

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

Coordination rédactionnelle / *Drafting coordination*

Céline Le Stunff

Sébastien La Vieille

Ambroise Martin

Coordination éditoriale / *Editorial coordination*

Carole Thomann

Liste des abréviations

Int : international, *EU* : européen, *F* : français, *US* : américain, *UK* : britannique, *Can* : canadien, *Aus* : australien

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ACIA	Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (Can)
AESA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments = EFSA (EU)
APHIS	Animal and Plant Health and Inspection Service (USDA, US)
ARN	Acide RiboNucléique
α AI	Inhibiteur d'alpha-amylase
BN	<i>Brown Norway</i>
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CCA	Commission du Codex Alimentarius (Int)
CCD	Cross-reactive Carbohydrate Determinants
CDC	Centers for Disease Control and prevention (US)
CE	Communauté Européenne (EU)
CICBAA	Centre d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire (F)
CSIRO	Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (Aus)
EAST	Enzyme Allergo Sorbent Test
EFSA	European Food Safety Agency = AESA (EU)
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPA	Environmental Protection Agency (US)
FALCPA	Food Allergen and Consumer Protection Act (US)
FARRP	Food Allergy Research and Resource Program (US)
FAO	Food and Agriculture Organization (Int)
FDA	Food and Drug Administration (US)
FD&C Act	Federal food, Drug and Cosmetic Act (US)
FSA	Food Standards Agency (UK)
GM	Génétiquement Modifié
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFBC	International Food Biotechnology Council (Int)
Ig	Immunoglobulines
ILSI	International Life Science Institute (Int)
i.p.	intra-péritonéale [voie]
IRI	Information Resources, Inc. (UK)
kDa	kiloDalton
LTP	Lipid Transfer Protein
MG	Modification Génétique
MGM	Microorganisme Génétiquement Modifié
NCFST	National Center for Food Safety and Technology (US)
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques (Int)
OGM	Organisme(s) Génétiquement Modifié(s)
OMC	Organisation Mondiale du Commerce (Int)
OMS	Organisation Mondiale pour la Santé = WHO (Int)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGM	Plante(s) Génétiquement Modifiée(s)
PIR	Protein Information Resource (US)
PR	Pathogenesis-Related [protein]
RAST	Radio Allergo Sorbent Test
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SDAP	Structural Database of Allergenic Proteins (US)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TNS	Taylor Nelson Sofres (UK)
TPODA	Test de Provocation Orale en Double Aveugle [contre placebo]
UE	Union Européenne (EU)
USDA	United States Department of Agriculture (US)
VCN	Végétal / Végétaux à Caractères Nouveaux (Can)
VTA	Virus des Tâches Annulaires
WHO	World Health Organization = OMS (Int)

Personnes ayant contribué à la rédaction du rapport

Louis-Aimé Aumaître
Institut national de la recherche agronomique, Département élevage des monogastriques
(Saint-Gilles).

Pierre Besançon
*Université de Montpellier II, Département agroressources et procédés biologiques et
industriels.*

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

Francine Casse
Université de Montpellier II.

Patrick Fach
*Afssa – Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et les procédés
agroalimentaires (Maisons-Alfort).*

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

Philippe Joudrier
*Institut national de la recherche agronomique – UMR Polymorphismes d'intérêt
agronomique (Montpellier).*

Henri Malandain
Centre hospitalier Bretagne Atlantique, Laboratoire de biochimie (Vannes).

Gabriel Peltre
*École supérieure de physique et de chimie industrielles, Laboratoire allergie et
environnement (Paris).*

Fabienne Rancé
Hôpital des enfants, Allergologie – pneumologie (Toulouse).

Maxime Schwartz
Afssa, Direction de la programmation des laboratoires (Maisons-Alfort).

Jean-Pierre Zalta
Université de 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.***

