgène, aucun effet immunogène n'était observé (Moneret-Vautrin DA, 2006).

Bien que le petit pois en question ne montre pas de caractère strictement allergène, le développement de cette variété GM a été stoppé. On peut considérer que ce projet a été conduit selon les règles, voire au-delà. En effet, l'étude immunologique qui a été menée n'est pas strictement requise dans tous les cas par les agences d'évaluation des risques alimentaires. Cette recherche, qui montre qu'une protéine codée par un transgène peut subir des modifications post-traductionnelles différentes selon la plante hôte, souligne la pertinence d'une évaluation au cas par cas.

*No reaction was observed: the immunogenic effects observed previously are therefore specific to the  $\alpha$ AI of the GM pea.*

*Other experiments not described here have demonstrated that the  $\alpha$ AI of the GM pea had an immunomodulator effect (increase in the level of IgG1) with regard to other food antigens (ovalbumin and other pea proteins).*

#### ■ Study of the molecular structure of $\alpha$ AI

*The study of purified proteins by MALDI-TOF mass spectrometry shows differences in the molecular mass between the structure of the naturally synthesised  $\alpha$ AI in the bean, and the structure of the synthesised  $\alpha$ AI in the GM pea: the protein extracted from the pea is glycosylated differently from the one produced by the bean.*

*Carbohydrate structures are directly responsible for the new immunogenic properties of the protein. This phenomenon has already been observed (p. 19). The pea cells probably do not have the same glycosylation enzymes as those in the bean.*

#### ■ Discussion

*Due to the existence of post-translational modifications which differ from organism to organism, it is possible that a protein coded by a transgene and expressed by a host plant can have a different structure to that of the native protein. However, these modifications (if they exist) do not always have the same consequences as in the case of the pea, since Prescott et al. (2005) noted that, with a chickpea carrying the same transgene, no immunogenic effect was observed (Moneret-Vautrin DA, 2006).*

*Although the pea in question shows no strictly allergenic character, the development of this GM variety has been stopped. It may be considered that this project was carried out according to the rules, and even beyond that, since the immunological study conducted is not strictly required in every case by the food risk assessment agencies. This research, which shows that a protein coded by a transgene may undergo different post-translational modifications depending on the host plant, highlights the relevance of case-by-case assessment.*



## Y-A-T-IL DES PGM À SURVEILLER PLUS PARTICULIÈREMENT ?

L'évaluation de tous les effets non intentionnels de la transgénèse sur l'allergénicité du matériel hôte n'a pas été considérée, par les experts de la consultation FAO/WHO de 2000 (FAO/WHO, 2000), comme étant nécessaire, sauf si l'on peut prédire que la concentration de la protéine dans le produit hôte sera modifiée de façon significative.

Pour les PGM « de première génération », modifiées essentiellement pour améliorer leurs caractéristiques agronomiques, les modifications du profil protéique sont *a priori* mineures : chez le soja, l'introduction du gène de résistance au glyphosate n'a pas entraîné de modifications visibles, tant qualitatives que quantitatives, dans la composition en allergènes « naturels » de différentes variétés commerciales (Burks, 1995 ; Sten, 2004), même si la technique utilisée était relativement peu discriminante (Wal, 1998a).

Lorsqu'il s'agit de PGM « de deuxième génération », modifiées pour améliorer leur valeur nutritionnelle, des modifications non négligeables au sein de la fraction protéique de la plante sont prévisibles, surtout si l'on cherche précisément à faire varier la composition en protéines et en acides aminés. L'étude de l'allergénicité de l'aliment entier, et non plus seulement de la (des) protéine(s) codée(s) par le(s) transgène(s), est dans ce cas particulièrement justifiée.

Il faudra aussi porter particulièrement attention aux aliments à base de graines GM surexprimant des enzymes, car de nombreux allergènes présentent une activité enzymatique (p. 21). Compte tenu du fait qu'une très petite quantité de protéines peut être allergisante, les huiles issues de PGM et provenant de graines surexprimant certains acides gras devraient être particulièrement surveillées (Moneret-Vautrin, 2001b). Le potentiel allergisant des huiles a en effet été démontré, et ce malgré les quantités très faibles de protéines qui s'y trouvent (Frémont, 2002).

Enfin, l'existence de réactions croisées entre les pollens et d'autres parties des plantes qui sont consommées (graines, feuilles, racines...) fait craindre un risque de sensibilisation aérienne par le pollen, qui pourrait induire par la suite une allergie respiratoire et/ou alimentaire. L'étude du potentiel allergénique des pollens serait donc également à prendre en compte dans l'évaluation de l'allergénicité d'une plante (GM ou non), à plus forte raison lorsqu'il existe des cas rapportés de pollinose dans la littérature.

## ARE THERE GMPS THAT REQUIRE PARTICULAR MONITORING?

*The FAO/WHO expert committee (FAO/WHO, 2000) considered the assessment of all the unintentional effects of transgenesis on the allergenicity of a host material unnecessary, except where it could be predicted that the concentration of a protein in the host product would be significantly modified.*

*For "first generation" GMPS, modified essentially to improve their agronomical characteristics, the proteic profile modifications are a priori minor: in soybean, the introduction of a glyphosate-resistant gene didn't bring about visible qualitative or quantitative modifications in the composition of "natural" allergens in different varieties on sale (Burks, 1995; Sten, 2004), even if the technique used was relatively undiscriminating (Wal, 1998a).*

*As for "second generation" GMPS, modified to improve their nutritional value, significant changes in the plant's proteic fraction are likely, especially if we are looking precisely to vary the protein and amino acid composition. Research on the allergenicity of the entire food, and not just on the protein(s) coded by the transgene(s) is especially justified in this case.*

*Particular attention should also be paid to food derived from GM seeds over-expressing enzymes, as numerous allergens present an enzymatic activity (p. 21). In view of the fact that a very small number of proteins can be allergenic, oils derived from GMPS and seeds that over-express certain fatty acids should be put under particular surveillance (Moneret-Vautrin, 2001b). The allergenic potential of oils has in fact been proved, despite the very low quantities of proteins that are found in them (Frémont, 2002).*

*Lastly, the existence of cross-reactions between pollens and other parts of plants which are eaten (seeds, leaves, roots, etc.) means that there is a risk of air sensitization by pollen, which could subsequently induce a respiratory and/or food allergy. Research on the allergenic potential of pollens would therefore also be considered in the allergenicity assessment of a plant (GM or non-GM), all the more so since there are cases of pollinosis reported in literature.*

# ASPECTS RÉGLEMENTAIRES ET SURVEILLANCE ACCOMPAGNANT LA MISE SUR LE MARCHÉ DES OGM

## REGULATORY ASPECTS AND MONITORING ACCOMPANYING THE MARKETING OF GMOs

L'étiquetage des ingrédients allergènes et celui des OGM (donc des PGM) suivent deux approches réglementaires différentes. L'ensemble est nécessaire pour garantir un niveau de sécurité élevé aux consommateurs par rapport au risque allergique potentiel lié aux OGM.

*The labelling of allergenic ingredients and of GMOs (and thus of GMPs) complies with two different regulatory approaches. Both are necessary to ensure consumers a high level of safety regarding the potential allergic risk of GMOs.*

### ÉTIQUETAGE DES INGRÉDIENTS ALLERGÈNES

La **directive 2003/89/CE** du 10 novembre 2003<sup>(49)</sup> a modifié la directive 2000/13/CE en ce qui concerne l'indication des ingrédients présents dans les denrées alimentaires.

Le régime de l'ingrédient composé a été redéfini : le détail de la composition de celui-ci, auparavant obligatoire seulement lorsque l'ingrédient composé représentait plus de 25 % du produit fini, est désormais obligatoire quel que soit son pourcentage d'intervention (sauf exceptions<sup>(50)</sup>).

Une liste de 12 allergènes a par ailleurs été établie (Annexe III bis de la directive 2003/89/CE) : *céréales contenant du gluten, crustacés, œufs, poissons, arachides, soja, lait, fruits à coques, céleri, moutarde, graines de sésame, sulfites (>10 mg/kg)*. Ces ingrédients, ainsi que leurs dérivés, doivent figurer sur l'étiquetage quelle que soit la forme sous laquelle ils sont introduits dans les produits alimentaires. La liste est systématiquement réexaminée et, le cas échéant, remise à jour (ajout ou suppression d'ingrédients) sur la base des connaissances scientifiques les plus récentes.

Certains ingrédients dérivés de substances allergènes, évalués par l'EFSA comme étant peu susceptibles de déclencher des réactions allergiques ou des intolérances, sont provisoirement exclus de l'Annexe III bis et donc dispensés d'étiquetage (directive 2005/26/CE du 21 mars 2005<sup>(51)</sup>). Des études complémentaires doivent cependant être menées pour confirmer la très faible allergénicité de ces ingrédients. Une décision définitive doit régler leur situation avant le 25 novembre 2007.

### LABELLING ALLERGENS

**Directive 2003/89/EC** of 10 November 2003<sup>(49)</sup> amends Directive 2000/13/EC as regards indication of the ingredients present in foodstuffs.

*The nature of the compound ingredient has been redefined: the detail of its composition, previously only obligatory when the compound ingredient represented more than 25% of the final product, is now obligatory regardless of its representation (save for exceptions<sup>(50)</sup>).*

Furthermore, a list of 12 allergens has been established (Annex IIIa of Directive 2003/89/EC): *cereals containing gluten, crustaceans, eggs, fish, peanuts, soybeans, milk, nuts, celery, mustard, sesame seeds and sulphites (>10mg/kg)*. These ingredients, and products thereof, must feature on the label, regardless of the form in which they are introduced into the food products. The list is systematically reexamined and, where necessary, updated (addition or removal of ingredients) on the basis of the most recent scientific knowledge.

*Certain ingredients derived from allergenic substances, assessed by the EFSA as being unlikely to trigger allergic reactions or intolerances, are provisionally excluded from Annex IIIa and thus exempt from labelling (Directive 2005/26/EC of 21 March 2005<sup>(51)</sup>). Additional research must, however, be conducted to confirm the very low allergenicity of these ingredients. A definitive decision is due to settle their situation before 25 November 2007.*

(49) Journal Officiel des Communautés européennes n° L 308 du 25/11/2003 p. 0015 – 0018.

(50) Se reporter au texte officiel pour ces précisions.

(51) Journal Officiel des Communautés européennes n° L 75 du 22/03/2005 p. 0033 – 0034.

(49) Official Journal of the European Communities no. L 308 of 25/11/2003 p. 0015 – 0018.

(50) Consult the official text for these exceptions.

(51) Official Journal of the European Communities no. L 75 of 22/03/2005 p. 0033 – 0034.

Cette disposition devrait permettre à la fois :

- un étiquetage plus adapté à la réalité des risques encourus par le consommateur allergique : celui-ci ne se privera plus de certains produits inutilement ;
- un étiquetage moins « pénalisant » pour certains industriels, qui ne souhaitent pas voir des ingrédients très purifiés étiquetés en tant qu'allergènes.

→ Les principaux allergènes seront donc désormais étiquetés, que les ingrédients utilisés soient issus d'OGM ou non. Le risque d'accident allergique est diminué par ces nouvelles règles d'étiquetage.

## ÉTIQUETAGE ET TRAÇABILITÉ DES OGM

### Dans l'Union européenne

En Europe, les OGM (incluant les PGM) font désormais l'objet d'une traçabilité et d'un étiquetage rigoureux. Ces mesures pourront faciliter le retrait de produits au cas où seraient constatés des cas d'allergie, et plus généralement, des effets sur la santé humaine, la santé animale ou l'environnement.

La **directive 2001/18/CE**<sup>(52)</sup> du 12 mars 2001, relative à la dissémination d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement, spécifie en Annexe IV les exigences en matière d'étiquetage d'un produit contenant des OGM. L'étiquetage doit être proposé sur une étiquette ou dans un document accompagnant le produit. L'information doit inclure, au moins sous une forme résumée, le nom commercial du produit, la mention « Ce produit contient des Organismes Génétiquement Modifiés », ainsi que les nom et adresse complète de la personne établie sur le territoire de la communauté qui est responsable de la mise sur le marché (fabricant, importateur ou distributeur). L'étiquetage doit enfin indiquer comment accéder aux informations dans la partie du registre qui est accessible au public.

Le **règlement 1829/2003/CE**<sup>(53)</sup> du 22 septembre 2003 fixe des procédures communautaires pour l'autorisation et la surveillance des denrées alimentaires GM et des aliments GM destinés aux animaux, ainsi que des dispositions concernant leur étiquetage. L'objectif est de garantir l'information du consommateur, la transparence et la loyauté des transactions commerciales.

(52) Journal Officiel des Communautés européennes n° L 106 du 17/04/2001 p. 0001 – 0039.

(53) Journal Officiel des Communautés européennes n° L 268 du 18/10/2003 p. 0001 – 0023.

*This provision should allow, at the same time, for:*

- *labelling that is more adapted to the reality of risks taken by allergic consumers: who should no longer need to deprive themselves of certain products for no reason;*
- *less "penalising" labelling for certain manufacturers who do not want very purified ingredients to be labelled as allergenic.*

*→ The main allergens will thus be labelled from now on, whether the ingredients used come from GMOs or not. These new labelling rules reduce the allergic accident risk.*

## LABELLING AND TRACEABILITY OF GMOs

### In the European Union

*In Europe, GMOs (including GMPs) are now subjected to rigorous labelling and traceability. These measures may make it easier to withdraw products in the event that cases of allergy and, more generally, effects on human health, animal health or the environment are noted.*

*Directive 2001/18/EC*<sup>(52)</sup> of 12 March 2001, on the release into the environment of genetically modified organisms, specifies in Annex IV the requirements for labelling a product containing a GMO. The labelling must be presented on a label or in a document that comes with the product. The information must include, at least in summary form, the trade name of the product, the words "This product contains Genetically Modified Organisms" and the name and address of the person in the Community who is responsible for marketing the product (manufacturer, importer or distributor). Lastly, the labelling must indicate how to get hold of information in the part of the register that is accessible to the public.

