



**HAL**  
open science

## **Organismes génétiquement modifiés**

Cécile Collonnier, Andre Kobilinsky, Yves Bertheau

► **To cite this version:**

Cécile Collonnier, Andre Kobilinsky, Yves Bertheau. Organismes génétiquement modifiés. Méthodes d'analyses immunochimiques pour le contrôle de qualité dans les IAA / Immunochemical analytical methods for quality control in food industries, 2005, 2-7430-0760-5. <hal-02397962>

**HAL Id: hal-02397962**

**<https://hal.science/hal-02397962v1>**

Submitted on 6 Dec 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

# Organismes génétiquement modifiés

Cécile Collonnier, André Kobilinsky  
et Yves Bertheau

## Introduction

Depuis 1994, un nombre croissant d'aliments contenant ou dérivés d'organismes génétiquement modifiés (OGM) est commercialisé dans le monde. Le développement, en parallèle, des réglementations nationales destinées à définir les règles d'étiquetage de ces produits, a entraîné un besoin important en méthodes analytiques destinées à déterminer les concentrations en OGM dans les matrices alimentaires et les semences.

Il existe différentes catégories de techniques de détection des ingrédients génétiquement modifiés. Elles se distinguent par le type de molécules prises pour cibles et les méthodologies mises en œuvre. Si la réglementation européenne retient les protéines et les acides nucléiques, rien n'empêche de penser que d'autres molécules (acides gras) pourraient être un jour prises en compte. Dans le cas des acides nucléiques (ADN ou ARN), elles s'effectuent soit par amplification de leur cible *polymerase chain reaction* (PCR), PCR quantitative en temps réel (QRT-PCR), soit par amplification du signal émis par leur cible (*ligase chain reaction*, LCR), soit encore par amplification de leur cible puis du signal émis (PCR suivie d'hybridation sur puces à ADN). D'autres méthodes reposent sur la détection des produits d'expression des transgènes. Ceux-ci peuvent être des métabolites non protéiques ( $\beta$ -carotène chez le riz, acide laurique chez le colza), détectés par des analyses biochimiques classiques, ou des protéines, détectées par des tests d'activité enzymatique (dégradation d'herbicides, biosdosages...) et, plus généralement, par des tests immunologiques comme nous allons le montrer dans ce chapitre.

Du fait de sa grande efficacité de détection tout au long des chaînes agroalimentaires humaine et animale, l'amplification de l'ADN par PCR est jusqu'à présent la technique la plus utilisée en Europe. Cela pourrait cependant rapidement évoluer. La levée attendue du moratoire *de facto* qui empêchait, depuis 1998, la mise sur le marché européen de nouveaux OGM, pourrait, en effet, entraîner une forte augmentation des cultures génétiquement modifiées sur le territoire des états membres, et

générer, par voie de conséquence, un important besoin en méthodes de détection simples, rapides et peu onéreuses, permettant d'assurer en particulier la ségrégation des récoltes à la sortie du champ. La détection des protéines transgéniques présentes dans les récoltes par des tests immunologiques adaptés pourrait répondre à cette attente, comme elle le fait déjà à grande échelle aux États-Unis.

## 1. *Cadre réglementaire européen en matière d'OGM*

Comme dans d'autres pays tiers, pour toute demande d'autorisation (importation, culture...) au sein de la Communauté européenne, tout nouvel OGM doit faire l'objet d'une évaluation de ses risques potentiels pour la santé humaine et animale et pour l'environnement. Deux textes réglementaires majeurs régissent les modalités de ces analyses de risques en fonction de l'utilisation envisagée du produit. Il s'agit de la directive 2001/18/CE du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire des OGM dans l'environnement à toutes autres fins qu'alimentaires (culture, importation, transformation industrielle), et du règlement 1829/2003/CE du Parlement et du Conseil européens du 18 octobre 2003 concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux contenant ou dérivant d'organismes génétiquement modifiés. Le règlement 1829/2003/CE est accompagné de deux règlements relatifs à l'étiquetage et à la traçabilité des aliments génétiquement modifiés et de leurs dérivés : le règlement 1830/2003/CE du Parlement et du Conseil du 22 septembre 2003, et le règlement 65/2004/CE de la Commission du 14 janvier 2004.

### 1.1. *Directive 2001/18/CE*

La directive 2001/18/CE, qui modifie la directive 1990/220/CE, institue l'obligation de procéder, avant toute dissémination volontaire d'un OGM, à une évaluation des risques pour la santé publique et l'environnement. Elle définit précisément les modalités de cette évaluation, ainsi que toutes les étapes de la procédure d'autorisation de mise sur le marché des OGM pour des usages non-alimentaires.

#### 1.1.1. *Procédure d'autorisation de mise sur le marché des OGM*

Toute autorisation est le résultat d'une procédure communautaire harmonisée et transparente, qui comprend une phase nationale et une phase européenne. Comme le montre la figure 1, tout demandeur doit adresser à l'autorité compétente d'un des États membres (en France, le ministère de l'Agriculture) une notification<sup>1</sup> qui comprend un dossier d'informations scientifiques et techniques comprenant en particulier une analyse complète des risques (figure 2).

L'évaluation initiale de ce dossier est conduite par les instances nationales compétentes de l'état européen choisi (en France, la Commission du génie biomoléculaire).

1. Notification d'un OGM : demande d'autorisation de commercialisation d'un OGM, déposée par l'obteneur auprès de l'autorité compétente d'un des états membres de l'UE, comprenant un dossier scientifique et technique d'évaluation des risques sanitaires et environnementaux.

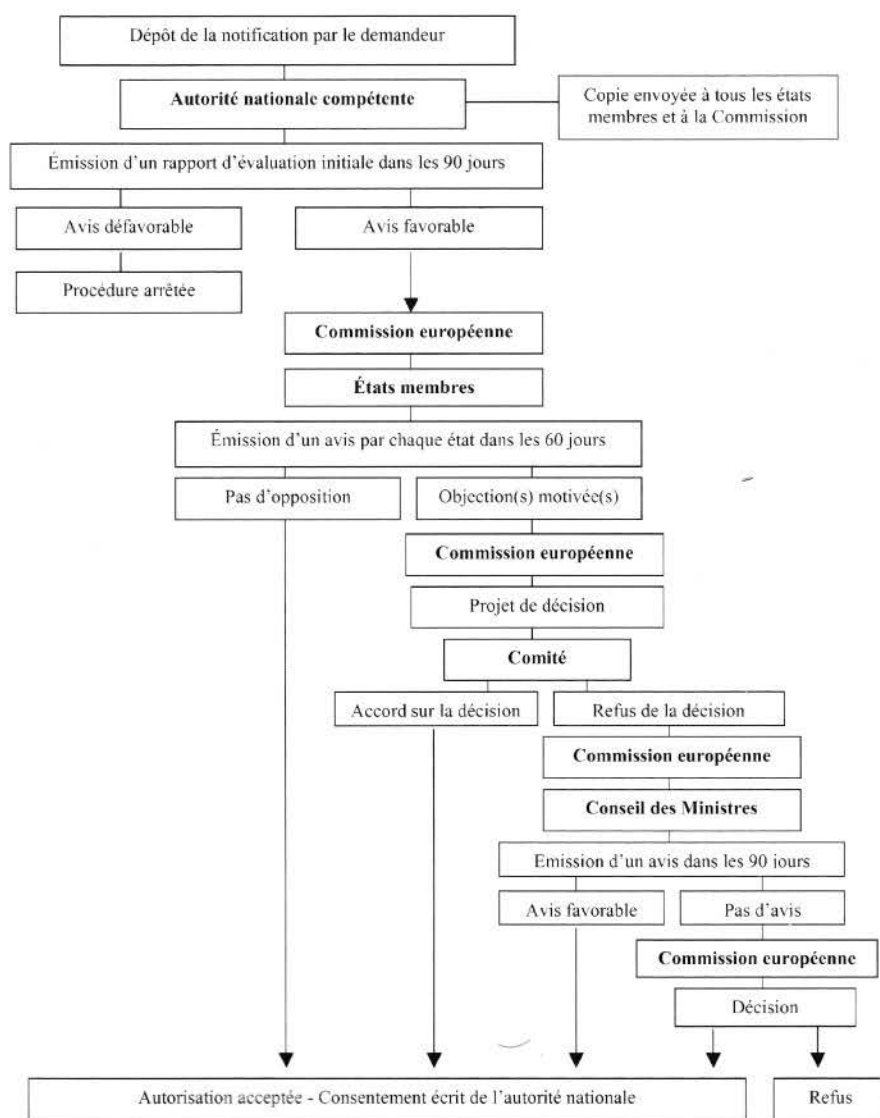


Figure 1 ■ Procédure d'autorisation d'un OGM selon la directive 2001/18/CE.

laire (CGB) et l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA). Lorsque cette évaluation aboutit à l'émission d'un avis favorable, les autorités nationales compétentes de l'état membre (en France, le ministère de l'Agriculture, avec accord du ministère de l'Environnement) transmettent le dossier à la Commission européenne. La procédure d'instruction communautaire démarre alors par une période de 60 jours de consultation des autres états membres. Si aucune objection n'est émise dans ce délai, l'état membre qui a initialement instruit la demande donne par écrit son autorisation pour la mise sur le marché et la transmet au demandeur, à la Commission et aux autres États membres. En revanche, si un ou plusieurs états membres émettent des objections dans le délai des 60 jours, la décision doit se

- Une description détaillée de la construction génétique transférée mentionnant :
  - l'origine et la séquence de tous les éléments génétiques constitutifs de l'insert présent dans l'organisme hôte ;
  - les modalités d'expression de chacun des gènes introduits ;
  - les risques potentiels engendrés par chacun de ces gènes ;
  - la stabilité de l'insert au fil des générations ;
- Une évaluation des risques pour l'environnement portant sur :
  - les conditions et la zone d'utilisation de l'OGM ;
  - les modalités de développement de la plante ou de l'organisme génétiquement modifié ;
  - l'impact écologique des OGM lors de leur dissémination (en particulier sur les populations d'insectes et de micro-organismes associés) ;
  - la capacité de transfert génétique vers d'autres espèces végétales et vers les bactéries du sol.
- Une analyse du risque sanitaire évaluant :
  - le risque toxique : toxicité des nouvelles protéines présentes dans la plante du fait de la modification génétique ;
  - le risque alimentaire pour l'homme et l'animal, qui consiste en l'étude de l'équivalence en substance de l'OGM avec le produit de référence traditionnel (vérification des quantités de nutriments caractéristiques, toxiques naturels, composés antinutritionnels déjà présents) ;
  - le risque allergique : l'évaluation implique la comparaison des nouvelles protéines avec les allergènes connus (similitudes structurales) et l'étude de leurs caractéristiques biochimiques. Elle peut également consister en des tests sur des cellules isolées d'individus sensibles.

Figure 2 ■ Principaux éléments du dossier d'évaluation d'un OGM proposé à la commercialisation sur le marché européen (directive 2001/18/CE).

prendre après consultation du Comité réglementaire ou du Conseil des ministres sur la base d'un projet de décision élaboré par la Commission.

La directive 2001/18/CE permet la délivrance d'autorisations de mise sur le marché d'une durée maximale de 10 ans. Ces autorisations sont assorties de mesures de suivi des effets éventuels à long terme des OGM autorisés sur l'environnement et la santé humaine et animale, qui peuvent déboucher sur des plans de rappel. Un Comité de biovigilance<sup>2</sup>, réunissant experts scientifiques et représentants de la société civile, a été mis en place en France à cet effet en mars 1998.

La directive 2001/18/CE définit également les règles d'étiquetage et de traçabilité des produits non alimentaires constitués ou contenant des OGM. Enfin, elle oblige, dorénavant, le notifiant à accompagner sa demande de méthodes d'échantillonnage et de détection spécifiques de l'OGM proposé, méthodes qui doivent être validées par le laboratoire de référence communautaire (LRC) de l'IHCP (*Institute for Health and Consumer Protection*) au JRC (*Joint Research Center*, Ispra, Italie), avant autorisation. La liste des méthodes validées peut être consultée sur le site : <http://gmo-crl.jrc.it>.

2. Biovigilance : surveillance biologique des effets consécutifs à la dissémination des OGM dans l'environnement et à leur introduction dans les filières agroalimentaires. Elle est assurée en France par le Comité de biovigilance.

### 1.1.2. OGM autorisés

À ce jour, 17 autorisations de dissémination d'OGM ont été délivrées en Europe dont 14 pour des plantes. Ces 14 dernières autorisations couvrent 23 évènements de transformation<sup>3</sup> différents (tableau 1).

Tableau 1 ■ Organismes génétiquement modifiés autorisés dans le cadre de la directive 1990/220/CE, remplacée par la directive 2001/18/CE, classement par type d'utilisation.

OGM	Caractères d'intérêt	Société	Utilisations autorisées	Lieu de dépôt de la notification	Année d'autorisation
Tabac ITB 1000-0X	Stérilité mâle et tolérance à un herbicide	SEITA	Culture et importation en vue de transformation industrielle	France	1994
Colza MS1/RF1	Stérilité mâle et tolérance à un herbicide	Plant Genetic Systems	Culture et importation en vue de transformation industrielle	France	1997 (pas autorisé en France)
Colza MS1/RF2	Stérilité mâle et tolérance à un herbicide	Plant Genetic Systems	Culture et importation en vue de transformation industrielle	France	1997 (pas autorisé en France)
Maïs event-176 (+ 9 variétés dérivées)	Tolérance à la pyrale et à un herbicide	Novartis	Culture et importation en vue de transformation industrielle	France	1997
Maïs Mon810 (+ 6 variétés dérivées)	Tolérance à la pyrale	Monsanto	Culture et importation en vue de transformation industrielle	France	1998
Maïs T25	Tolérance à un herbicide	AgrEvo	Culture et importation en vue de transformation industrielle	France	1998
Soja GTS 40/3/2	Tolérance à un herbicide	Monsanto	Importation en vue de transformation industrielle	Royaume-Uni	1996
Colza Topas 19/2	Tolérance à un herbicide	AgrEvo	Importation en vue de transformation industrielle	Royaume-Uni	1998
Maïs Bt-11	Tolérance à la pyrale et à un herbicide	Novartis	Importation en vue de transformation industrielle	Royaume-Uni	1998

3. Événement de transformation : lignée issue d'une expérience de transformation génétique. Même s'ils ont été transformés de la même manière, à partir de la même lignée parentale et avec la même construction génétique, deux évènements différencieront par le lieu d'insertion de cette construction dans leur génome.

Tableau 1 (suite) ■ Organismes génétiquement modifiés autorisés dans le cadre de la directive 1990/220/CE, remplacée par la directive 2001/18/CE, classement par type d'utilisation.

OGM	Caractères d'intérêt	Société	Utilisations autorisées	Lieu de dépôt de la notification	Année d'autorisation
Chicorée lignées RM3-3, -4, -6	Stérilité mâle et tolérance à un herbicide	Bejo-Zaden BV	Culture et commercialisation de semences uniquement	Pays-Bas	1996
Colza MS1/RF1	Stérilité mâle et tolérance à un herbicide	Plant Genetic Systems	Culture et commercialisation de semences uniquement	Royaume-Uni	1996
Œillet lignées 4, 11, 15, 16	Coloration modifiée	Florigène	Culture et commercialisation de fleurs coupées	Pays-Bas	1997
Œillet lignée 6	Tenue en vase prolongée	Florigène	Culture et commercialisation de fleurs coupées	Pays-Bas	1998
Œillet lignées 959A, 988A, 1226A, 1351A, 1363A, 1400A	Coloration modifiée	Florigène	Culture et commercialisation de fleurs coupées	Pays-Bas	1998
Vaccin contre la rage		Rhône-Mérieux	Applications médicales	Belgique puis France	1993
Vaccin contre la maladie d'Aujeszky		Vemie Veterinär Chemie GmbH	Applications vétérinaires	Allemagne	1994
Kit de détection de résidus antibiotiques dans le lait		Valio Oy	Applications industrielles	France	1997

À ce jour, 32 événements, nouveaux ou déjà autorisés selon la directive 1990/220/CE, sont en attente d'être autorisés dans le cadre de la directive 2001/18/CE (tableau 2). À terme, tous les OGM autorisés dans le cadre de la directive 1990/220/CE devront avoir été réévalués selon les modalités décrites par la directive 2001/18/CE.

La mise sur le marché des semences de ces variétés OGM est subordonnée à leur inscription au catalogue européen des espèces et variétés, régie par la directive 1998/95/CE. Comme le montre le tableau 1, la directive 1990/220/CE permettait des autorisations au cas par cas pour chaque type d'utilisation possible de l'OGM notifié (culture, importation et/ou transformation industrielle). Tirant la leçon des contaminations croisées accidentelles entre filières (comme l'affaire Starlink/Taco Bell où la protéine Cry9C du maïs Starlink avait été retrouvée dans des tacos alors que celui-ci n'était alors autorisé aux États-Unis que pour l'alimentation du bétail), la directive 2001/18/CE n'accorde plus d'autorisations séparées. L'évaluation des risques est faite pour toute utilisation et les nouvelles autorisations sont attribuées selon le principe « une porte-une clé ».