Sommaire

Liste des abréviations	3
Résumé.....	7
Introduction.....	8
1 Maladies allergiques, atopie et allergie alimentaire	10
2 Allergénicité des protéines	12
2.1 <i>Quantité présente dans l'aliment</i>	12
2.2 <i>Masse moléculaire</i>	12
2.3 <i>Structure tridimensionnelle</i>	13
2.4 <i>Modifications post-traductionnelles</i>	13
2.5 <i>Résistance aux pH acides et à la digestion enzymatique</i>	14
2.6 <i>Thermostabilité</i>	14
2.7 <i>Fonction au sein de l'organisme vivant</i>	15
2.8 <i>Influence des traitements technologiques</i>	16
3 Conséquences possibles d'une modification génétique sur la composition d'un aliment.....	17
3.1 <i>La modification génétique</i>	17
3.2 <i>Effets directs de l'insertion de gènes et de leurs produits</i>	17
3.3 <i>Effets indirects et inattendus de l'expression d'un gène : le pléiotropisme</i>	17
3.4 <i>Mutations inattendues résultant de l'insertion de gènes ou du réarrangement de gènes</i>	18
3.5 <i>Risques allergiques théoriques liés à la modification génétique</i>	18
4 Méthodes d'évaluation de l'allergénicité d'une PGM.....	19
4.1 <i>Principe de l'équivalence substantielle</i>	19
4.2 <i>Les méthodes actuelles</i>	19
4.2.1 <i>Etude de l'allergénicité de l'espèce à l'origine du transgène</i>	19
4.2.2 <i>Homologie de séquence avec des allergènes connus</i>	20
4.2.3 <i>Digestion enzymatique <i>in vitro</i></i>	21
4.2.4 <i>Tests immunologiques</i>	22
4.2.5 <i>Autres tests</i>	23
4.2.6 <i>A propos de l'utilisation de protéines recombinantes</i>	24
4.3 <i>Les méthodes en développement</i>	24
4.3.1 <i>Modèles animaux</i>	24
4.3.2 <i>Protéomique et « allergomique »</i>	26
4.3.3 <i>Représentation différentielle</i>	27
4.4 <i>Discussion</i>	27
5 Les variétés hypoallergéniques : un bénéfice apporté par les PGM ?.....	29
5.1 <i>Arachide hypoallergénique</i>	29
5.2 <i>Riz hypoallergénique</i>	30
5.3 <i>Soja hypoallergénique</i>	30
5.4 <i>Blé hypoallergénique</i>	31
5.5 <i>Pommier hypoallergénique</i>	32
5.6 <i>Discussion</i>	33

6 Risques potentiels liés à certaines PGM : problèmes d'allergie évoqués dans la littérature.....	34
6.1 <i>Le soja enrichi en méthionine (1996)</i>	34
6.1.1 L'étude de Nordlee et al. (1996).....	34
6.1.2 Discussion.....	34
6.2 <i>Le maïs Starlink™ (2000)</i>	35
6.2.1 Rappels.....	35
6.2.2 Études menées par les autorités américaines.....	35
6.2.3 Autres études.....	37
6.2.4 Conclusion.....	38
6.3 <i>La papaye résistante au virus "ring spot" (2002)</i>	38
6.4 <i>Le petit pois résistant à la bruche (2005)</i>	40
6.5 <i>Y-a-t-il des PGM à surveiller plus particulièrement ?</i>	41
7 Aspects réglementaires et surveillance accompagnant la mise sur le marché des OGM.....	42
7.1 <i>Étiquetage des ingrédients allergènes</i>	42
7.2 <i>Étiquetage et traçabilité des OGM</i>	42
7.2.1 Dans l'Union Européenne.....	42
7.2.2 Aux Etats-Unis et au Canada.....	45
7.3 <i>Surveillance épidémiologique</i>	46
7.3.1 Le réseau National d'Allergovigilance.....	46
7.3.2 Mise en place de sérothèques.....	46
7.4 <i>Surveillance après la mise sur le marché des OGM</i>	47
7.4.1 Principe.....	47
7.4.2 Etude de faisabilité de la Food Standards Agency sur les données d'exposition.....	47
7.4.3 Surveillance après la mise sur le marché et allergies alimentaires.....	48
Conclusion.....	49
Annexe 1 : Arbre de décision IFBC/ILSI (1996).....	51
Annexe 2 : Arbre de décision FAO/WHO (2000).....	52
Annexe 3 : Arbre de décision FAO/WHO (2001).....	53
Annexe 4 : Formulaire de déclaration d'un accident allergique grave.....	54
Bibliographie / References.....	55

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 du Brésil. L'allergénicité de ce soja a été prouvée mais cette PGM est restée au stade expérimental ;
- Le maïs StarlinkTM (2000), autorisé aux Etats-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 StarlinkTM 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.

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, 2005_a). 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.

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 Etats-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) .

A la demande de la France et d'autres Etats 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"¹.

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 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.

¹ A la demande de la France et d'autres Etats 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.

1 Maladies allergiques, atopie et allergie alimentaire

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 IgE², 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) :

- 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).