*Regulation 1829/2003/EC*<sup>(53)</sup> of 22 September 2003 fixes the Community procedures for authorising and monitoring GM foodstuffs and GM feed for animal consumption, as well as the provisions regarding their labelling. The objective is to guarantee information for consumers, and the transparency and loyalty of commercial transactions.

*Labelling applies to foodstuffs (Art.12):*

(52) Official Journal of the European Communities no. L 106 of 17/04/2001 p. 0001 – 0039.

(53) Official Journal of the European Communities no. L 268 of 18/10/2003 p. 0001 – 0023.

**L'étiquetage** s'applique aux denrées (Art.12) :

- qui consistent en OGM (ex : maïs en boîte) ;
- qui contiennent des OGM (ex : pop corn) ;
- qui sont produites à partir d'OGM (ex : sirop de glucose de maïs) ;
- qui contiennent des ingrédients produits à partir d'OGM (ex : confiserie contenant du sirop de glucose de maïs).

La présence fortuite ou techniquement inévitable d'OGM dans une proportion inférieure à 0,9 % de chaque ingrédient de la denrée alimentaire n'est pas soumise à l'étiquetage. Le caractère fortuit ou techniquement inévitable doit être démontré par les exploitants aux autorités compétentes (prise de mesures adéquates pour éviter la présence d'OGM). Le seuil de 0,9 % peut être abaissé pour certaines denrées par le moyen d'une procédure spécifique<sup>(54)</sup>.

Remarque : les mesures transitoires, applicables dans les trois ans suivant la date d'application de ce règlement, considèrent qu'une présence fortuite de matériel GM inférieure à 0,5 % dans les produits n'est pas une infraction, à condition que l'OGM ait obtenu un avis favorable du ou des comités scientifiques de la Communauté ou de l'EFSA avant la date d'application du règlement. Par ailleurs, la demande d'autorisation ne doit pas avoir été rejetée, et des méthodes de détection de l'OGM doivent être accessibles au public.

Lorsque la denrée contient plusieurs ingrédients, la mention « *génétiquement modifié* » ou « *produit à partir de [nom de l'organisme] génétiquement modifié* » doit figurer entre parenthèses, immédiatement après le nom de l'ingrédient (Art.13). De même pour les ingrédients désignés par un nom de catégorie. En l'absence d'une liste d'ingrédients, la mention « *GM* » ou « *produit à partir de [...] GM* » doit apparaître clairement sur l'étiquetage.

Ces mentions peuvent également figurer dans une note au bas de la liste d'ingrédients, dans une police de caractère ayant au moins la même taille que celle de la liste. Lorsque la denrée n'est pas préemballée, l'information requise doit être affichée sur le présentoir ou à proximité de la denrée, ou sur le matériau d'emballage.

L'étiquetage doit aussi mentionner la composition, la valeur nutritive ou les effets nutritionnels, l'usage auquel l'aliment est destiné, les implications pour la santé de certaines populations, lorsque ceux-ci diffèrent du produit conventionnel de référence. Il doit préciser toute caractéristique pouvant susciter des préoccupations d'ordre éthique ou religieux.

En l'absence de produit conventionnel de référence, l'étiquetage doit préciser les informations adéquates sur la nature et les caractéristiques de la denrée alimentaire issue d'OGM.

- *consisting of GMOs (e.g.: tinned corn),*
- *containing GMOs (e.g.: pop corn),*
- *produced from GMOs (e.g.: corn syrup)*
- *containing ingredients produced from GMOs (e.g.: sweets containing corn syrup).*

*The adventitious or technically inevitable presence of a GMO in a proportion lower than 0.9% of each ingredient in a foodstuff does not require labelling. An adventitious or technically inevitable character must be proven by farmers to the competent authorities (taking appropriate measures to prevent the presence of GMOs). The threshold of 0.9% may be lowered for certain foodstuffs by a specific procedure<sup>(54)</sup>.*

*Note: the transitory measures, applicable for the three years following the date of application of this regulation, consider that an adventitious presence of GM material lower than 0.5% in products is not an infraction, provided that the GMO has obtained a favourable opinion from one or more scientific committees of the Community or the EFSA before the date of application of the regulation. Moreover, the authorisation request must not have been rejected and the methods of detecting the GMO must be accessible to the public.*

*When the food contains several ingredients, the words "genetically modified" or "produced from genetically modified [name of the ingredient]" must feature between brackets, immediately following the name of the ingredient (Art.13). The same goes for ingredients designated by a name of category. If there is no list of ingredients, the words "GM" or "produced from GM [...]" must clearly appear on the labelling.*

*These words may also appear in a note at the bottom of the list of ingredients, in a font of at least the same size as the one used in the list. When the food is not pre-packaged, the required information must be given on the food display or immediately next to it, or on the packaging material.*

*When the food differs from its conventional counterpart, the labelling must also mention the composition, nutritional value or nutritional effects, the intended use of the food and implications for the health of certain sections of the population. It must specify any characteristics which may give rise to ethical or religious concerns.*

*If there is no conventional counterpart, the labelling must specify appropriate information on the nature and characteristics of the OGM-based food concerned.*

*Feed made from GM plants for animal consumption*

(54) Cf. articles 5 et 7 de la Décision 1999/468/CE.

(54) Cf. articles 5 and 7 of Decision 1999/468/EC.



Les aliments issus de plantes GM et destinés aux animaux sont également soumis à autorisation. Les exigences sont, à quelques détails près, les mêmes que pour les denrées alimentaires. L'expérience montre en effet qu'il est difficile de garantir l'imperméabilité des filières pour l'alimentation animale et l'alimentation humaine : en ayant les mêmes niveaux d'exigence pour les deux filières, les risques sont moindres en cas de mélange accidentel.

Il est possible d'obtenir une autorisation seulement pour l'alimentation humaine (Art. 4) ou seulement pour l'alimentation animale (Art. 16). Cependant, dans la majorité des cas, les produits sont susceptibles d'être utilisés à la fois comme denrées alimentaires et comme aliments pour animaux. Une demande d'autorisation unique est alors déposée. Elle donne lieu à un avis unique de l'EFSA et à une décision unique de la Communauté (Art.27).

Le **règlement 641/2004/CE**<sup>(55)</sup> du 6 avril 2004 fixe des modalités d'application du règlement 1829/2003/CE. Lorsque la demande d'autorisation est limitée à l'alimentation humaine ou à l'alimentation animale, elle doit comporter une justification vérifiable expliquant pourquoi l'autorisation ne doit pas couvrir les deux utilisations (Art.2).

Le **règlement 1830/2003/CE**<sup>(56)</sup> du 22 septembre 2003 modifie la directive 2001/18/CE. Il concerne la **traçabilité et l'étiquetage** des OGM et la traçabilité des produits destinés à l'alimentation humaine ou animale produits à partir d'OGM.

Au premier stade de la mise sur le marché, y compris en vrac, d'un *produit contenant des OGM*, les opérateurs doivent transmettre par écrit à l'opérateur recevant le produit (Art.4) :

- l'indication que le produit contient des OGM ;
- le ou les identifiants uniques attribués à ces OGM (Cf. règlement 65/2004/CE ci-après).

À tous les stades ultérieurs de mise sur le marché de ce produit, ces informations doivent être transmises par écrit aux opérateurs recevant le produit.

Les opérateurs disposent de systèmes et de procédures normalisés leur permettant de conserver les informations et d'identifier, pendant une période de cinq ans après chaque transaction, l'opérateur dont ils ont obtenu le produit, et celui à la disposition duquel ils l'ont mis.

Ces mesures de traçabilité ne s'appliquent pas aux traces fortuites d'OGM présentes dans les produits à des seuils inférieurs à ceux définis précédemment.

*is also subject to authorisation. With the exception of a few details, the requirements are the same as for foodstuffs, since experience shows that it is difficult to ensure the impermeability of the sectors for feed and food: with the same levels of requirement for both sectors, the risks are lower in the event of accidental mixing.*

*It is possible to obtain authorisation for food only (Art.4) or for feed only (Art.16). However, in most cases, the products are likely to be used for both food and feed. A request for a single authorisation is thus submitted. This gives rise to a single opinion from the EFSA and a single decision from the Community (Art.27).*

*Regulation 641/2004/EC*<sup>(55)</sup> of 6 April 2004 fixes the modalities for the implementation of Regulation 1829/2003/EC. When the authorisation request is limited to food or feed, it must contain a veritable justification explaining why the authorisation should not cover both these uses (Art.2).

*Regulation 1830/2003/EC*<sup>(56)</sup> of 22 September 2003 amends Directive 2001/18/EC concerning the **traceability and labelling** of GMOs and the traceability of food and feed products produced from GMOs.

*At the first stage of the placing on the market of a product containing GMOs, including bulk quantities, operators must transmit the following information in writing to the operator receiving the product (Art.4):*

- the indication that it contains GMOs;
- the unique identifier(s) assigned to those GMOs (Cf. regulation 65/2004/EC below).

*At all subsequent stages of the placing on the market of this product, this information must be transmitted to the operators receiving the product in writing.*

*The operators shall have in place systems and standardised procedures to allow the holding of information and the identification, for a period of five years after each transaction, of the operator by whom and the operator to whom the products have been made available.*

*These traceability measures do not apply to adventitious traces of GMO present in the products at lower thresholds than those defined previously.*

*For food and feed produced from GMOs,*

(55) Journal Officiel des Communautés européennes n° L 102 du 07/04/2004 p. 0014 – 0025.

(56) Journal Officiel des Communautés européennes n° L 268 du 18/10/2003 p. 0024 – 0028.

(55) Official Journal of the European Communities no. L 102 of 07/04/2004 p. 0014 – 0025.

(56) Official Journal of the European Communities no. L 268 of 18/10/2003 p. 0024 – 0028.



Dans le cas des *denrées alimentaires et des aliments pour animaux produits à partir d'OGM*, les informations transmises par écrit sont (Art.5) :

- une indication de chaque ingrédient alimentaire produit à partir d'OGM ;
- une indication de chaque matière première ou additif pour les aliments pour animaux produits à partir d'OGM ;
- une indication que le produit est élaboré à partir d'OGM pour les produits n'ayant pas de liste d'ingrédients.

Les traces fortuites d'OGM présentes dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux produits à partir d'OGM dans une proportion n'excédant pas les seuils établis pour ces OGM ne sont pas soumises à de telles mesures de traçabilité.

Lorsque la législation communautaire prévoit des systèmes d'identification particuliers (ex : numérotation par lot pour les produits préemballés), les opérateurs ne sont pas tenus de conserver les informations spécifiées précédemment, à condition que celles-ci figurent clairement sur l'emballage avec le numéro de lot. Ces informations doivent également être conservées pendant cinq ans. Ce type de dérogation ne peut cependant pas s'appliquer au premier stade de la mise sur le marché d'un produit, ni à la production proprement dite ou au reconditionnement d'un produit (Art.6).

Le **règlement 65/2004/CE<sup>(57)</sup>** du 14 janvier 2004 a instauré un système pour l'élaboration et l'**attribution d'identificateurs uniques pour les OGM**. L'opérateur qui met sur le marché un produit contenant des OGM est tenu de mentionner l'identificateur unique qui a été attribué à chaque OGM. L'autorisation de mise sur le marché d'un OGM doit toujours spécifier cet identificateur. Celui-ci est élaboré selon un format précis, après avoir consulté la base de données BioTrack Product de l'OCDE<sup>(58)</sup> et le centre d'échange pour la prévention des risques biotechnologiques (mis en place par le protocole de Carthagène), qui ont peut-être déjà généré un identificateur pour l'OGM en question (Art.2).

Le format de l'identificateur unique est décrit en annexe du règlement. Il comprend 9 caractères alphanumériques, et se compose de 3 éléments :

- le demandeur / titulaire de l'autorisation (2 ou 3 caractères) ;
- l'événement de transformation (5 ou 6 caractères) ;
- un caractère numérique final servant à la vérification (il correspond à la somme des caractères alphanumériques de l'identificateur).

Exemple :

C	E	D	-	A	B	8	9	1	-	6
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Équivalent numérique: 3 5 4 1 2 8 9 1 6\*

\* = 3+5+4+1+2+8+9+1 = 33 et 3+3 = 6

*the information transmitted in writing are (Art.5):*

- *an indication of each of the food ingredients produced from GMOs;*
- *an indication of each of the feed materials or additives which is produced from GMOs;*
- *an indication that the product is produced from GMOs for products without a list of ingredients.*

*The adventitious traces of GMOs present in food and feed produced from GMOs in a proportion not exceeding the thresholds established for these GMOs are not subject to these traceability measures.*

*When Community legislation provides for specific identification systems (e.g.: lot numbering for pre-packaged products), operators are not obliged to hold the information specified previously, provided that this information and the lot number is clearly marked on the packaging. This information must also be held for five years. However, this type of exemption cannot apply to the first stage of placing a product on the market, nor to primary manufacture or re-packaging of a product (Art.6).*

**Regulation 65/2004/EC<sup>(57)</sup>** of 14 January 2004 installed a system for developing and assigning **unique identifiers for GMOs**. The operator who places on the market a product containing GMOs is obliged to mention the unique identifier which is accorded to each GMO. Authorisation to market a GMO must specify this identifier at all times. This is developed on the basis of a specific format, after consulting the OCDE<sup>(58)</sup> BioTrack Product database and the exchange centre for the prevention of biotechnological risks (set up by the Cartagena protocol), which have perhaps already generated an identifier for the GMO in question (Art.2).

