

Maisons-Alfort, le 18 juillet 2003

## AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments  
relatif à une demande de précisions sur les positions prises dans ses avis<sup>1</sup>,  
concernant la mise sur le marché de lignées de maïs et de colza  
génétiquement modifiées tolérantes au glyphosate, concernant (1)  
l'évaluation du pouvoir allergène et (2) l'intérêt de disposer de la séquence  
du transgène inséré dans le génome de la plante**

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 13 juin par la Direction générale de l'alimentation, la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes et la Direction générale de la santé d'une demande de précisions sur les positions prises dans ses avis<sup>1</sup>, relatifs à la mise sur le marché de lignées de maïs et de colza génétiquement modifiées tolérantes au glyphosate, concernant (1) l'évaluation du pouvoir allergène et (2) l'intérêt de disposer de la séquence du transgène inséré dans le génome de la plante.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé "Biotechnologie", réuni le 17 juillet 2003, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments apporte les précisions suivantes.

### 1 EVALUATION DU POUVOIR ALLERGENE

Dans ses avis relatifs à l'évaluation des dossiers d'autorisation de mise sur le marché du maïs NK603 et du colza GT73, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a indiqué que, concernant l'évaluation du pouvoir allergène des produits d'expression des gènes transférés, les données fournies dans ces dossiers "*(résultats de dégradation in vitro des protéines et comparaison de séquences) ne suffisent pas, pour autant, pour conclure de façon certaine à l'absence d'un potentiel toxique et allergénique maïs, qu'en l'état actuel des connaissances, une telle certitude ne pourrait être obtenue pour aucune protéine.*"

Un certain nombre de points sur la connaissance de l'allergénicité et sur la détection des allergènes motive cette assertion.

#### Qu'est-ce qu'un allergène?

Un allergène est, par définition, un antigène reconnu par les anticorps de la classe des immunoglobulines E (IgE) d'un individu souffrant d'allergie ou encore appelée hypersensibilité immédiate de type 1.

#### Pourquoi un antigène est-il allergénique ?

La communauté scientifique a identifié plusieurs centaines d'allergènes protéiques, les caractérisant par leur séquence en acides aminés et certaines de leurs propriétés physico-chimiques telles que la masse moléculaire ou le point isoélectrique. Les fonctions de certaines de ces molécules sont connues pour les plantes ou les animaux qui les produisent : enzymes, molécules de défense, de structure, de réserve, etc. Une

<sup>1</sup> Saisines 2003-SA-0027, 2003-SA-0046 et 2003-SA-0047.

cinquantaine d'allergènes a été cristallisé et leur structure tridimensionnelle déterminée par diffraction des rayons X.

A ce jour, il n'a pas été possible d'associer le caractère "allergène" d'une molécule à une structure donnée. Personne ne sait dire pourquoi un antigène déclenche une réaction allergique. Cependant, on sait que les produits allergisants tels que le pollen, les acariens ou la farine de blé sont souvent constitués d'allergènes distincts. Par ailleurs, on sait que les mêmes molécules qui sont allergéniques pour les humains peuvent l'être aussi pour les souris, les rats, les cobayes conditionnés pour étudier l'allergie humaine. D'autres animaux peuvent être allergiques "naturellement" tels les veaux, les porcelets, les chiens ou les chevaux. Lorsque les allergènes qui les font souffrir peuvent être identifiés, ils appartiennent tous au répertoire des allergènes qui sensibilisent et déclenchent l'allergie chez l'homme.

#### **Comment évalue-t-on le potentiel allergénique d'une protéine<sup>2</sup> ?**

Il convient d'identifier la source de la nouvelle protéine, de la caractériser par ses propriétés physico-chimiques et de comparer sa séquence en acides aminés avec des allergènes connus et répertoriés. La réunion des trois conditions suivantes : non issue d'une source d'allergènes connus, dégradation protéolytique et acide rapide et absence d'homologie de séquences avec celles de molécules allergènes connus, permet de penser que cette nouvelle protéine n'a qu'une faible probabilité d'induire une réaction allergique.

Cependant, en raison de la spécificité de l'hôte et du caractère individuel de la réaction allergique, il convient de garder à l'esprit que même si :

- la nouvelle protéine n'est pas issue d'une source contenant des allergènes connus, cela n'exclut pas qu'elle puisse être à l'origine du développement d'une allergie ;
- la résistance à la protéolyse et à la dégradation thermique constitue des conditions importantes d'allergénicité<sup>3</sup>, l'absence de résistance n'exclut pas la possibilité que la nouvelle protéine soit allergénique ;
- la comparaison de séquences en acides aminés montre une absence d'homologie avec des séquences d'allergènes connus, cela n'exclut pas la possibilité que la nouvelle protéine soit un allergène.