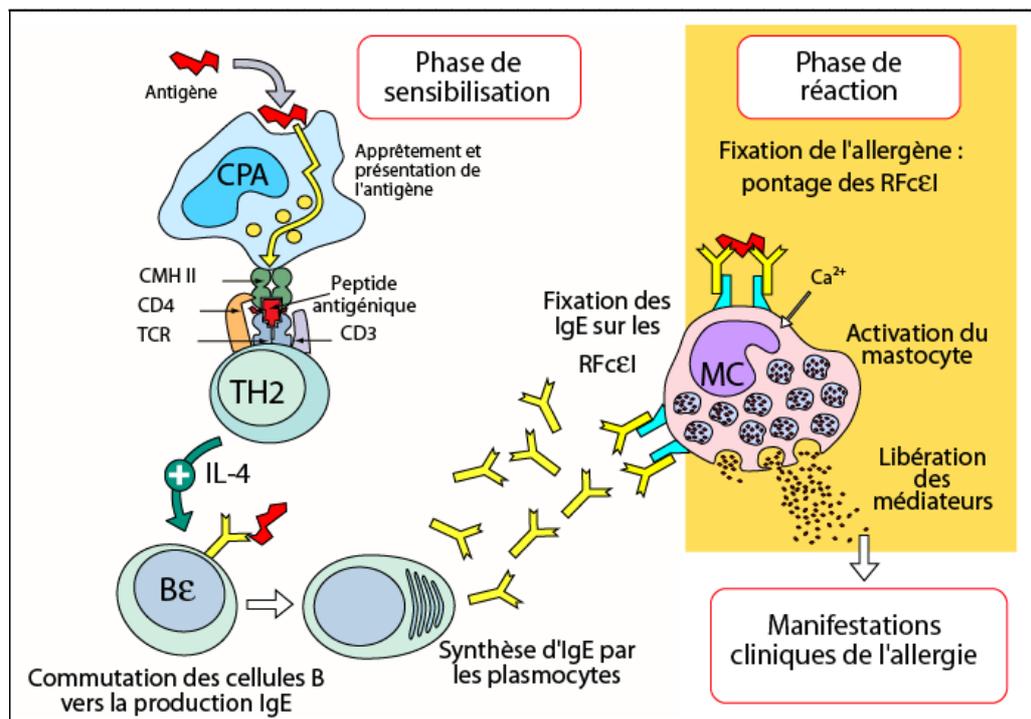


Figure 1 : les phases de sensibilisation et de réaction allergique
(Source : Peltre G, communication personnelle)

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.

² Immunoglobulines E

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.

Etant 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...).

2 Allergénicité des protéines

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 structurales 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 structurale *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.

2.1 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).

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 majeur³ de la pêche, se trouve en quantité sept fois plus importante dans la peau que dans la pulpe du fruit (Carnes, 2002).

2.2 Masse moléculaire

La plupart des allergènes auraient une masse moléculaire comprise entre 10 et 70 kDa⁴. 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*

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

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 HPLC⁵, 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-PAGE⁶) : ce sont alors des sous-unités de la molécule initiale qui sont visualisées.

2.3 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 (Cf.2.4),
- 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).

2.4 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 si des arguments récents tendent à nuancer cette position (Kochuyt, 2005). Le problème

⁵ High Performance Liquid Chromatography

⁶ Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

des IgE “anti-carbohydate” provient de la fréquence des réactions croisées observées *in vitro* entre épitopes glucidiques, d'où le nom de “CCD”⁷ qui leur a été attribué.

2.5 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 (Cf.4.2.3).

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).

2.6 Thermostabilité

Les protéines dites globulaires ont, outre leur structure primaire (enchaînement des acides aminés), une structure secondaire (présence d'hélices α et de feuillets β), 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.

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 (LTP⁸ 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 PR10⁹) présents dans le soja et l'arachide (plantes oléagineuses) sont encore capables de déclencher des réactions systémiques après chauffage des produits allergisants (Mittag, 2004_a, 2004_b) : 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.

⁷ Cross-reactive Carbohydrate Determinants

⁸ Lipid Transfer Protein

⁹ Pathogenesis-Related

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).

2.7 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).

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 végétaux¹⁰ 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' α -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, 2004_a), 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

2.8 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 (Cf.2.6).

3 Conséquences possibles d'une modification génétique sur la composition d'un aliment

3.1 La modification génétique

La MG¹¹ 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'ADN¹² 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.

3.2 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 (Cf.6.1) ;
- 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 ;
- 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).

3.3 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

¹¹ Modification Génétique

¹² Acide DésoxyriboNucléique

l'augmentation du taux de certains allergènes dans l'aliment. Ces effets, dits pléiotropiques, ne sont toutefois pas spécifiques de l'état d'OGM.

3.4 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.

3.5 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, Cf.3.3). 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.

4 Méthodes d'évaluation de l'allergénicité d'une PGM

4.1 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.

4.2 Les méthodes actuelles

Les recommandations du Comité d'experts FAO/WHO¹³ 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'IFBC¹⁴/ILSI¹⁵ 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'EFSA¹⁶ n'a pas non plus retenu l'arbre décisionnel dans son rapport sur l'évaluation des risques liés aux OGM (EFSA, 2004).

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.*

4.2.1 Etude 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 ?

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)

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-Prot¹⁷ - Université de Genève et European Bioinformatic Institute, UK
- PIR¹⁸ (Protein Information Resource) - National Biomedical Research Foundation et Georgetown University Medical Center, USA
- SDAP¹⁹ (Structural Database of Allergenic Proteins) - Université du Texas, USA
- Allergen Database du CSL²⁰ - Central Science Laboratory, UK
- Allergen Database de l'I2R²¹ - Institute for Infocomm Research, Singapour
- Allergen Sequence Database du NCFST²² - National Center for Food Safety and Technology, Illinois Institute of technology, USA
- Allergen Database du FARRP²³ - Food Allergy Research and Resource Program, USA
- Allergome²⁴ : 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.

A 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).