*The format of the unique identifier is described in the annex to the Regulation. It includes 9 alphanumeric digits and consists of 3 components:*

- *the applicant/consent holder (2 or 3 digits);*
- *the transformation event (5 or 6 digits);*
- *a final numeric digit providing verification (this is the total of the identifier's alphanumeric digits).*

Example:

C	E	D	-	A	B	8	9	1	-	6
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Numerical equivalent: 3 5 4 1 2 8 9 1 6\*

\* = 3+5+4+1+2+8+9+1 = 33 et 3+3 = 6

(57) Journal Officiel des Communautés européennes n° L 10 du 16/01/2004 p. 0005 – 0010.

(58) Organisme de Coopération et de Développement Économique.

(57) Official Journal of the European Communities no. L 10 of 16/01/2004 p. 0005 – 0010.

(58) Organisation for Economic Co-operation and Development.

→ L'ensemble de ces règlements européens, établissant des mesures strictes en matière d'étiquetage et de traçabilité, permet donc d'informer les consommateurs sur les produits qu'ils achètent, et facilite le retrait éventuel de produits pouvant poser problème.

### Aux États-Unis et au Canada

À titre de comparaison, il est intéressant de se pencher sur la réglementation outre-Atlantique concernant l'étiquetage et la traçabilité des OGM.

**Aux États-Unis** (Bren, 2003), trois organismes réglementent les OGM : l'USDA<sup>(59)</sup>, l'EPA et la FDA. La FDA doit s'assurer de la sécurité sanitaire des aliments pour l'homme et les animaux.

D'après le FD&C Act<sup>(60)</sup> (FDA, 2004), les sociétés sont tenues de s'assurer que chaque produit mis sur le marché respecte les normes de sécurité établies par la loi. Ces normes sont les mêmes pour les aliments GM et les aliments conventionnels. En cas de non respect de ces normes, la FDA a la possibilité de retirer les produits du marché.

L'étiquetage n'est nécessaire que lorsque le produit alimentaire GM lui-même (et non pas le processus de transformation qui lui est appliqué) présente une différence tangible avec le produit conventionnel. La FDA considère qu'il n'existe pas d'informations selon lesquelles les aliments GM constitueraient une classe d'aliments particuliers en termes de qualité, sécurité sanitaire ou autre : rendre obligatoire l'étiquetage de la présence de matériel GM ne se justifie pas. Si toutefois des différences existaient, du point de vue de la composition nutritionnelle, de la présence d'allergènes, ou d'autres propriétés qui nécessiteraient un stockage ou un mode de cuisson inhabituels, ces différences devraient être signalées sur l'étiquetage du produit GM.

La FDA a émis des lignes directrices concernant l'étiquetage volontaire des denrées alimentaires GM et des aliments GM pour animaux (FDA, 2001a). Les industriels restent libres de signaler ou non la présence de matériel GM dans leurs produits, tant que cela n'induit pas le consommateur en erreur. Par ailleurs, la mention « GMO free »<sup>(61)</sup> présente sur certains produits est discutée : il semble difficile de pouvoir garantir qu'un aliment ne contient pas de matériel GM, dans la mesure où aucun seuil de tolérance n'a été fixé, et que des méthodes de détection fiables ne sont pas toujours disponibles (sans compter que, par définition, l'absence est impossible à prouver). La filière « Organic »<sup>(62)</sup>, dont les approvisionnements sont contrôlés et exempts de produits issus de plantes GM, devrait répondre à l'exigence « GMO free » (National Organic Program final rule ; 65 FR 80548).

(59) United States department of Agriculture.

(60) Federal Food, Drug and Cosmetic Act.

(61) Ne contient pas d'OGM.

(62) Biologique.

→ All these European regulations, establishing strict measures regarding labelling and traceability, thus allow consumers to be informed about the products that they buy, and facilitates the possible withdrawal of products which pose problems.

### In the United States and Canada

By way of comparison, it is interesting to examine the regulations across the Atlantic with regard to the labelling and traceability of GMOs.

**In the United States** (Bren, 2003), three organisations regulate GMOs: the USDA<sup>(59)</sup>, the EPA and the FDA. The FDA has to ensure the health safety of food for human and animal consumption.

According to the FD&C Act<sup>(60)</sup> (FDA, 2004), companies are obliged to ensure that each product placed on the market complies with the safety standards established by the law. These standards are the same for GM foods and conventional foods. In the event that these standards are not complied with, the FDA may withdraw products from the market.

Labelling is only necessary when the GM food product itself (and not the processing method it undergoes) presents a tangible difference with the conventional product. The FDA considers that there is no information according to which GM foods would constitute a particular food class in terms of quality, health safety or other: making the labelling of the presence of GM material obligatory unjustified. If, however, differences did exist, in terms of the nutritional composition, the presence of allergens or other properties which would require special storage or cooking methods, these differences would have to be marked on the packaging of the GM product.

The FDA has issued guidelines concerning the voluntary labelling of GM foodstuffs and GM feed (FDA, 2001a). Manufacturers are free to decide whether to indicate the presence of GM material in their products or not, as long as this does not mislead consumers. Moreover, the words "GMO free"<sup>(61)</sup> printed on certain products is debateable: it seems difficult to be able to guarantee that a food does not contain GM material, insofar as no threshold tolerance has been fixed, and that there are still no reliable detection methods available (especially since, by definition, absence is impossible to prove). The "Organic"<sup>(62)</sup> sector, for which supplies are monitored and exempt of products derived from GM plants, should meet the requirement "GMO free" (National Organic Program final rule; 65 FR 80548).

(59) United States department of Agriculture.

(60) Federal Food, Drug and Cosmetic Act.

(61) Does not contain GMOs.

(62) Biological.

**Au Canada** (Santé Canada, 2002), les VCN<sup>(63)</sup> sont réglementés par l'ACIA<sup>(64)</sup>. La réglementation est différente selon qu'il s'agit d'un VCN destiné à l'alimentation animale ou humaine : dans le premier cas, il faut se référer à la directive de Réglementation 95-03 et à la loi et aux règlements sur les aliments du bétail. Dans le second cas, il faut consulter le règlement sur les aliments nouveaux établi en vertu de la loi sur les aliments et drogues.

→ La séparation des filières alimentation animale et alimentation humaine est discutable, dans la mesure où il est encore difficile, à l'heure actuelle, de s'assurer de l'imperméabilité de ces filières l'une par rapport à l'autre. C'est pourquoi, par prudence, la réglementation européenne ne fait pas cette distinction. La réglementation en matière de traçabilité et d'étiquetage des produits GM est donc beaucoup plus stricte en Europe qu'aux États-Unis ou au Canada.

## SURVEILLANCE ÉPIDÉMIOLOGIQUE

### Le réseau National d'Allergovigilance

L'accroissement de la prévalence des allergies alimentaires et l'apparition d'allergies à de nouveaux aliments ont motivé la création d'un réseau National d'Allergovigilance en janvier 2001. Ce réseau, créé par le CICBAA<sup>(65)</sup>, a pour objectifs (Moneret-Vautrin, 2001a) :

- de référencer les cas d'anaphylaxie alimentaire létale ou pré-létale (choc anaphylactique, angio-œdème laryngé, asthme aigu grave, réaction systémique sévère) ;
- de référencer les autres cas d'anaphylaxie grave (allergies médicamenteuses, allergies graves aux hyménoptères) ;
- de réaliser des études prospectives ou rétrospectives sur certaines allergies alimentaires (ex : étude de la sensibilisation à l'arachide (Morisset, 2005)) ;
- d'évaluer le risque allergique des novel foods (dont les OGM).

En juin 2006, ce réseau recensait la participation de 362 allergologues déclarants répartis sur le territoire français, y compris les DOM-TOM. Des membres des pays européens avoisinants (Belgique, Luxembourg, Finlande, Grèce, Italie, Pologne, Portugal, Suisse), du Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie) ainsi que d'Argentine, du Chili et des États-Unis, participent aussi à la déclaration régulière de nouveaux cas grâce à une correspondance *via* courrier électronique ou télécopie (Annexe 4).

(63) Végétaux à Caractères Nouveaux.

(64) Agence Canadienne d'Inspection des Aliments.

(65) Cercle d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire.

**In Canada** (Santé Canada, 2002), the PNTs<sup>(63)</sup> are regulated by the CFIA<sup>(64)</sup>. Regulations are different depending on whether it is a PNT for animal or for human consumption: in the first case, the directive of Regulation 95-03 and the law and regulations on food from livestock must be referred to. The second case is dealt with in the regulation on new foods established in accordance with the law on foods and drugs.

→ The separation of the food and feed sectors is debateable, insofar as it is still difficult at present to ensure the impermeability of these sectors from one to the other. This is why European regulations do not make this distinction, as a precaution. Regulations with regard to the traceability and labelling of GM products is therefore considerably stricter in Europe than in the United States or Canada.

## EPIDEMIOLOGICAL MONITORING

### The French National Network: Allergovigilance

The increasing prevalence of food allergies and the emergence of allergies to new foods motivated the creation of a National Allergovigilance Network in January 2001. This network, created by the CICBAA<sup>(65)</sup>, has the following objectives (Moneret-Vautrin, 2001a):

- to reference the cases of lethal or pre-lethal anaphylactic allergy (anaphylactic shock, laryngeal angio-œdema, acute asthma, severe systematic reaction),
- to reference other cases of serious anaphylaxis (medicinal allergies, serious allergies to Hymenoptera),
- to conduct prospective or retrospective research on certain food allergies (e.g.: studying sensitization to peanuts (Morisset, 2005)),
- to assess the allergic risks of novel foods (including GMOs).

In June 2006, this network compiled a register of 362 allergists throughout French territory, including French overseas départements and territories. Members from neighbouring European countries (Belgium, Luxembourg, Finland, Greece, Italy, Poland, Portugal, Switzerland), North Africa (Algeria, Morocco and Tunisia) as well as Argentina, Chile and the United States also take part in regularly declaring new cases through email or fax (Annex 4).

(63) Plants with Novel Traits.

(64) Canadian Food Inspection Agency.

(65) Cercle d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire (Centre for Clinical and Biological Investigations in Food Allergology).

Les cas déclarés répondent à deux conditions :

- information précise de l'accident ayant entraîné la consultation chez l'allergologue, avec description clinique détaillée ;
- détails cliniques de la réaction allergique et traitement, permettant de juger la sévérité du diagnostic.

Pour être inclus, le cas doit avoir nécessité une injection d'adrénaline ou le recours à une unité de réanimation ou une hospitalisation.

Chaque cas fait l'objet d'une validation par les coordinateurs médicaux du réseau. Un complément d'enquête auprès de l'allergologue déclarant est effectué lorsque cela s'avère nécessaire. Les cas sont diffusés à l'ensemble des membres du réseau par courrier électronique dans un délai de sept jours, ainsi que dans la revue bimestrielle *Alim'Inter*.

→ L'existence de ce réseau pourra permettre une certaine réactivité face à l'émergence éventuelle de nouvelles allergies, qu'elles soient dues ou non aux OGM.

### Mise en place de sérothèques

La mise en place de sérothèques, c'est-à-dire de banques de sérums de patients allergiques, doit permettre de recueillir de précieuses informations sur la nature et la prévalence des sensibilisations existant au sein de la population. Les sérums disponibles proviennent des analyses réalisées pour le diagnostic et le suivi des patients allergiques : le sérum non utilisé peut être conservé et destiné à des activités de recherche. Les données médicales concernant le patient sur lequel le prélèvement a été effectué (âge, sexe, provenance) sont communiquées, mais l'anonymat du patient est préservé.

L'informatisation de telles banques de sérums est nécessaire. Elle permettra de connaître le pourcentage de patients sensibilisés à tel ou tel allergène, de savoir quelles sont les sensibilisations croisées les plus fréquentes, de mener des études sur l'allergénicité comparée des aliments naturels et de leurs équivalents GM.

## SURVEILLANCE APRÈS LA MISE SUR LE MARCHÉ DES OGM

### Principe

La surveillance "post-marketing" des aliments nouveaux, et des OGM en particulier, ne se substitue pas à l'évaluation sanitaire qui précède leur mise sur le marché. Elle vient compléter celle-ci, dans la mesure où elle augmente les chances de détecter d'éventuels effets inattendus dus à la consommation de ces aliments.