Tableau 2 ■ Organismes génétiquement modifiés en attente d'autorisation dans le cadre de la directive 2001/18/CE, classés par ordre chronologique de dépôt de la notification.

Événement	Caractères d'intérêt	Société	Lieu de dépôt de la notification	Date de dépôt de la notification
Maïs Bt-11	Tolérance à la pyrale et à un herbicide	Syngenta	France	(1996) 2003
Colza Liberator Falcon GS40/90pHoe6/Ac	Tolérance à un herbicide	Bayer CropScience	Allemagne	(1996) 2003
Colza MS8/RF3	Tolérance à un herbicide	Bayer CropScience	Belgique	(1996) 2003
P. de terre EH92-527-1	Amidon modifié	Amylogene/BASF	Suède	(1996) 2003
Coton 531	Résistance aux insectes	Monsanto	Espagne	(1996) 2003
Coton 1445	Tolérance à un herbicide	Monsanto	Espagne	(1997) 2003
Betterave fourragère A5/15	Tolérance à un herbicide	Danisco/DLF/Monsanto	Danemark	(1997) 2003
Tomate TGT7F	Maturité retardée	Zeneca	Espagne Royaume-Uni	(1996) (1998)
Chicorée RM3-3, -4, -6	Stérilité mâle et tolérance à un herbicide	Bejo-Zaden	Pays-Bas	(1998)
Chicorée GM2-28	Stérilité mâle et tolérance à un herbicide	Bejo-Zaden	Pays-Bas	(1998)
Soja DD-026005-3 (variétés G94-1, G49-19, G-168)	Forte teneur en acide oléique	DuPont	Allemagne	(1998)
Colza GT73	Tolérance à un herbicide	Monsanto	Pays-Bas	(1998) 2003
Colza Liberator Falcon pHoe6/Ac	Tolérance à un herbicide	Bayer CropScience	Allemagne	(1998) 2003
Soja A2704-12 et A5547-127	Tolérance à un herbicide	PGS/Bayer CropScience	Belgique	(1998) 2003
Coton 10215 et 10222	Tolérance à un herbicide	Stoneville Pedigreed Seed Company	Espagne	(1999) 2003
Colza T45	Tolérance à un herbicide	Bayer CropScience	Royaume-Uni	(1999) 2004
Maïs T25xMon810	Tolérance à la pyrale et à un herbicide	Pioneer	France	(2000)
Maïs NK603	Tolérance à un herbicide	Monsanto	Espagne	(2000) 2003

Entre parenthèses : date de dépôt de notification selon l'ancienne directive 1999/220/CE.

Tableau 2 (suite) ■ Organismes génétiquement modifiés en attente d'autorisation dans le cadre de la directive 2001/18/CE, classés par ordre chronologique de dépôt de la notification.

Événement	Caractères d'intérêt	Société	Lieu de dépôt de la notification	Date de dépôt de la notification
Maïs 1507	Tolérance à la pyrale et à un herbicide	Pioneer	Pays-Bas (importation)	(2000) 2003
		Mycogen Dow	Espagne (culture)	(2001) 2003
Betterave H7-1	Tolérance à un herbicide	KWS SAAT/Monsanto	Allemagne	(2000) 2003
Maïs Mon863	Tolérance aux insectes	Monsanto	Allemagne	(2002) 2003
Maïs Mon863xMon810	Tolérance aux insectes	Monsanto	Allemagne	(2002) 2003
Maïs Mon810xNK603	Tolérance à la pyrale et à un herbicide	Monsanto	Royaume-Uni	(2002) 2003
Riz LLRICE62	Tolérance à un herbicide	Bayer CropScience	Royaume-Uni	2003
Maïs NK603xMon810	Tolérance à la pyrale et à un herbicide	Monsanto	Espagne	2004
Coton 281-24-236 et 3006-210-23	Résistance aux insectes	Agrigenetics Inc./Mycogen seeds	Pays Bas	2004
Riz LL cotton 25	Tolérance à un herbicide	Bayer CropScience	Espagne	2004
Maïs GA21	Tolérance à un herbicide	Monsanto	Espagne	(1998) abandonné
Maïs GA21xMon810	Tolérance à la pyrale et à un herbicide	Monsanto	Espagne	(1999) abandonné
Betterave T9100152	Tolérance à un herbicide	Monsanto/Syngenta	Belgique	(1999) abandonné

Entre parenthèses : date de dépôt de notification selon l'ancienne directive 1999/220/CE.

À la condition que leurs objections soient justifiées, une clause de sauvegarde (article 23 de la directive 2001/18/CE, article 16 de la directive 1990/220/CE) permet aux états membres de demander à la Commission européenne de restreindre ou de prohiber l'utilisation, sur leur territoire, d'un OGM autorisé. L'article 16 de la directive 1990/220/CE a été invoqué 9 fois (3 fois par l'Autriche, 2 fois par la France et une fois par l'Allemagne, le Luxembourg, la Grèce et l'Angleterre), mais la Commission n'a jamais reconnu les objections émises comme suffisantes pour annuler les autorisations données.

## 1.2. Règlement 1829/2003/CE

Le règlement 1829/2003/CE, dit « Novel Food/Novel Feed » (NF/NF), relatif aux denrées alimentaires et aux aliments pour animaux incluant des produits issus

d'OGM, met en place une procédure unique d'autorisation de commercialisation des OGM et dérivés destinés aux alimentations humaine et animale. Il couvre tous les aliments, ingrédients, additifs et arômes alimentaires, qui sont des OGM, contiennent des OGM, ou sont produits à partir d'OGM sans en contenir. Remplaçant les règlements 258/1997/CE (dit Novel Food), 1139/1998/CE, 49/2000/CE et 50/2000/CE, il définit les modalités d'évaluation de la sécurité alimentaire, ainsi que toutes les étapes de la procédure d'autorisation de mise sur le marché. Il prévoit également des dispositions claires pour l'étiquetage de tous les OGM et produits dérivés d'OGM destinés à l'alimentation humaine et animale.

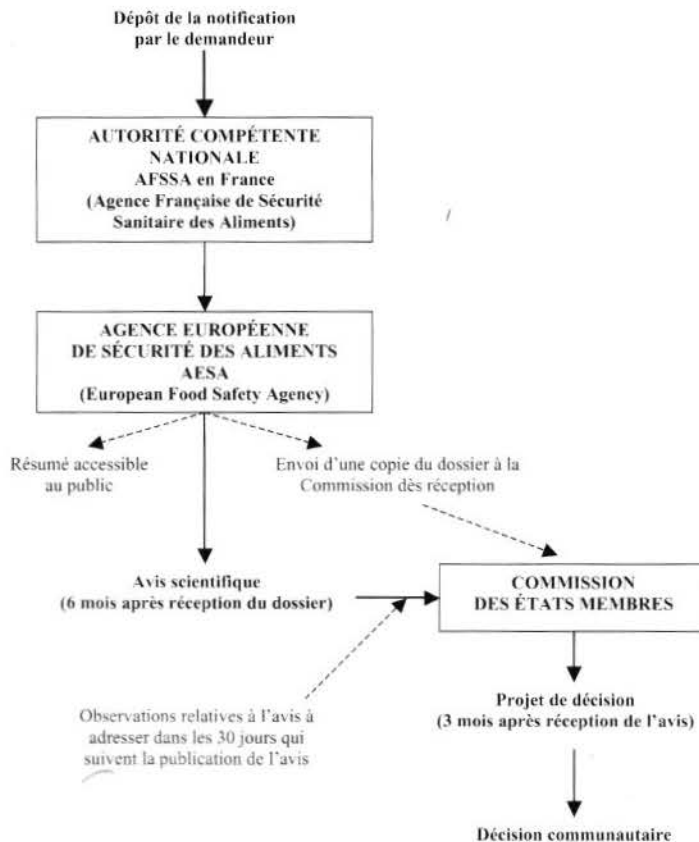


Figure 3 ■ Procédure d'autorisation d'un nouvel aliment génétiquement modifié sur le marché européen (règlement 1829/2003/CE).

### 1.2.1. Procédure d'autorisation de mise sur le marché d'aliments GM

Avant l'entrée en vigueur du règlement 1829/2003/CE, les autorisations de mise sur le marché d'aliments OGM suivaient la procédure prévue par le règlement 258/1997/CE. Il s'agissait, comme pour la directive 2001/18/CE, d'une procédure en deux étapes comprenant une phase nationale au cours de laquelle l'état membre recevait le dossier et procédait à une première évaluation, et une phase communautaire au cours de laquelle l'évaluation était faite par les autres États membres. Afin

d'éviter toute différence d'appréciation suivant l'État membre instruisant le dossier, la procédure d'autorisation instaurée par le règlement NF/NF est désormais totalement centralisée (figure 3).

Le demandeur doit soumettre une notification à l'autorité nationale compétente d'un des États membres, qui l'étudie et la transmet ensuite à l'autorité européenne de sécurité des aliments, l'Agence européenne de sécurité des aliments (AESA). Instaurée par le règlement 178/2002/CE, l'AESA est chargée de l'évaluation scientifique des produits alimentaires pour l'ensemble de l'Union européenne. Dans le cas d'une demande portant sur un OGM, elle procède à l'évaluation de la sécurité sanitaire du produit et, avant l'émission de son avis, consulte les autorités compétentes de l'état receveur afin de s'assurer que les exigences en matière de sécurité vis-à-vis de l'environnement sont remplies. Sur la base de l'avis de l'AESA, la Commission européenne propose au vote des États membres un projet de décision d'autorisation.

Comme dans la directive 2001/18/CE, les autorisations sont accordées pour 10 ans avec une possibilité de renouvellement après réévaluation des produits. Les demandes doivent être accompagnées de méthodes d'échantillonnage et de détection des produits afin de faciliter les contrôles. Ces méthodes doivent être validées par le Laboratoire de référence communautaire au *Joint research center* (LRC/JRC, Ispra, Italie) avant que l'autorisation soit accordée.

Lorsque l'autorisation est accordée, le produit peut être utilisé à la fois en alimentation humaine et animale. Cette disposition vise à éviter, par exemple, qu'un OGM autorisé uniquement en alimentation animale se retrouve dans des produits destinés à l'alimentation humaine sans qu'il ait été évalué pour cette utilisation.

Par ailleurs, le principe « une seule clé par porte » est également retenu pour le règlement 1829/2003/CE : pour une modification génétique donnée, l'ensemble des utilisations potentielles est pris en compte. D'autre part, le risque environnemental étant pris en compte par l'AESA, ce règlement permet d'autoriser à la fois la dissémination dans l'environnement de l'OGM évalué et la commercialisation des denrées alimentaires le contenant, lui ou ses dérivés.

La consolidation et la normalisation des critères et des modes d'évaluation de la sécurité alimentaire des OGM sont des sujets majeurs et font l'objet de nombreux travaux menés au sein d'instances internationales diverses dont, notamment, le *Codex alimentarius*.

La transparence du processus décisionnel est assurée en permettant au public, d'une part, de faire des observations sur l'avis scientifique de l'autorité alimentaire européenne, et d'autre part, d'avoir accès au registre communautaire de tous les produits alimentaires OGM autorisés à la commercialisation en Europe.

### 1.2.2. *Étiquetage des aliments issus d'OGM*

Excepté les produits fabriqués à l'aide d'auxiliaires technologiques tels que les enzymes issues de micro-organismes génétiquement modifiés et les produits issus d'animaux nourris avec des OGM (comme lait, œufs et viande), tout produit destiné à l'alimentation humaine ou animale constitué d'OGM, dérivé d'OGM ou fabriqué à partir d'OGM doit désormais être étiqueté, même en l'absence d'ADN ou de protéines transgéniques détectables.

La présence accidentelle ou techniquement inévitable d'OGM autorisés en Europe dans un produit alimentaire est acceptée sans étiquetage jusqu'à un seuil de 0,9 % d'OGM par ingrédient, dans la mesure où l'opérateur peut démontrer qu'il a pris toutes les mesures pour éviter la présence d'OGM dans son produit. Au-delà de ce seuil, le produit doit être étiqueté quelles que soient les circonstances et l'origine de la « contamination » OGM.

Les OGM et produits dérivés dont les demandes d'autorisation n'ont pu aboutir à cause du moratoire seront tolérés sans étiquetage pendant les trois années suivant l'entrée en vigueur du règlement 1829/2003/CE, à condition que l'OGM en question ait fait l'objet d'une évaluation scientifique communautaire favorable, qu'il soit présent dans la denrée alimentaire de façon fortuite dans la limite de 0,5 % et qu'une méthode de détection ait été validée par le JRC. Au-delà de ce seuil, ou dans le cas où l'une de ces conditions n'est pas remplie, le produit, même étiqueté, ne pourra être commercialisé.

Pour les OGM dont la demande d'autorisation a été rejetée en Europe et les OGM uniquement autorisés et évalués dans des pays non-européens, toute commercialisation sur le sol européen est interdite. Aucune règle d'étiquetage n'est donc nécessaire puisqu'en cas de contamination avérée le produit doit être retiré des circuits commerciaux.

Le calcul du pourcentage d'OGM présent dans un produit, auquel sont inféodées les règles d'étiquetage, se fait par ingrédient, ce qui a été traduit en termes analytiques par espèce végétale. Par exemple, le pourcentage de maïs génétiquement modifié présent dans un échantillon est égal à la somme des quantités de tous les maïs OGM présents dans l'échantillon, rapportée à la quantité totale de maïs de l'échantillon. Le pourcentage d'OGM n'est donc pas rattaché à la masse de l'aliment mais à celle de l'ingrédient. En d'autres termes, 0,9 % d'OGM ne signifie pas 0,9 g d'OGM dans 100 g de produit mais 0,9 g d'OGM dans 100 g d'ingrédient. Ce mode de calcul implique de disposer dans les produits complexes de systèmes de quantification des espèces végétales.

D'autre part, un échantillon contenant plusieurs ingrédients génétiquement modifiés sera étiqueté si au moins un de ces ingrédients contient plus de 0,9 % d'OGM. Si chaque ingrédient présente moins de 0,9 % d'OGM, le produit ne sera pas étiqueté même si la totalité des OGM présents, tous ingrédients confondus, dépasse 0,9 %. Par exemple, un produit contenant 0,9 % de maïs GM et 0,1 % de soja GM sera étiqueté, alors qu'un produit contenant 0,4 % de maïs GM et 0,6 % de soja GM ne le sera pas.

### 1.2.3. Aliments génétiquement modifiés autorisés

Il n'y a pas encore, sur le marché européen, de produits OGM autorisés en l'état (comme des fruits et légumes) pour l'alimentation humaine. Ne sont, pour l'instant, mis sur le marché de cette filière que des produits dérivés de 15 OGM différents (tableau 3).

Ces dérivés d'OGM ont été autorisés en alimentation humaine dans le cadre du règlement 258/1997/CE avant l'entrée en vigueur du règlement NF/NF. Certains ont

Tableau 3 ■ Dérivés d'OGM autorisés en alimentation humaine dans le cadre du règlement 258/1997/CE remplacé par le règlement 1829/2003/CE, classement par type d'aliments.

Aliment GM	Caractères d'intérêt de l'OGM source	Société	Lieu de dépôt de la notification	Date d'autorisation
Huile obtenue à partir du colza Topas 19/2	Colza tolérant à un herbicide	AgrEvo	Royaume-Uni	1997
Huiles obtenues à partir des colzas MS1, RF1 et de l'hybride MS1/RF1	Colza restaurateur de fertilité	Plant Genetic Systems	France	1997
Huiles obtenues à partir des colzas MS1, RF2 et de l'hybride MS1/RF2	Colza restaurateur de fertilité	Plant Genetic Systems	France	1997
Huile obtenue à partir du colza GT73	Colza tolérant à un herbicide	Monsanto	Pays-Bas	1997
Huile obtenue à partir du colza Falcon GS40/90	Colza tolérant à un herbicide	AgrEvo	Allemagne	1999
Huile obtenue à partir du colza Liberator L62	Colza tolérant à un herbicide	AgrEvo		1999
Huiles obtenues à partir des colzas MS8, RF3 et de l'hybride MS8/RF3	Colza tolérant à un herbicide	Plant Genetic Systems	Belgique	2000
Huile obtenue à partir du coton 531	Coton résistant à un insecte	Monsanto	Espagne	2002
Huile obtenue à partir du coton 1445	Coton tolérant à un herbicide	Monsanto	Espagne	2002
Ingrédients* obtenus à partir du soja GTS 40/3/2	Soja résistant à un insecte et tolérant à un herbicide	Monsanto	Royaume-Uni	1996
Ingrédients* obtenus à partir du maïs Bt176	Maïs résistant à un insecte et tolérant à un herbicide	Novartis	France	1997
Ingrédients* obtenus à partir du maïs MON810	Maïs résistant à un insecte	Monsanto	France	1998
Ingrédients* obtenus à partir du maïs T25	Maïs tolérant à un herbicide	AgrEvo	France	1998
Ingrédients* obtenus à partir du maïs Bt11	Maïs résistant à un insecte	Novartis	France	1998
Ingrédients* obtenus à partir du maïs MON809	Maïs résistant à un insecte	Monsanto	France	1998

Ingrédients\* : farine, gluten, semoule, amidon, glucose, huile.