4.2.2 Homologie de séquence avec des allergènes connus

Principe

Des banques de données répertoriant les allergènes connus et leur séquence sont disponibles sur internet (Cf.4.2.1). 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.

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

¹⁷ <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>

¹⁸ <http://pir.georgetown.edu/>

¹⁹ http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_src.html

²⁰ <http://allergen.csi.gov.uk/>

¹⁷ <http://sdmc.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/Allergen/>

¹⁸ <http://www.iit.edu/~sgendel/fa.htm>

¹⁹ <http://allergenonline.com>

²⁰ <http://allergome.org>

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, 1998_b) : 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 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.

4.2.3 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).

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.

4.2.4 Tests immunologiques

Il existe un grand nombre et une grande variété de tests immunochimiques. Dérivés des tests radioimmunologiques (RAST²⁵), ils sont aujourd'hui souvent basés sur des réactions immunoenzymatiques (réactions colorimétriques : ELISA²⁶, EAST²⁷), ou une détection par luminescence (Immulite DC, Centaur Bayer) ou par fluorescence (CAP, Pharmacia).

4.2.4.1 Dépistage sur sérums humains "spécifiques"

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%.

4.2.4.2 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 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.

²⁵ Radio Allergo Sorbent Test

²⁶ Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

²⁷ Enzyme Allergo Sorbent Test

4.2.4.3 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 (Cf.2.4). 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-carbohydrates" 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).

4.2.5 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.

4.2.5.1 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.

4.2.5.2 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 donnée, ce qui est impossible avec les tests précédemment cités, et qui reste difficile avec les modèles animaux (Cf.4.3.1), plus ou moins bien représentatifs du système immunitaire humain.

4.2.6 A 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 (Cf.2.4). 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*TM (Cf.6.2.2).

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.

4.3 Les méthodes en développement

4.3.1 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 adjuvant²⁸, 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 murins²⁹ 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 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.³⁰ 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***³¹ : 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 (+++) ³², noisette (+++) > épinard (0) > 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.

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

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

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,

(0) : aliment non-allergisant chez l'homme.

- 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 immune 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" (Cf.5.4).

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 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.

4.3.2 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. A 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 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.

4.3.3 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-PCR³³) sont réalisées à partir des ARN³⁴ 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.

4.4 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 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

³³ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

³⁴ Acide RiboNucléique

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.

5 Les variétés hypoallergéniques : un bénéfice apporté par les PGM ?

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 Etats-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.

5.1 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 Etats-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.

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 cals, 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 inconnues³⁵. Il est peu réaliste de parvenir à toutes les éliminer ou les modifier, tout en conservant une plante viable.

5.2 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 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. Etant 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.

5.3 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.

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

Herman et al. (2003) ont cherché à éliminer de la graine la protéine *P34*, de 30 kDa, appartenant à la famille des papaines 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.

5.4 Blé hypoallergénique

Les réactions allergiques au blé sont provoquées par un certain nombre de protéines allergènes telles que les α -gliadines, les inhibiteurs d' α -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 cœliaques volontaires. De plus, les épitopes T caractérisés dans la maladie cœliaque 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.

5.5 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 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.

5.6 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 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.

6 Risques potentiels liés à certaines PGM : problèmes d'allergie évoqués dans la littérature

6.1 Le soja enrichi en méthionine (1996)

6.1.1 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.

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).

6.1.2 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. Etant 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 Etats-Unis concernant les tests précédant la dissémination des OGM (Cf. 7.2.2).

6.2 Le maïs *Starlink*TM (2000)

6.2.1 Rappels

La société Aventis (ex-AgrEvo) a mis au point le maïs *Starlink*TM, 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 Etats-Unis par l'EPA³⁶ 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*TM est survenu en septembre 2000, lorsque des traces de maïs *Starlink*TM ont été retrouvées dans plus de 300 produits destinés à la consommation humaine, notamment des chips et des corn-flakes vendus aux Etats-Unis, ainsi que des gâteaux vendus au Japon. Cette présence peut être expliquée par un mélange accidentel fait après récolte entre le maïs *Starlink*TM 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*TM ont été rapportés à la FDA³⁷ 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*TM entrée dans l'alimentation humaine n'a jamais pu être estimée.

6.2.2 Études menées par les autorités américaines

- **Évaluation de l'allergénicité de la protéine Cry9C du maïs *Starlink*TM 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 plante³⁸.

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.

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 durées³⁹)

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 concluait 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*TM 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 (Cf.2.1).

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*TM, 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.

- **Recherche de maïs *Starlink*TM dans les produits incriminés par les patients**

Selon le rapport du CDC⁴⁰ (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, 2001_b). Sur les 11 échantillons analysés par PCR et ELISA, aucun ne s'est révélé positif⁴¹ 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 n° 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.

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

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.

- **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*TM 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 (Cf.4.2.6) : 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 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.

6.2.3 Autres études

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

- **Etude de l'immunotoxicité du maïs *Starlink*TM sur des modèles murins**

Une étude a comparé le maïs GM *Starlink*TM 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*TM. 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.