*The declared cases meet two conditions:*

- *exact information of the accident leading to a consultation with an allergist, with a detailed clinical description;*
- *clinical details of the allergic reaction and treatment, enabling the severity of the diagnosis to be assessed.*

*To be included, the case must require an injection of adrenaline or admission to intensive care or hospital.*

*Each case must be validated by medical coordinators of the network. An additional survey is filled out by the allergist when necessary. The cases are sent to all network members by email within seven days, along with the bimonthly review *Alim'Inter*.*

*→ The existence of this network may enable a certain reactivity to the possible emergence of new allergies, whether they are due to GMOs or not.*

### Setting up of serum banks

*Serum banks, with serum taken from allergic patients, enable the collection of valuable information on the nature and prevalence of sensitizations existing in the population. The available sera come from analyses conducted for the diagnosis and monitoring of allergic patients: unused serum can be kept and sent off for research activities. Medical data concerning the patient from whom the sample was taken (age, sex, origin) are given, but the patient remains anonymous.*

*The computerisation of such banks is necessary. This will give information on the percentage of patients sensitized to a particular allergen, on which are the most common cross sensitizations and will allow for research to be carried out on allergenicity, comparing natural food with their GM equivalents.*

## POST-MARKETING MONITORING OF GMOs

### Principe

*"Post-marketing" monitoring of novel foods, and of GMOs in particular, is not a substitute for pre-marketing health assessment. Rather it complements this, insofar as it increases the likelihood of detecting any unexpected effects due to the consumption of these foods.*



Cette surveillance consiste donc en la collecte et l'analyse de données sanitaires et de données de consommation, afin de mettre en évidence un lien éventuel entre celles-ci. Étant donné que sa mise en œuvre est particulièrement délicate, elle devrait être nécessaire seulement lorsque le nouvel aliment ne peut être comparé à un équivalent traditionnel (EFSA, 2004). Ce serait le cas par exemple des aliments issus de plantes GM dont la composition aurait subi des modifications importantes et/ou pour lesquels on souhaiterait obtenir une allégation nutritionnelle.

La surveillance après mise sur le marché semble également pertinente lorsque l'aliment issu de plante GM est destiné à remplacer un aliment traditionnel. En raison de ses propriétés spécifiques, il pourrait en effet être consommé en plus grandes quantités que ne l'était son équivalent traditionnel, ce qui pourrait à long terme avoir un impact significatif sur le statut nutritionnel et l'état de santé de la population.

La demande d'autorisation d'un OGM doit contenir :

- soit une proposition de surveillance de l'utilisation dans la consommation humaine de la denrée alimentaire (ou de l'aliment pour animaux) à la suite de sa mise sur le marché ;
- soit une justification vérifiable de l'inutilité d'une surveillance consécutive à la mise sur le marché (Art.3 f/ du règlement 641/2004/CE).

### Étude de faisabilité de la Food Standards Agency sur les données d'exposition

Deux éléments sont essentiels pour obtenir des données d'exposition fiables (ILSI, 2004) :

- la traçabilité : données sur la provenance, la distribution, l'utilisation du produit, etc. ;
- les données de consommation : études nutritionnelles au niveau individuel ou à l'échelle du ménage, données sur les achats alimentaires, autres études permettant d'évaluer de façon probabiliste et/ou déterministe l'exposition.

Au Royaume-Uni, la FSA<sup>(66)</sup> a émis un rapport (Elliott, 2003) concernant la faisabilité d'études "post-marketing". Les données de consommation (données d'exposition) utilisées étaient issues :

- d'une enquête menée par la TNS<sup>(67)</sup> sur les achats alimentaires de 10.000 ménages britanniques de 1991 à 2000 ;
- des ventes alimentaires de sept grands supermarchés britanniques pour l'année 2000, fournies par l'IRI<sup>(68)</sup>.

(66) Food Standards Agency.

(67) Taylor Nelson Sofres.

(68) Information Resources, Inc.

*This monitoring thus involves the collection and analysis of health data and consumption data so as to reveal a possible link between the two. Given that its implementation is particularly tricky, it should only be necessary when the novel food cannot be compared to a traditional equivalent (EFSA, 2004). This would be the case, for example, for food derived from GM plants whose composition would have undergone significant modification and/or for which the obtaining of a nutritional allegation is desired.*

*Post-marketing monitoring also seems pertinent when the GM plant-derived food is intended to replace a traditional food. Due to its specific properties, it could actually be consumed in greater quantities than its traditional equivalent, which could, in the long term, have a significant impact on the nutritional status and state of health of the population.*

*The GMO authorisation request must contain:*

- *either a proposal for post-marketing monitoring regarding the use of the food for human consumption (or feed for animal consumption);*
- *or a veritable justification to the effect that post-marketing monitoring is not necessary (Art.3 f/ of Regulation 641/2004/EC).*

### FSA feasibility study on exposure data

*Two elements are key to obtaining reliable exposure data (ILSI, 2004):*

- *traceability: data on the origin, distribution, use of product, etc;*
- *consumption data: nutritional studies on an individual or household scale, data on food purchases, other studies enabling the probabilist or determinist assessment of exposure.*

*In the United Kingdom, the FSA<sup>(66)</sup> published a report (Elliott, 2003) on the feasibility of "post-marketing" studies. The consumption data (exposure data) used were collected from:*

- *a survey conducted by the TNS<sup>(67)</sup> on food purchases by 10,000 British households from 1991 to 2000;*
- *food sales in seven large British supermarkets for the year 2000, supplied by the IRI<sup>(68)</sup>.*

(66) Food Standards Agency.

(67) Taylor Nelson Sofres.

(68) Information Resources, Inc.



Les données de vente se sont avérées inutilisables dans le cadre d'études « post-marketing », pour diverses raisons (informations insuffisantes sur les produits, notamment). Les données sur les achats des ménages seraient exploitables mais présentent des limites : par exemple, elles ne prennent en compte qu'environ 70 % de la consommation alimentaire des ménages, les repas pris hors du foyer n'étant pas comptabilisés.

Quatre produits alimentaires avaient été définis *a priori* comme étant des « marqueurs ». L'objectif était de voir si l'on pouvait évaluer la consommation de produits spécifiques dans le régime alimentaire. Cela serait envisageable si l'on se limitait à « a consommé » / « n'a jamais consommé » le produit (exposé / non exposé).

À condition d'apporter quelques améliorations (échantillonnage, informations sur la composition des produits...), les auteurs concluent qu'il serait possible d'utiliser la base de données de la TNS sur les consommations alimentaires à l'échelle du ménage, dans l'optique d'évaluer l'exposition de la population à des nouveaux aliments.

Cette étude de faisabilité ne concernait que les données d'exposition : pour mettre en place un système de surveillance après la mise sur le marché, celles-ci doivent être reliées à des données sanitaires.

Différentes approches sont envisagées par la FSA :

- utiliser (avec leur consentement) les numéros de sécurité sociale des individus faisant partie des ménages, et suivre d'un point de vue sanitaire ces individus sur le court, le moyen et le long terme ;
- mener des études écologiques<sup>(69)</sup> lorsque des « clusters » temporels surviennent dans la population : il faudrait alors comparer le niveau d'exposition dans une région, avec le niveau d'exposition dans d'autres régions.

## Surveillance après la mise sur le marché et allergies alimentaires

L'évaluation de l'allergénicité effectuée au préalable de la commercialisation d'une PGM, permet raisonnablement de penser que, si aucun test ne s'est révélé positif (stabilité à la digestion gastrique, homologues de séquences notamment), la probabilité pour que la protéine codée par le transgène déclenche des réactions croisées avec les allergènes connus est faible. Cependant, aucun modèle animal n'étant encore validé, aucune information concernant l'éventuel potentiel sensibilisant de la nouvelle protéine n'est disponible. En outre, la démarche d'évaluation de l'allergénicité est très ciblée sur la protéine codée par le transgène et ne prend pas vraiment en compte

*The sales data proved unuseable in "post-marketing" studies, for diverse reasons (insufficient information on products, in particular). The data on household purchases would be useable, but present limits: for example, they do not take account of around 70% of a household's food consumption, since meals eaten outside the home were not counted.*

*Four food products had been defined a priori as "markers". The objective was to see if the consumption of specific products in a daily diet could be assessed. This would only be conceivable if we limit ourselves to know if the person has eaten or has never eaten the product (exposed / non exposed individuals).*

*Provided that a few improvements were made (sampling, information on product composition, etc.), the authors conclude that it would be possible to use the TNS database on food consumptions on a household level with a view to assessing the exposure of the population to novel foods.*

*This feasibility study only concerned exposure data: to set up a post-marketing monitoring system, these must be combined with health data. Various approaches are being considered by the FSA:*

- using (with their consent) NHS numbers of individuals in households and following up the health of these individuals on the short, medium and long term;
- conducting ecological studies<sup>(69)</sup> when temporal "clusters" arise in the population: the level of exposure in a region must then be compared with the level of exposure in other regions.

## Post-marketing monitoring and food allergies

*Allergenicity assessment carried out before a GMP is marketed allows for the reasonable assumption that, if no test has proved positive (stability to gastric digestion, sequence homologues in particular), the probability that the protein coded by the transgene triggers cross reactions with known allergens is low. However, since an animal model is yet to be validated, no information on the possible sensitizing potential of the new protein is available. Furthermore, the allergenicity assessment method is very focused on the protein coded by the transgene and does not really take account of the whole of the proteic fraction*

(69) Études dont l'unité d'observation n'est pas l'individu mais un groupe d'individus tels qu'une classe, une usine, un quartier, une communauté, une ville, etc.

(69) Studies where the unit of observation is not the individual but a group of individuals such as a class, factory, area, community, town, etc.

l'ensemble de la fraction protéique de la PGM : une surveillance après la mise sur le marché pourrait éventuellement mettre en évidence des réactions allergiques dues à la présence d'une protéine nouvelle ou d'une protéine surexprimée qui serait allergisante.

La démarche consisterait à confronter les données sanitaires recueillies avec des éléments concernant l'évaluation de l'exposition (estimations des quantités consommées notamment). Cependant, chaque patient allergique a un seuil réactogène qui lui est propre : certains réagiront à des quantités relativement importantes d'aliment, et d'autres à de simples traces. Autrement dit, il n'existe de relation dose/réponse qu'au niveau individuel. Cet élément risque de compliquer notablement l'interprétation des résultats.

Une autre approche, évoquée dans une étude récente (Batista, 2005), consisterait à étudier au moyen de tests cliniques, sur une population allergique (sensible à des allergènes alimentaires et/ou respiratoires), la sensibilisation aux plantes GM et aux nouvelles protéines produites par ces plantes.

*of the GMP: post-marketing monitoring could possibly reveal allergic reactions due to the presence of a new or over-expressed protein which is allergenic.*

*The method would involve combining collected health data with elements concerning exposure assessment (estimations of consumed quantities, in particular). However, each allergic patient has a unique reactogenic threshold: some will react to relatively large quantities of the food, while others to just traces. In other words, there is only a dose/response relation on the individual level. This element risks to complicate the interpretation of results in particular.*

*Another approach, mentioned in a recent study (Batista, 2005), would consist in studying, using clinical tests, an allergic population (sensitive to food and/or respiratory allergens), sensitization to GM plants and the new proteins produced by these plants.*



# CONCLUSION

## CONCLUSION

Aujourd'hui, les citoyens européens sont plutôt défavorables à la culture et à la commercialisation des OGM agricoles en Europe. Cette mauvaise acceptation sociale contribue à ce que les plantes génétiquement modifiées soient aujourd'hui testées de manière approfondie sur de nombreux aspects avant leur mise sur le marché, comparativement aux autres plantes élaborées par des techniques considérées comme plus conventionnelles.

L'évaluation de l'allergénicité d'une PGM est centrée sur la ou (les) protéine(s) exprimée(s) par le(s) gène(s) introduit(s) volontairement dans le génome ompte le nouvel organisme en tant que tel pour cet aspect. Des approches plus globales seraient possibles. Mais celles-ci, outre leur lourdeur sur les plans technique et financier, sont difficilement interprétables dans l'état actuel des connaissances.

Elles ne permettraient pas de fournir des indications conclusives concernant le potentiel allergénique de l'organisme étudié, qu'il s'agisse d'une PGM ou de tout autre aliment. L'étude du profil allergénique et l'analyse des protéines nouvelles ou surexprimées par rapport à l'aliment conventionnel, notamment par mise en contact de la fraction protéique de la PGM avec des sérums de patients allergiques, peuvent toutefois être suggérées. Cela serait particulièrement intéressant pour les PGM de deuxième génération (Cf.6.5), car les modifications génétiques effectuées sont susceptibles d'entraîner des changements plus importants au sein de la fraction protéique.

Aujourd'hui, il convient de développer :

- la recherche sur de nouveaux outils analysant l'ensemble de la composition de la PGM (étude du protéome, du transcriptome, du profil métabolique) ;
- une base de données la plus exhaustive possible pour la recherche de séquences homologues avec des allergènes connus, et recensant les structures tridimensionnelles des protéines ;
- des modèles animaux pertinents, permettant d'évaluer le potentiel sensibilisant des nouvelles protéines ;
- des sérothèques collectant les sérums de patients allergiques, ce qui est prévu par la FAO et réalisé notamment par le réseau d'Allergovigilance en France.

Les plantes GM hypoallergéniques ne sont pour l'instant qu'au stade de la recherche, et l'intérêt des sociétés de biotechnologie pour ces PGM reste modéré. De telles PGM pourraient peut-être se révéler utiles dans une optique de prévention des sensibilisations, si des variétés contenant moins d'allergènes étaient largement consommées.