Dans le cas où les conditions citées ci-dessus ne seraient pas réunies, la mise en œuvre de tests *in vitro* et *in vivo* peut s'avérer nécessaire<sup>2</sup>.

**Les tests immuno-chimiques *in vitro*** sont nombreux et très divers dans leur mise en œuvre, mais, en règle générale, ils sont basés sur le principe des dosages par radio-

<sup>2</sup> En se fondant sur les conclusions de la consultation FAO/OMS des experts internationaux (Foods derived from biotechnology, allergenicity of genetically modified foods, 22-25 janvier 2001), le Codex alimentarius a, dans le cadre des lignes directrices pour l'évaluation des dossiers OGM (Guideline for the conduct of safety assessment of foods derived from modified plants), développé une stratégie d'évaluation par étape et élaboré des recommandations particulières pour l'évaluation du pouvoir allergène des nouvelles protéines.

<sup>3</sup> Allergies alimentaires : état des lieux et propositions d'orientations. Janvier 2002. C. Dubuisson, S. La Vieille, A. Martin. Rapport de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (disponible sur le site [www.afssa.fr](http://www.afssa.fr)).

immunologie développés dans les années 60 puis de l'ELISA qui date de 1972 et qui consiste en l'immobilisation de l'allergène sur une phase solide, sa reconnaissance par les IgE des sérums de patients allergiques grâce à des anticorps animaux secondaires marqués. La détection et la quantification de ces anticorps IgE anti-allergènes est la base du diagnostic de routine de l'allergie.

Pour confirmer la nature allergénique d'une molécule purifiée, un certain nombre de **tests *in vivo*** sont disponibles<sup>3</sup> mais ils peuvent poser des problèmes éthiques lorsque le bénéfice attendu pour le patient n'est pas évident.

Tout d'abord les **tests cutanés** :

- l'intra-dermo réaction (IDR) est très sensible mais parfois difficile à pratiquer car potentiellement dangereuse pour l'individu allergique en cas de surdosage d'allergène ;
- le Prick test lui est préféré car bien supporté par l'individu testé mais il est bien moins sensible que l'IDR (d'un facteur de 100 à 1000) ;
- le test labial est applicable à la plupart des allergènes alimentaires.

Les **tests de provocation allergénique** sont parfois pratiqués, sous surveillance médicale stricte en milieu hospitalier, pour éprouver les muqueuses digestive, nasale et bronchique ou oculaire.

Un **test *ex-vivo*, la dégranulation** des cellules polynucléaires basophiles de sujets allergiques par des concentrations croissantes d'allergènes et la mesure de l'histamine libérée constitue un test assez sensible et réaliste applicable à une vaste gamme d'allergènes protéiques ou hapténiques incluant des médicaments.

Cependant, ces tests présentent des limites, notamment les tests *in vitro* dans la mesure où ils reposent sur l'existence d'une banque de sérums humains allergiques. Mais leur principal handicap est qu'ils sont incapables de détecter de nouveaux allergènes et de prédire qu'une nouvelle molécule puisse devenir un allergène.

Plusieurs projets de recherche et outils sont en cours de développement en vue de mieux identifier un risque allergénique, notamment alimentaire.

#### **Comment détecter les nouveaux allergènes ?**

Au cours des 15 dernières années, le nombre des cas rapportés d'allergie a doublé. L'allergie alimentaire touche 3 % de la population générale mais près de 8 % de la population pédiatrique. Le nombre d'allergiques sensibilisés à plusieurs sources d'allergènes a considérablement augmenté au cours de ces dernières années<sup>4</sup>. Ces observations épidémiologiques font penser que de nouveaux allergènes ou sources d'allergènes apparaissent dans notre environnement ou/et que plus de molécules sont reconnues comme allergènes parmi les sources existantes.

<sup>4</sup> En 1980, on observait qu'un individu pollinique sur 3 était sensible à un seul type de pollen (arbres ou graminées). De plus, lorsqu'il était sensible au pollen de graminées, le nombre d'allergènes moléculaires qu'il reconnaissait était (pour un tiers d'entre eux) inférieur à 5. Aujourd'hui, 90 % des polliniques sont sensibles à plus d'un type de pollens et la majorité d'entre eux reconnaît plus de 5 allergènes différents par source d'allergènes.