- **Etude 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*TM.

- **TPODA⁴² effectué avec du maïs *Starlink*TM 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*TM préparés sur place. Tous les prick-tests étaient négatifs. Le TPODA a été réalisé avec du maïs non GM et du maïs *Starlink*TM 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*TM.

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).

6.2.4 Conclusion

Les investigations qui ont été menées n'ont pas permis d'associer la consommation de maïs *Starlink*TM 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*TM, 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, 2005_b). 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.

6.3 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 VTA⁴³ (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

⁴² Test de Provocation Orale en Double Aveugle

⁴³ Virus des Tâches Annulaires

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 Etats-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, laissent 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-APHIS⁴⁴, avait pour sa part décidé de ne plus considérer la papaye SunUp comme étant soumise au règlement 7 CFR part 340⁴⁵ en lui accordant un statut « non réglementé » (USDA-APHIS, 1996).

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 coelomique 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 parasitaire⁴⁶, 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.

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.

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).

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 (Cf.4.2.1, 4.2.2).

6.4 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' α -amylase (α 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' α -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)).

- **Etude in vivo des effets immunogènes chez la souris BALB/c**

L' α 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' α 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 retardée⁴⁷, une inflammation des voies respiratoires⁴⁸, 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' α 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' α AI du haricot. Aucune réaction n'a été constatée : les effets immunogènes observés précédemment sont donc spécifiques de l' α AI du petit pois GM.

D'autres expériences non détaillées ici ont montré que l' α 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).

- **Etude de la structure moléculaire de l' α AI**

L'étude des protéines purifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF montre des différences de masse moléculaire entre la structure de l' α AI naturellement synthétisé dans le haricot, et la structure de l' α 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 (Cf. 2.4). Les cellules de

⁴⁷ Réaction cutanée observée 24h après injection d' α AI

⁴⁸ Hyperréactivité bronchique, production de mucus et d'éosinophiles après introduction d' α AI dans la trachée

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.

6.5 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, 1998_a).

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 (Cf.2.7). 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, 2001_b). 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.

7 Aspects réglementaires et surveillance accompagnant la mise sur le marché des OGM

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.

7.1 Etiquetage des ingrédients allergènes

La **directive 2003/89/CE** du 10 novembre 2003⁴⁹ 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 exceptions⁵⁰).

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 (>10mg/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 2005⁵¹). 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.

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.

7.2 Etiquetage et traçabilité des OGM

7.2.1 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**⁵² 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

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.

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

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**⁵³ 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.

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 spécifique⁵⁴.

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.

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

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

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

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**⁵⁵ 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**⁵⁶ 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 identificateurs uniques attribués à ces OGM (Cf. règlement 65/2004/CE ci-après).

A 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.

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**⁵⁷ 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'OCDE⁵⁸ et le centre d'échange pour la prévention des

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.

⁵⁷ Journal Officiel des Communautés européennes n° L 10 du 16/01/2004 p. 0005 – 0010.

⁵⁸ Organisme de Coopération et de Développement Économique

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

↳ 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.

7.2.2 Aux Etats-Unis et au Canada

A titre de comparaison, il est intéressant de se pencher sur la réglementation outre-Atlantique concernant l'étiquetage et la traçabilité des OGM.

Aux Etats-Unis (Bren, 2003), trois organismes réglementent les OGM : l'USDA⁵⁹, 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 Act⁶⁰ (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, 2001_a). 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 »⁶¹ 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 »⁶², 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).

Au Canada (Santé Canada, 2002), les VCN⁶³ sont réglementés par l'ACIA⁶⁴. 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

⁵⁹ United States department of Agriculture

⁶⁰ Federal Food, Drug and Cosmetic Act

⁶¹ Ne contient pas d'OGM

⁶² Biologique

⁶³ Végétaux à Caractères Nouveaux

⁶⁴ Agence Canadienne d'Inspection des Aliments

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 Etats-Unis ou au Canada.

7.3 Surveillance épidémiologique

7.3.1 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 CICBAA⁶⁵, a pour objectifs (Moneret-Vautrin, 2001_a) :

- 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 Etats-Unis, participent aussi à la déclaration régulière de nouveaux cas grâce à une correspondance *via* courrier électronique ou télécopie (Annexe 4).

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.

7.3.2 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.

⁶⁵ Cercle d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire

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.

7.4 Surveillance après la mise sur le marché des OGM

7.4.1 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.

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. Etant 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).

7.4.2 Etude 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 FSA⁶⁶ 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 TNS⁶⁷ 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'IRI⁶⁸.

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.

⁶⁶ Food Standards Agency

⁶⁷ Taylor Nelson Sofres

⁶⁸ Information Resources, Inc.

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).

A 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 écologiques⁶⁹ 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.

7.4.3 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 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.

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.

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 de la plante. Il conviendrait de mieux prendre en compte 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.

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.