*Today, European citizens are rather against the cultivation and marketing of agricultural GMOs in Europe. This poor acceptance in society means that genetically modified plants are currently tested thoroughly on a number of aspects before being placed on the market, in comparison with other plants developed from more conventional methods.*

*The allergenicity assessment of a GMP focuses on the protein(s) expressed by the gene(s) introduced deliberately into the plant genome. The new organism should be taken better account of as such for this aspect. More global approaches would be possible although, beyond their technical complexity and considerable cost, they are difficult to interpret on the basis of current knowledge. They would not provide conclusive indications on the allergenic potential of the organism studied, whether this be a GMP or any other food. Studies of the allergenic profile and analyses of new or over-expressed proteins in contrast with the conventional food, particularly through placing the GMP proteic fraction in contact with sera from allergic patients, can however be proposed. This would be of particular interest for second generation GMPs (Cf.6.5), as the genetic modifications carried out are likely to trigger greater changes within the proteic fraction.*

*Today, the following must be developed:*

- *Research on new tools analysing the whole of a GMP composition (study of the proteome, transcriptome, and metabolic profile);*
- *Development of the most exhaustive database possible for conducting research into homologous sequences with known allergens and listing the tridimensional structures of proteins;*
- *appropriate animal models, allowing for the sensitizing potential of new proteins to be assessed;*
- *Serum banks collecting sera from allergic patients, which is planned by the FAO and implemented by the Allergovigilance network in France, in particular.*

*Hypoallergenic GM plants are only at the research stage at present, and biotechnology companies are only showing moderate interest in these GMPs. Such GMPs could perhaps turn out to be useful with regard to the prevention of sensitizations, if the varieties containing less allergens were widely consumed.*

Bien que l'on puisse encore progresser dans l'évaluation du risque, en l'état actuel des connaissances, les aliments issus de plantes GM ne semblent pas plus dangereux que les aliments issus de plantes non GM en ce qui concerne le potentiel allergénique. La littérature ne mentionne jusqu'à présent que les cas de PGM pour lesquelles le danger a été identifié avant même que la mise sur le marché ne soit envisagée, ou des PGM pour lesquelles le risque d'allergie lié à la modification génétique semble très faible, voire inexistant.

La surveillance et l'évaluation sanitaire des OGM par rapport au risque allergique sont particulièrement rigoureuses en comparaison de celles appliquées soit aux nouvelles variétés obtenues par sélection conventionnelle (aucun contrôle sur cet aspect), soit aux nouveaux aliments (Règlement CE n° 258/97)<sup>(70)</sup>. Il est donc important de rappeler que les techniques conventionnelles de culture et de sélection pourraient contribuer à augmenter l'allergénicité de nos aliments (Baudo, 2006). Ainsi, l'emploi de produits activateurs de résistance et la sélection d'espèces végétales particulièrement aptes à synthétiser des protéines de stress (protéines PR), qui leur permettent de résister à des agressions fongiques ou virales, seraient susceptibles de participer à l'accroissement de la prévalence des allergies alimentaires (Hanninen, 1999). En effet, 42 % des allergènes végétaux décrits en 2003 étaient des protéines PR (Malandain, 2004b).

Enfin, si les PGM sont l'objet de nombreuses préoccupations, il est essentiel de poursuivre par ailleurs les études évaluant l'allergénicité des autres "aliments nouveaux", mais aussi celle des aliments qui sont d'ores et déjà consommés, dans une perspective plus globale de meilleure connaissance et de prévention de l'allergie (Kleter, 2003 ; Spök, 2005). En effet, un certain nombre d'aliments non GM récemment introduits sur le marché, notamment les noix et fruits exotiques, sont souvent à l'origine de réactions allergiques sévères (Moneret-Vautrin, 2005).

*Although more progress could be made in risk assessment, as knowledge currently stands, food derived from GM plants does not appear to be more dangerous than food derived from non-GM plants in terms of the allergenic potential. To date, the literature only mentions GMPs for which the danger has been identified even before marketing was envisaged, or GMPS for which the allergy risk associated with genetic modification seems to be very low, or nonexistent.*

*Health assessment and monitoring of GMOs in terms of allergic risk are particularly rigorous in comparison with those applied to new varieties obtained by conventional selection (no control on this aspect), i.e. to novel foods (Regulation EC 258/97)<sup>(70)</sup>. Thus it is important to remember that conventional techniques of cultivation and selection may contribute to increasing the allergenicity of our food (Baudo, 2006). As a result, the use of resistance-activating products and the selection of plant species that are particularly suited to synthesising stress proteins (PR proteins), which would make them resistant to fungal or viral attacks, may have an influence in increasing the prevalence of food allergies (Hanninen, 1999). Note, for example, that 42% of plant allergens described in 2003 were PR proteins (Malandain, 2004b).*

*Lastly, if GMPs are the source of a number of concerns, it is all the more essential to continue research assessing the allergenicity of other "novel foods" as well as of food that is already being eaten, in a more global context of improved knowledge and allergy prevention (Kleter, 2003; Spök, 2005). This is because a certain number of non-GM foods recently placed on the market, especially nuts and exotic fruits, are often the cause of severe allergic reactions (Moneret-Vautrin, 2005).*

(70) Les OGM ne sont plus soumis au règlement 258/97/CE, dit "Novel foods", mais au règlement 1829/2003/CE.

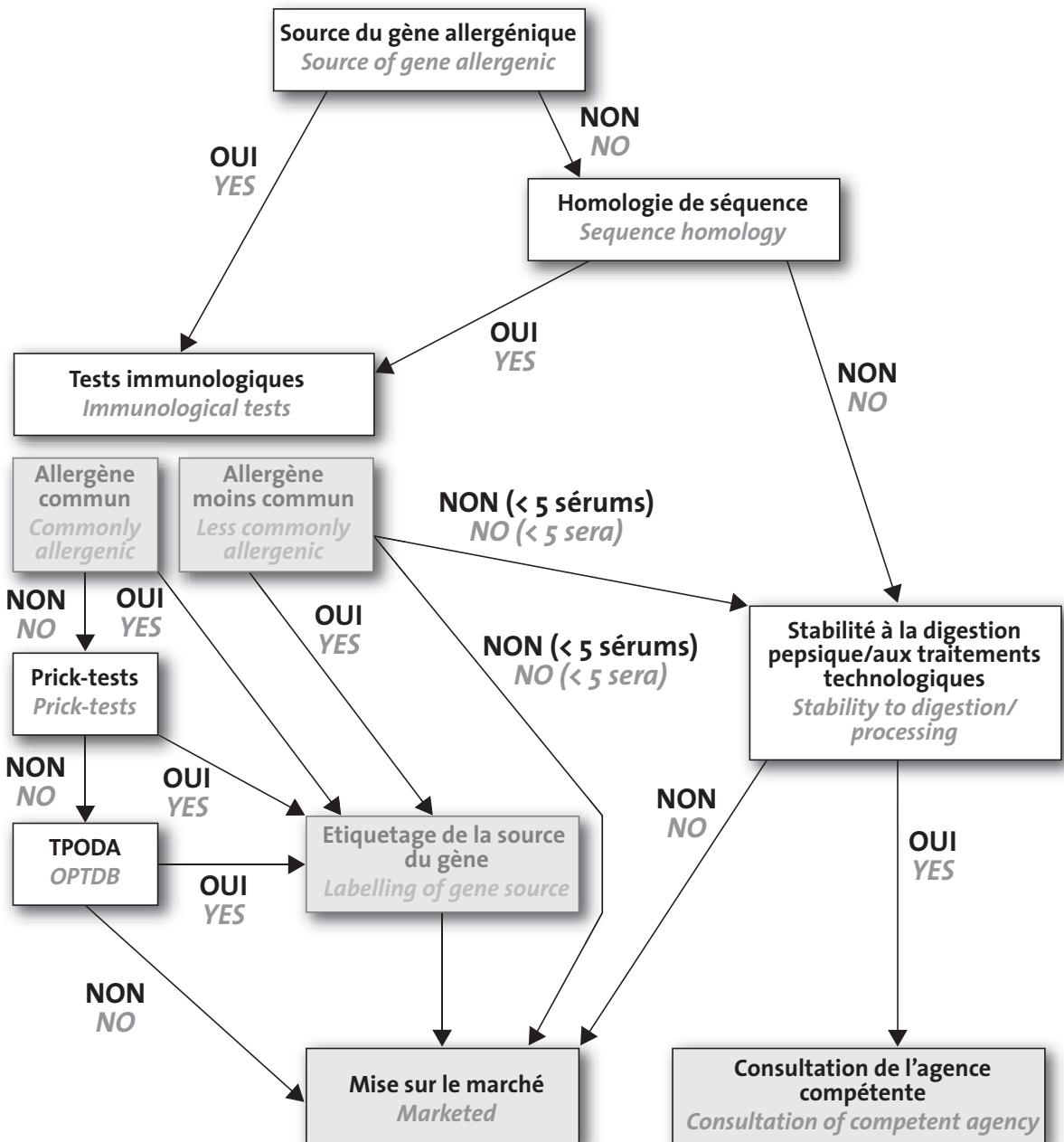
(70) GMOs are no longer subject to regulation 258/97/EC, called "Novel foods", but to regulation 1829/2003/EC.



# ANNEXE 1

## ARBRE DE DÉCISION IFBC/ILSI (1996)

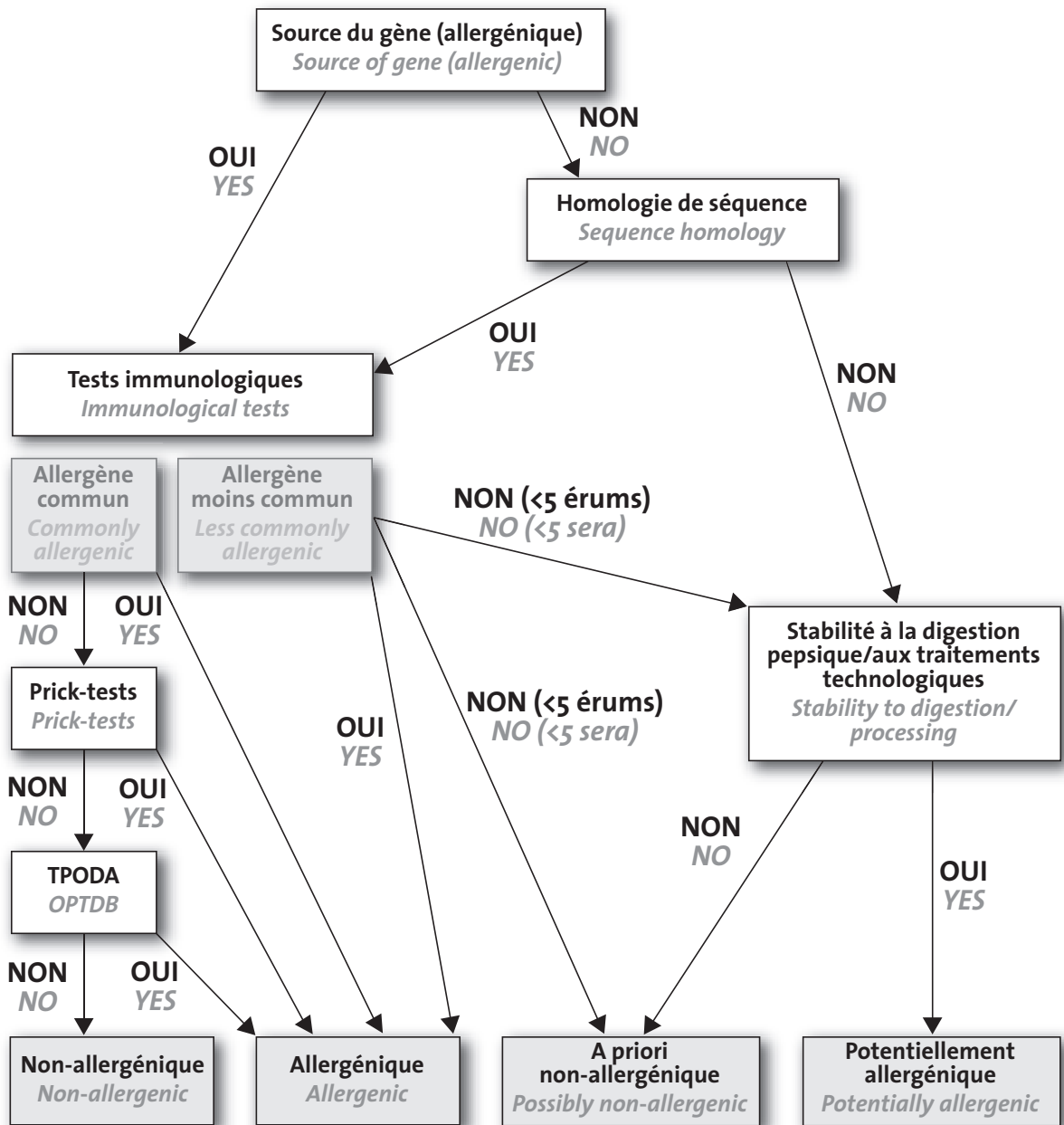
ANNEX 1: DECISION TREE IFBC/ILSI (1996)