été autorisés, en l'état ou non, pour l'alimentation animale. Tous devront faire l'objet, à terme, d'une nouvelle évaluation au titre du règlement 1829/2003/CE. Il s'agit :

- *pour l'alimentation animale* :
  - du soja GTS 40/3/2 ;
  - des maïs T25, Mon810, Bt11 et Event 176 ainsi que des produits dérivés du colza Topas 19/2.
- *pour l'alimentation humaine* :
  - des ingrédients (farine, gluten, semoule, amidon, glucose et huile) dérivés des maïs Event 176, Bt11, T25, Mon810 et Mon809, et du soja GTS 40/3/2 ;
  - des huiles obtenues à partir des cotons 531 et 1445, et des colzas Topas 19/2, GT73, Liberator L62, Falcon GS 40/90, MS1/RF2, MS1/RF1 et MS8/RF3.

La possibilité de consommer directement des OGM dont des dérivés ont été autorisés pour l'alimentation humaine, ou des OGM autorisés pour l'alimentation animale, a été jusqu'ici limitée car la plupart des espèces concernées (soja, maïs...) ne sont pas consommées en tant que telles. Par exemple, les pousses dites de soja, vendues fraîches ou en conserve, sont en réalité des pousses de haricot mungo qui n'ont rien à voir avec le soja utilisé dans l'industrie agroalimentaire. De même, les maïs génétiquement modifiés autorisés jusqu'à présent ne servent pas à la production de maïs doux ou de pop-corn.

En terme d'alimentation humaine, on peut consommer des produits dérivés d'OGM sous la forme :

- d'aliments à base de maïs, de soja et de colza (farine, semoule, huile, chips, tofu...);
- d'ingrédients :
  - farine de maïs, flocons de maïs, semoule de maïs,
  - amidon de maïs et liants amyliques (féculé),
  - dérivés de l'amidon de maïs (sirop de glucose, dextrose, maltodextrines...),
  - farines de soja,
  - protéines de soja,
  - matières grasses végétales (maïs, soja, colza),... ;
- d'additifs :
  - issus du maïs : amidon oxydé (E 1404), phosphates d'amidon (E 1410, E 1412 à E 1414), amidons acétylés (E 1420, E 1422), amidons hydroxypropylés (E 1440, E 1442), succinate d'amidon (E 1450), amidon oxydé acétylé (E 1451), caramels (E 150a à E 150d), sorbitol (E 420), mannitol (E 421), iso-malt (E 953), maltitol (E 965), lactitol (E 966), xylitol (E 967), glucono-lactone (E 575), érythorbates (E 315 et E 316)....,
  - issus du soja : lécithine (E 322), huile de soja oxydée (E 479b)...
- d'arômes ;
- de supports d'arômes (non pris en compte par la réglementation sur l'étiquetage) :
  - produits dérivés du maïs tels qu'amidons, maltodextrines,  $\beta$ -cyclodextrine ;

- d'enzymes (non pris en compte par la réglementation sur l'étiquetage) :
  - du type amylase, utilisées pour la fabrication de bière, d'alcool, de pain, de sirops de maltose et de glucose,
  - du type chymosine et protéase, utilisables pour la fabrication des fromages autres que les AOC (Appellations d'Origines Contrôlées).

Neuf nouvelles lignées OGM ont été proposées pour utilisation dans les filières alimentaires et attendent d'être autorisées selon le règlement 1829/2003/CE (tableau 4). Le maïs doux Bt 11 serait le premier OGM autorisé à la consommation.

Tableau 4 ■ OGM en attente d'être autorisés en alimentation humaine dans le cadre du règlement 1829/2003/CE.

Événement	Caractères d'intérêt	Société	Lieu de dépôt de la notification	Date de dépôt de la notification
Maïs GA 21	Tolérance à un herbicide	Monsanto	Pays-Bas	1999
Maïs Bt 11 (maïs doux)	Résistance aux insectes	Syngenta	Pays-Bas	2000
Maïs NK 603	Tolérance à un herbicide	Monsanto	Pays-Bas	2002
Maïs MON 863	Résistance aux insectes	Monsanto	Allemagne	2003
Maïs MON 863 × MON810	Résistance aux insectes	Monsanto	Allemagne	2003
Maïs 1507	Résistance aux insectes	Pioneer	Pays-Bas	2003
Maïs MON 810 × GA 21	Tolérance à un herbicide et résistance aux insectes	Monsanto	Pays-Bas	2004
Betterave H7-1	Tolérance à un herbicide	Monsanto	Pays-Bas	2004
Soja A 2704-12 at A 5547-127	Tolérance à un herbicide	Bayer CropScience	Belgique	2004

### 1.3. Règlements 1830/2003/CE et 65/2004/CE

Dans le cadre de la mise en place d'un système européen de traçabilité « de la fourche à la fourchette », le règlement 1830/2003/CE (du Parlement et du Conseil du 22 septembre 2003) établit le principe et les modalités de la traçabilité des produits OGM tout au long de leurs chaînes de production et de distribution. Contrairement à la directive 2001/18/CE qui introduit le principe de la traçabilité uniquement pour les OGM en tant que tels, ce règlement vise plus largement :

- tous les produits consistant ou contenant des OGM (à l'exception des médicaments à usage humain et vétérinaire), indépendamment de leur utilisation (culture, transformation industrielle ou alimentaire) ;
- ainsi que tous les produits dérivés d'OGM utilisés en alimentation humaine et animale (ingrédients, additifs et arômes).

L'identification des produits OGM ou dérivés d'OGM à tous les stades de leur mise sur le marché suppose la tenue de registres d'entrée et de sortie des marchandises

assortie d'échanges d'information entre tous les opérateurs des différentes filières. L'ensemble de ces informations doit être conservé pendant une durée de 5 ans.

Afin de faciliter les échanges entre professionnels et les contrôles, le règlement 65/2004/CE (de la Commission du 14 janvier 2004) impose l'attribution d'un code unique (identificateur unique de l'OCDE) à chaque événement de transformation permettant de l'identifier spécifiquement. La transmission de ce code est obligatoire jusqu'à la première transformation du produit, puis seule l'indication du caractère transgénique suffit.

Globalement, les objectifs de la traçabilité (analytique et documentaire) sont la fiabilité de l'étiquetage des OGM et dérivés, la mise en place de dispositifs de surveillance des OGM et le retrait des produits en cas de mise en évidence d'un risque non identifié auparavant.

Afin d'établir le caractère OGM ou non OGM d'un produit, des méthodes de détection plus ou moins spécifiques ont été développées. Certaines reposent sur l'ADN, d'autres sur les protéines comme les tests immunologiques...

## 2. Méthodes immunologiques de détection des OGM

Parallèlement aux techniques de détection fondées sur la présence des éléments de la construction génétique insérée, la détection des OGM peut être également effectuée, dans un certain nombre de cas, en repérant la ou les protéine(s) résultant de l'expression du transgène. On utilise pour cela des tests immunologiques qui nécessitent de disposer d'anticorps correspondant aux protéines recherchées.

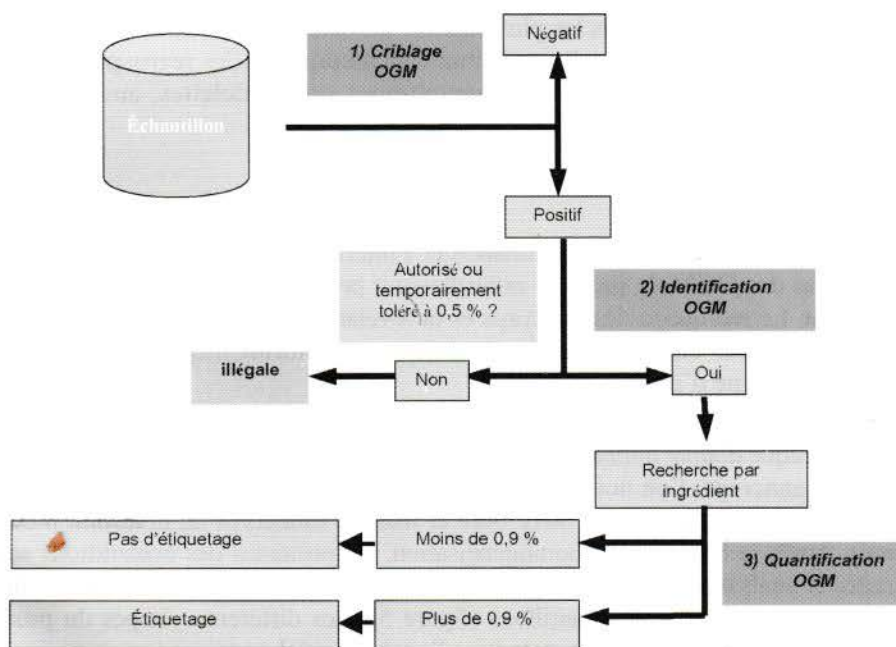


Figure 4 ■ Schéma général d'étude d'un échantillon potentiellement OGM.

Dans le schéma général d'étude des échantillons OGM (figure 4), les tests immunologiques peuvent être utilisés pour cribler, détecter, voire quantifier pour certains tests les OGM.

La procédure de détection immunologique des OGM, comme toute procédure analytique, comprend les étapes suivantes :

- échantillonnage du lot à analyser et préparation du sous-échantillon d'analyse ;
- broyage et homogénéisation de l'échantillon ;
- extraction des protéines ;
- analyses immuno-chimiques ;
- interprétation et expression des résultats (incluant comparaison à des échantillons standards de référence et évaluation des incertitudes de mesure et des résultats des contrôles).

L'échantillonnage du lot et la préparation de l'échantillon d'analyse sont deux étapes cruciales. Au cours de notre description des méthodes d'analyses immuno-chimiques, nous nous attacherons particulièrement à montrer l'importance de la seconde.

## 2.1. Types de méthodes

Comme n'importe quelle protéine, toute protéine d'origine transgénique peut *a priori* être détectée par les différentes catégories d'analyses protéiques existantes : chromatographie, électrophorèses SDS mono/bidimensionnelles, *Western blot*, spectrométrie de masse et ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

En pratique, les techniques les plus utilisées en détection d'OGM restent, cependant, celles fondées sur les techniques immuno-chimiques. Elles regroupent ELISA sur plaques et tests immunochromatographiques sur bandelettes, aussi appelés « strip tests » ou « dip sticks ».

### 2.1.1. ELISA

L'ELISA repose sur la reconnaissance et l'interaction spécifique d'un antigène (dans le cas des OGM, la protéine nouvellement produite) et de son anticorps correspondant. Le marquage des anticorps et la révélation du complexe antigène-anticorps marqué, par une réaction fluorimétrique ou colorimétrique, permettent de mesurer la quantité d'antigène présent.

La mesure de la concentration des protéines transgéniques se fait principalement par la technique *double antibodies sandwich* (DAS-ELISA), où l'antigène est en fait lié à deux anticorps, l'un non-marqué et adsorbé sur un support (anticorps de capture mono- ou polyclonal) et l'autre libre et marqué (anticorps de détection monoclonal). Après le broyage et l'homogénéisation, les protéines des échantillons sont extraites et analysées sur des plaques 96 puits se prêtant bien au traitement automatisé d'un grand nombre d'échantillons (figure 5). Les différentes étapes du protocole, qui dure de 2 à 3 h, imposent de faire l'analyse en laboratoire.

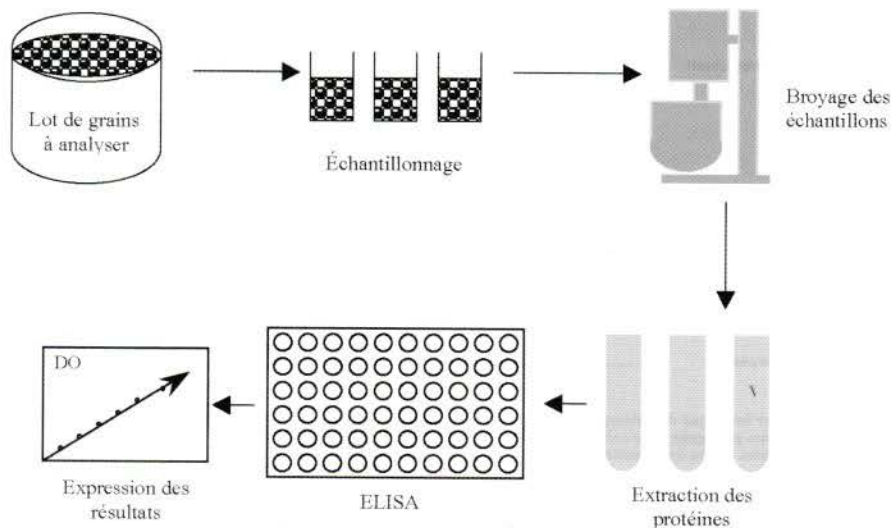


Figure 5 ■ Étapes de la détection par ELISA.

*Remarque* : une technique de PCR suivie d'hybridation sur des puits recouverts de sondes nucléiques marquées et fixées sur un support porte le nom de PCR-ELISA (Garrec *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2004). Il ne s'agit pas d'une méthode immuno-chimique de détection.

### 2.1.2. Tests immunochromatographiques

Les tests immunochromatographiques (*strip test*) utilisés pour la détection des OGM fonctionnent sur le même principe que les ELISA. Ils sont constitués d'une bandelette comprenant, sur un support plastique, une membrane généralement de nitrocellulose encadrée de deux morceaux de papier absorbant (figures 6 et 7).

La partie inférieure de la bandelette est plongée dans l'extrait brut préparé par broyage de l'échantillon dans un tampon approprié ou dans de l'eau. La solution progresse par capillarité au travers du papier absorbant et de la membrane jusqu'à la zone imprégnée d'anticorps spécifiques libres marqués (dans l'exemple donné figure 6, ces anticorps sont marqués par des particules d'or colloïdal). Les protéines GM présentes dans la solution se lient spécifiquement à ces anticorps. Les complexes formés continuent à migrer jusqu'à la zone d'anticorps fixés sur la membrane et y sont immobilisés par une seconde réaction spécifique antigène-anticorps. Les « sandwichs » anticorps libre-protéine GM-anticorps fixé sont révélés par simple visualisation de l'or colloïdal qui forme une ligne colorée sur la bandelette. Un contrôle de migration indépendant du premier test forme une seconde ligne sur le test. Ainsi, pour un test destiné à détecter une protéine cible unique, un résultat positif est indiqué par une bandelette présentant deux lignes colorées. Il est négatif lorsque la bandelette n'en présente qu'une.

La réaction prend de 5 à 10 min, après la préparation de l'extrait brut par broyage. La simplicité du protocole permet une utilisation des *strip tests* directement sur le terrain (champ ou coopérative).

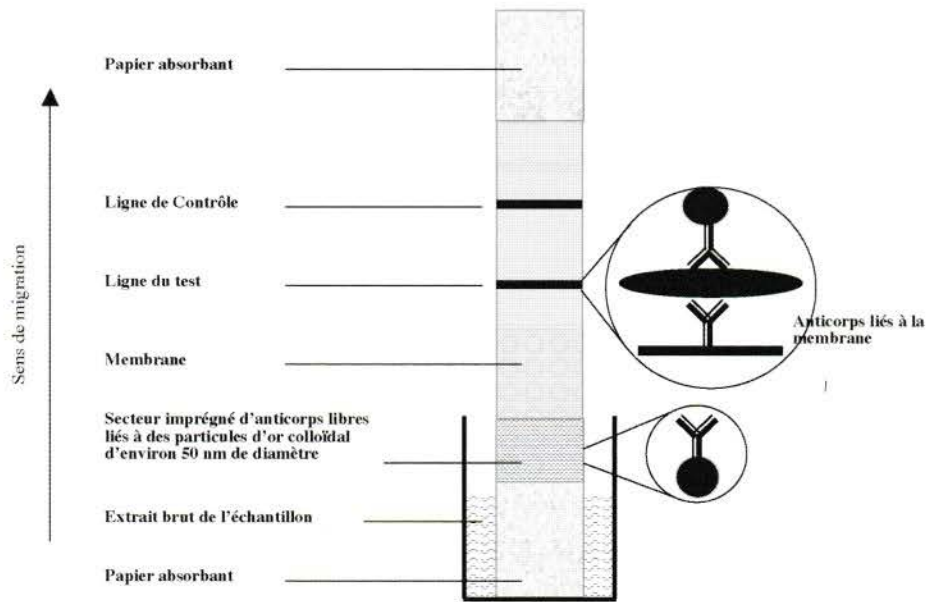


Figure 6 ■ Principe du fonctionnement d'un *strip test* (d'après Stave, 2002).