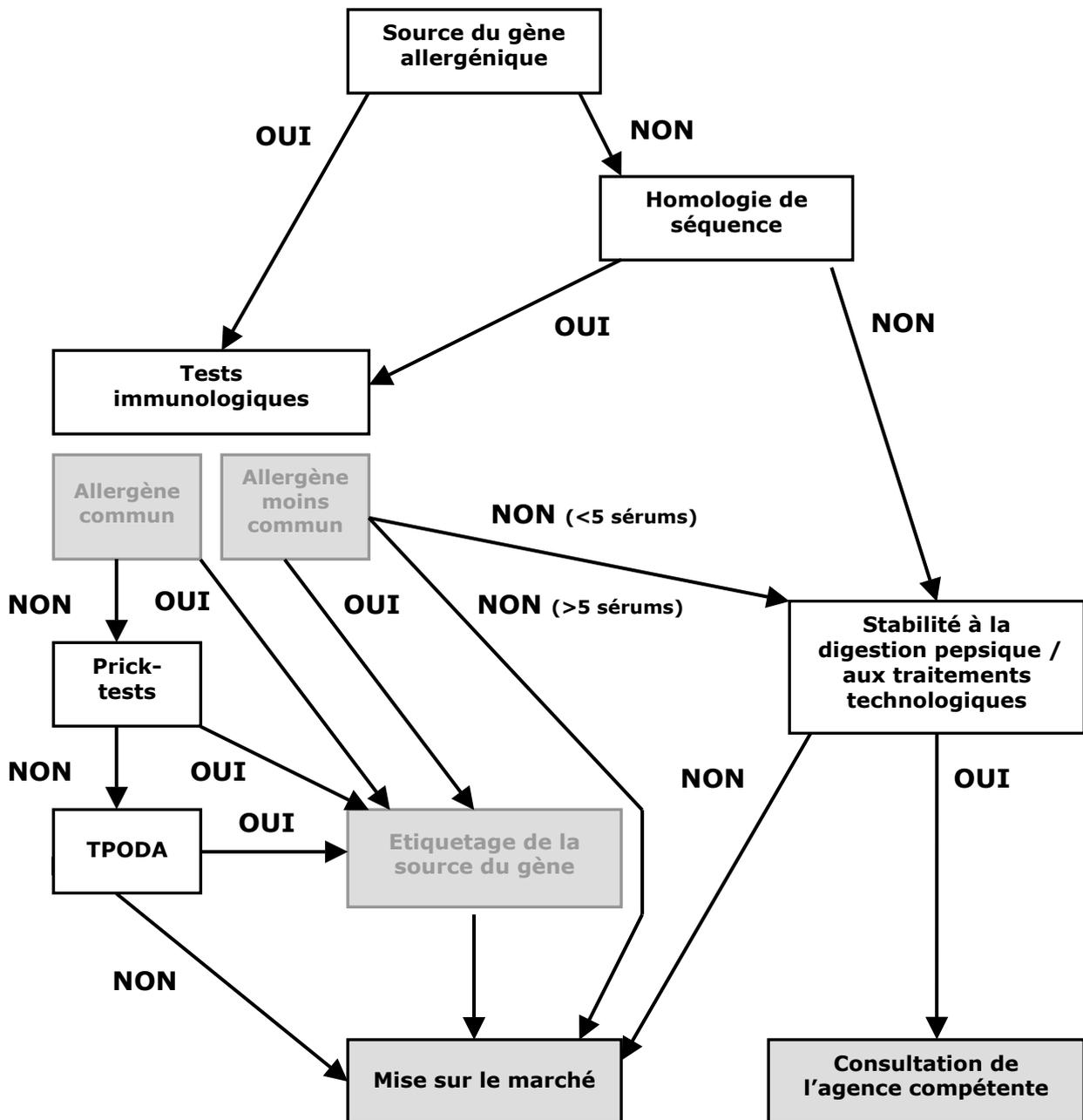
La surveillance et l'évaluation sanitaire des OGM par rapport au risque allergique sont particulièrement rigoureuses en comparaison de celles appliquées soit aux nouvelles variétés obtenues par sélection conventionnelle (aucun contrôle sur cet aspect), soit aux nouveaux aliments (Règlement CE n°258/97)⁷⁰. 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

⁷⁰ Les OGM ne sont plus soumis au règlement 258/97/CE, dit "Novel foods", mais au règlement 1829/2003/CE.

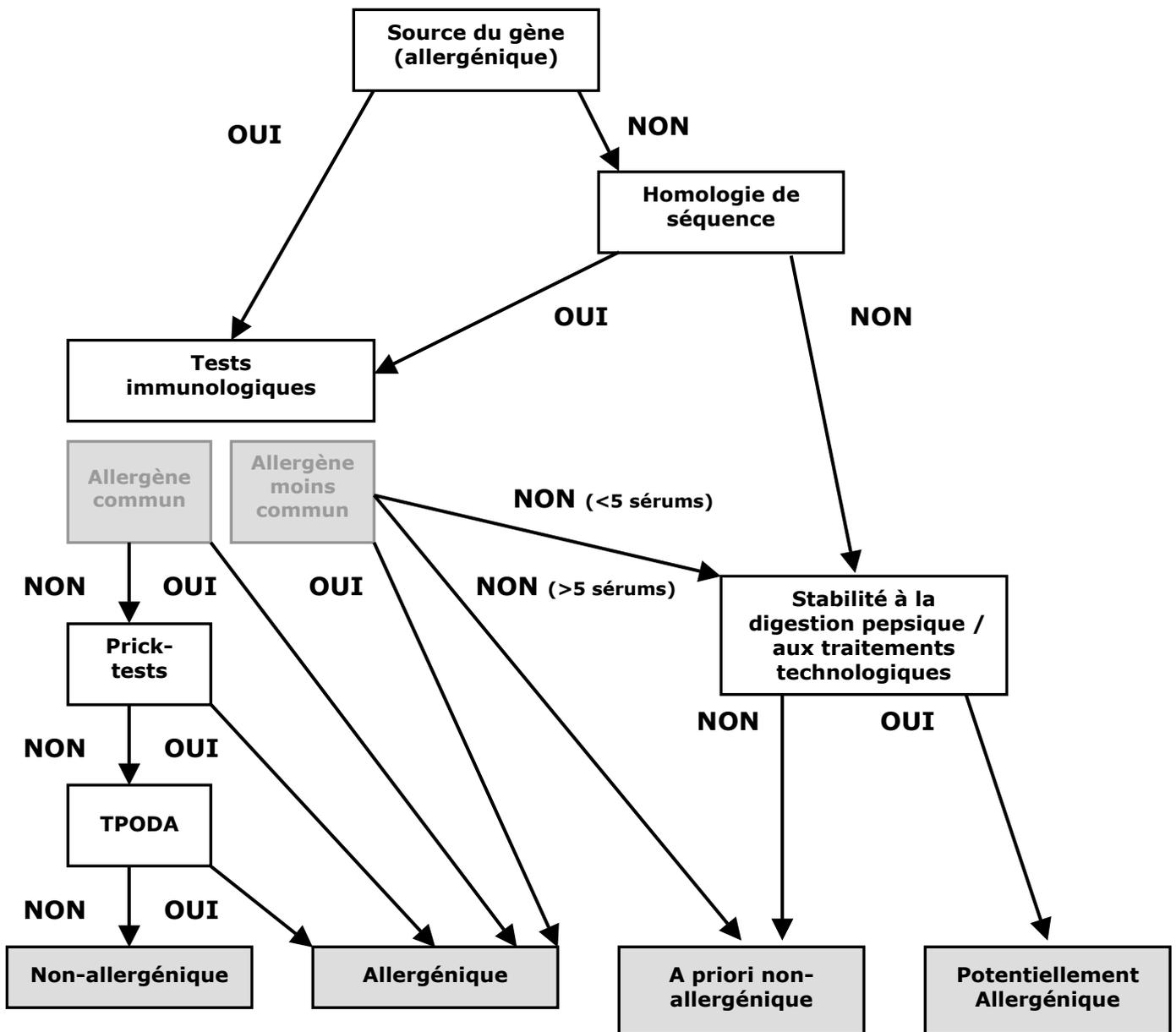
des allergies alimentaires (Hanninen, 1999). En effet, 42% des allergènes végétaux décrits en 2003 étaient des protéines PR (Malandain, 2004_b).

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).