# ANNEXE 2

## ARBRE DE DÉCISION FAO/WHO (2000)

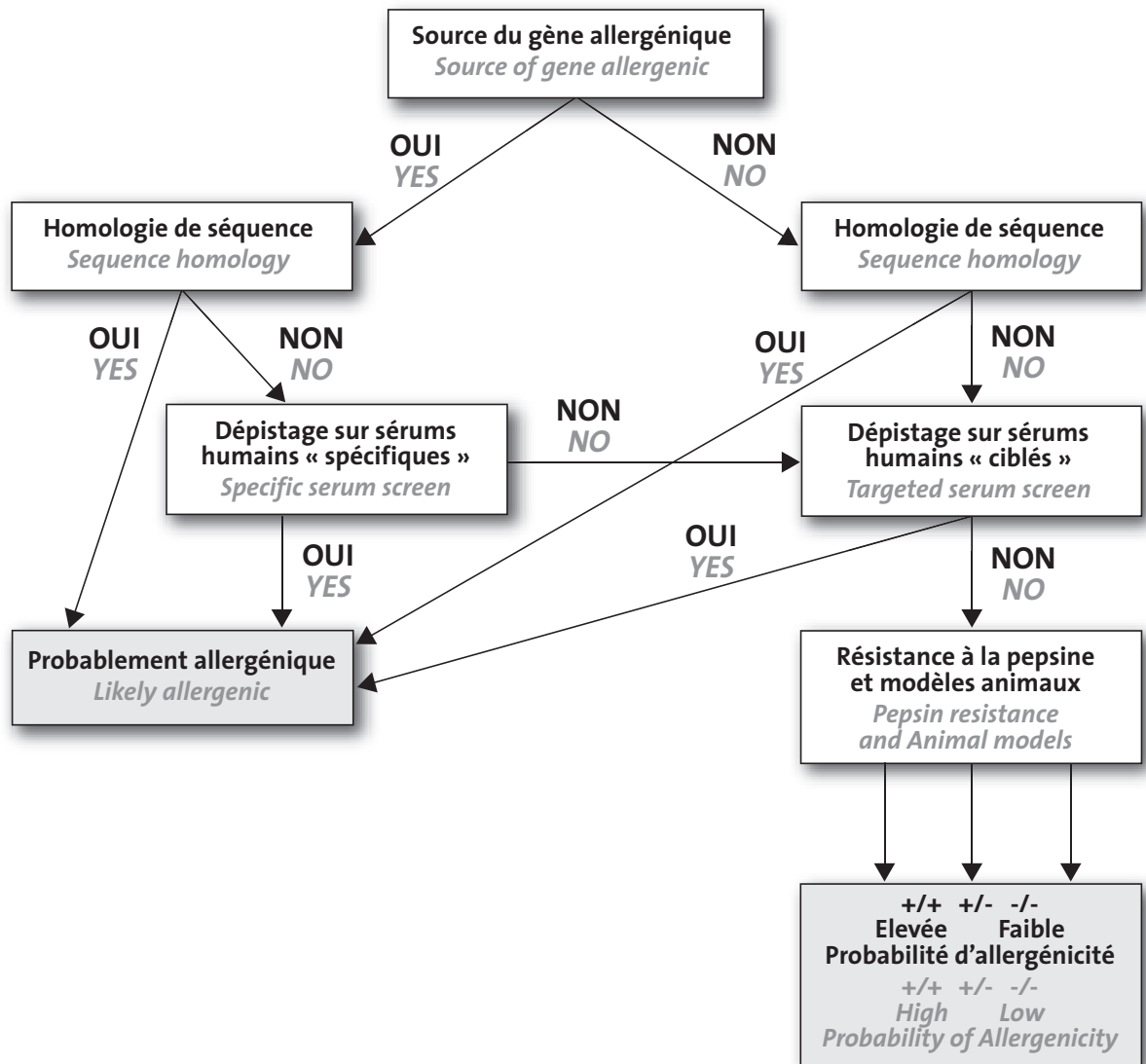
ANNEX 2: DECISION TREE FAO/WHO (2000)



# ANNEXE 3

## ARBRE DE DÉCISION FAO/WHO (2001)

ANNEX 3: DECISION TREE FAO/WHO (2001)



# ANNEXE 4

## FORMULAIRE DE DÉCLARATION D'UN ACCIDENT ALLERGIQUE GRAVE

### ANNEX 4: FORM FOR DECLARING A SEVERE ALLERGIC ACCIDENT

(Disponible sur les sites <http://www.cicbaa.org> et <http://www.allergique.org>)

(Available on the websites <http://www.cicbaa.org> and <http://www.allergique.org>)

#### RECUEIL D'ÉVÈNEMENTS ALLERGIQUES GRAVES POOLING OF SEVERE ALLERGIC INCIDENTS

Réseau d'Allergovigilance (aliments, médicaments, hyménoptères, idiopathiques)  
Allergovigilance Network (food, medication, Hymenoptera, idiopathic)

**IDENTIFICATION DU MÉDECIN (ces données sont à usage interne et n'apparaîtront pas lors de la diffusion du cas clinique) / IDENTIFICATION OF DOCTOR (these details are for internal use only and will not be given when the clinical case is disseminated):**

Votre nom / Your name:

Votre prénom / Your first name:

Votre email / Your email:

Votre ville / Your town:

Votre code postal / Your postcode:

**DESCRIPTION DU CAS CLINIQUE / DESCRIPTION OF THE CLINICAL CASE:**

**Réaction clinique :** Choc anaphylactique – Angioœdème laryngé – Asthme aigu grave – Réaction systémique sérieuse – Autres (remplir alors les commentaires) / **Clinical reaction:** Anaphylactic shock – Laryngeal angioedema – Acute asthma – Serious systemic reaction – Other (please specify below)

**Commentaires de la réaction clinique / Comments on clinical reaction:**

**Facteurs associés :** Effort physique – Prise d'alcool – Prise de médicaments aggravants – Aucun ou autre (remplir alors les commentaires) / **Associated factors:** Physical effort – Alcohol intake – Taking medication increasing effects occurring – None or other (please specify below)

**Commentaires des facteurs associés / Comments on associated factors:**

**Conduite tenue :** SAU – Hospitalisation – Réanimation – Traitement (adrénaline, ...) – Autre (préciser) /

**Management of the situation:** EMS (Accident and Emergency Departments) – Hospitalisation – Intensive Care – Treatment (adrenaline, etc.) – Other (to define)

**Antécédents :** Eczéma – Rhinite allergique – Asthme allergique – Dermatite atopique – Rhume des foins - Allergie alimentaire / **Past history:** Eczema – Allergic rhinitis – Allergic asthma – Atopic dermatitis – Hayfever - Food allergy

**Sexe / Gender:** M – F

**Âge / Age:**

**Bilan allergologique effectué :** Prick-tests – IgE spécifiques – Intra-dermo réaction – Test de provocation labiale – Test de provocation orale – Dosage de tryptase – Autre bilan (préciser les résultats dans le champ commentaires) /

**Allergic tests administered:** Prick-tests – Specific IgE – Intra-dermo reaction – Labial provocation test – Oral provocation test – Dose of tryptase – Other tests (specify the results below)

**Commentaires du bilan / Comments on the tests:**

**Diagnostic retenu :** Anaphylaxie à agent identifié – Anaphylaxie idiopathique / **Diagnosis given:** Anaphylaxis to an identified agent – Idiopathic anaphylaxis

**Commentaires du diagnostic / Comments on the diagnosis:**

**PRÉCISIONS ALIMENTAIRES / SPECIFIC INFORMATION ABOUT FOOD:**

**Circonstances alimentaires :** à domicile – au restaurant – chez des amis – cantine d'école – cantine d'entreprise – au sport – ne sais pas / **Eating circumstances:** at home – at restaurant – with friends – school meals – firm meals – while sport training – not known

**Aliment préemballé ?** Oui – Non – Ne sais pas / **Pre-packaged food?** Yes – No – not known

**Aliment en vrac ?** Oui – Non – Ne sais pas / **Loose food?** Yes – No – not known

**Lieu d'achat :** sur un marché – chez un artisan – don de nourriture – dans un supermarché – dans un commerce de proximité – ne sais pas / **Where food was bought:** at a market – from a private manufacturer – food gift – in a supermarket – in a local shop – not known

**Produit consommé habituellement ?** Oui – Non – Ne sais pas / **Food usually eaten?** Yes – No – not known

**Est-ce une nouvelle recette ?** Oui – Non – Ne sais pas / **Is it a new recipe?** Yes – No – not known

# BIBLIOGRAPHIE / RÉFÉRENCES

## B I B L I O G R A P H Y / R E F E R E N C E S

- Aalberse RC (2000).** Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Aug;106(2):228-238.
- Adel-Patient K, WAL JM (2004).** Animal models for assessment of GMO allergenicity: advantages and limitations. *Allerg Immunol (Paris).* 2004 Mar;36(3):88-91.
- Afssa (2002).** Évaluation des risques relatifs à la consommation de produits alimentaires composés ou issus d'organismes génétiquement modifiés. Janvier 2002. Disponible sur / Available at: <http://www.afssa.fr>
- Afssa (2003).** Avis de l'Afssa du 18 juillet 2003 relatif à une demande de précisions sur les positions prises dans ses avis [Saisines 2003-SA-0027, 2003-SA-0046 et 2003-SA-0047] concernant la mise sur le marché de lignées de maïs et de colza GM tolérantes au glyphosate, concernant l'évaluation du pouvoir allergène et l'intérêt de disposer de la séquence du transgène inséré dans le génome de la plante. Saisine n° 2003-SA-0208. Disponible sur / Available at: <http://www.afssa.fr>
- Afssa (2004).** OGM et alimentation : peut-on identifier et évaluer les bénéfices pour la santé ? Étude au travers de 4 exemples. Juin 2004. Disponible sur / Available at: <http://www.afssa.fr>
- Agbios (2001).** Product description : 55-1/63-1. Agbios GM Database – Information on GM approved products. Last update : 2001 Aug 20. Disponible sur / Available at: <http://www.agbios.com>
- Arshad SH et al. (1991).** Clinical and immunological characteristics of Brazil nut allergy. *Clin Exp Allergy.* 1991 May;21(3):373-6.
- Asturias JA et al. (2003).** The major *Platanus acerifolia* pollen allergen Pla a 1 has sequence homology to invertase inhibitors. *Clin Exp Allergy.* 2003 Jul;33(7):978-985.
- Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL (1996).** Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nat Biotechnol.* 1996 Oct;14(10):1269-1273.
- Bannon GA et al. (2001).** Engineering, characterization and *in vitro* efficacy of the major peanut allergens for use in immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;124:70-72.
- Batista R et al. (2005).** Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soya samples. *J Allergy Clin Immunol.* 2005. In press. Disponible sur / Available at: <http://www.us.elsevierhealth.com>
- Baudo MM et al. (2006).** Transgenesis has less impact on the transcriptome of wheat grain than conventional breeding. *Plant Biotechnol J.* 2006;4(4):369-380.
- Bernstein IL et al. (1999).** Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environ Health Perspect.* 1999 Jun;111(8):1114-1121. Disponible sur / Available at: <http://ehp.niehs.nih.gov>
- Bindslev-Jensen C et al. (2003).** Assessment of the potential allergenicity of ice structuring protein type III HPLC 12 using the FAO/WHO 2001 decision tree for novel foods. *Food Chem Toxicol.* 2003 Jan;41(1):81-87.
- Birmingham N, Thanavorakul S, Gangur V (2002).** Relative immunogenicity of commonly allergenic foods versus rarely allergenic and nonallergenic foods in mice. *J Food Prot.* 2002 Dec;65(12):1988-1991.
- Borde V (2004).** OGM à la rescousse. *L'actualité (Montréal).* 12 Août 2004. Disponible sur / Available at: <http://www.lactualite.com>
- Bredehorst R, David K (2001).** What establishes a protein as an allergen? *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001;756:33-40.
- Bren L (2003).** Genetic Engineering : the future of foods ? *FDA Consumer magazin.* 2003 Nov-Dec. Disponible sur / Available at: <http://www.fda.gov>
- Breiteneder H, Mills ENC (2005).** Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Jan;115(1):14-23.
- Buchini L, Goldberg R (2000).** Comments from Environmental Defense on EPA's "Cry9C Food Allergenicity Background Document". 2000 Feb 29. Disponible sur / Available at: <http://www.biotech-info.net>