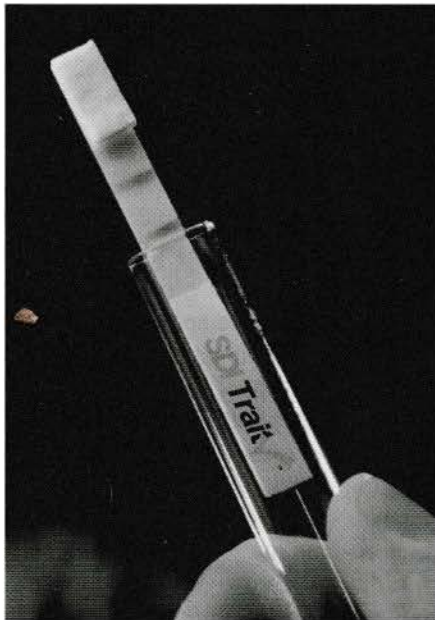


Figure 7 ■ *Strip test* commercialisé par la firme américaine SDI (DE, États-Unis).

## 2.2. Cibles

Les méthodes de détection immunologiques d'OGM visent un caractère exprimé : elles révèlent la présence de séquences codantes et non d'éléments géné-

tiques régulateurs (type promoteurs ou terminateurs). Leurs cibles sont les produits d'expression des transgènes codant pour des protéines nouvelles, qu'ils soient gènes d'intérêt ou gènes marqueurs.

Pour la plupart, les variétés transgéniques cultivées actuellement appartiennent à quatre espèces principales (soja, maïs, coton, colza) (tableau 5) et présentent majoritairement deux grands types de caractères (tableau 6) : des résistances aux insectes, conférées par les protéines Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt), et des tolérances à certains herbicides comme le glyphosate (RoundUp®) et le glufosinate (Liberty Link®) conférées, respectivement, par les protéines EPSPS (5-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase) et PAT (phosphinothricin N-acétyltransférase).

Il existe des tests immunologiques adaptés à la plupart des cultures OGM commercialisées (Brett *et al.*, 1999). Ces tests permettent la détection et la quantification des produits d'expression :

- de gènes marqueurs ou rapporteurs, comme *nptII* (*neomycin phosphotransférase*) (McKenzie *et al.*, 2000) ou *gus* ( $\beta$ -glucuronidase) ;
- de gènes de résistance aux insectes codant pour des protéines comme Cry1A(b), Cry1A(c), Cry1C, Cry1F, Cry2A, Cry3A, Cry3B et Cry9C ;
- de gènes de tolérance aux herbicides codant pour EPSPS comme CP4-*epsps* (issu de la souche CP4 d'*Agrobacterium tumefaciens*), ou pour PAT comme les gènes *bar* et *pat*.

Comme le montre le tableau 7, nombre de ces tests ont été développés sous la forme de kits ELISA (qualitatifs et/ou quantitatifs) et *strip tests* (qualitatifs et/ou semi-quantitatifs) par diverses entreprises comme Strategic Diagnostics Inc. (SDI) (Newark, DE, États-Unis), Envirologix (Portland, ME, États-Unis), Agdia (Elkhart, IN, États-Unis) et Neogen Corporation (Lansing, MI, États-Unis).

Outre les réactifs nécessaires à l'analyse, les kits commerciaux contiennent des contrôles positifs et parfois des échantillons de référence.

### 2.3. Prélèvement d'un échantillon de base

La première étape d'un contrôle consiste dans le prélèvement d'un échantillon de grain de quelques kilogrammes, appelé l'échantillon de base (*bulk sample*), de l'ensemble du lot inspecté. Cet échantillon doit être aussi représentatif que possible de l'ensemble du lot. On trouvera sur le site du GIPSA, dans les normes ISO 6644 ou dans la documentation ISTA (*International seed testing association*) une description des procédures ad hoc pour prélever cet échantillon.

Une méthode simple recommandée pour ce prélèvement est par exemple de mélanger des quantités de grains prélevées à intervalles réguliers lors du déchargement, mais ce mode d'échantillonnage n'est pas toujours possible à cause de la durée parfois fort longue du déchargement (plusieurs heures).

Une partie de l'échantillon de base est utilisée pour les analyses de laboratoire, le reste étant gardé pour permettre le cas échéant une contre-expertise (une proposition récente du JRC est de garder un échantillon de chacun des prélèvements effectués pour, le cas échéant, analyser une possible hétérogénéité d'un lot contenant l'OGM

Tableau 5 ■ Principales espèces OGM cultivées (source, ISAAA).

Répartition mondiale des surfaces cultivées en OGM									
Espèces	1996 (M ha)	1997 (M ha)	1998 (M ha)	1999 (M ha)	2000 (M ha)	2001 (M ha)	2001 (%)	2002 (M ha)	2002 (%)
Soja	0,45	5,04	13,59	21,6	25,8	33,3	63	36,5	62
Maïs	0,3	2,51	9,11	11,1	10,3	9,8	19	12,4	21
Colza	0,11	1,42	2,43	3,4	2,8	2,7	5	3	5
P. de terre	0,01	0,01	0,03	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Coton	0,73	1,43	2,46	3,7	5,3	6,8	13	6,8	12
Total	1,6	10,51	27,62	39,9	44,2	52,6	100	58,7	100

Part de surfaces cultivées en OGM pour chacune des quatre principales espèces cultivées transformées génétiquement					
Espèces	Surfaces cultivées mondiales (M ha) en 2002	Surfaces cultivées en OGM (M ha) en 2000	Surfaces cultivées en OGM (%) en 2000	Surfaces cultivées en OGM (M ha) en 2002	Surfaces cultivées en OGM (%) en 2002
Soja	72	25,8	36	36,5	51
Coton	34	5,3	16	6,8	20
Colza	25	2,8	11	3,0	12
Maïs	140	10,3	7	12,4	9
Total	271	44,2	18	58,7	21,7

Tableau 6 ■ Principaux types de caractères agronomiques transférés dans les variétés génétiquement modifiées effectivement cultivées (source ISAAA).

Caractères	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
Tolérance à un herbicide	23	54	71	71	74	77	75
Résistance aux insectes	37	31	28	22	19	15	17
Tolérance à un herbicide et résistance aux insectes	–	< 1	1	7	7	8	8
Résistance aux virus	40	14	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Qualité du produit récolté	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Total	100	100	100	100	100	100	100

Tableau 7 ■ Exemples de tests immunologiques commercialisés pour la détection d'OGM.

Protéine détectée	Matrice	ELISA				Strip tests			
		AgDia	Envirologix	Neogen	SDI	AgDia	Envirologix	Neogen	SDI
CP4 EPSPS	Feuilles/grains	ELISA plate	– QualiPlate™ pour maïs NK603 et coton – QuantiPlate™ pour soja	GMOCheck™ (v <sup>1</sup> sur soja)	Immuno strip	Quickstix™ (3 pour maïs et soja)	Reveal®	TraitCheck™ (v <sup>3</sup> sur maïs et soja)	
	Aliments		QuantiPlate™ pour farine de soja		GMOCheck™ pour soja				TraitCheck™ pour soja
PAT	Feuilles/grains		Plate kits pour <i>bar</i> et <i>pat</i> (v <sup>3</sup> sur maïs)				Quickstix™		TraitCheck™
	Aliments								
Cry1A(b)	Feuilles/grains		QualiPlate™		GMOCheck™ (v <sup>2</sup> sur maïs)		Quickstix™ (v <sup>3</sup> sur maïs)		TraitCheck™
	Aliments								
Cry1A(c)	Feuilles/grains		Plate kit						
	Aliments								
Cry1A(b) et PAT	Feuilles/grains								TraitCheck™
	Aliments								

v<sup>1</sup> : validé par le LRC/JRC (étude collaborative pour le soja Roundup Ready) ; v<sup>2</sup> : validé par l'AACC (*ring test* sur le maïs Mon810) ; v<sup>3</sup> : validé par le USDA-GIPSA.

Tableau 7 (suite) ■ Exemples de tests immunologiques commercialisés pour la détection d'OGM.

Protéine détectée	Matrice	ELISA				Strip tests			
		AgDia	Envirologix	Neogen	SDI	AgDia	Envirologix	Neogen	SDI
Cry1A(b) et Cry1A(c)	Feuilles/grains	ELISA plate	QuantiPlate™			Immuno strip	Quickstix™		
	Aliments								
CP4 EPSPS et Cry1A(b)/Cry1A(c)	Feuilles/grains	ELISA plate							
	Aliments								
Cry1F	Feuilles/grains		QualiPlate™				Quickstix™		TraitCheck™ (v <sup>3</sup> )
	Aliments								
Cry2A	Feuilles/grains	ELISA plate	Plate kit			Immuno strip	Quickstix™		
	Aliments								
Cry3B	Feuilles/grains	ELISA plate					Quickstix™		TraitCheck™
	Aliments								
Cry9C	Feuilles/grains	ELISA plate	QuantiPlate™ (v <sup>3</sup> )		GMOCheck™ (v <sup>6</sup> , v <sup>3</sup> sur maïs)	Immuno strip	Quickstix™ (v <sup>3</sup> )	Reveal®	TraitCheck™ (v <sup>3</sup> )
	Aliments								

v<sup>1</sup> : validé par le LRC/JRC (étude collaborative pour le soja Roundup Ready) ; v<sup>2</sup> : validé par l'AACC (*ring test* sur le maïs Mon810) ; v<sup>3</sup> : validé par le USDA-GIPSA.

recherché). La partie destinée aux analyses de laboratoire peut être subdivisée de façon aléatoire en plusieurs « *groupes de grains* », aussi appelés « *sous-échantillons* », qui sont analysés séparément. Chaque sous-échantillon est broyé et analysé séparément en vue d'y rechercher la présence éventuelle d'OGM. L'analyse de chaque sous-échantillon produit une réponse, par exemple en ELISA l'augmentation de densité optique par unité de temps, notée ici  $\Delta_{DO}$ . Le caractère quantitatif d'une telle réponse peut être exploité pour obtenir une estimation de la concentration de protéine transgénique recherchée. Il faut pour cela disposer de cette même réponse pour une gamme de référence et c'est par comparaison à cette gamme qu'on estime la concentration de protéine transgénique dans l'échantillon (voir paragraphe 2.5.2).

Plusieurs facteurs peuvent jouer sur une réponse telle que l'augmentation de DO par unité de temps  $\Delta_{DO}$ . Si ces facteurs ne jouent pas de la même façon sur les sous-échantillons testés et sur la gamme de référence, l'estimation de concentration peut être fortement biaisée. Il peut donc être judicieux de ne retenir du signal obtenu que la présence ou l'absence de la protéine. L'analyse basée sur ces résultats de présence, absence dans les différents sous-échantillons est moins sujette à caution. On dit aussi qu'elle est plus robuste.

Il y a donc deux façons de traiter le signal. On peut le dégrader et ne retenir pour chaque sous-échantillon que cet aspect « *qualitatif* » de présence ou absence, appelé en contrôle de qualité un « *attribut* » du sous-échantillon. On peut au contraire comparer le signal quantitatif obtenu au même signal pour la gamme de référence et en déduire une estimation quantitative de la concentration mais cette façon de procéder est moins robuste.

On passe assez facilement du signal quantitatif à l'attribut de présence, absence. Par exemple en ELISA, la présence se traduit par une augmentation nette de DO, qui n'a pas lieu en cas d'absence. Si l'on veut un test statistique de présence, on peut utiliser un test t de Student unilatéral pour déceler si la  $\Delta_{DO}$  du groupe de graines testé est supérieure ou pas à la  $\Delta_{DO}$  d'échantillons de référence dans laquelle la protéine recherchée est absente (voir paragraphe 2.4.2.2).

On présente dans les paragraphes suivants les deux approches utilisées. D'abord le contrôle de qualité basé sur les attributs des différents groupes de graines analysés, c'est-à-dire sur les réponses qualitatives de présence, absence obtenues. Ensuite, la méthode de calibration qui part de la réponse quantitative telle que la  $\Delta_{DO}$ .

Dans tous les cas, la procédure utilisée part de l'échantillon de base. Il est donc important que celui-ci soit aussi représentatif que possible de l'ensemble du lot. Il est donc essentiel de suivre les procédures recommandées pour le prélever.

Le paragraphe suivant explique comment, avec une procédure de contrôle qui s'appuie exclusivement sur les attributs de présence/absence, on peut maîtriser à la fois le risque de l'acheteur du grain et celui du producteur. Une telle procédure est notamment indiquée dans les cas où l'OGM recherché est toléré jusqu'à un certain seuil. L'acheteur ne veut pas que ce seuil soit dépassé, mais lorsqu'on est nettement au-dessous du seuil, et qu'il n'y a donc que des traces de cet OGM, il est important pour le producteur que le lot ne soit pas refusé.

## 2.4. Réponse qualitative

### 2.4.1. Types de méthodes utilisables

Les deux types de méthodes, ELISA et strip tests, sont utilisables pour déterminer si une protéine cible est présente ou non dans un groupe de grains.

La taille de chaque groupe de grains doit être assez petite pour être certain d'avoir un résultat positif même quand il n'y a qu'un unique grain OGM dans le groupe. Ainsi dans le cas des produits Envirologix, la plupart des strip tests disponibles ont une LOD (*limit of detection*) de 1 %, ce qui veut dire que ces tests sont capables de détecter une graine OGM dans 100 grains et pas au-dessous. Dans ce cas, la taille de chaque sous-échantillon ne doit pas excéder 100 grains. Les kits ELISA pour analyse qualitative (Qualiplate™) ont une LOD plus faible de 0,25. Ils peuvent donc détecter jusqu'à une graine OGM parmi 400 et les sous-échantillons peuvent avec ces kits comporter jusqu'à 400 grains.

Le paragraphe suivant « Plan de contrôle simple et double » précise comment élaborer un plan de contrôle permettant de maîtriser le risque de l'acheteur aussi bien que celui du vendeur, tout en réduisant au maximum les coûts d'analyse. Notons que si on ne se préoccupe que du risque de l'acheteur, c'est le nombre total  $M$  de grains analysés qui est déterminant et l'approche la plus économique dans ce cas est d'analyser suffisamment de groupes de la taille maximum possible pour atteindre ce nombre total  $M$  de grains.

Supposons par exemple que l'on veuille pouvoir détecter avec une probabilité de 99 % qu'un lot contient 1 % ou plus de grains OGM. Notons  $p$  ce pourcentage ( $p = 1 \%$ ). Quand on prend un grain au hasard dans l'échantillon de base, la probabilité qu'il ne soit pas OGM est  $1 - p = 99 \%$ . Quand on en prend deux, la probabilité qu'aucun des deux ne soit OGM est  $(1 - p)^2 = 0,99^2 = 0,98$ . Quand on en prend  $M$ , la probabilité qu'aucun des  $M$  ne soit OGM est  $(1 - p)^M$ . La probabilité d'avoir au contraire un grain OGM parmi ces  $M$  est donc  $1 - (1 - p)^M$ . Pour que cette probabilité soit supérieure à 99 %, il faut prendre  $M > 459$  :

$$1 - 0,99^{458} = 0,98997881$$

$$1 - 0,99^{459} = 0,99007902$$

Si on travaille avec le QuickStix™ Kit pour Cry1F d'Envirologix, la taille d'un groupe de grains ne pouvant excéder 100, on doit analyser cinq groupes au minimum, et il paraît logique alors de retenir cinq groupes de 92 grains (soit 460 grains au total) pour avoir des groupes de taille égale.

Pour avoir la même probabilité de détecter dans 99 % des cas avec la méthode ELISA, on a besoin de deux groupes au moins puisque la taille du groupe ne peut excéder 400 grains dans ce cas. Mais si l'on accepte de ne détecter que dans 95 % des cas, on peut alors se contenter d'un groupe de 299 grains puisque :

$$1 - 0,99^{298} = 0,949963$$

$$1 - 0,99^{299} = 0,950463$$

Tout ceci suppose bien sûr que le protocole ait été respecté à la lettre et qu'il n'y ait ni contamination, ni réaction croisée des anticorps. Dans le cas contraire, il faut

prendre en compte ce type d'erreurs, ce qui n'est possible que si l'on a déterminé leurs probabilités d'occurrence par des études préalables (Kobilinsky et Bertheau, 2002).

#### 2.4.2. Contrôle de qualité par attribut

La figure 8 illustre le contrôle d'un lot de grains par un plan d'échantillonnage simple. La seule propriété retenue ici pour décider de l'acceptation ou du rejet du lot est la présence ou l'absence d'OGM dans des groupes de graines. Comme indiqué au paragraphe « Prélèvement d'un échantillon de base », un contrôle basé uniquement sur cet « attribut » de chaque groupe de grains est certainement plus robuste qu'un contrôle basé sur une réponse quantitative souvent très sensible.