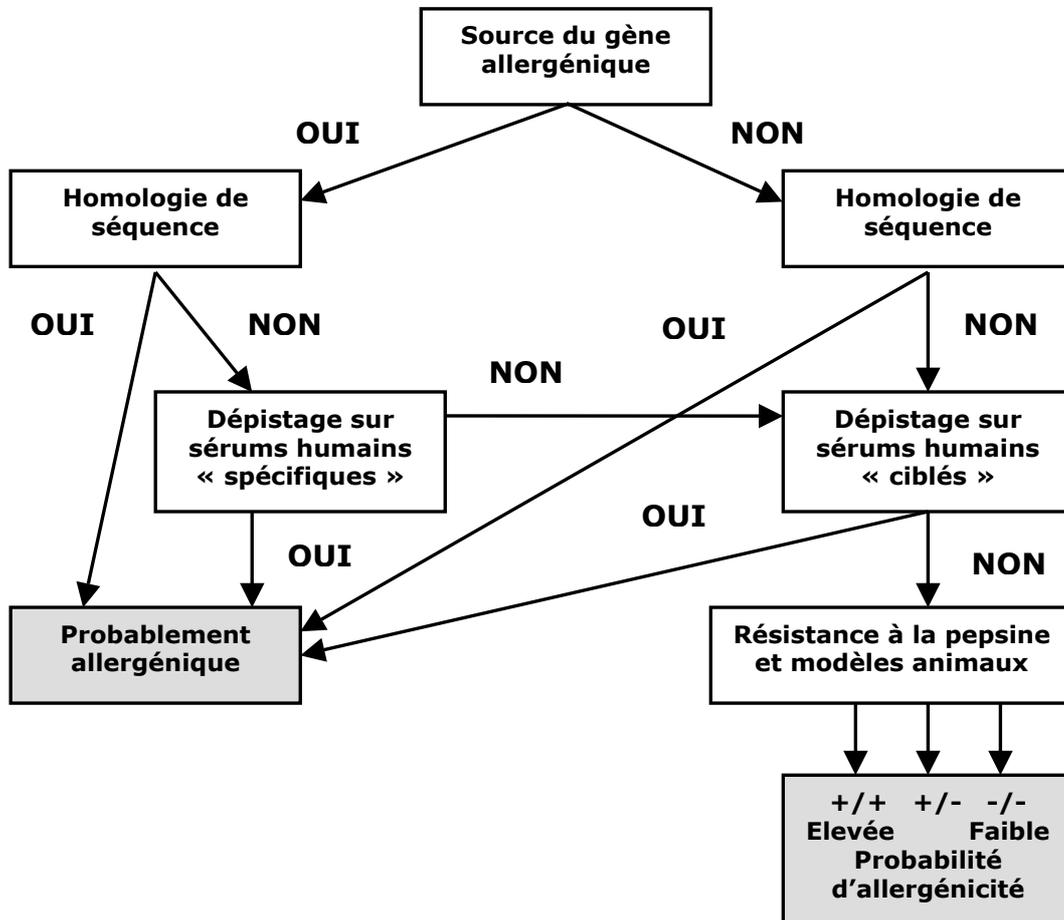
Annexe 1 : Arbre de décision IFBC/ILSI (1996)



Annexe 2 : Arbre de décision FAO/WHO (2000)



Annexe 3 : Arbre de décision FAO/WHO (2001)



Annexe 4 : Formulaire de déclaration d'un accident allergique grave

(Disponible sur les sites <http://www.cicbaa.org> et <http://www.allergique.org>)

RECUEIL D'ÉVÈNEMENTS ALLERGIQUES GRAVES

Réseau d'Allergovigilance (aliments, médicaments, hyménoptères, idiopathiques)

IDENTIFICATION DU MEDECIN (ces données sont à usage interne et n'apparaîtront pas lors de la diffusion du cas clinique) :

Votre nom :
Votre prénom :
Votre email :
Votre ville :
Votre code postal :

DESCRIPTION DU CAS CLINIQUE :

Réaction clinique : Choc anaphylactique – Angioœdème laryngé – Asthme aigu grave – Réaction systémique sérieuse – Autres (remplir alors les commentaires)

Commentaires de la réaction clinique :

Facteurs associés : Effort physique – Prise d'alcool – Prise de médicaments aggravants – Aucun ou autre (remplir alors les commentaires)

Commentaires des facteurs associés :

Conduite tenue : SAU – Hospitalisation – Réanimation – Traitement (adrénaline, ...) – Autre (préciser)

Antécédents : Eczema – Rhinite allergique – Asthme allergique – Dermate atopique – Rhume des foins - Allergie alimentaire

Sexe : M – F

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)

Commentaires du bilan :

Diagnostic retenu : Anaphylaxie à agent identifié – Anaphylaxie idiopathique

Commentaires du diagnostic :

PRECISIONS ALIMENTAIRES :

Circonstances alimentaires : à domicile – au restaurant – chez des amis – cantine d'école – cantine d'entreprise – au sport – ne sais pas

Aliment préemballé ? Oui – Non – Ne sais pas

Aliment en vrac ? Oui – Non – Ne sais pas

Lieu d'achat : sur un marché – chez un artisan – don de nourriture – dans un supermarché – dans un commerce de proximité – ne sais pas

Produit consommé habituellement ? Oui – Non – Ne sais pas

Est-ce une nouvelle recette ? Oui – Non – Ne sais pas

Bibliographie / References

- 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). *Evaluation 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 ? Etude 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>
- Breddehorst 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.
- Bucchini 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^{ème} 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 (2005_a). *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
- Commission Européenne (2005_b). *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
- 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 (2001_a). *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 (2001_b). *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^{ème} 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, Ovomuroid, 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 Dec12;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:S47-50.
- 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 (2004_a). *Basic immunology, allergen prediction and bioinformatics*. Allergy. 2004 Sep;59(9):1011-1012.
- Malandain H, Lavaud F (2004_b). *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.
- Metcalfe DD et al. (1996). *Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants*. Crit Rev Food Sci Nutr. 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. (2004_a). *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. (2004_b). *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 (2001_a). *Présentation du réseau d'Allergovigilance*. Rev Fr Allergol Immunol Clin. 2001;41(8):685-690.
- Moneret-Vautrin DA (2001_b). *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 α -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 α -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 Cry9c 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). *Règlementation 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 α -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.
- Suszkiw 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 Hawai; 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

- 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.