- Buchanan BB et al. (1997).** Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 May 13;94(10):5372-5377. Disponible sur / Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov>
- Buchanan BB, Frick OL (2002).** The dog as a model for food allergy. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 May;964:173-183.
- Burks AW, Fuchs RL (1995).** Assessment of the endogenous allergens in glyphosate-tolerant and commercial soybean varieties. *J Allergy Clin Immunol*. 1995 Dec;96(6 Pt 1):1008-1010. Disponible sur / Available at: <http://www.us.elsevierhealth.com>
- Burks AW, Sampson HA, Bannon GA (1998).** Peanut allergens. *Allergy*. 1998 Aug;53(8):725-730.
- Carnes J et al. (2002).** Pru p 3 (LTP) content in peach extracts. *Allergy*. 2002 Nov;57(11):1071-1075.
- CCA (Commission du Codex Alimentarius) (2002).** Avant-projet d'annexe sur l'évaluation de l'allergénicité potentielle au projet de directives régissant la conduite de l'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments dérivés de plantes à ADN recombiné. Rapport de la 3<sup>e</sup> session du groupe spécial intergouvernemental du Codex sur les aliments dérivés des biotechnologies. Alinorm 03/34. Disponible sur / Available at: <http://www.codexalimentarius.net>
- CDC (Centers for Disease Control and prevention) (2001).** Investigation of human health effects associated with potential exposure to genetically modified corn. Report to the U.S. FDA. 2001 June 11. Disponible sur / Available at: <http://www.cfsan.fda.gov>
- Chapoval SP, David CS (2003).** Identification of antigenic epitopes on human allergens : studies with HLA transgenic mice. *Env Health Perspect*. 2003 Feb;111(2):245-250. Disponible sur / Available at: <http://ehp.niehs.nih.gov>
- Cho MJ et al. (1999).** Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Dec. 7;96(25):14641-14646. Disponible sur / Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov>
- Christensen AB et al. (2002).** The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Mol Plant Pathol*. 2002;3:135-144.
- Commission Européenne (2005a).** Europeans, Science and Technology. Special Eurobarometer 224/ Wave 63.1 – TNS Opinion & Social. June 2005. Disponible sur / Available at: [http://ec.europa.eu/public\\_opinion/archives/eb\\_special\\_en.htm](http://ec.europa.eu/public_opinion/archives/eb_special_en.htm)
- Commission Européenne (2005b).** Questions et réponses sur la réglementation des OGM dans l'Union européenne. Mis à jour le 20 mai 2005. Disponible sur / Available at: [http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/gmfood/qanda\\_fr.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/gmfood/qanda_fr.pdf)
- Dearman RJ et al. (2001).** Characterization of antibody responses induced in rodents by exposure to food proteins: influence of route of exposure. *Toxicology*. 2001 Oct 30;167(3):217-231.
- Del Val G et al. (1999).** Thioredoxin treatment increases digestibility and lowers allergenicity of milk. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Apr;103(4):690-697.
- Diaz-Perales A et al. (2003).** Analysis of avocado allergen (Prs a 1) IgE-binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Nov;112(5):1002-1007.
- Dieterich W, Esslinger B, Schuppan D (2003).** Pathomechanisms in celiac disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003 Oct;132(2):98-108.
- Dodo H, Konan K, Viquez O (2005).** A genetic engineering strategy to eliminate peanut allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005 Jan;5(1):67-73.
- Duriez T, Dujardin L, Afchain D (2002).** Ascariidose. Laboratoire de parasitologie. Faculté de pharmacie de Lille. Disponible sur / Available at: <http://arachosia.univ-lille2.fr/labos/parasito/Internat/courspar/ascaris.html>
- Dupont C, De Boissieu D (2003).** Formula feeding during cow's milk allergy. *Minerva Pediatr*. 2003 Jun;55(3):209-216.
- Ebo DG et al. (2004).** *In vitro* allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy*. 2004 Mar;34(3):332-339.
- EFSA (2004).** Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed (Question N° EFSA-Q-2003-005). Adopted on 24 September 2004. Final, edited version of 8 November 2004. *The EFSA Journal*. 2004;99:1-94. Disponible sur / Available at: <http://www.efsa.eu.int>

- Elliott P et al. (2003).** Surveillance and Post Market Monitoring of Potential Health Effects of Novel (Including GM) Foods: Feasibility Study. Final report, FSA project code: GO1021. Disponible sur / Available at: <http://www.foodstandards.gov.uk/>
- EPA (1997).** Coat protein of papaya ringspot virus and the genetic material necessary for its production ; Exemption from the requirement of a tolerance. Federal register. 1997 Aug 22;62(163):44572-44575. Disponible sur / Available at: <http://www.epa.gov/fedrgstr/>
- FAO/WHO (2000).** Aspects de la salubrité des aliments génétiquement modifiés d'origine végétale. Rapport d'une consultation conjointe d'experts FAO/OMS sur les aliments produits par biotechnologie, 29 Mai - 2 Juin 2000, Genève. Disponible sur / Available at: <http://www.who.int>
- FAO/WHO (2001).** Evaluation of allergenicity of Genetically Modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology, 2001 Jan 22-25, Rome. Disponible sur / Available at: <http://www.fao.org>
- FDA (1992).** Statement of policy : foods derived from new plant varieties. Notice, Federal Register. 1992 May 29;57(104):22984-23005. Disponible sur / Available at: <http://www.cfsan.fda.gov>
- FDA (1997).** Note to file BNF42 [Memorandum to file concerning Ringspot virus resistant papaya line 55-1]. Department of health and human services. 1997 Sept 12. Disponible sur / Available at: <http://www.cfsan.fda.gov>
- FDA (2001a).** Guidance for industry – Voluntary labeling indicating whether foods have or have not been developed using bioengineering. Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2001 Jan. Disponible sur: <http://www.cfsan.fda.gov>
- FDA (2001b).** FDA cover letter [to US EPA] regarding their findings concerning *StarLink™* Corn. Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2001 June 12. Disponible sur / Available at: <http://www.cfsan.fda.gov>
- FDA (2004).** Laws Enforced by the FDA and Related Statutes. Federal Food, Drug and Cosmetic Act and additional laws. Disponible sur / Available at: <http://www.fda.gov/opacom/laws>
- Franco OL et al. (2002).** Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases. Structure, function, and potential for crop protection. Eur J Biochem. 2002;269:392-412.
- Frémont S et al. (2002).** Allergenicity of oils. Allerg Immunol (Paris). 2002 Mar;34(3):91-94.
- Frick OL (1996).** Food allergy in atopic dogs. Adv Exp Med Biol. 1996;409:1-7.
- Fujimura T et al. (2004).** Two-dimensional IgE-binding spectrum of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergens. Int Arch Allergy Immunol. 2004 Feb;133(2):125-135. Epub 2004 Jan 26.
- Gilissen LJ et al. (2005).** Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. J Allergy Clin Immunol. 2005 Feb;115(2):364-369.
- Godeau P, Herson S, Piette J (2004).** Traité de médecine. Flammarion Médecine-Sciences (Paris). 2004 (4<sup>e</sup> édition).
- Goodman RE et al. (2005).** Assessing genetically modified crops to minimize the risk of increased food allergy : a review. Int Arch Allergy Immunol. 2005 Jun;137(2):153-166. Epub 2005 June 8.
- Greiner S et al. (1999).** Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. Nat Biotechnol. 1999 Jul;17(7):708-711.
- Hanninen AR et al. (1999).** Increased allergen production in turnip (*Brassica rapa*) by treatments activating defense mechanisms. J Allergy Clin Immunol. 1999 Jul;104(1):194-201.
- Helm RM et al. (1998).** Cellular and molecular characterization of a major soybean allergen. Int Arch Allergy Immunol. 1998;117:29-37.
- Helm RM et al. (2000).** Mutational analysis of the IgE-binding epitopes of P34/Gly m 1. J Allergy Clin Immunol. 2000;105:378-384.
- Herman EM et al. (2003).** Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. Plant Physiol. 2003 May;132(1):36-43. Disponible sur / Available at: <http://www.plantphysiol.org>

- Hileman RE et al. (2002).** Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;128:280-291.
- Hilton J et al. (1997).** Characteristics of antibody responses induced in mice by protein allergens. *Food Chem Toxicol.* 1997 Dec;35(12):1209-1218.
- Hirose J et al. (2004).** Recognition of Native and/or Thermally Induced Denatured Forms of the Major Food Allergen, Ovomucoid, by Human IgE and Mouse Monoclonal IgG Antibodies. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004 Dec; 68(12):2490-2497. Disponible sur / Available at: <http://www.jstage.jst.go.jp>
- Hoffman DR, Day ED Jr, Miller JS (1981).** The major heat stable allergen of shrimp. *Ann Allergy.* 1981 Jul;47(1):17-22.
- Hoffmann-Sommergrüber K (2002).** Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochem Soc Trans.* 2002 Nov;30(Pt 6):930-935. Disponible sur / Available at: <http://www.biochemsoctrans.org>
- Howie M (2001).** Missouri files suit over Starlink issue. *Feedstuffs.* 2001, May 14.
- ILSI (2004).** Nutritional and safety assessment of foods and feeds nutritionally improved through biotechnology. Institute of Food Technologists' Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2004. Disponible sur : <http://www.ift.org>
- Ivanciu O, Schein CH, Braun W (2003).** SDAP: database and computational tools for allergenic proteins. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jan 1;31(1):359-362. Disponible sur / Available at: <http://nar.oxfordjournals.org>
- Jensen-Jarolim E et al. (1999).** Allergen mimotopes in food enhance type I allergic reactions in mice. *FASEB J.* 1999 Sep;13(12):1586-1592.
- Joudrier P et al. (2005).** The thioredoxin h system : potential applications. *Biotechnol Adv.* 2005 Jan;23(1):81-85. Epub 2004 Oct 27.
- Kanny G et al. (2001).** Population study of food allergy in France. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;108(1):133-140.
- Kimber I et al. (2003).** Assessment of protein allergenicity on the basis of immune reactivity : animal models. *Environ Health Perspect;* 2003 June;111(8):1125-1130. Disponible sur / Available at: <http://ehp.niehs.nih.gov>
- Kleter GA, Peijnenburg AA (2002).** Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presence of short amino acid sequences identical to potential, IgE-binding linear epitopes of allergens. *BMC Struct Biol.* 2002 Dec;2(1):8. Disponible sur / Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov>
- Kleter GA, Peijnenburg AA (2003).** Presence of potential allergy-related linear epitopes in novel proteins from conventional crops and the implication for the safety assessment of these crops with respect to the current testing of genetically modified crops. *Plant Biotechnol J.* 2003 Sept; 1(5):371-380.
- Knippels LM, Penninks AH, Houben GF (1998).** Continued expression of anti-soy protein antibodies in rats bred on a soy protein-free diet for one generation: the importance of dietary control in oral sensitization research. *J Allergy Clin Immunol.* 1998 Jun;101(6 Pt 1):815-820.
- Knippels LM et al. (2000).** Comparison of antibody responses to hen's egg and cow's milk proteins in orally sensitized rats and food-allergic patients. *Allergy.* 2000;55:251-258.
- Knippels LM, Penninks AH (2003).** Assessment of the allergenic potential of food proteins extracts and proteins on oral application using the brown Norway rat model. *Environ Health Perspect.* 2003 Feb;111(2):233-238.
- Kochuyt AM, Van Hoeyveld EM, Stevens EA (2005).** Prevalence and clinical relevance of specific immunoglobulin E to pollen caused by sting- induced specific immunoglobulin E to cross-reacting carbohydrate determinants in Hymenoptera venoms. *Clin Exp Allergy.* 2005 Apr;35(4):441-447.
- Konan K, Viquez O, Dodo H (2003).** Towards the development of a hypoallergenic peanut through genetic transformation. *Appl Biotechnol, Food Sci and Policy.* 2003;1(3):159-168.
- Koppelman SJ et al. (1999).** Heat-induced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties. *J Biol Chem.* 1999 Feb 19;274(8):4770-4777. Disponible sur / Available at: <http://www.jbc.org>
- Kopper RA et al. (2004).** Peanut protein allergens: gastric digestion is carried out exclusively by pepsin. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Sep;114(3):614-618.

- Lee YH (1992).** Food-processing approaches to altering allergenic potential of milk-based formula. *J Pediatr.* 1992;121:547-50.
- Lehrer SB, Bannon GA (2005).** Risks of allergic reactions to biotech proteins in foods : perception and reality. *Allergy.* 2005 May;60(5):559-564.
- Li XM et al. (2000).** A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Jul;106(1 Pt 1):150-158.
- Liang P, Pardee AB (1992).** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 1992 Aug 14;257(5072):967-971.
- Malandain H (2004a).** Basic immunology, allergen prediction and bioinformatics. *Allergy.* 2004 Sep;59(9):1011-1012.
- Malandain H, Lavaud F (2004b).** Allergénicité des protéines de défense végétale. *Rev Fr Allergol Immunol Clin.* 2004;44:469-475.
- Malandain H (2005).** IgE-reactive carbohydrate epitopes--classification, cross-reactivity, and clinical impact. *Allerg Immunol (Paris).* 2005 Apr;37(4):122-128.
- Malanin K, Lundberg M, Johansson SG (1995).** Anaphylactic reaction caused by neoallergens in heated pecan nut. *Allergy.* 1995 Dec;50(12):988-991.
- McGibbon AM et al. (1990).** Identification of the major *Ascaris* allergen and its purification to homogeneity by high-performance liquid chromatography. *Mol Biochem Parasitol.* 1990 Mar;39(2):163-171.
- Melo VM et al. (1994).** Allergenicity and tolerance to proteins from Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). *Food Agri Immunol.* 1994;6:185-195.
- Metcalf DD et al. (1996).** Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit Rev Food Sci Nut.* 1996;36(S):S1-18.
- Meyer H (1998).** In search for the benefit. *AG Biologische Vielfalt.* 1998. Disponible sur / Available at: <http://www.forumue.de>
- Mills ENC et al. (2004).** Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004;44(5):379-407.
- Mittag D et al. (2004a).** Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Jan;113(1):148-154.
- Mittag D et al. (2004b).** Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Dec;114(6):1410-1417.
- Moneret-Vautrin DA, Kanny G (1995).** Food-induced anaphylaxis. A new French multicenter study. *Bull Acad Natl Med.* 1995;179:161-184.
- Moneret-Vautrin DA, Kanny G (1996).** Absence of modification of endogenous soy allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 1996 Oct;98(4). Disponible sur / Available at: <http://www.us.elsevierhealth.com>
- Moneret-Vautrin DA (2001a).** Présentation du réseau d'Allergovigilance. *Rev Fr Allergol Immunol Clin.* 2001;41(8):685-690.
- Moneret-Vautrin DA (2001b).** Risques et bénéfices de la transgénèse vis-à-vis de l'allergie. Actes du colloque de l'Afssa « OGM et alimentation : peut-on évaluer les bénéfices pour la santé ? », 17-18 Déc 2001. Disponible sur / Available at: <http://www.afssa.fr>
- Moneret-Vautrin DA (2003).** The allergic risk of transgenic foods : strategy for prevention. *Ann Pharm Fr.* 2003 Mar;61(2):96-102.
- Moneret-Vautrin DA et al. (2005).** Registre des anaphylaxies alimentaires sévères rapportées au Réseau Français d'Allergovigilance de 2001 à 2004. Disponible sur / Available at: <http://www.cicbaa.org>
- Moneret-Vautrin DA (2006).** OGM et modifications d'immunogénicité. *Alim'Inter.* 2006 Mar;11(2) :63-65.
- Morisset M, Parisot L (2004).** Réseau National d'Allergovigilance : comparaison des relevés des années 2002 et 2003. *Alim'Inter.* Mars 2004;10(2):68-72. Disponible sur / Available at: <http://www.cicbaa.org>