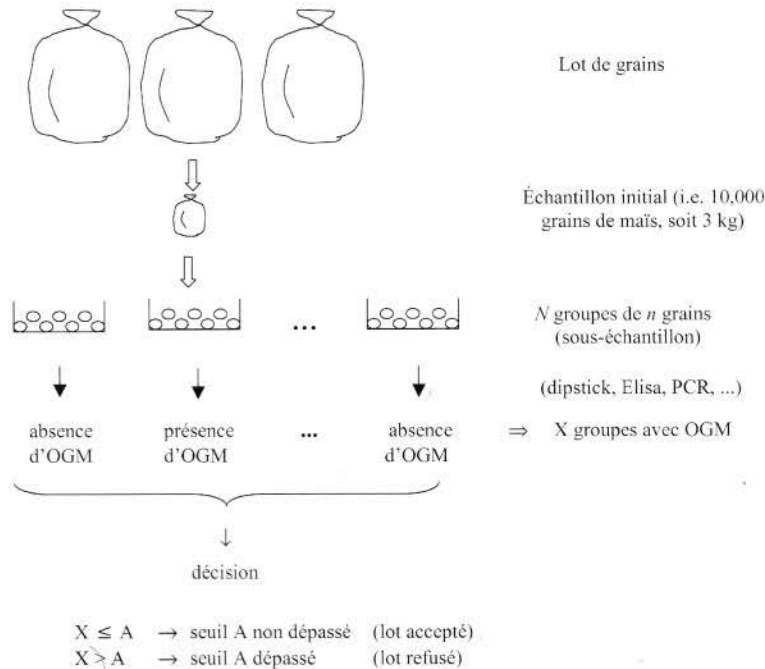


Figure 8 ■ Plan de contrôle simple par attribut.

##### 2.4.2.1. Plan de contrôle simple et double

Les attributs de présence/absence d'OGM dans les groupes de grains peuvent être utilisés dans un plan d'échantillonnage adapté pour décider si le pourcentage de grains GM (génétiquement modifié) est inférieur ou pas à un seuil prédéterminé. Le seuil en question dépend naturellement de la nature de l'OGM et de la réglementation en vigueur. Ainsi en 2004, il y a obligation d'étiquetage pour un OGM autorisé si le pourcentage de ces grains GM dépasse 0,9 % (directives européennes 1829/2003/EC et 1830/2003/EC). Il faut donc décider si la proportion de grains génétiquement modifiés, notée  $p$  dans ce qui suit, est inférieure ou pas à 0,9 %.

La proportion  $p$  est bien sûr inconnue, mais elle peut être estimée à partir des attributs des différents groupes de grains extraits de l'échantillon de base. Dans cette approche, on fait les hypothèses suivantes :

- chaque grain a la probabilité  $p$  d'être GM (génétiquement modifié) indépendamment des autres, comme cela se passerait si l'extraction des grains de l'échantillon de base se faisait totalement au hasard ;
- la sensibilité de la méthode de détection et la taille des groupes de grains sont telles que la présence d'un seul grain GM dans le groupe est détectable.

La première hypothèse repose essentiellement sur la représentativité de l'échantillon de base, dont il a déjà été question. La seconde dépend de la sensibilité de la méthode immunologique utilisée pour détecter l'antigène recherché. Par exemple, on sait qu'avec la méthode ELISA on peut généralement détecter une graine GM dans un groupe ayant aux alentours de 500 graines. Pour déceler plus précisément la limite à ne pas excéder, il est prudent d'étudier dès le départ la relation entre le nombre de grains GM et la  $\Delta_{DO}$ , et de choisir la taille du groupe de façon à ce que la puissance du test de détection soit supérieure à un seuil déterminé (99 % par exemple) lorsqu'on a une seule graine GM dans le groupe.

Comme cela est habituel en contrôle de la qualité, on peut utiliser un plan d'échantillonnage simple ou double. Dans le plan simple (figure 8),  $N$  groupes de  $n$  grains sont extraits de l'échantillon de base et le lot est accepté si le nombre  $X$  de groupes contenant des OGM est au-dessous d'un certain seuil d'acceptation  $A$ . Dans le plan double, il peut y avoir deux étapes. Dans la première,  $N_1$  groupes de  $n_1$  grains sont d'abord analysés. Le lot est accepté si le nombre  $X_1$  de groupes GM est au-dessous d'un seuil d'acceptation  $A_1$  et rejeté si  $X_1$  est au-dessus d'un certain seuil de rejet  $R_1$ . Entre les deux, c'est-à-dire si  $A_1 < X_1 < R_1$ , un second ensemble de  $N_2$  groupes de  $n_2$  grains est analysé. La décision d'accepter, rejeter (ou étiqueter) est alors basée sur les nombres  $X_1$  et  $X_2$  de groupes GM respectivement parmi les  $N_1$  et  $N_2$  groupes des deux étapes. Plus précisément,  $X_2$  est comparé à un seuil  $A_2$  choisi d'autant plus petit que  $X_1$  est grand. S'il est inférieur, le lot est accepté, sinon il est rejeté.

Kobilinsky et Bertheau (2002, 2005) décrivent une méthode pour sélectionner des paramètres  $N_1, n_1, A_1, R_1, N_2, n_2, A_2$  appropriés. Ils proposent de choisir le plan d'échantillonnage le moins coûteux parmi ceux qui rendent les risques de l'acheteur et du producteur inférieur à des seuils prédéfinis. Ces deux risques sont décrits dans le standard de la norme ISO 3534. Le risque de l'acheteur est la probabilité d'accepter un lot qui contient un nombre de grains GM excédant le seuil autorisé. Le risque du producteur est la probabilité de se voir refuser un lot acceptable, c'est-à-dire où le nombre de grains GM est au-dessous du seuil autorisé. Ce type d'approche est également décrit par Remund *et al.* (2001).

En examinant s'il y a ou pas présence d'OGM dans un nombre relativement restreint de groupes de graines, il apparaît que l'on peut maîtriser aussi bien le risque du producteur que celui de l'acheteur. Cette double maîtrise semble dans bien des cas plus adaptée que la seule maîtrise du risque de l'acheteur permise par les plans aujourd'hui préconisés par les standards européens. Ceux-ci prévoient aussi l'utilisation de plusieurs groupes de graines broyées et testés séparément mais uniquement pour tenir compte de la sensibilité de la méthode de détection. Cependant, ils ne se

préoccupent que du risque de l'acheteur et peuvent donc conduire à un rejet quand il n'y a que des traces de l'OGM considéré, alors même que les règlements autorisent de telles traces parce qu'on les sait inévitables et que l'innocuité de l'OGM en question a été démontrée.

#### ► EXEMPLE

La figure 9 donne les caractéristiques opérationnelles de quelques plans d'échantillonnage simple et double. En abscisse est reportée la proportion  $p$  de grains OGM dans le lot. En ordonnée la probabilité d'acceptation du lot.

1	plan simple	$N=1$	$n=300$	$A=0$				
2	plan simple	$N=3$	$n=300$	$A=1$				
3	plan simple	$N=7$	$n=204$	$A=4$				
4	plan double	$N_1=1$	$n_1=333$	$A_1=0$	$R_1=2$	$N_2=6$	$n_2=339$	$A_2(1)=4$
5	plan double	$N_1=2$	$n_1=393$	$A_1=1$	$R_1=3$	$N_2=5$	$n_2=330$	$A_2(2)=3$

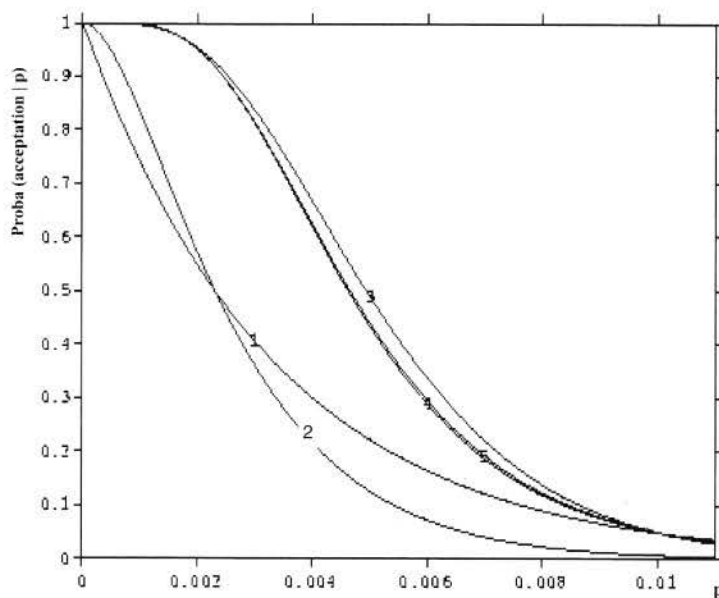


Figure 9 ■ Courbes d'efficacité (operating characteristic curves) de quelques plans d'échantillonnage simple et double.

Tous ces plans sont tels que si la proportion  $p$  dépasse 1 % de grains OGM, la probabilité d'acceptation du lot est inférieure à 5 %. Ils satisfont donc la contrainte de l'acheteur. Cependant, les deux plans simples 1 et 2, qui utilisent respectivement 1 et 3 groupes de graines, ne donnent à un lot ayant seulement 0,2 % de grains OGM qu'une probabilité 1/2 d'être accepté, ce qui peut être rédhibitoire pour un producteur. Si l'on veut avec un plan simple s'assurer qu'un tel lot contenant moins de 0,2 % de grains OGM soit accepté avec une probabilité de 95 %, il faut réaliser un plan tel que le 3 où on broie et analyse au moins 7 groupes de grains. Si l'on pra-

tique l'échantillonnage double, on peut respecter cette même contrainte du producteur en même temps que celle de l'acheteur avec les plans 4 et 5 qui n'utilisent à la première étape que 1 ou 2 groupes de graines et n'utilisent d'avantage de groupes que lorsque ces premières analyses laissent un doute. Kobilinsky et Bertheau (2002) décrivent le mode d'obtention de ces derniers plans bâtis pour minimiser le coût d'analyse sous certaines hypothèses réalistes.

#### 2.4.2.2. Test de présence (*t* de Student)

S'il y a 10 témoins sans OGM, donnant des augmentations  $\Delta_{DO}$  de DO par heure entre  $-0,05$  et  $0,05$  et qu'on trouve pour un puits d'un échantillon testé une  $\Delta_{DO}$  de  $0,80$ , la présence dans ce puits d'OGM ne fait pas de doute. Le test de présence peut naturellement être formalisé en prenant la différence entre le résultat du puits testé et le résultat moyen des témoins sans OGM, et en divisant cette différence par son écart type estimé dans ce cas avec  $9 = 10 - 1$  degrés de liberté. Le tableau 8 donne un exemple qui conduit à une valeur de test de  $21,45$ .

Tableau 8 ■ Comparaison d'un échantillon testé à la moyenne des témoins.

Résultats des témoins	$-0,025 \ 0,021 \ -0,025 \ 0,049 \ 0,029 \ 0,014 \ 0,041 \ -0,013 \ -0,047 \ -0,050$
Moyenne des témoins	$-0,0006$
Variance des témoins	$0,001298 = [(-0,025 + 0,0006)^2 + \dots + (-0,050 + 0,0006)^2]/9$
Variance de la moyenne des témoins	$0,0001298 = 0,001298/10$
Résultat du puits testé	$0,81$
Différence entre puits testé et moyenne des témoins	$0,8106 = 0,81 - (-0,0006)$
Variance associée	$0,0014278 = 0,001298 + 0,0001298$
Écart-type associé	$0,037786$
Test <i>t</i> de Student	$21,45 = 0,8106/0,037786$

La probabilité qu'un *t* de Student à 9 degrés de liberté centré dépasse une telle valeur de  $21,45$  est pratiquement nulle ( $< 10^{-8}$ ) ce qui indique que l'échantillon testé contient de l'OGM. Il est cependant prudent de se méfier de ce type de formalisation. En pratique l'expérimentateur considère souvent comme témoins indépendants des puits ayant reçu en fait un même extrait. La variabilité entre ces puits peut être très inférieure à ce qu'elle serait si tous ces puits témoins correspondaient à des extraits différents. Donc l'écart type peut être sous-estimé et le *t* de Student très sur-estimé. Mais si l'expérience passée montre, avec des extraits bien différents, que la  $\Delta_{DO}$  n'excède généralement pas  $0,05$  en valeur absolue en l'absence d'OGM, une valeur de  $\Delta_{DO}$  de  $0,80$  indique manifestement, sauf grosse erreur de manipulation, un puits qui contient l'analyte recherché.

## 2.5. Réponse quantitative

### 2.5.1. Types de méthodes utilisables

L'ELISA sur plaque est adaptée à l'analyse quantitative d'échantillons potentiellement OGM. La comparaison des résultats obtenus à une gamme standard établie à l'aide d'un matériel de référence permet de quantifier la protéine cible.

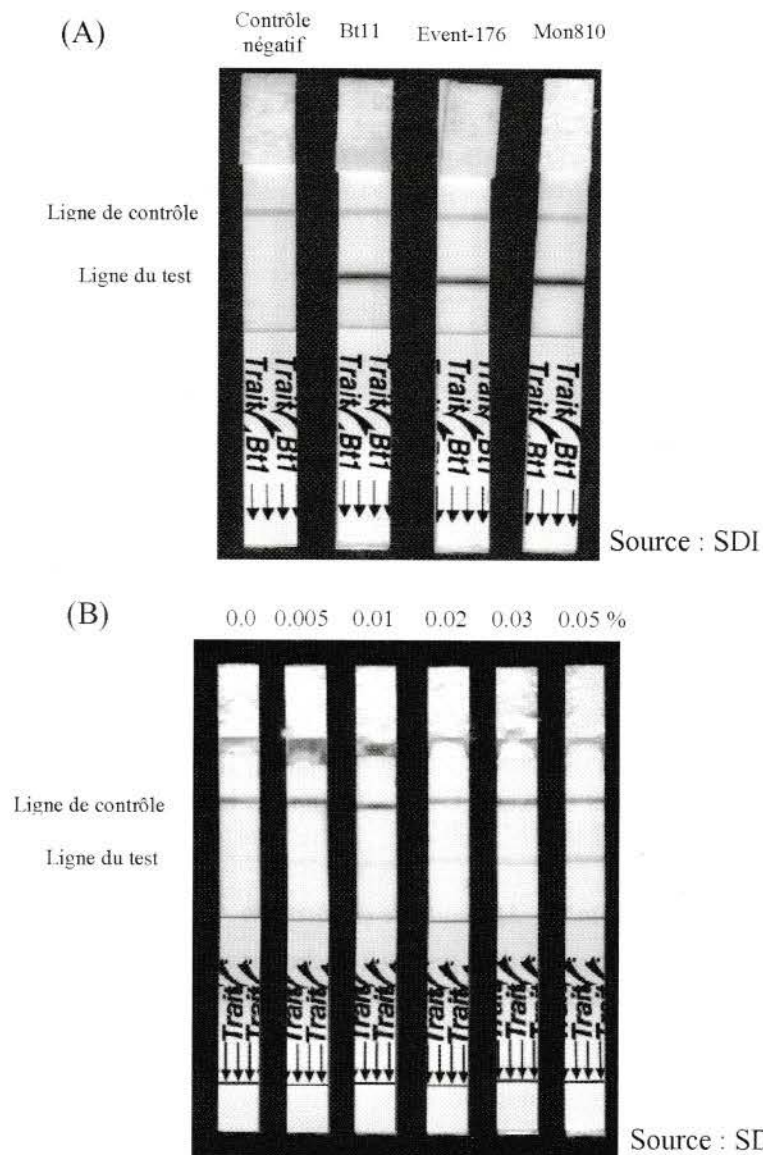
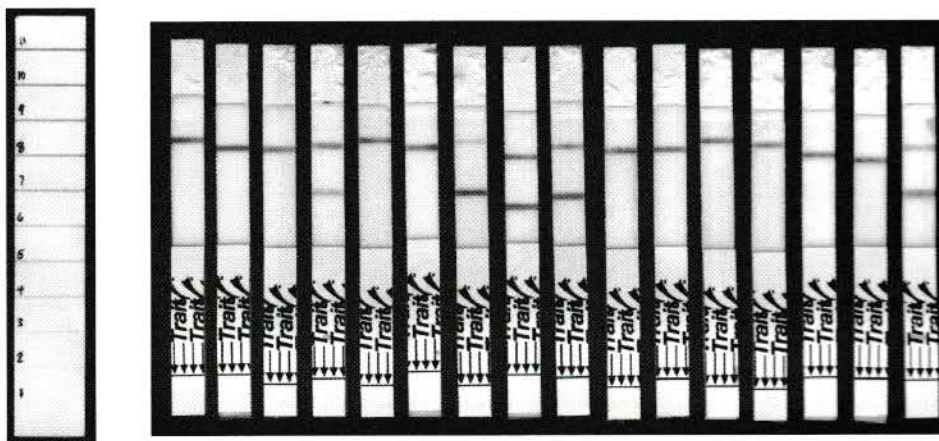


Figure 10 ■ Détection de la protéine transgénique CryIA(b) par un *strip test* de la société SDI.

(A) Analyse qualitative sur différentes lignées de maïs transgéniques (Bt11, Bt176 et Mon810) exprimant toutes Cry1A(b) ; (B) Analyse semi-quantitative sur des extraits contenant différents pourcentages de maïs Bt11.

Les *strip tests* peuvent également être utilisés pour des analyses semi-quantitatives en comparant l'intensité des bandes colorées apparues sur le test à un nuancier établi à partir d'une série de concentrations croissantes de matériel de référence (figures 10 et 11). Cette quantification approximative donne des résultats voisins de ceux obtenus en ELISA (figure 11).

Échantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
ELISA (% OGM)	-	-	-	< 0,1	-	-	1,3	0,2	0,3	-	-	-	-	-	-	0,5
Strip test (valeur d'intensité)	-	-	-	4	-	-	10	8	8	-	-	-	-	-	-	7



Échelle d'intensité

Figure 11 ■ Corrélation entre la détection semi-quantitative de soja roundup ready par ELISA et *strip test* (source SDI).

Il arrive que les résultats obtenus par ELISA soient significativement différents de ceux obtenus par PCR (Powel et Owen, 2002), mais la plupart du temps ils sont parfaitement cohérents (Lin *et al.*, 2001).

### 2.5.2. Dosage quantitatif – Méthode de calibration

Le contrôle de qualité par attribut permet à l'acheteur et au vendeur de trouver un compromis limitant leurs risques pourvu que plusieurs groupes de grains soient analysés.

Pour apprécier quantitativement la concentration de la protéine recherchée en limitant les coûts, on peut aussi limiter le contrôle à une ou deux analyses par échantillon et utiliser, au lieu du seul attribut de présence/absence de l'OGM, le caractère quantitatif de la réponse obtenue, l'augmentation  $\Delta_{DO}$  de densité optique par unité de temps. Cette appréciation quantitative s'effectue par comparaison au matériel de référence, et comme cela a déjà été signalé, elle peut être fortement biaisée par les différences importantes pouvant exister entre ce matériel de référence et l'échantillon analysé. Dans les cas où des études préalables permettent d'aboutir à

un mode opératoire qui limite ces différences, on peut utiliser, pour doser, la méthode classiquement utilisée dans les essais biologiques qui consiste à quantifier par comparaison à un standard, (Finney, 1978 ; Govindarajulu, 2001 ; Huet et Laporte, 1988 ; Huet *et al.*, 2003 ; Volund, 1978).

L'évolution de la  $\Delta_{DO}$  en fonction de la concentration  $C$  est modélisée sous la forme :

$$y = f(\log(C)) + \varepsilon$$

En règle générale la fonction  $f$  a une forme de logistique qui dépend de 3 ou 4 paramètres, par exemple :

$$f(Z) = \frac{M}{1 + \exp[(4 \mu/M)(\lambda - Z) + 2]} \quad (0)$$

Cette fonction  $f$  croît de 0, obtenu quand  $C = 0$ , soit  $Z = \log(C) = -\infty$  jusqu'au maximum  $M$  obtenu quand  $C$  donc  $Z$  tendent vers l'infini. Le paramètre  $\mu$  est ici la pente de la tangente au point d'inflexion et  $\lambda$  l'abscisse où cette tangente coupe l'axe des abscisses. Pour rendre la courbe plus flexible, on peut élever le dénominateur à une certaine puissance qui constitue alors le quatrième paramètre (Huet *et al.*, 2003).

Notons  $C_s$  la concentration de la protéine cherchée dans la solution standard. Si on note  $y_{si}$  la  $\Delta_{DO}$  obtenue pour le  $i^e$  puits de standard ( $s$  pour standard),  $d_i$  la dilution associée, et enfin  $\varepsilon_{si}$  le terme d'erreur correspondant, on a donc :

$$y_{si} = f[\log(d_{si} C_s)] + \varepsilon_{si} \quad (1)$$

Si on note de même  $y_{ti}$ ,  $d_{ti}$ ,  $\varepsilon_{ti}$  : la  $\Delta_{DO}$ , la dilution et l'erreur pour la  $i^e$  solution à tester ( $t$  pour test) et  $C_t = \rho C_s$  : sa concentration inconnue, les  $\Delta_{DO}$  des puits où on a déposé cette solution sont modélisées sous la forme

$$y_{ti} = f[\log(d_{ti} \rho C_s)] + \varepsilon_{ti} \quad (2)$$

Partant de (1) et (2), on peut estimer par une méthode d'ajustement non linéaire des moindres carrés les paramètres de la logistique et le coefficient  $\rho$  donnant la concentration inconnue en fonction de la concentration du standard. Ce coefficient est appelé « activité » (*potency* en anglais). Cette méthode permet aussi d'apprécier les variances et covariances des coefficients estimés et d'en dériver des intervalles de confiance. On notera que si l'on représente  $f$  avec en abscisse le logarithme de la dilution, la courbe test est la courbe standard translatée d'une quantité  $-\log(\rho)$ . Si  $\rho$  est plus petit que 1,  $-\log(\rho)$  est positif et cette translation est vers la droite. Elle est vers la gauche dans le cas où  $\rho > 1$ . On peut apprécier bien sûr visuellement ce déplacement horizontal, en déduire une première estimation de  $\log(\rho)$  que l'on peut utiliser comme point de départ dans les itérations de l'ajustement non linéaire.

Lorsqu'on ne dispose que d'une dilution  $d_t$  de la solution testée, on estime  $\log(d_t \rho)$  comme la dilution qui donne la  $\Delta_{DO}$  observée sur la courbe standard et on en déduit  $\log(\rho)$  par soustraction de  $\log(d_t)$ .

Lorsqu'on dispose de plusieurs dilutions de l'échantillon test on peut donc s'en servir pour obtenir une estimation plus fiable de la concentration cherchée. Il est aussi possible de tester que les courbes test et standard sont bien translatées, i.e. que la solution test se comporte comme le standard, à la concentration près.

2.5.3. *Obtention de la  $\Delta_{DO}$*

La  $\Delta_{DO}$ , augmentation de DO par unité de temps, est déterminée en régressant les DO mesurées sur les temps de mesure correspondants. On n'utilise pour effectuer cette régression que les temps où la DO n'excède pas la limite de lecture généralement voisine de trois. Si il y a des différences importantes de concentration de l'analyte recherché, la densité optique évolue à des vitesses totalement différentes d'un puits à l'autre et le nombre de puits utilisés pour déterminer la  $\Delta_{DO}$  est donc nettement plus réduit pour un puits à évolution rapide que pour un puits à évolution lente.

La régression de la DO mesurée sur le temps, effectuée en ne prenant donc en compte pour chaque puits que les temps où cette DO n'excède pas la capacité de lecture, donne une équation de droite :

$$y = a + b t$$

en notant  $y$  la DO et  $t$  le temps exprimé en secondes. La pente  $b$  fournit la mesure  $\Delta_{DO}$  recherchée. La comparaison des ordonnées à l'origine et des écarts-types résiduels de ces régressions est utile pour détecter des évolutions anormales.

Les valeurs  $a$  de l'ordonnée à l'origine donnent la densité optique initiale, pourvu que l'on prenne comme temps 0 le temps de dépôt dans les plaques. Ces densités optiques doivent être similaires et ne pas différer significativement de celle des témoins.

Généralement les écarts-types résiduels  $s$  des régressions augmentent avec la valeur de  $\Delta_{DO}$ , comme cela se voit nettement sur le graphique de la figure 12 où on a représenté  $s$  en fonction de la  $\Delta_{DO}$  pour l'ensemble des puits d'une plaque ELISA.

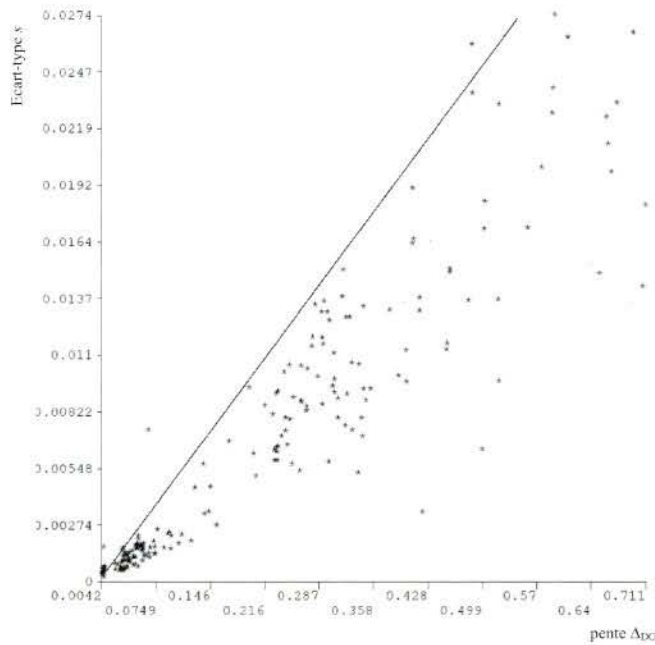


Figure 12 ■ Écarts-types résiduels des régressions DO/temps en fonction des pentes (droite d'équation  $y = A x$  avec  $A = 0,05$ ).

On a reporté sur ce graphique une droite passant par l'origine d'équation  $y = Ax$ , où  $A$  a été déterminé manuellement de façon à laisser la grande majorité des points au-dessous de cette droite. Les points au-dessus sont suspects et il est naturel de réexaminer pour chacun d'eux l'évolution de la DO en fonction du temps. La figure 13 donne le graphique DO versus temps pour un des points suspects ainsi détectés. Il montre une augmentation anormalement grande de la DO après 3 300 s et suggère de recommencer la régression en écartant cette dernière mesure.

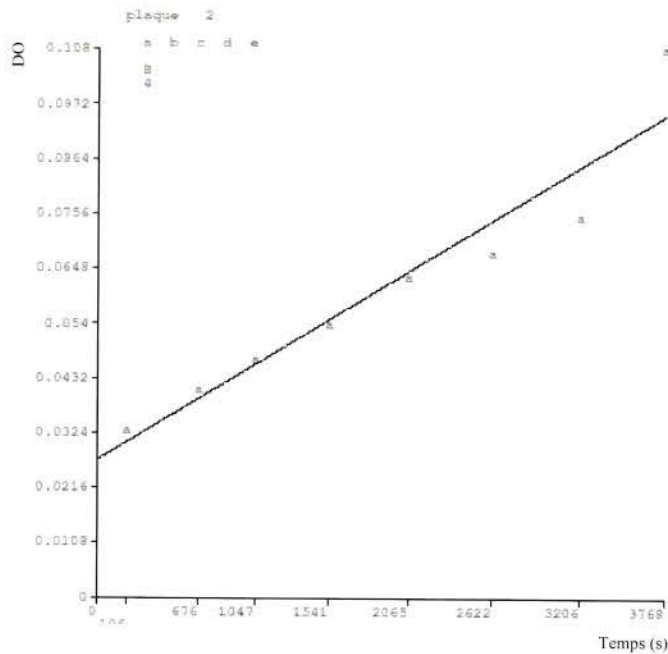


Figure 13 ■ DO en fonction du temps pour un puits où la régression a un écart-type résiduel anormalement grand.

La figure 14 montre aussi que les écarts-types résiduels estimés sont d'autant plus dispersés que la  $\Delta_{DO}$  est importante.

Cela suggère pour détecter les puits à évolution anormale une procédure légèrement différente. On remplace  $s$  et  $\Delta_{DO}$  par leurs logarithmes. Pour  $\Delta_{DO}$ , qui peut parfois prendre des valeurs faiblement négatives, on utilise plus précisément une variable  $\log(\Delta_{DO} + B)$  où la constante  $B$  est choisie assez grande pour éviter d'avoir à prendre le logarithme d'un nombre négatif. Pour détecter les puits à évolution anormale, on effectue alors une régression quadratique qui donne une courbe d'équation :

$$\log(s) = a + b \log(\Delta_{DO} + B) + c [\log(\Delta_{DO} + B)]^2$$

On considère comme suspect tout point tel que le résidu de cette régression est supérieur à  $A$  fois l'écart-type résiduel  $\sqrt{v}$  de cette régression quadratique. Les points suspects sont donc ceux qui apparaissent dans le graphique au-dessus de la courbe d'équation :

$$y = a + b \log(\Delta_{DO} + B) + c [\log(\Delta_{DO} + B)]^2 + A \sqrt{v} \quad (3)$$

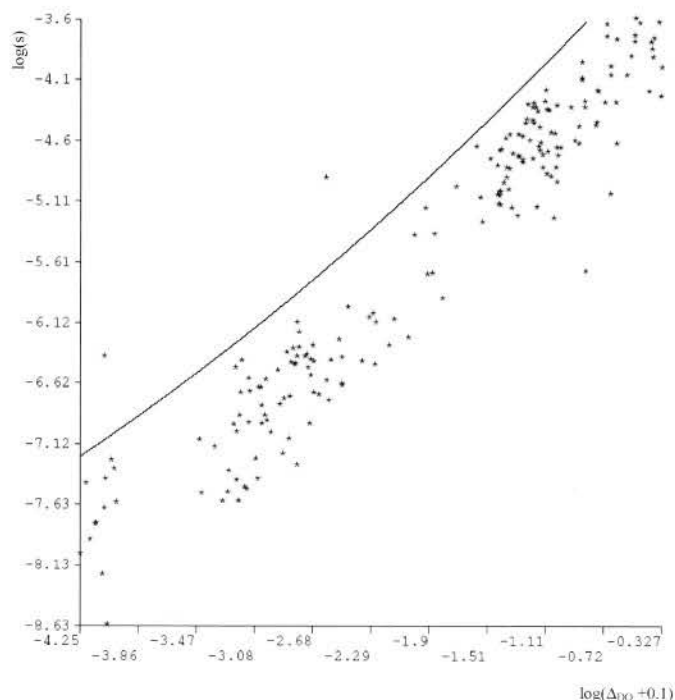


Figure 14 ■ Log des écarts-types résiduels des régressions DO/temps en fonction des log des pentes.

Pour chacun de ces points il est souhaitable de réexaminer le graphique d'évolution de la densité optique en fonction du temps. Cette représentation avec les logarithmes de la pente  $\Delta_{DO}$  et de l'écart-type résiduel  $s$  est donnée dans la figure 14 où sont figurés les puits de la plaque ELISA déjà considérée dans la figure 12. On a reporté sur cette figure la courbe d'équation (3).

#### 2.5.4. Optimisation de la méthode ELISA par des plans d'expériences

Les conditions expérimentales de la méthode ELISA doivent être ajustées pour permettre d'estimer aussi précisément que possible l'activité  $\rho$ , c'est-à-dire le ratio entre la concentration  $C_t$  de la solution testée et la concentration  $C_s$  du standard, avec un nombre limité de puits. Cela implique de réaliser des expériences préalables pour déterminer les bons réactifs, leurs concentrations, les temps et températures d'incubation. Il est naturellement souhaitable, lorsque ces expériences sont réalisées, de prendre en compte aussi les différences entre plaques et éventuellement la variabilité pouvant exister à l'intérieur même d'une plaque. Des techniques très éprouvées de formation de plans d'expériences existent et peuvent être mises en pratique avec différents logiciels (par exemple ceux développés par Kobilinsky, 1994 et le SAS Institute, 1989).

Pratiquement, lorsqu'on utilise ces techniques, il faut d'abord déterminer la variable que l'on va chercher à optimiser. En fait, toutes les conditions expérimentales jouent sur la forme de la logistique considérée précédemment, et la forme de

cette logistique est évidemment déterminante dans la précision d'estimation des concentrations inconnues. On a ainsi intérêt à ce que la logistique ait une pente forte en son point d'inflexion, une différence importante entre son plateau haut et son plateau bas. Ces paramètres que l'on va chercher à optimiser au travers de plans d'expériences seront appelés dans ce qui suit les paramètres représentatifs (PR en abrégé). C'est donc l'influence sur ces PR des conditions opératoires que l'on étudie et optimise au travers des plans d'expériences. Noter que si on ajuste par la courbe logistique d'équation (0), les paramètres représentatifs cités ci-dessus sont  $\mu$  et  $M$ . En fait, il faut aller au-delà de l'étude de ces deux paramètres en prenant aussi en compte la variabilité résiduelle autour de la logistique et la façon dont ces différents paramètres jouent sur la variance d'estimation de l'activité  $\rho$ , mais cela ne sera pas abordé ici.

Pour évaluer les PR, il faut pour chaque condition opératoire être capable d'évaluer la forme de la logistique. Le plus simple pour cela est d'utiliser un ensemble de puits contigus dans lesquels on met différents niveaux de concentration de la solution antigénique et qui sont ensuite tous traités de façon identique. Un tel ensemble de puits, appelé unité analytique (UA), permet d'évaluer pour la condition opératoire correspondante les paramètres de la logistique et donc les PR. Ces UA sont les unités du plan d'expérience qui déterminent donc les conditions expérimentales utilisées dans chacune d'elles. Il n'est pas possible de développer complètement ici cet aspect construction de plan d'expérience, qui recouvre toute une branche importante des statistiques. On se référera au livre cité dans la référence de Kobilinsky (1997) pour avoir un aperçu sur ces méthodes de construction et la bibliographie correspondante.

Citons ci-dessous deux exemples caractéristiques.

#### ► EXEMPLE 1

Dans la méthode sandwich, les concentrations d'anticorps adsorbé et d'anticorps conjugué sont essentielles. Un plan pour surface de réponse comme le dispositif hexagonal invariant par rotation pour deux facteurs quantitatifs (Myers, 1971) complété par deux points au centre est parfaitement adapté (figure 15). Ce plan comporte 8 UA Il peut être mis en place en utilisant par exemple 8 lignes d'une plaque ELISA. Dans l'UA de chaque ligne, on peut alors mettre jusqu'à 12 concentrations différentes d'antigènes. Tout est possible à ce niveau-là aussi et on peut très bien envisager de dupliquer certaines concentrations pour évaluer la variabilité des réponses autour de la logistique, variabilité importante pour évaluer la précision d'estimation d'une concentration inconnue.

Dans une approche séquentielle, un tel plan est facile à utiliser plusieurs fois, comme cela est illustré dans la figure 16. Cette figure donne, pour certains points du premier plan hexagonal réalisé, la courbe reliant la  $\Delta_{DO}$  au logarithme de la concentration en antigène. Au vu de telles courbes, on peut trouver des conditions optimales et réaliser un nouveau plan comme cela est illustré dans la figure 15 pour affiner la recherche de ces conditions.

#### ► EXEMPLE 2

On prend en compte 4 facteurs, 2 à 4 niveaux et 2 à 2 niveaux comme indiqué dans le tableau ci-après.

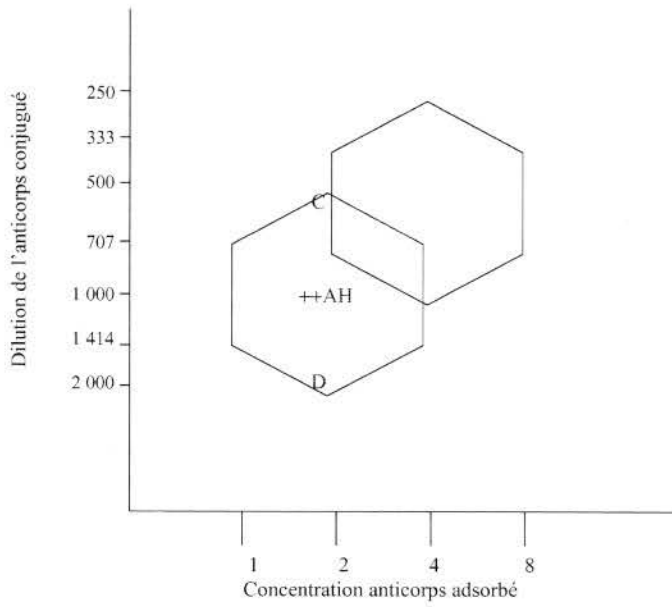


Figure 15 ■ Plan hexagonal pour l'étude des concentrations d'anticorps adsorbés et conjugués.

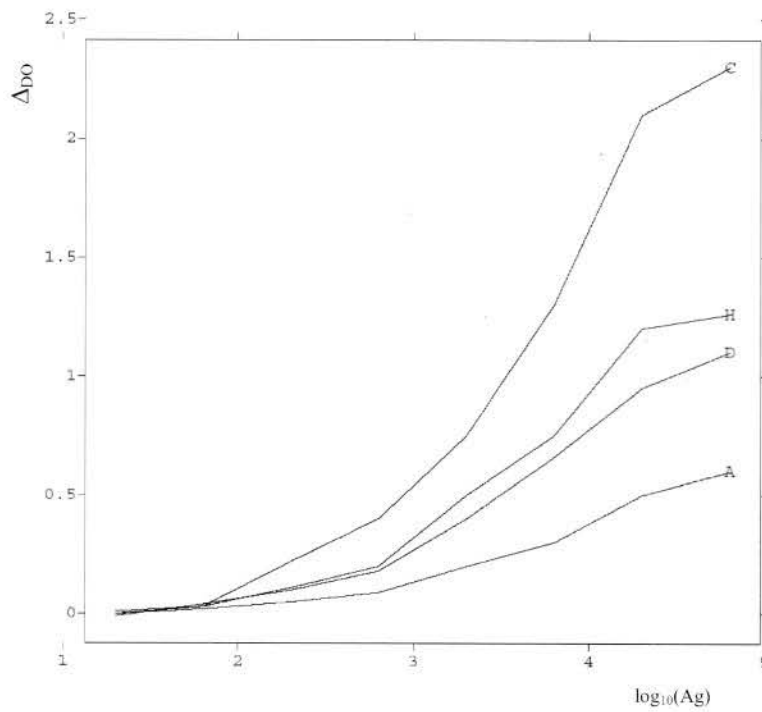


Figure 16 ■ Évolution de  $\Delta_{DO}$  en fonction du logarithme de la concentration  $Ag$  en antigène pour les unités analytiques A, D, H, C de la figure 15.

	Facteur	Niveaux
A	Concentration de l'anticorps adsorbé	1, 2, 4, 8 µg/mL
B	Dilution de l'anticorps conjugué	1/250, 1/400, 1/640, 1/1 024
C	BSA dans diluant du conjugué	Présent, absent
D	Temps d'incubation du conjugué	1 h 30, 3 h

Les UA comprennent 8 puits recevant l'anticorps à 0, 3,2, 16, 80, 400, 2 000, 10 000, 50 000, 250 000 ng/mL. C'est-à-dire que les concentrations sont en progression géométrique de rapport 5, donc équi-espacées en échelle logarithmique.

Il y a *a priori*  $64 = 4 \times 4 \times 2 \times 2$  traitements à expérimenter. Si on utilise les 8 lignes de chaque plaque comme UA, on peut donc expérimenter l'ensemble des traitements sur 8 plaques. Si l'on désire étudier en outre la variabilité autour de la logistique, on peut réaliser 16 plaques recevant chacune 4 traitements répétés deux fois. Pour répartir les traitements entre les plaques en prenant en compte les différences potentielles entre plaques, il faut répartir le plan factoriel  $4 \times 4 \times 2 \times 2$  entre les 8 ou les 16 plaques. La méthode la plus simple pour cela est d'utiliser la méthode de répartition en blocs (Kobilinsky, 1990, 1997 ; Kobilinsky et Monod, 1995). Bien entendu, l'effet temps d'incubation du conjugué ne pouvant varier intra-plaque est obligatoirement confondu avec un effet plaque. Cependant, cette limite mise à part, cette méthode de répartition permet d'estimer les 38 paramètres d'un modèle de degré 4 en les 4 facteurs A, B, C, D indépendamment des effets plaques et avec un maximum de précision.

Les deux exemples ci-dessus, très succinctement décrits, montrent de quelle façon les plans d'expériences peuvent être utilisés ici. Si on rajoute d'autres facteurs (comme l'origine de l'anticorps, une plus grande gamme de temps d'incubations, etc.), il devient impossible d'étudier tous les traitements générés. On est donc obligé d'utiliser un plan fractionnaire. Il existe une grande diversité de tels plans, et les méthodes actuelles de construction permettent de trouver de tels plans très robustes et bien adaptés aux idées que l'on a au départ sur l'influence des différents facteurs. Bailey (1981), Box (1978) et Monod et Kobilinsky (1994) donnent quelques développements sur la construction, la randomisation et l'analyse des plans. Cliquet *et al.* (1994) rapportent une illustration de ce problème à un niveau plus élémentaire. Enfin des exemples de construction et de randomisation dans le cadre de l'analyse immuno-chimique sont décrits par Burrows *et al.* (1984) et Hooton et Paetkau (1986).

### 3. Domaines d'application des méthodes immunologiques

#### 3.1. Matrices

La grande spécificité des anticorps utilisés leur permet d'interagir avec leurs protéines cibles dans des matrices complexes. Cependant l'efficacité de la détection

(exactitude, précision) est affectée si ces matrices résultent de procédés industriels agressifs dont les traitements thermiques et chimiques dégradent voire détruisent les protéines, et en particulier les épitopes conformationnels. Fondés sur la liaison spécifique des protéines et de leurs anticorps, les tests immunologiques sont en effet sensibles au moindre changement dans la structure tertiaire des protéines cibles. Par exemple, la fiabilité de la détection des protéines d'un échantillon peut être remise en cause si cet échantillon a été chauffé à plus de 65 °C pendant plus d'une heure (Eyquem, 2000). Les méthodes reposant sur la détection des protéines sont donc particulièrement utilisées pour les produits bruts (feuilles, semences) et quelques matières premières peu transformées (farines).

De nouveaux tests sont pourtant en cours de développement pour l'analyse de matrices alimentaires plus complexes ayant subi des traitements plus drastiques.

## 3.2. Avantages et limites des méthodes immunologiques

### 3.2.1. Avantages

Les tests immunologiques (ELISA et strip tests) permettent donc à la fois de détecter et de quantifier les OGM. Ils ont l'avantage d'être rapides et de ne nécessiter qu'un investissement modéré en équipement et en personnel. Ils sont fiables et adaptés à tout type de matériel végétal brut et à certaines matrices alimentaires. Ils ont un large spectre de détection qui permet leur utilisation pour des criblages. Ils sont, d'autre part, plus faciles à réaliser, et plus transférables d'un laboratoire à l'autre que les méthodes basées sur l'ADN (tableau 9). Les *strip tests* sont peu onéreux et permettent des analyses au champ ou en coopérative. Ils sont largement utilisés dans la filière semences et permettent à certains pays producteurs comme les États-Unis de vérifier rapidement le degré de pureté de leurs lots et d'assurer efficacement et à moindre coût leurs systèmes IP (*identity preservation*).

### 3.2.2. Limites

La principale limite de la détection immunologique des OGM par ELISA est constituée par son domaine d'application réduit à des matrices aux protéines peu ou pas dégradées.

Si elle est également sensible à des molécules présentes dans les matrices alimentaires complexes, comme les surfactants (saponine), les composés phénoliques, les acides gras et les phosphatases, qui peuvent inhiber l'interaction spécifique antigène-anticorps et affecter la précision des mesures (Bonfini *et al.*, 2002), elle ne diffère pas fondamentalement en cela d'autres méthodes de détection comme la PCR qui est elle-même très sensible aux inhibiteurs.

À moins de disposer de kits prêts à l'emploi, c'est une technique assez lourde à initier puisqu'elle nécessite de disposer, pour chaque protéine cible, d'anticorps efficaces, en quantité suffisante et de qualité constante (les anticorps monoclonaux sont pour cela très intéressants). Il faut de plus s'affranchir des réactions croisées potentielles entre antigènes et anticorps (détection de plusieurs protéines cibles par un même anticorps) par de stricts tests de spécificité. La détection de la protéine trans-

Tableau 9 ■ Comparaison des méthodes immunochimiques et des méthodes fondées sur la PCR, pour la détection des OGM.

	Méthodes fondées sur la PCR	Méthodes immunochimiques	
		Strip test	ELISA
Principe	détection/quantification par amplification de séquences d'ADN uniques	détection/quantification de protéines spécifiquement liées à des anticorps	
Types d'analyses	qualitatives/quantitatives	qualitatives/semi-quantitatives	qualitatives/quantitatives
Cibles	séquences de la construction génétique transférée	protéines recombinantes	
Prérequis	connaissance de la structure moléculaire des séquences insérées	connaissance de la structure moléculaire et des propriétés physicochimiques des protéines nouvelles	
Durée	1 à 2 jours	5 à 20 min	4 à 6 h
Sensibilité	forte	moyenne	
Coût	moyen à fort	moyen	fort
Équipement	thermocycleur	aucun	lecteur de plaque ELISA
Fiabilité	bonne	très bonne	
Utilisation de matériel de référence	nécessaire	nécessaire	
Standardisation des méthodes d'échantillonnage et d'extraction	nécessaire	nécessaire	

génique EPSPS nécessite une spécificité capable de la différencier de l'EPSPS native structurellement très proche présente chez certaines espèces végétales.

D'autre part, si leur capacité à détecter une même protéine présente chez différents OGM en fait une bonne méthode de criblage, les tests immunologiques ne permettent en revanche pas d'identifier précisément un OGM donné et donc de différencier un OGM autorisé d'un OGM non autorisé (figure 10B). Comme les tests PCR classiques, ils ne permettent pas non plus de différencier un OGM présentant plusieurs gènes empilés, d'un mélange d'OGM.

Ils sont de plus difficilement utilisables sur des OGM exprimant peu la protéine cible (comme le maïs Bt176 pour la protéine Cry1A(b)). Le niveau d'expression d'une protéine donnée varie en effet selon l'OGM et parfois aussi selon les tissus (figure 17, tableau 10) (Gore *et al.*, 2001 ; Stave, 2002, Anklam *et al.*, 2002). Le niveau d'expression est également très dépendant à la fois des conditions agronomiques et environnementales, et du fond génétique de chaque variété, ce qui peut poser problème lors de l'utilisation des tests immunologiques pour la certification de semences OGM et non OGM.

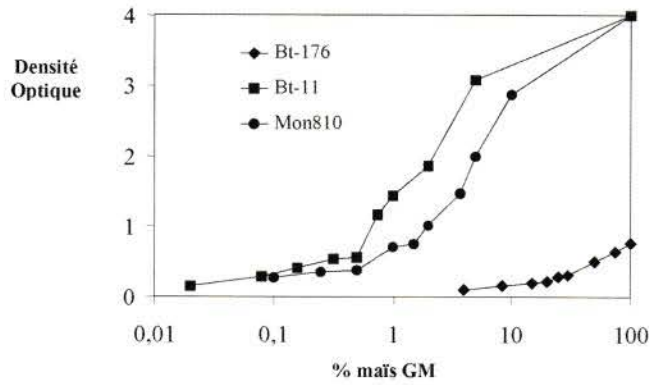


Figure 17 ■ Détection de la protéine CryIA(b) par test ELISA chez différents maïs génétiquement modifiés (d'après Stave, 2002).

Tableau 10 ■ Niveaux d'expression de la protéine CryIA(b) chez différents maïs génétiquement modifiés (d'après Stave, 2002).

Événement de transformation	Graines $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche	Feuilles $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche
Mon810	0,31	9,35
Bt-11	4,76	20,00
Event-176	< 0,005	1,00

Comme pour les méthodes d'amplification d'ADN, l'utilité des tests immunologiques est également limitée sur des matrices alimentaires ne contenant plus ou presque de protéine comme les huiles raffinées par exemple. Sur les matrices alimentaires contenant des protéines dénaturées par le procédé industriel de fabrication du produit, il est possible d'utiliser des tests de détection adaptés à la structure tertiaire des protéines dénaturées. Un test de détection adapté à la forme dénaturée de la protéine CP4 EPSPS présente dans certains dérivés de soja a par exemple été développé (Stave, 2002).

Enfin, la modification génétique apportée au génome des plantes transformées ne conduit pas toujours à la synthèse d'une protéine nouvelle. Il peut s'agir au contraire de diminuer ou d'augmenter la synthèse d'une protéine initialement présente (figure 18). La recherche de protéines transgéniques n'est alors pas applicable. C'est, par exemple, le cas de la tomate FlavrSavr<sup>TM</sup> à maturation retardée grâce à l'utilisation d'un système anti-sens inhibant la production de polygalacturonase, ou de plantes rendues résistantes aux virus par l'emploi d'ARNi (système anti-sens inhibant la traduction d'une famille multigénique) comme la papaye brevetée par l'université d'Hawaii.

Du fait de leur forte sensibilité à de nombreux paramètres environnementaux, les tests immunologiques de détection des OGM, plus que ceux fondés sur la présence d'ADN, semblent devoir être validés pour chaque type de matrice testée.

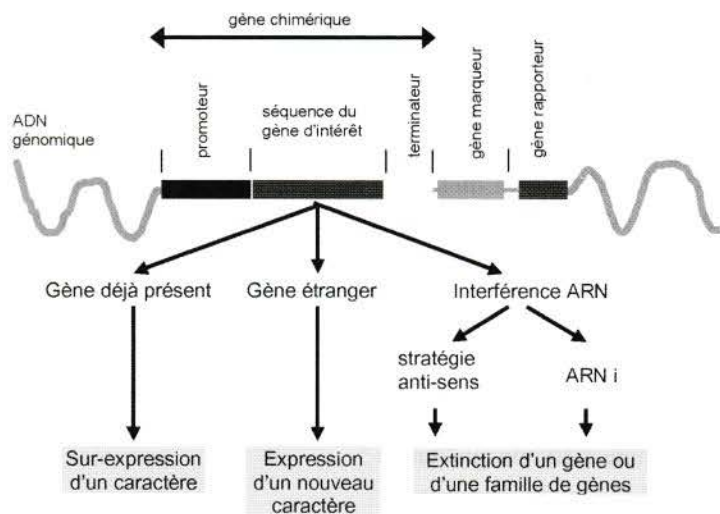


Figure 18 ■ Différents types de transgènes et leurs fonctions.

## 4. Validation et normalisation des méthodes immunologiques

Comme dans tous les domaines de la détection, les laboratoires de contrôle des OGM préfèrent disposer de méthodes de référence normalisées et validées par des tests interlaboratoires.

Dans le domaine particulier des OGM, cela présente également l'avantage d'augmenter la confiance des producteurs et des consommateurs dans la fiabilité des systèmes de traçabilité, et permet de fournir des avis scientifiques valides lors de la gestion juridique de certains conflits commerciaux.

### 4.1. Validation

#### 4.1.1. Principe

L'objectif de la validation d'une méthode est de montrer qu'elle produit, pour un analyte donné, des résultats présentant des niveaux suffisants d'exactitude, de précision et de reproductibilité. Les résultats, obtenus en respectant scrupuleusement les protocoles, sont fiables et comparables entre laboratoires.

Les validations sont menées selon des protocoles internationaux harmonisés, tels ceux publiés par l'IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), l'AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) ou l'ISO (*International Standards Organisation*). Elles doivent inclure une large gamme de laboratoires et se déroulent sous l'égide d'un organisme organisateur compétent et reconnu (LRC/JRC, AACC (*American Association of Cereal Chemists*), FDA (*Food and Drug Administration...*)). Le coût de ces études collaboratives à grande échelle impose de valider des méthodes ayant généralement déjà fait l'objet de prévalida-

tions s'assurant de leur robustesse. Ces travaux préliminaires, effectués en interne ou par un petit nombre de laboratoires partenaires, permettent d'évaluer une première fois les critères de performance de la méthode et de connaître les valeurs cibles à atteindre lors de la validation.

Le choix des paramètres à évaluer lors de la validation est déterminé par la nature et l'utilisation attendue de la méthode. En raison des concentrations inconnues d'analyte dans les échantillons à tester et de la forte sensibilité requise pour déterminer si on est au-dessus ou en dessous des seuils d'étiquetage imposés par les différentes réglementations, les méthodes de détection d'OGM doivent présenter de très bons niveaux de résultats pour une importante liste de paramètres (Lipton *et al.*, 2000 ; Bonfii *et al.*, 2002).

Comme pour toute méthode de détection d'OGM, les critères de performance observés lors de la validation d'un test immunologique de détection d'OGM sont, entre autres pour une méthode qualitative :

- sa sensibilité (limite de détection) ;
- sa spécificité (= nombre de faux positifs. Cela n'est pas la spécificité moléculaire) ;
- sa précision (répétabilité, reproductibilité) ;
- sa robustesse.

Avec en sus des critères du *Codex alimentarius* : son domaine d'application, sa facilité d'utilisation et son efficacité, généralement augmentés, pour une méthode quantitative, de :

- son exactitude (capacité à donner la valeur réelle de l'échantillon) ;
- sa limite de quantification ;
- sa gamme dynamique (intervalle de valeurs où le signal mesuré est proportionnel à la quantité de cible).

#### 4.1.2. Méthodes immunologiques validées par des tests interlaboratoires

Jusqu'à ce jour, seules trois méthodes immunologiques d'analyse d'OGM ont été validées selon l'ISO 5725. Elles avaient pour cibles les protéines transgéniques CP4-EPSPS, Cry1Ab et Cry9C (tableau 11).

- La première concernait une méthode ELISA sandwich mise au point par Rogan *et al.* (1999) pour détecter la protéine EPSPS chez le soja *roundup ready* (RRS). La validation, impliquant 38 laboratoires, a porté sur le kit correspondant développé par SDI, avec pour matrice de la poudre de soja déshydratée contenant 0 %, 0,5 %, 1 % et 2 % d'OGM (Lipp *et al.*, 2000).

- La seconde avait pour objet un autre kit ELISA développé par SDI pour détecter et quantifier la protéine à propriété insecticide Cry1A(b) exprimée par le maïs Mon810 Yield Gard construit par Monsanto (Saint Louis, DE, USA) (Stave *et al.*, 2000). L'étude collaborative menée par l'AACC regroupait 40 laboratoires de 20 pays différents et portait sur l'analyse d'échantillons de farine de maïs, contenant de 0 % à 2 % d'OGM.

• La troisième, enfin, était relative à un kit ELISA développé par Envirologix pour la détermination de la protéine Cry9C exprimée dans le maïs Starlink. L'étude collaborative, coordonnée par la FDA (États-Unis), regroupait 7 laboratoires américains chargés de tester des échantillons de différentes matrices alimentaires fabriquées à partir de maïs Starlink ou non OGM et enrichies ou non avec la protéine Cry9C extraite de bactéries ou du maïs Starlink.

Tableau 11 ■ Tests immunologiques validés pour la détection d'OGM.

OGM cible	Antigène	Matrice	Nombre de labos	Coordinateur de l'étude	Référence
GTS 40-3-2 (RRS)	EPSPS	Poudre de soja	38	JRC	Lipp et Anklam, 2000
Mon810	Cry1A(b)	Farine de maïs	40	AACC	Stave <i>et al.</i> , 2001
Starlink	Cry9C	Aliments contenant du maïs (amidon, huile raffinée, tortillas, chips, corn flakes, gateaux de maïs, muffins de maïs, pain de maïs)	7	US FDA	Trucksess <i>et al.</i> , 2001

D'autre part, certaines méthodes peuvent également faire l'objet non pas d'une validation interlaboratoire au sens défini ci-dessus, mais d'une certification par un organisme compétent. C'est par exemple ce qu'a fait l'USDA (*US department of agriculture*) sur des kits de strip tests utilisés pour la détection de la protéine Cry9C sur grains de maïs ou de la protéine EPSPS sur soja (tableau 7). Les résultats de ces tests sont utilisés par des organismes de contrôle officiels comme le FGIS (*Federal grain inspection service*) aux États-Unis et peuvent alors servir de base à toute action juridique.

## 4.2. Normalisation

Les protocoles standards de détection immuno-chimique des OGM sont définis dans le projet de norme prEN-ISO 21572 qui sera publié d'ici peu.

## Conclusion

Les méthodes immunologiques de détection des OGM sont des méthodes simples, fiables, robustes. Elles ont cependant un domaine d'application qui a ses limites. Comme toute méthode de détection, elles se heurtent également à la difficulté de la définition de l'échantillon d'analyse, difficulté qui peut être surmontée par des plans de contrôle adaptés. Leur compatibilité avec les résultats obtenus par des méthodes basées sur les acides nucléiques est un sujet d'actualité qui devrait être abordé prochainement par les programmes européens initiés dans ce domaine.

Il reste à développer et valider de nouveaux kits et méthodes afin d'élargir le champ des matrices analysables.

Les tests immunologiques sont utilisés en routine et à grande échelle aux États-Unis pour la détection des OGM lors de la distribution des lots de grains. Combinés aux systèmes d'*identity preservation*, ils fournissent les moyens de bien caractériser les matières premières agricoles entrant dans les chaînes agroalimentaires et de respecter les règles d'étiquetage destinées à protéger le libre choix des consommateurs. Ils devraient être d'une grande utilité en Europe lors de la levée du moratoire pour tester les semences à la sortie du champ puis contribuer à assurer la traçabilité des dérivés des récoltes.

Malgré leur domaine d'application limité, les tests immunologiques semblent avoir une belle vie devant eux si leur facilité d'utilisation et leur coût maintiennent leur intérêt face aux avantages des nouvelles techniques de détection d'ADN en multiplex.

## Références bibliographiques

- Ahmed FE (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnol.* **20** (5) : 215-223.
- Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijneneburg H, Van den Eede G (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Res Technology*, **214** : 3-26.
- Bertheau Y, Diolez (1999). Les aliments passés au crible *Biofutur*, **192** : 28-31.
- Bonfini L, Kay S, Heinze P, Van den Eede G (2002). Report on GMO detection identification and quantification methods submitted to collaborative studies. European commission, Joint research centre, Institute for health and consumer protection, Food products and consumer goods unit, report EUR 20383 EN.
- Box GEP, Hunter WG, Hunter JS (1978). *Statistics for experimenters*. J Wiley, New York : 653.
- Brett GM, Chambers SJ, Huang L, Morgan MRA (1999). Design and development of immunoassays for detection of protein. *Food Control*, **10** : 401-406.
- Bailey RA (1981). A unified approach to design of experiments. *J Roy Stat Soc A*, **44** : 214-223.
- Burrows PM, Scott SW, Barnett OW, McLaughlin MR (1984). Use of experimental designs with quantitative ELISA. *J Virol Meth.* **8** : 207-216.
- Cliquet S, Durier C, Kobilinsky A (1994). Principle of a fractional factorial design for qualitative and quantitative factors: application to the production of *Bradyrhizobium japonicum* in culture media. *Agronomie*, **14** : 569-587.
- Eyquem F (2000). Quantitative detection of Roundup Ready® soybean by ELISA. In: The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. Eds : Organisation mondiale de la santé, IHCP-JRC-European Commission. <http://gmotraining.jrc.it>
- Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargainaratz C, Botella L, Gourreau JM, Carlin F, Popoff MR, Broussolle V (2002). Detection by PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in Northern France. *Appl Envir Microbiol.* **68** : 5870-5876.
- Finney DJ (1978, 3<sup>e</sup> édition). *Statistical method in biological assay*. Charles Griffin, London : 508.
- Garrec N, Dilasser F, Pourcher AM, Perelle S, Fach P (2003). Comparison of a cultural

- method with ListerScreen plus Rapid<sup>®</sup> L. mono or PCR-ELISA methods for the enumeration of *L. monocytogenes* in naturally contaminated sewage sludge. *J Microbiol Meth.* **55** (3) : 763-773.
- GIPSA. <http://www.usda.gov/gipsa/>  
Sampling and testing recommendations for the detection of Cry9C protein in hybrid seed corn. (biotech/starlink/cry9cdetection.htm)  
Sampling for the detection of biotech grains (biotech/sample2.htm)  
Grain Inspection Handbook, Book 1, Grain Sampling (pubs/pubs.htm)
- GMO food ingredient testing, Soya kit user's guide (1999). Strategy Diagnostics Inc., Rev. 052099, Vers. 1.8.
- Gore J, Leonard BR, Adamczyk JJ (2001). Bollworm (*Lepidoptera noctuidae*) Survival on "Bollgard" and "Bollgard II" cotton flower bud and flower components. *J Econ Entomol.* **94** (6) : 1445-1451.
- Govindarajulu Z (2001, 2<sup>nd</sup> edition). Statistical Techniques in Bioassay Ed : Karger, 234.
- Hooton JWL, Paetkau V (1986). Random assignment of treatments in a 96-well (8 × 12) microtiter plate. *J Immun Meth.* **94** : 81-89.
- Huet S, Laporte J (1988). Statistical methods for the comparison of antibody levels in serums assayed by enzyme linked immuno sorbent assay. Inra, Jouy-en-Josas, laboratoire de biométrie. *Rapp techn.* 87-33.
- Huet S, Bouvier A, Poursat MA, Jolivet E (2003, 2<sup>e</sup> édition). Statistical tools for non-linear regression. A practical guide with S-Plus and R examples. Springer, 229 p.
- ISO 21572 (prEN) (2002). Foodstuffs – Detection of genetically modified organisms and derived products – Protein based methods, CEN, Brussels.
- ISO 3534-2 (1993). Statistics – Vocabulary and symbols – Part 2: statistical quality control, ISO, Genève.
- ISO 5725 (1994, 1998). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. ISO, Genève.
- ISO 6644 (1981, 2001, 2002). Cereals and milled cereal product – Automatic sampling by mechanical means. ISO, Genève.
- ISTA : [www.seedtest.org](http://www.seedtest.org)
- Kobilinsky A (1990). Complex linear models and cyclic designs. *Linear Algebra Applic.* **127** : 227-282.
- Kobilinsky A, Monod H (1995). Juxtaposition of regular factorial designs and the complex linear model. *Scand J Statist.* **22** (2) : 223-254.
- Kobilinsky A (1997). Les plans factoriels. In : JJ Dreesbeke, J Fine, G Saporta (éd.), *Plans d'expériences : applications à l'entreprise*. Technip, Paris, 69-209.
- Kobilinsky A (1994). PLANOR : programme de génération automatique de plans d'expériences réguliers. Biometrics unit (MIA), Inra, Jouy.
- Kobilinsky A, Bertheau Y (2002). Minimisation of the cost of GMO detection in kernels using control be attributes. Proceedings of the 7<sup>th</sup> European Conference Food Industry and Statistics. ISBN 2-7380-1016-4.
- Kobilinsky A, Bertheau Y (2005). Minimum cost acceptance sampling plans for grain control, with application to GMO detection. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems.* **75**(2) : 189-200.
- Lin H-Y, Chiang J-W, Yang-Chih Shih D (2001). Detection of genetically modified soybeans by PCR method and immunoassay kits. *J Food Drug Anal.* **9** (3) : 160-166.
- Lipp M, Brodmann P, Pietsch K, Pauwels J, Anklam E (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder. *JAOAC Int.* **82** : 923-928.
- Lipp M, Anklam E, Stave JW (2000). Validation of an immunoassay for detection and quantification of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference material: inter-laboratory study. *JAOAC Int.* **83** (4) : 919-927.
- Lipton CR, Dautlick JX, Grothaus GD, Hunst PL, Magin KM, Mihaliak CA, Rubio FM, Stave JW (2000). Guidelines for the validation and use of immunoassays for determination of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. *Food Agric Immunol.* **12** (2) : 153-164.

- Liu G, Su W, Xu Q, Long M, Zhou J, Song S (2004). Liquid-phase hybridization based PCR-ELISA for detection of genetically modified organisms in food. *Food Control*, **15** (4) : 303-306.
- Lüthy J (1999). Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. *Food Control*, **10** (6) : 359-361.
- McKenzie MJ, Mett V, Jameson PE (2000). Modified ELISA for the detection of neomycin phosphotransferase II in transformed plant species. *Plant Cell Rep*, **19** : 286-289.
- Monod H, Kobilinsky A (1994). In: T Calinski, R Kala (ed.), *Using the complex linear model to search for an optimal juxtaposition of regular fractions. Proceedings LINSTAT 93*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 229-237.
- Myers RH (1971). Response surface methodology. Allyn et Bacon, Boston.
- Petit L, Baraige F, Balois AM, Bertheau Y, Fach P (2003). Screening of genetically modified organisms and specific detection of Bt176 maize in flours and starches by PCR-enzyme linked immunosorbent assay. *Eur Food Res. Technol*, **217** : 83-89.
- Powel J, Owen L (2002). Reliability of food measurements: the application of proficiency testing to GMO analysis. *Accredit Quality Assurance*, **7** (10) : 392-402.
- Remund K, Dixon D, Wright D, Holden L (2001). Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. *Seed Science Res*, **11** : 101-119.
- Rogan GJ, Dudin YA, Lee TC, Magin KM, Astwood JD, Bhatka NS, Leach JN, Sanders PR, Fuchs RL (1999). Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready<sup>®</sup> soybeans. *Food Control*, **10** : 407-414.
- SAS Institute, Inc. (1989). SAS/QC Software. The FACTEX Procedure. Version 6, First Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC, États-Unis.
- Stave JW (1999). Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO – future needs. *Food Control*, **10** (6) : 367-374.
- Stave JW, Magin KM, Schimmel H, Lawruk T, Wehling P, Bridges AR (2000). AACC collaborative study of a protein method for detection of genetically modified corn. *Cereal Foods World*, **45** (11) : 497-501.
- Stave JW (2002). Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: applications, limitations, and practical considerations. *J AOAC Int*, **85** (3) : 780-786.
- Trucksess MW (2001). Determination of Cry9C protein in corn-based foods by enzyme-linked immunosorbent assay: Interlaboratory study. *J AOAC Int*, **84** : 1891-1901.
- Volund A (1978). Application of the four-parameter logistic model to bioassay: comparison with slope ratio and parallel line models. *Biometrics*, **4** : 357-365.
- Sites web des compagnies privées citées :  
[www.agdia.com](http://www.agdia.com)  
[www.envirologix.com](http://www.envirologix.com)  
[www.neogen.com](http://www.neogen.com)  
[www.sdix.com](http://www.sdix.com)