Un réseau d'allergo-vigilance, regroupant plus de 250 médecins référents, a été mis en place<sup>5</sup> en France avec pour objectif notamment de signaler en temps réel l'apparition de toute nouvelle source d'allergènes alimentaires sur notre territoire. Il encourage les médecins à rechercher activement, chez les patients, des allergènes peu ou pas diagnostiqués jusqu'à présent. Ce réseau a également pour objectif de dresser régulièrement une carte des fréquences de sensibilisations et de mettre en évidence leur évolution dans le temps.

La constitution d'une banque de sérums humains, encouragée par l'Afssa et selon les recommandations de la FAO/OMS<sup>6</sup>, est associée à ce réseau afin de faciliter l'étude du potentiel allergénique des protéines recombinantes.

#### **Comment prédire qu'une nouvelle molécule puisse devenir un allergène ?**

Il n'est pas possible, en l'état actuel des connaissances, de prédire le potentiel allergénique d'une molécule. L'une des voies de recherche s'oriente vers l'identification de facteurs adjuvants à la réaction d'allergie.

L'un de ces projets de recherche<sup>7</sup> vise à identifier divers adjuvants de l'allergénicité pour les allergènes existants et à tester leur action potentielle sur les molécules qui ne sont pas encore des allergènes reconnus comme tels dans notre environnement quotidien immédiat, en passant au crible un grand nombre de sources d'allergènes connues et en recherchant tout d'abord les molécules qui possèdent une affinité physico-chimique pour ces allergènes. Une stratégie de criblage à haut débit intra et inter-sources est en cours d'évaluation. A terme, un inventaire des adjuvants les plus fréquents ou les plus "polyvalents" sera dressé pour tenter de prédire si une nouvelle molécule, issue des biotechnologies actuelles, aurait une affinité pour l'un d'entre eux et pourrait constituer, pour un individu donné, un futur allergène.

## **2 INTERET DE DISPOSER DE LA SEQUENCE DU TRANSGENE INSERE DANS LE GENOME DE LA PLANTE**

Dans son avis de janvier 2002 "Evaluation des risques relatifs à la consommation de produits alimentaires composés ou issus d'organismes génétiquement modifiés (OGM)", dont l'une des questions portait sur l'identification des points sensibles de l'évaluation des risques sanitaires liés à la consommation humaine et animale d'OGM ou de produits qui en sont issus et les éléments pertinents de cette évaluation, l'Afssa indiquait que :

*Dans les conditions actuelles d'obtention des OGM végétaux, les dangers objectifs et potentiels, concernant la sécurité sanitaire des aliments, peuvent naître essentiellement des faits suivants :*

<sup>5</sup> à l'initiative du Professeur D.A. Moneret-Vautrin au CHU de Nancy et auquel l'Afssa contribue financièrement.

<sup>6</sup> Consultation FAO/OMS des experts internationaux : Foods derived from biotechnology, allergenicity of genetically modified foods, 22-25 janvier 2001.

<sup>7</sup> Ce projet de recherche est actuellement développé à l'Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles de Paris (ESPCI) dans le groupe Allergie et Environnement de G. Peltre.

- 1) *une plante transgénique peut synthétiser une protéine étrangère qui pourrait produire des effets toxiques aigus ou à long terme et/ou des effets allergéniques ;*

Du fait que l'intégration du transgène dans la plante résulte de mécanismes de recombinaison illégitime, la formation d'une protéine de fusion, si le transgène s'insère dans une région codante, est un événement qu'on ne peut exclure *a priori*.

- 2) *l'extinction de gènes ou l'expression de séquences silencieuses propres au génome de la plante d'origine pourrait conduire à un effet inattendu. Dans le cas des plantes transgéniques, l'insertion du transgène pourrait induire de tels phénomènes dans la plante transformée ;*

Les phénomènes épigénétiques qui conduisent à une régulation permanente de l'expression génétique en fonction de l'état de la chromatine, notamment des modifications des histones par acétylation, phosphorylation ou méthylation (Nye *et al*, 2002<sup>8</sup>), commencent à être mieux compris. Ces modifications peuvent se propager le long de la chromatine et peuvent conduire à une extinction génique permanente (Richards and Elgin, 2002<sup>9</sup>). A l'inverse, des activateurs transcriptionnels forts peuvent modifier la structure de la chromatine au voisinage du site de liaison et entraîner l'expression de gènes normalement silencieux (Kuhn and Geyer, 2003<sup>10</sup>).

- 3) *les interactions métaboliques, discrètes ou non, pourraient faire apparaître des métabolites non prévisibles et toxiques.*

Les connaissances accumulées récemment dans le domaine de la génomique et du métabolisme, notamment des plantes, permettent de dresser un tableau de plus en plus dense des interactions entre les différentes voies métaboliques.

Afin de pouvoir mieux identifier ces modifications potentielles et en évaluer l'impact, l'Afssa recommandait notamment que :

*Les informations relatives à la description des séquences d'ADN insérées ou supprimées soient complétées par la séquence<sup>11</sup> du transgène et des régions faisant la jonction avec le génome dans le but de permettre de :*

- *de vérifier si le fragment inséré est bien identique à celui qui avait été introduit dans le vecteur transformant ;*
- *d'examiner l'environnement du gène inséré ;*
- *de localiser l'insert dans le génome de la plante."*

<sup>8</sup> Nye A.C., Rajendran R.R., Stenoien D.L., Mancini M.A., Katzenellenbogen B.S., Belmont A.S. (2002). Alteration of large-scale chromatin by estrogen receptor. *Mol. Cell. Biol.* 22 (10), pp 3437-3449.

<sup>9</sup> Richards E.J. and Elgin S.C.R. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, 108, pp489-500.

<sup>10</sup> Kuhn E.J. and Geyer P.K. (2003). Genomic insulators: connecting properties to mechanism. *Current opinion in Cell Biology*, 15, pp 259-265.

<sup>11</sup> Afin de faciliter la comparaison des séquences fournies avec des bases de données, il serait souhaitable de mettre à la disposition de l'évaluateur ces séquences sur support informatique.

Après avoir examiné en quoi les informations résultant de la mise en œuvre de ces recommandations étaient utiles et pouvaient être exigées pour les organismes dont le génome n'est pas connu de façon approfondie, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments précise les points suivants :

- i) En ce qui concerne la formation de nouvelles protéines non attendues, la détermination de la séquence du transgène intégré et des régions flanquantes devrait permettre de détecter la formation d'une protéine de fusion. Cette recherche pourra éventuellement nécessiter l'identification des transcrits comprenant tout ou partie du transcrit du transgène. Des méthodes telles que la RT PCR (reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction) et la tail PCR (Liu *et al*, 1995<sup>12, 13</sup>) (thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction) peuvent être utilisées pour identifier ces transcrits.
- ii) Même dans les espèces végétales pour lesquelles les connaissances de génomique sont encore fragmentaires, il est possible par RT PCR ou tail PCR de connaître les séquences environnant le transgène et déterminer l'état d'expression de ces séquences dans l'organisme parent et dans l'organisme génétiquement modifié. Ceci pourrait être, de plus, utile pour détecter la transcription d'éventuels RNAi (par exemple Kusaba *et al*, 2003<sup>14</sup>) (RNA interférents).
- iii) La modification du métabolisme provoquée, soit directement par l'insertion du transgène dans une séquence codante, soit par modification épigénétique induite par modification de la structure de la chromatine, ne pourra être déterminée que par des méthodes d'analyse telles que la spectrométrie de masse ou la RMN (résonance magnétique nucléaire). Néanmoins, l'identification des gènes dont l'expression serait altérée dans le transgène pourrait utilement guider les recherches de modifications métaboliques.

Il convient de noter que ces données sur le génome de la plante transformée et sur son expression au voisinage du site d'insertion du transgène ne peuvent apporter des informations définitives sur les risques ou l'absence de risque inhérents à un OGM déterminé. Elles permettent cependant d'orienter la recherche d'effets toxiques ou allergéniques non attendus. Le rapport bénéfice/coût de ces recherches est largement positif et les justifie même pour des plantes pour lesquelles les données de génomique sont encore fragmentaires.

**Martin HIRSCH**

<sup>12</sup> Liu Y.G. and Whittier R.F. (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, 25 (3), pp 674-81.

<sup>13</sup> Liu Y.G., Mitsukawa N., Oosumi T., Whittier R.F. (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.*, 8 (3), pp 457-63

<sup>14</sup> Kusaba M., Miyahara K., Lida M., Fukuoka H., Takano T., Sassa H., Nishimura M. Nishio T. (2003). *Low Glutenin content1* : a dominant mutation that suppresses the *glutenin* multigene family via RNA silencing in rice. *The Plant Cell*, 15, pp1455-1467.