- Morisset M et al. (2005).** Prevalence of peanut sensitization in a population of 4,737 subjects--an Allergo-Vigilance Network enquiry carried out in 2002. *Allerg Immunol (Paris)*. 2005 Feb;37(2):54-57.
- Moneret-Vautrin DA (2006).** OGM et modifications d'immonogénicité. *Alim'Inter*. 2006 Mar;11(2) :63-65.
- Morton RL et al. (2000).** Bean alpha-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:3820-3825.
- Nakamura R, Matsuda T (1996).** Rice allergenic protein and molecular-genetic approach for hypoallergenic rice. *Biosci Biotech Biochem*. 1996;60(8):1215-1221.
- Nestle M (1996).** Allergies to transgenic foods – Questions of policy. *N Engl J Med*. 1996 Mar 14;334(11):726-728.
- Nordlee JA et al. (1996).** Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *N Engl J Med*. 1996 Mar 14;334(11):688-692. Disponible sur / Available at: <http://content.nejm.org>
- Ogawa T et al. (1991).** Investigation of the IgE-binding proteins in soybeans by immunoblotting with the sera of the soybean-sensitive patients with atopic dermatitis. *J Nutr Sci Vitaminol*. 1991;37:555-565.
- Ogawa T et al. (1993).** Identification of the soybean allergenic proteins, Gly m Bd 30 K, with the soybean seed 34 kDa oil-body-associated protein. *Biosci Biotech Biochem*. 1993;57:1030-1033.
- Ogawa T, Samoto M, Takahashi K (2000).** Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2000;46:271-279.
- Ogura Y et al. (1993).** The usefulness and limitations of the radioallergosorbent test in diagnosing food allergy in atopic dermatitis. *Arerugi*. 1993 Jun;42(6):748-756.
- Pastorello EA et al. (1998).** Sensitization to the major allergen of Brazil nut is correlated with the clinical expression of allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1998 Dec;102(6 Pt 1):1021-1027.
- Paterson JCM et al. (2002).** Modulation of a heterologous immune response by the products of *Ascaris suum*. *Infect Immun*. 2002 Nov;70(11):6058-6067. Disponible sur / Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov>
- Pedersen MH et al. (2004).** Evaluation of the potential allergenicity of the enzyme microbial transglutaminase using the 2001 FAO/WHO Decision Tree. *Mol Nutr Food Res*. 2004 Nov;48(6):434-430.
- Pioneer Hi-Bred (2003).** Biotechnology – Biotech soybeans and Brazil nut protein. *Pioneer Hi-Bred*. 2003 July 23. Disponible sur / Available at: <http://www.pioneer.com>
- Prescott VE et al. (2005).** Transgenic expression of bean  $\alpha$ -amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicity. *J Agric Food Chem*. 2005 Nov 16;53(23):9023-9030.
- Pusztai A et al. (1999).** Expression of the insecticidal bean  $\alpha$ -amylase inhibitor transgene has minimal detrimental effect on the nutritional value of peas fed to rats at 30% of the diet. *J Nut*. 1999;129:1597-1603. Disponible sur / Available on : <http://jn.nutrition.org>
- Rabjohn P et al. (1999).** Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J Clin Invest*. 1999 Feb;103(4):535-542. Disponible sur / Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov>
- Rancé F, Grandmottet X, Grandjean H (2005).** Prevalence and main characteristics of schoolchildren diagnosed with food allergies in France. *Clin Exp Allergy*. 2005 Feb;35(2):167-172.
- Raybourne RB et al. (2003).** Development and use of an ELISA test to detect IgE antibody to Crygc following possible exposure to bioengineered corn. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003 Dec;132(4):322-328.
- Robinson C (2003).** Modification génétique et alimentation – Santé et sécurité du consommateur. ILSI Europe concise monograph series. ILSI Press (Bruxelles).
- Samoto M et al. (1997).** Substantially complete removal of three major allergenic soybeans proteins (Gly m Bd 30 K, Gly m Bd 28 K, and the alpha-subunit of conglycinin) from soy protein by using a mutant soybean, Tohoku 124. *Biosci Biotech Biochem*. 1997;61:2148-2150.
- Sanchez C, Frémont S (2003).** Conséquences des traitements thermiques et de la formulation sur la structure et l'allergénicité des protéines alimentaires. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*. 2003;43(1):13-20.



- Sander I et al. (2001).** Identification of wheat flour allergens by means of 2-dimensional immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 May;107(5):907-913.
- Santé Canada (2002).** Réglementation des végétaux à caractères nouveaux au Canada. Agence canadienne d'inspection des aliments – Direction des produits végétaux – Bureau de la biosécurité végétale. Disponible sur / Available at: <http://www.inspection.gc.ca>
- Scheurer S et al. (2004).** Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Oct;114(4):900-907.
- Scholl I et al. (2005).** Antiulcer drugs promote oral sensitization and hypersensitivity to hazelnut allergens in BALB/c mice and humans. *Am J Clin Nutr.* 2005 Jan;81(1):154-160.
- Schroeder HE et al. (1995).** Transgenic pea seeds expressing the  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchids beetles. *Biotechnol.* 1994;12:793-796.
- Shewry PR, Tatham AS, Halford NG (2001).** Genetic modification and plant food allergens: risks and benefits. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001 May 25;756(1-2):327-335.
- Sicherer SH, Munoz-Furlong A, Sampson HA (2003).** Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey : a 5-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Dec;112(6):1203-1207.
- Spök A et al. (2005).** Suggestions for the assessment of the allergenic potential of genetically modified organisms. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005 Jun;137(2):167-180. Epub 2005 June 8.
- Stadler MB, Stadler BM (2003).** Allergenicity prediction by protein sequence. *FASEB J.* 2003 Jun;17(9):1141-1143. Epub 2003 Apr 22. Disponible sur / Available at: <http://www.fasebj.org>
- Sten E et al. (2004).** A comparative study of the allergenic potency of wild-type and glyphosate-tolerant gene-modified soybean cultivars. *APMIS.* 2004 Jan;112(1):21-28.
- Stickler M et al. (2003).** A human dendritic cell-based method to identify CD4+ T-cell epitopes in potential protein allergens. *Environ Health Perspect.* 2003 Feb;111(2):251-254.
- Suszkiv J (2002).** Researchers develop first hypoallergenic soybeans. *Agricultural Research Magazine* (published by USDA-ARS). 2002 Sep;50(9):16-17. Disponible sur / Available at: <http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/sep02/>
- Sutton SA et al. (2003).** A negative, double-blind, placebo-controlled challenge to genetically modified corn. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112(5):1011-1012.
- Tada Y et al. (1996).** Reduction of 14-16 kDa allergenic proteins in transgenic rice plants by antisense gene. *FEBS Lett.* 1996 Aug 12;391(3):341-345.
- Taneva SG et al. (2000).** Redox- and pH-dependent association of plastocyanin with lipid bilayers: effect on protein conformation and thermal stability. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Feb 15;1463(2):429-438.
- Taylor SL, Lehrer SB (1996).** Principles and characteristics of food allergens. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1996;36:S91-118
- Taylor SL, Hefle S (2001).** Will genetically modified foods be allergenic? *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107:765-771.
- Tennant P et al. (2001).** Papaya ringspot virus resistance of transgenic Rainbow and Sunup is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. *Eur J Plant Pathol.* 2001 July;107(6):645-653.
- Teshima R et al. (2002).** Effect of subchronic feeding of genetically modified corn (CBH351) on immune system in BN rats and B10A mice. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 2002 Oct;43(5):273-279.
- Teuber SS (2002).** Hypothesis: the protein body effect and other aspects of food matrix effects. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 May;964:111-116.
- Thomas K et al. (2004).** A multi-laboratory evaluation of a common *in vitro* pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2004 Apr;39(2):87-98.
- Tryphonas H et al. (2003).** Animal models to detect allergenicity to foods and genetically modified products : workshop summary. *Environ Health Perspect.* 2003;111:221-222. Disponible sur / Available at: <http://ehp.niehs.nih.gov>

- Tyssandier V et al. (2003).** Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Jun;284(6):G913-923. Disponible sur / Available at: <http://ajpgi.physiology.org>
- Urisu A et al. (1991).** 16 kDa rice protein is one of the major allergens in rice grain extract and responsible for cross allergenicity between cereal grains in the poaceae family. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991;96:244-252.
- USDA-APHIS (1996).** Cornell University and University of Hawaii; Availability of determination of non-regulated status for papaya lines genetically engineered for virus resistance. *Federal Register.* 1996 Sep 16;61(180):48663-48664. Disponible sur / Available at: <http://www.epa.gov/fedrgstr/>
- Van Hoeyveld EM et al. (1998).** Allergenic and antigenic activity of peptide fragments in a whey hydrolysate formula. *Clin Exp Allergy.* 1998 Sep;28(9):1131-1137.
- Van Kampen V, Merget R, Baur X (2000).** Occupational airway sensitizers: an overview on the respective literature. *Am J Ind Med.* 2000 Aug;38(2):164-218.
- Van Loon LC, Van Strien EA (1999).** The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol mol Plant Pathol.* 1999;55:85-97. Disponible sur / Available at: <http://www.bio.uu.nl>
- Van Ree R (2002).** Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. *Int Arc Allergy Immunol.* 2002;129:189-197.
- Vervloet D, Magnan A (2003).** Traité d'allergologie. Flammarion Médecine-Sciences (Paris). 2003.
- Vieths S et al. (1998).** Factors influencing the quality of food extracts for *in vitro* and *in vivo* diagnosis. *Allergy.* 1998;53(46 Suppl):65-71.
- Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B (2002).** Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 May;964:47-68.
- Wal JM (1998a).** Les aliments transgéniques n'entraînent-ils pas des problèmes d'allergie? Dossiers d'information scientifique. Organismes génétiquement modifiés à l'INRA : environnement, agriculture et alimentation. OGM et alimentation. Mai 1998. Disponible sur / Available at: <http://www.inra.fr>
- Wal JM, Pascal G (1998b).** Benefits and limits of different approaches for assessing the allergenic potential of novel foods. *Allergy.* 1998;53:98-101.
- Wal JM (2001).** Structure and function of milk allergens. *Allergy.* 2001;56 Suppl 67:35-38.
- Wal JM (2003).** Thermal processing and allergenicity of foods. *Allergy.* 2003 Aug;58(8):727-729.
- Yano H et al. (2001).** A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Apr 10;98(8):4794-4799. Disponible sur / Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov>
- Zavodszky M (2001).** Disulfide bond effects on protein stability : designed variants of Cucurbita maxima trypsin inhibitor-V. *Protein Sci.* 2001 Jan;10(1):149-160. Disponible sur / Available at: <http://www.proteinscience.org>
- Zorzet A, Gustafsson M, Hammerling U (2002).** Prediction of food protein allergenicity: a bioinformatic learning systems approach. *In Silico Biol.* 2002;2(4):525-534. Disponible sur / Available at: <http://www.bioinfo.de/isb>

# AUTRES TRAVAUX DE L'AFSSA EN LIEN AVEC CETTE THÉMATIQUE

## OTHER PUBLICATIONS BY AFSSA IN RELATION TO THIS THEME

■ Enquête sur les besoins en informations et les bonnes pratiques de fabrication vis-à-vis des allergènes dans l'industrie agroalimentaire française (septembre 2005).

■ Allergies alimentaires – Connaissances, clinique et prévention (janvier 2004).

*Cette synthèse est disponible sur le site Internet du Ministère de la Santé :*  
<http://www.sante.gouv.fr> thème Nutrition.

■ Allergies alimentaires – État des lieux et propositions d'orientations (janvier 2002).

■ OGM et alimentation :

Peut-on évaluer des bénéfices pour la santé ?

Actes du colloque international (17-18 décembre 2001).

Peut-on améliorer l'évaluation des risques pour la santé ? Avis de l'Afssa (janvier 2002).

■ OGM et alimentation : peut-on identifier et évaluer des bénéfices pour la santé ? – Étude au travers de 4 exemples (juin 2004).

*Ces rapports sont disponibles sur le site Internet de l'Afssa :*  
<http://www.afssa.fr> rubrique Publications.

■ *Inquiry into the needs for information and good manufacturing practices with regard to allergens in the French food processing industry (September 2005).*

■ *Food allergies – Knowledge, clinical information and prevention (January 2004).*

*This review is available on the Ministry for Health's website:*

<http://www.sante.gouv.fr> under the theme of Nutrition.

■ *Food allergies – Inventory and proposals of guidelines (January 2002).*

■ *GMOs and food:*

*Can the health benefits be assessed? International Conference Acts (17-18 December 2001).*

*Can health risk assessment be improved? Afssa opinion (January 2002).*

■ *GMOs and food: Can the health benefits be identified and assessed? – Study on 4 examples (June 2004).*

*These reports are available on Afssa's website: <http://www.afssa.fr> Publications section.*

27-31, avenue du Général Leclerc  
94701 MAISONS-ALFORT cedex  
[www.afssa.fr](http://www.afssa.fr)

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE