

ETUDES ANALYTIQUES : Détection des OGM : du libre choix des consommateurs aux études de biovigilance

ANALYTIC STUDIES: Detecting GM crops: from freedom of choice for consumers to bio-vigilance studies

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 7, Numéro 4, 314-9, Juillet - Août 2000, Dossier : "OGM: expertise et décision publique"

Auteur(s) : Yves BERTHEAU, Annick DIOLE, INRA PMDV/MDO, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex.

Résumé : Les récentes affaires de semences conventionnelles de colza et de maïs contaminées par des traces d'OGM ont à nouveau, s'il en était besoin, rappelé à notre bon souvenir les besoins en méthodes de détection et d'identification des OGM fiables et sensibles. Les développements se poursuivent, certes bien plus lentement qu'initialement espéré du fait du nombre important de facteurs à maîtriser et du caractère relativement inédit de ce travail. Concernant des matrices alimentaires variées, cette détection se heurte au manque de recul dans plusieurs domaines tels que celui de l'extraction et la purification d'acides nucléiques en quantité et en qualité. Bien que développées pour satisfaire aux besoins réglementaires européens concernant l'alimentation humaine, ces méthodes devraient être aisément applicables dans d'autres domaines concernés par les OGM (étude des transferts de gènes par flux pollinique, éventuels transferts horizontaux, suivi des acides nucléiques lors de l'ingestion...). Au-delà des OGM, les méthodes mises en œuvre devraient présenter un intérêt dans d'autres domaines comme la microbiologie, l'épidémiologie ou l'authentification des composants biologiques d'un produit.

ARTICLE

Réglementation

Du fait d'une mise en place progressive en réponse à diverses demandes sociales, la situation réglementaire concernant l'étiquetage de certains produits issus d'OGM ou en contenant est caractérisée à la fois par sa complexité, un certain nombre de lacunes rendant difficile son application, mais surtout par la primauté accordée à la protection du consommateur par l'exercice de son libre choix.

Une complexité réglementaire certaine

La complexité de la réglementation européenne se traduit par :

- la prise en compte des ingrédients, additifs et arômes mais non des supports d'arômes, solvants d'extraction et auxiliaires technologiques. En conséquence, les analyses dans les produits finis et semi-finis ne valent qu'autant que leurs constituants sont concernés par la réglementation (258/97/CE, 50/2000/CE). Dans l'attente d'une traçabilité encore à définir et normaliser, ceci ne facilite guère les

relations clients/fournisseurs, surtout dans le cas des produits intermédiaires. Au final, les industriels se retrouvent à devoir conserver et gérer des échantillons importants des composants de leurs produits pour éventuelle expertise ;

- la définition d'un seuil de contamination fortuite de 1 % uniquement pour l'ingrédient contenant ou issu des maïs Bt176 et soja RR (règlements 1139/98/CE et 49/2000/CE). La généralisation de cette définition aux autres OGM, dont ceux actuellement autorisés dans le cadre du règlement « nouveaux aliments et nouveaux ingrédients » (258/97/CE) ou de la directive européenne 90/220/CEE, en cours de révision, et de ses transcriptions nationales, ne devrait pourtant guère poser de problèmes ;

- la fixation d'un seuil d'étiquetage pour les produits destinés à l'alimentation humaine mais non pour ceux qui sont destinés à l'alimentation animale ni pour les semences, qui constituent pourtant le socle commun à toutes les filières de production.

La traçabilité, d'origine et de procédé, et sa normalisation sont donc d'autant plus d'actualité. Une remise à plat de la réglementation est ardemment souhaitée par de nombreux opérateurs de façon à faciliter son application.

Des besoins analytiques à prendre en compte

Un certain nombre de carences dans la directive 90/220/CEE en cours de révision et dans le règlement 258/97/CE, qui ne facilitent pas la vie des laboratoires et accroissent les risques de discordances de résultats et donc de litiges, peuvent être relevées.

Les deux principales carences concernent :

- les autorisations de commercialisation ou de mise en culture d'OGM accordées avant que les standards (OGM *versus* non OGM) ne soient disponibles pour la mise au point des méthodes ou comme gamme de calibration des méthodes quantitatives ;

- l'absence d'obligation pour les firmes de biotechnologies de fournir pour chaque OGM un test d'identification quantitative de chaque OGM, rendant ainsi nécessaires de coûteux et longs développements méthodologiques, car ceux-ci dépendent du peu d'informations publiquement disponibles et des standards.

Une bonne prise en compte des intérêts des consommateurs

Malgré toutes ses imperfections, la réglementation européenne se caractérise par une des meilleures protections possibles des consommateurs pour des produits sans effets néfastes prévisibles sur la santé humaine, grâce à un système d'autorisation au cas par cas :

- la notion de « contamination » implique que toute « contamination » en amont entraîne un étiquetage sur tous les produits dérivés à moins qu'ils n'appartiennent à la fameuse « liste négative », toujours vide ;

- la notion de « contamination fortuite » implique qu'aucune « dilution » d'un produit « contaminé » n'est possible. En outre, les preuves doivent être apportées que toutes les précautions ont été prises pour éviter ces « contaminations » ;

- le seuil de 1 % retenu initialement pour les seuls ingrédients a été étendu aux autres constituants majeurs des aliments (additifs et arômes) et s'avère, comparé à d'autres systèmes de certification en vigueur, particulièrement drastique pour les *bulk commodities*, échangées en vrac et en grandes quantités, dès lors que la santé publique n'est pas en jeu.

Alors que la demande des consommateurs européens apparaissait comme une cause perdue 2 ans auparavant, le choix d'un étiquetage déjà repris dans de nombreux pays (Japon, Corée du Sud, Australie et Nouvelle-Zélande, Afrique du Sud) gagne du terrain (par exemple au Canada) et se retrouve dans des protocoles internationaux comme celui de la convention de Carthagène, récemment signée à Montréal.

État actuel des méthodes de détection et de la normalisation

La réglementation retient jusqu'à présent deux cibles de détection, les protéines et les acides nucléiques. La prépondérance de chaque type de technique varie selon le côté de l'océan Atlantique où on se trouve. Cette dichotomie s'explique aisément par des besoins différents : l'Europe a plus nettement besoin de tests de contrôles sur l'ensemble de la chaîne alimentaire alors que les pays tiers sont majoritairement exportateurs de produits bruts ou peu transformés accessibles à plus de techniques.

Méthodes fondées sur les protéines

Les pays producteurs et exportateurs de graines et fèves tels que ceux d'Amérique du Nord utilisent majoritairement, surtout dans le cas du soja, des tests phénotypiques fondés sur la détection de la ou des protéines ou du caractère conféré par le transgène.

Les approches par dosage de l'activité enzymatique, comme dans le cas de tolérances à des herbicides, ou de modification du spectre en proche IR¹ n'ont pas eu le succès escompté, tant en raison de phénomènes de mode dans les méthodes de détection que de sensibilité de ces méthodes.

Une partie de la certification AOSCA², particulièrement dans le cas du soja, est fondée sur l'effet de l'apport d'herbicide sur plantules de lots de graines sensés ne pas contenir d'OGM tolérant. Ces pratiques bon marché nécessitent une faible technicité. Ces tests phénotypiques sont toutefois restreints aux phénotypes aisément contrôlables comme une tolérance à un herbicide. Ils ne peuvent en outre être appliqués qu'à du matériel vivant, dépendant dans ce cas de la capacité germinative des graines.

Les tests immunologiques, utilisables dès lors qu'une protéine est produite, voire supprimée, sont très largement employés sous forme de *dip stick* (languette de papier portant les anticorps et plongés dans la solution à tester pour la présence de l'antigène) ou de test ELISA³. Le premier test est utilisable en quelques dizaines de minutes, du champ au laboratoire, soit plante par plante, dans le cas d'une production de semences OGM par exemple, soit par *batch* (assemblage de plusieurs plantes ou de graines) pour rechercher la présence accidentelle d'OGM dans des lots de graines. Différentes sociétés (SDI⁴, Agdia, Envirologix...) produisent et commercialisent de tels tests dont la limite de quantification est généralement proche de 0,5 %. Le test SDI a été validé sur fèves de soja broyées par un test inter-laboratoires international.

Le domaine d'application de ces tests immunologiques (OGM détectables, parties des plantes

utilisables, matrices analysables...), au demeurant relativement peu chers, devra être fourni pour les tests soumis à normalisation. Globalement, ils s'appliquent :

- aux produits peu ou non transformés, en raison de la sensibilité des protéines aux process agro-alimentaires, à moins que les anticorps ne soient dirigés contre des épitopes stables (travaux du laboratoire CEA/INRA d'Immuno-allergie alimentaire de Gif-sur-Yvette) ;

- aux produits purs ou en mélange selon les cas, car correspondant à des tests de criblage. Comme pour tout test de criblage, ces tests ne sont quantitatifs que sur les produits issus d'une seule espèce végétale, voire d'une lignée OGM si les niveaux d'expression varient entre OGM et leurs cultivars. Ils constituent néanmoins d'excellents tests de criblage qualitatifs pour les produits issus d'un mélange ;

- sur une gamme dynamique faible mais couvrant largement les besoins réglementaires.

Du fait du nombre plus restreint de matrices analysables, divers obstacles (extraction, dosage de protéines, effets d'inhibiteurs...) sont plus aisément surmontés.

Pour revenir au cas de la contamination de semences conventionnelles évoqué en préambule, signalons toutefois que la compatibilité des résultats de ces tests avec les tests PCR demeure inconnue. Quel échantillonnage doit-on pratiquer et quelle variabilité doit-on ainsi accepter d'un test phénotypique, fondé sur des tolérances individuelles de plantules issues de graines de masses inconnues, et d'un test PCR, fondé sur des nombres de copies initialement corrélés à des masses, pour que les deux concordent ? De même l'expression d'une protéine, cible d'un test immunologique, est-elle constante quel que soit le cultivar étudié ? Comment prendre en compte deux OGM de la même espèce produisant une même protéine à des niveaux massiques différents ?

Cependant, une erreur, commune en Europe, consiste à sous-estimer l'intérêt de ces techniques dès lors qu'une traçabilité fiable est opérationnelle. Ceci est sans doute la conséquence des investissements importants des laboratoires européens dans les techniques fondées sur les acides nucléiques.

Méthodes fondées sur les acides nucléiques

Pas plus que les méthodes fondées sur les protéines, celles qui sont fondées sur les acides nucléiques, et la PCR en particulier [1-4], ne peuvent être utilisées sans restriction. Ces méthodes (extraction et purification des acides nucléiques, dosage d'ADN, PCR qualitatives, PCR semi-quantitatives, PCR quantitatives) présentent chacune des domaines d'application instamment demandés pour toute normalisation. Bien que faisant l'objet de la majorité des développements européens, leur application à un grand nombre de matrices alimentaires et le manque de données publiques sur les séquences obèrent fortement leur disponibilité.

Globalement, ces méthodes présentent tout de même une large polyvalence due au plus grand nombre de cibles PCR possibles :

- soit de criblage car internes à l'« insert » et donc potentiellement présentes dans plusieurs OGM, en particulier d'espèces différentes. Elles ne permettent de ce fait de quantifier les OGM que dans les produits purs (un seul OGM ou une seule espèce selon le type de criblage) dès lors qu'un autre OGM avec une même séquence interne est autorisé. Ces tests de criblage sont couramment différenciés en :

* « criblage », comme celui du promoteur P35S présent dans 28 des événements d'insertion sur les 52 autorisés en Amérique du Nord, et dans tous ceux autorisés en Europe. Ce type de test ne peut être utilisé pour la quantification que dans des produits purs (un seul OGM) car le nombre de copies peut varier entre OGM (par exemple une copie de P35S pour le maïs Bt176, 2 copies pour Bt11, 3 copies pour Mon810). La « contamination » par plusieurs OGM d'une même espèce ne peut donc être quantifiée à moins d'accepter une surestimation de sa valeur réelle ;

* « spécifique d'un insert » et donc utilisable en PCR quantitative dans un mélange tant qu'un autre OGM avec les mêmes séquences internes n'est pas autorisé au sein de l'UE. Certains de ces tests sont donc, dans l'état actuel des autorisations européennes, utilisés pour la quantification dans des produits issus de productions européennes. Ainsi un test fondé sur le gène CP4 EPSPS sert-il actuellement à quantifier le soja RR dans un mélange d'espèces (soja avec colza et maïs par exemple). Le domaine d'application de ces tests variera donc au fur et à mesure des autorisations européennes. Il ne peut servir que dans certains cas pour des produits importés ;

- soit d'identification correspondant au fragment de bordure qui constitue, dans l'état actuel des techniques de transgénèse et des sites d'insertion nucléaires, une signature univoque de chaque OGM. Seuls les tests fondés sur ces « signatures » des OGM permettent les quantifications exactes dans les produits mixtes, pourvu que les OGM ne résultent pas d'un empilage de gène (*gene stacking*), c'est-à-dire d'un croisement entre deux OGM préalablement autorisés. Bt11 est actuellement le seul OGM autorisé qui bénéficie d'un test PCR public fondé sur un de ses fragments de bordure.

Hormis les produits purs non transformés comme les graines et semences, la détermination de la teneur en OGM d'une matrice nécessite deux quantifications :

- la première vise à connaître la teneur en espèce végétale en déterminant le nombre de copies d'une cible d'ADN spécifique de l'espèce végétale. Ceci suppose de disposer, pour les développements d'un certain nombre de variétés cultivées représentatives, de la diversité mondiale de l'espèce considérée, afin de vérifier la conservation des séquences cibles (amorces, sondes...) et de leur nombre de copies ;

- la seconde vise à déterminer pour le même échantillon la quantité de molécules d'ADN spécifiques du ou des OGM de cette espèce présents.

Le rapport des quantités de copies de chaque type donne la teneur en OGM par espèce. La variabilité finale de la détection sera donc fonction de celles de chacun des tests PCR qui doivent avoir été optimisés.

$$\frac{\sum_{i=1}^N \text{Nombre de copies spécifiques de chaque OGM}_i}{\text{Nombre de copies spécifiques de l'espèce}}$$

Cette variabilité est également affectée par d'autres facteurs comme la quantité et la qualité (taille des fragments, ADN/ARN, quantités d'autres inhibiteurs...) de l'ADN extrait. Un certain nombre de contrôles doivent donc assurer en routine de l'efficacité des techniques d'extraction et de purification de l'ADN. Les limites de détection et de quantification sur une matrice étant fonction des quantités d'ADN extractible et amplifiable, un dosage de l'ADN est normalement requis pour disposer par tube PCR d'au moins 10 000 équivalents génomes de l'espèce végétale étudiée. Ce dosage n'est guère possible que pour des matrices à forte teneur en ADN. Dans ce cas « favorable », l'analyste se heurte

alors à l'absence de méthode de dosage de l'ADN, chacune présentant un domaine d'application, indépendante de la qualité de l'ADN dosé, alors que la taille des génomes n'est qu'approximativement connue.

Comme nous venons rapidement de le voir, les difficultés de développement des seuls tests PCR ne sont que la partie immergée de l'iceberg que constituent les méthodes fondées sur les acides nucléiques.

Problèmes communs aux deux types de méthodes et normalisation en cours

L'adage, selon lequel la solidité d'une chaîne ne vaut que par son maillon le plus faible, s'applique à notre sujet. Aussi sensible et spécifique que soit une technique de détection, celle-ci ne saurait compenser un mauvais échantillonnage ou une mauvaise extraction de protéine ou d'ADN. Le nombre de techniques de détection disponibles demeure donc faible même si, comparativement à d'autres secteurs d'analyse, les développements sont rapides.

Cadres normatifs

La normalisation, apparue rapidement nécessaire, vise autant à fiabiliser les analyses actuelles qu'à instaurer un cadre aux développements et des méthodes de référence aux laboratoires.

À la différence de la normalisation CEN⁵, la normalisation française s'est attachée au sein de la commission AFNOR⁶ V03E à définir dans son premier document :

- un certain nombre de bonnes pratiques de laboratoire et divers témoins ;
- un cadre général aux futurs développements de l'ensemble des étapes nécessaires à des détections PCR qualitative, semi-quantitative ou quantitative fiables des OGM ;
- un certain nombre de garde-fous permettant aux donneurs d'ordres de savoir ce qu'ils sont en droit d'attendre des laboratoires. Une formalisation minimale des rendus d'analyse devrait également éviter de retrouver certains types de rapports d'analyse.

Ce choix pragmatique devrait déboucher sur une première publication à l'automne 2000. La dernière version de ce document français a servi de base à l'ensemble des textes de travail actuellement discutés au sein du CEN.

La normalisation européenne s'attache quant à elle à fournir des protocoles validés par des tests interlaboratoires (*ring tests*). Bien que plusieurs documents de travail soient actuellement à l'étude, à peine 1 an après la mise en place du groupe de travail CEN, les textes définitifs ne devraient pas être publiés avant un certain temps. Ces délais résultent de l'absence de données expérimentales dans certains domaines ou de l'absence de méthodes validées. Un document général, réclamé par la France dès la première réunion CEN en février 1999 à Berlin, n'a été rajouté aux tâches du groupe de travail CEN qu'en mars 2000 lors de la réunion de Lisbonne.

À côté de la normalisation « horizontale » CEN une normalisation ISO plus « verticale », également réclamée par la France pour assurer au plus tôt la compatibilité des méthodes entre continents différents, se mettra en place cet automne.

Les documents français et CEN ne font aucune référence à la réglementation existante. Les méthodes semi-quantitatives et quantitatives se réfèrent à l'espèce végétale dont la réglementation ne constituerait qu'un cas particulier d'application. Il n'a pas été possible de rédiger, dans un laps de temps acceptable, un document aisément lisible qui permettrait de prendre en compte les OGM des différents règnes ; les documents actuels concernent donc uniquement le règne végétal et les OGM correspondants.

Plusieurs articles antérieurs ont déjà abordé divers aspects de la détection des OGM [5-7]. Nous ne reviendrons ici que sur les points saillants ou ayant évolué ; beaucoup ont trait aux matrices à faible teneur en analyte.

Échantillonnage et taille des prises d'essais

Selon les matrices et leur conditionnement, l'échantillonnage peut ou non encore constituer un problème. Les plans d'échantillonnage au champ de graines ou plantes peuvent ainsi être repris d'autres domaines concernés par le contrôle qualité. En revanche, d'autres plans comme ceux des cargos avec un contenu en vrac, malgré de récents travaux à ce sujet, ou de chaînes de production demeurent problématiques. Des divergences sont en outre apparues quant à l'intérêt d'appliquer les plans d'échantillonnages utilisés pour les mycotoxines. Plus globalement, la normalisation sur ce thème progresse peu, reflet des difficultés rencontrées.

La taille des prises d'essai et donc de celles des échantillons de laboratoires a fait l'objet d'après discussions. Fallait-il, comme certains le recommandaient, augmenter la taille des échantillons analysés jusqu'à disposer de quantités suffisantes d'ADN ou de protéines pour les dosages (avec donc un minimum de 10 000 équivalents génomes en raison de la limite de détection de 0,01 %) ? Ou fallait-il au contraire définir une taille égale quels que soient les produits et leurs teneurs en protéines ou ADN ? La seconde solution, avec une masse de 1 g, a été retenue pour la majorité des matrices de sorte que, tout en considérant le désir légitime des consommateurs d'accéder à une information fiable, la norme soit disponible le plus rapidement possible et les méthodes praticables à un coût socialement acceptable. La première solution aurait en effet nécessité de :

- définir, par de longues et coûteuses études et pour toute matrice alimentaire ou produit intermédiaire, la taille minimale de prise d'essai permettant de récupérer assez d'ADN ou de protéines ;
- réévaluer périodiquement ces quantités, en raison de modifications probables des procédés agro-alimentaires ;
- disposer, voire faire fabriquer, le matériel approprié au traitement de masses importantes.

Il est probable que plusieurs dizaines de kilos ou de litres auraient été nécessaires pour nombre de matrices, ce qui est irréalisable en routine à un coût acceptable. Enfin, la transposition de telles dispositions aux méthodes fondées sur les protéines aurait nécessité de déterminer, pour chaque OGM et ses cultivars, des tailles d'échantillons indépendantes des conditions de culture et de l'âge, caractères influençant la teneur en protéines.

Extraction et purification des cibles

L'ensemble des matrices analysées ne semble guère pouvoir être soumis à une méthode universelle d'extraction et de purification des acides nucléiques. Le problème est moins criant pour les protéines dont le domaine d'application est plus restreint en ce qui concerne les matrices analysables. Les méthodes proposées à la normalisation devront donc être accompagnées de leur domaine d'application comprenant des listes « positives » et « négatives » de matrices à partir desquelles de l'ADN de qualité aura ou non été extrait. L'établissement de ces listes nécessite alors :

- une classification, appropriée au sujet mais aussi simple que possible, des matrices alimentaires afin d'éviter de leur donner des noms commerciaux dont les procédés d'obtention, et donc les teneurs en analyse, pourraient sans cesse évoluer ;
- la reconnaissance aisée de ces matrices si celles-ci ne leur sont pas spécifiées par les donneurs d'ordre.

Bien que nombre de bases de données et de langages de description des matrices alimentaires soient disponibles, la normalisation bute sur l'absence d'une définition simple et opérationnelle des produits à analyser. Une telle classification nécessitera-t-elle de disposer de coûteux standards d'extraction ?

Tests PCR

Dans le même état d'esprit, tout test PCR qualitatif, semi-quantitatif et quantitatif normalisé, qu'il porte sur les OGM ou les espèces, devra être accompagné de son domaine d'application (une liste d'organismes naturels et d'OGM sur lesquels la réponse aux tests PCR est connue). Le premier test PCR repris dans le document CEN sur la PCR quantitative est représentatif des carences des tests actuels.

De longues discussions ont également porté sur la définition des limites de détection et de quantification des méthodes, PCR en particulier, et leur implication. Les tests PCR, qui doivent tous être optimisés, présentent généralement des limites de détection « absolues » comprises entre 1 et 20 copies d'ADN cible. On ne peut dès lors atteindre une limite de détection de 0,01 %, telle que préconisée par la norme, que si l'on dispose d'au moins 10 000 cibles potentielles, soit, dans le cas présent, entre 10 000 et 200 000 équivalents génomes. Les limites de détection et de quantification relatives utilisées pour la réglementation varient donc avec les matrices et leur teneur en ADN. C'est pourquoi, dans une matrice à faible teneur d'ADN (certaines huiles et lécithines...), les limites de détection et de quantification d'une technique PCR optimisée peuvent être largement supérieures à 10 % selon la teneur en ADN extractible. Fallait-il dès lors, comme pour les tailles d'échantillons de ces matrices, définir les limites de détection et de quantification pour chacune des matrices ? Il paraissait impossible de définir ces limites pour toutes les matrices existantes. En conséquence, les limites de détection et de quantification des tests ont donc été définies pour des valeurs respectives de 0,01 % et 0,1 %, en prenant comme seules références les semences et l'ADN purifié, après corrélation aux masses de semences. Un avertissement devrait rappeler, dans les rendus d'analyses des laboratoires, les variations induites par les teneurs en ADN des matrices analysées.

Une telle prise en compte de la diversité des matrices alimentaires dans les domaines d'application des méthodes d'extraction et de purification des acides nucléiques cherche également à éviter de devoir préparer et utiliser en routine, comme initialement proposé par certains, des standards à teneurs certifiées en OGM, pour de nombreuses matrices alimentaires. Outre les délais nécessaires et les difficultés techniques inhérentes à la préparation de tels standards, la maîtrise du nombre de

standards nécessaires aux analyses de routine tente de contenir les augmentations des coûts d'analyses dus à leur achat.

Évolutions prévisibles et souhaitables

Comme nous venons de le voir, la question de la détection des OGM est loin d'être résolue. Diverses évolutions sont prévisibles ou souhaitables.

Au niveau de la réglementation

Le premier souhait est évidemment celui d'une plus grande cohérence de la réglementation par la définition rapide de seuils pour l'ensemble :

- des produits (auxiliaires technologiques, supports d'arômes...);
- des OGM autorisés ou non (donc autres que Bt176 et RRS);
- des filières concernées (donc autres que l'alimentation humaine).

On peut comprendre que la réglementation actuelle reflète une prise en considération progressive des réactions des consommateurs. La réglementation future devra au contraire clairement refléter la prise de conscience des pouvoirs publics européens que dorénavant tout produit concerné par les OGM devra être soumis à étiquetage. La transparence et un éventuel retour à la confiance des consommateurs sont à ce prix.

Un certain nombre des lacunes relevées précédemment doivent être comblées, alors qu'il ne faut pas se voiler la face devant d'autres problèmes :

- la fourniture par les sociétés de biotechnologies des informations nécessaires aux développements des tests et des standards doit dorénavant constituer un prérequis à toute nouvelle autorisation d'OGM. L'intégration des besoins des laboratoires à la directive 90/220/CEE, en cours de révision, et au règlement 258/97/CE paraît une condition *sine qua non* au développement rapide d'outils performants de bio-vigilance. Là encore, seule une réglementation cohérente tirant les leçons du passé pourrait permettre de restaurer la confiance de certains de nos concitoyens. Le récent communiqué des ministres européens appelant à la mise en place d'une « traçabilité » des OGM et les préoccupations du Parlement européen constituent des signes encourageants ;

- devant l'impossibilité technique de différencier, sinon plante à plante, les OGM résultant d'empilage de gènes (*gene stacking*) de leurs géniteurs, il paraît nécessaire de résoudre, ou tout au moins d'encadrer, réglementairement le problème de leur quantification après concertation de tous les acteurs ;

- les filières « sans utilisation d'OGM » européennes doivent être rapidement définies [8]. La consultation des différents partenaires, les résultats du programme de recherche sur la pertinence économique et la faisabilité technique des filières « sans utilisation d'OGM » et les consultations en cours récemment annoncées par les associations de consommateurs réunies au sein du groupe de travail « OGM » du CNC⁷ fourniront une partie des bases nécessaires à cette définition. L'approche japonaise a permis, à partir de son seuil d'étiquetage de 5 % qui doit entrer en vigueur au 1^{er} avril 2001, de définir des seuils pour ses filières « sans utilisation d'OGM ». L'Europe n'a pu encore définir

de valeur lui permettant enfin de s'approvisionner dans les pays tiers et surtout de tester grandeur nature la capacité des filières à fournir des produits garantis « sans utilisation d'OGM ». Les diverses initiatives privées observées ces dernières années ne parviennent qu'à désorienter le consommateur et à accroître les distorsions de concurrence. Les définitions, variables selon les continents, des filières « sans utilisation d'OGM » devraient être harmonisées au sein des structures appropriées (convention de Rio, OCDE...). Il convient en particulier d'éviter l'amalgame entre les filières « sans utilisation d'OGM » et les actuelles filières américaines « IP⁸ » ;

- il faut enfin prendre garde aux interférences qui résulteraient de l'intervention d'autres acteurs que la Commission européenne ou les autorités compétentes. C'est ainsi que les semenciers, au particulier au sein de la FIS⁹ et de l'ISTA¹⁰, ont défini et appliquent un seuil maximum de contamination des semences, conventionnelles entre autres, de 1 % alors que la Commission propose un seuil de 0,5 % et que Marylise Lebranchu, secrétaire d'État en charge de la coordination du dossier OGM, préconise un seuil plus bas, à la limite de quantification. Là aussi, les retards européens laissent la porte ouverte aux initiatives privées, sources potentielles de confusion pour les producteurs et les consommateurs.

Au niveau des méthodes et de leur normalisation

Compatibilité : un maître mot pour réduire les litiges

La vérification de la compatibilité des méthodes est une tâche urgente à entreprendre afin de réduire au maximum toute possibilité de discordance de résultats entre laboratoires ou organismes certificateurs nationaux, et donc de limiter les litiges commerciaux. Cette compatibilité devra prendre en compte les trois approches actuellement utilisées : celles fondées sur les protéines, et plus généralement l'expression phénotypique, celles fondées sur l'ADN et enfin celles fondées sur les plans d'échantillonnage actuellement testées par les semenciers au sein de la FIS et de l'ISTA. Il conviendra aussi de se préoccuper des méthodes en cours d'étude comme les « puces à ADN » et autres « micro-array » ou « ADN branché ». Ces travaux, généralement peu rentables en termes de publications, n'intéressent guère les laboratoires de recherche. Ils risquent donc de constituer les « dernières roues du carrosse » des programmes dédiés à la détection des OGM. L'important travail de coordination de laboratoires aux compétences différentes et de préparation d'échantillons ainsi que la nécessité d'un excellent encadrement statistique font de ces aspects une activité de choix pour les futurs tests internationaux coordonnés par le CCR d'Ispra.

La variabilité acceptable des méthodes constitue un facteur important de compatibilité des méthodes. Celle des seules méthodes de PCR quantitative n'est toujours pas déterminée. Les premiers tests interlaboratoires, regroupant des laboratoires de compétence inégale, laissent entrevoir une variabilité de près de 40 % autour du seuil réglementaire de 1 % de contamination fortuite. S'il est probable que la variabilité intrinsèque des méthodes PCR sera largement plus faible que ces valeurs, il est important de la déterminer au plus tôt pour réduire les risques de litiges.

Cette variabilité des méthodes PCR quantitatives pourrait rester sans conséquence pour certaines matrices comme les semences si l'approche statistique par plans d'échantillonnage actuellement étudiée sous l'égide de la FIS et de l'ISTA s'avérait efficiente. Une telle approche, relativement classique en contrôle qualité, suppose en effet une distribution des contaminations selon des lois binomiales et n'utilise que des tests qualitatifs. Cette méthodologie qui privilégie le prix, et la rareté, du produit à analyser par rapport au coût des analyses n'est par contre pas généralisable à toute

matrice.

De l'évolution des techniques et de la multiplicité des OGM à détecter

La multiplication des OGM à détecter, autorisés ou non au sein de l'UE, pose enfin la question de l'évolution des méthodes de détection. Les systèmes de « micro-array » et autres « puces à ADN » ou « ADN branché » pourraient-ils supplanter la PCR, au moins pour les cas où les teneurs en ADN sont suffisantes pour satisfaire les critères retenus en limites de détection et de quantification ? Au vu de la sensibilité de ces méthodes à base d'hybridation, il est probable que la réponse sera positive, pour les semences, graines, fèves et autres produits non transformés, ne serait-ce qu'en raison des durées de manipulations et des coûts importants des nombreuses PCR nécessaires. Elles complémenteraient voire concurrenceraient les techniques immunologiques pour des produits pour lesquels la demande devrait croître avec la mise en place d'une véritable traçabilité. En revanche, l'intérêt de telles techniques d'hybridation pour les matrices à faible teneur en ADN, et donc nécessitant des amplifications PCR préalables à l'hybridation, reste à déterminer. La réponse viendra sans doute de la facilité relative à développer les PCR multiplex qualitatives *versus* les PCR quantitatives en temps réel. Un programme européen, récemment accepté, vise à évaluer l'intérêt de telles techniques de « micro-array » avec et sans PCR préalables et à développer la première « puce » commerciale consacrée aux OGM.

De l'importance des standards

Comme nous l'avons déjà signalé, la disponibilité de standards certifiés stables, déjà problématique pour les développements, est un des goulots d'étranglement à l'obtention de résultats qualitatifs et quantitatifs comparables entre laboratoires. À côté des standards de calibration actuels à base de semences broyées, il est fort probable que des standards sous forme d'ADN génomique ou plasmidique devront être mis sur le marché. Espérons que la prise en compte des matrices alimentaires dans les méthodes normalisées d'extraction, associée à une classification simplifiée de celles-ci, évitera de devoir développer et utiliser des standards de toutes sortes à teneurs certifiées en OGM, standards dont les coûts seraient répercutés sur les prix d'analyses.

Des tests de validation de méthodes et des tests d'aptitude

Un certain nombre de règles, organisation et bonnes pratiques de laboratoire, témoins positifs et négatifs ont été recensés dans la norme française. L'accréditation des laboratoires est un besoin ressenti autant par les laboratoires que par les opérateurs. La publication prochaine de la norme française devrait permettre au COFRAC¹¹ d'initier un programme d'accréditation à moins que la publication tardive des normes CEN ne puisse retarder sa reconnaissance européenne.

Les tests d'aptitude (*proficiency tests* tels que celui du MAFF britannique ou celui à venir du BIPEA¹²) doivent être mieux différenciés des tests interlaboratoires de validation de méthodes. Si en outre, comme suggéré par certains, les méthodes de validation AOAC¹³ ne sont pas appropriées aux méthodes PCR utilisées dans le cadre de la détection des OGM, un chantier international devra s'ouvrir sur ce sujet.

La pratique du CEN de n'accepter à la normalisation que des méthodes PCR validées par des tests interlaboratoires risque de ralentir considérablement le processus normatif. Ainsi que cela a été suggéré par la France, des méthodes faisant l'objet d'un consensus au niveau CEN devraient pouvoir

être acceptées, sans avoir été formellement validées par des tests interlaboratoires longs et coûteux à mettre en place. Une telle pratique s'est d'ailleurs *de facto* mise en place pour les méthodes d'extraction.

De l'importance des domaines d'application

Le « domaine d'application » est une antienne lancinante de cet article. Le succès de la normalisation dépendra en premier lieu de l'examen minutieux des protocoles proposés à la normalisation et donc de la confiance que l'on pourra accorder aux domaines d'application fournis avec les méthodes d'extraction et de dosage d'ADN, ainsi que les tests PCR qualitatifs, semi-quantitatifs et quantitatifs. La normalisation des méthodes d'extraction progresse relativement rapidement grâce au consensus sans faille quant aux domaines d'application. En revanche, le premier test quantitatif repris dans le document CEN constitue un excellent exemple du domaine d'application effectif très limité des méthodes disponibles. Le recensement effectué des questions auxquelles devra répondre tout test PCR devrait constituer un canevas pour assurer des développements de méthodes appropriées et une meilleure adéquation des méthodes développées aux besoins des laboratoires.

Notes

¹ Infra Rouge.

² Association of Official Seed Certifying Agencies (42 agences aux États-Unis, 2 au Canada, 1 en Australie, 1 en Nouvelle-Zélande et 1 en Argentine).

³ Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay.

⁴ Strategic Diagnostic Incorporated.

⁵ Comité européen de normalisation.

⁶ Association française de normalisation.

⁷ Conseil national de la consommation.

⁸ Identity Preservation.

⁹ Fédération internationale des semenciers.

¹⁰ International Seed Testing Association.

¹¹ Comité français d'accréditation.

¹² Bureau interprofessionnel d'études analytiques.

¹³ Association of Official Analytical Chemists.

¹⁴ Acronyme d'un programme européen.

¹⁵ American Association of Cereal Chemists.

¹⁶ Conseil national de la consommation.

CONCLUSION

Les problèmes rencontrés ces dernières années pour la mise au point des tests de détection et leur utilisation devraient inciter les autorités compétentes et la Commission européenne à n'autoriser dorénavant que des OGM pour lesquels sont réunies les conditions d'une détection fiable. L'histoire des OGM ne peut continuer à se résumer pour les laboratoires à une longue traque de l'information et des standards. Le libre choix des consommateurs y gagnerait en rapidité, fiabilité et en coûts.

Plus globalement, le manque de coopération de certaines multinationales de biotechnologie a certainement fortement contribué au rejet des OGM exprimé par une majorité de consommateurs et citoyens européens, qui semblent néanmoins davantage identifier les OGM à une bataille économique et à un choix de société qu'à des problèmes de sécurité alimentaire. Une coopération de bonne augure se met en place avec certaines sociétés de biotechnologies, qui s'apprêtent à rendre publiques, au travers de laboratoires de recherche publics, des informations utiles à la détection des OGM, autorisés et non autorisés dans l'UE. Curieusement, cette meilleure coopération est aujourd'hui plus le fait de sociétés de pays tiers que de multinationales d'origine européenne. Ces sociétés persistent à vouloir garder confidentielles des données qui devront ainsi être « redécouvertes » par des programmes de recherche européens comme « qpcrgmofood »¹⁴, le tout aux frais du contribuable européen. Gageons que les multinationales européennes sauront aussi rapidement tirer les leçons des erreurs passées.

Grâce à la participation du CCR d'Ispra, la mise en réseau des laboratoires publics européens travaillant pour les autorités compétentes devrait accroître les synergies de développement, faciliter les échanges d'informations confidentielles et éviter tout doublon coûteux en temps et en deniers publics.

Les techniques de détection et d'identification des OGM évoluent rapidement. Le prochain colloque annuel en novembre 2000 de l'AACC¹⁵ devrait constituer une excellente occasion de faire le point sur les développements en cours et permettre de confronter les approches et pratiques européennes et américaines.

Le débat sur les OGM commence à sortir de la spirale infernale des anathèmes que se lançaient certains intervenants. La constitution de cadres, formels ou informels, de discussion tels que le groupe de travail permanent sur les OGM du CNC¹⁶ ou ceux du programme de recherches sur les filières « sans utilisation d'OGM » participe à cette maturité du débat autant que la possibilité de libre choix offerte aux consommateurs par un étiquetage fiable.

REFERENCES

1. INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY JJ, WHITE TJ (1990). PCR protocols - A guide to methods and applications. San Diego : Academic press, p. 482.
2. JENKINS FJ (1994). Basic methods for the detection of PCR products. *PCR Methods Appl*, 3 : S77-82.
3. LARRICK JW (1997). The PCR technique : quantitative PCR. Biotechnics books, Eaton Publishing.
4. PHILLIP P, SEYLER JF, BERTHEAU Y (2000). Détection des OGM dans les produits alimentaires et normalisation. *Bulletin des Experts chimistes de France* (sous presse).
5. BERTHEAU Y (1998). Détection et identification des OGM. *POUR*, 159 : 69-77.

6. BERTHEAU Y, DIOLEZ A (1999). Les aliments passés au crible. *Biofutur*, 192 : 28-32.
7. ORLANDO C, PINZANI P, PAZZAGLI M (1998). Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med*, 36 : 255-69.
8. BERTHEAU Y, RUFFIEUX B, VALCESCHINI E (2000). Avec ou sans OGM ? Comment y voir clair. *Le Monde* 23 mai 2000.

Illustrations

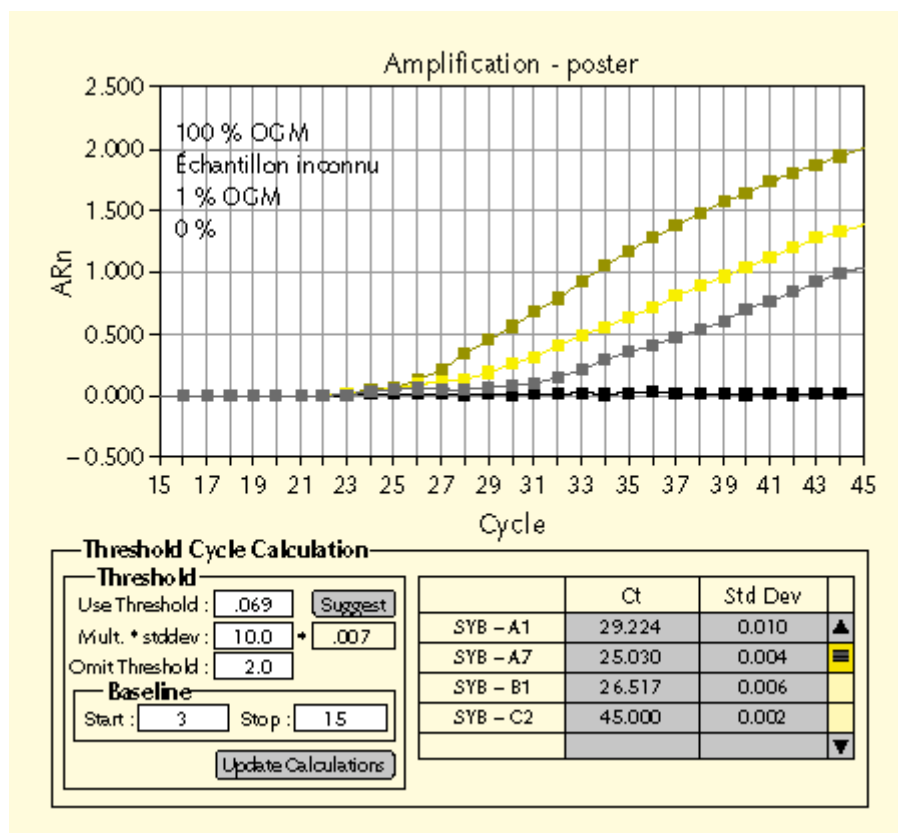


Figure. Quantification des OGM par PCR dite « en temps réel ».