

Utilisation de matériaux de référence certifiés pour la quantification des OGM dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux

Septembre 2006

Dernière révision : août 2019

Auteur : Stefanie Trapmann
Commission européenne - Centre commun de recherche
Retieseweg 111, 2440 Geel, Belgique
E-mail : stefanie.trapmann@ec.europa.eu

La présente note d'application livre des informations et conseils sur l'utilisation correcte des matériaux de référence du Centre commun de recherche (CCR) certifiés pour leur fraction massique GM (génétiquement modifiée) d'un événement de modification donné. Elle explique le fonctionnement du système de mesure utilisé pour quantifier les OGM dans le contexte de l'Union européenne.

INTRODUCTION

Dans l'Union européenne, les organismes génétiquement modifiés (OGM) doivent être autorisés avant d'être placés sur le marché européen. Le règlement (CE) n° 1830/2003 impose l'étiquetage des produits destinés à l'alimentation humaine ou animale contenant plus de 0,9 % d'OGM. Conformément au règlement (UE) n° 619/2011, les aliments pour animaux peuvent contenir 0,1 (m/m) % d'un OGM faisant l'objet d'une procédure d'autorisation ou dont l'autorisation au sein de l'Union européenne a expiré. Aux fins de la mise en œuvre de la législation européenne, il convient de quantifier de façon fiable la fraction GM des produits destinés à l'alimentation humaine ou animale. Aussi la décision d'autorisation relative à chaque OGM publiée par la Commission européenne spécifie-t-elle la méthode de détection et le matériel de référence certifié (MRC) définissant le système de mesure utilisé pour effectuer la quantification. Le MRC officiel est utilisé pour étalonner la méthode de référence de PCR quantitative spécifique d'un événement, validée par le laboratoire européen de référence pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux génétiquement modifiés (EU-RL GMFF).

CARACTÉRISTIQUES DES MRC DE QUANTIFICATION DES OGM

Les valeurs certifiées des MRC de quantification des OGM du CCR se fondent sur les masses de matériel végétal GM déshydraté (généralement des poudres obtenues à partir de semences) et/ou de matériel végétal non GM déshydraté. Pour les MRC nécessitant de mélanger des matériaux GM et non GM, les masses sont corrigées pour tenir compte de leur teneur en eau et de leur pureté pendant la certification. La fraction massique GM est calculée comme suit :

$$\frac{\text{masse GM corrigée}}{\text{masse GM corrigée} + \text{masse non GM corrigée}}$$

Chaque MRC de quantification des OGM est certifié pour la fraction massique d'un événement

GM spécifique (comme indiqué sur le certificat). Le MRC ne peut être utilisé que pour quantifier cet événement précis et le matériel « blanc » correspondant (matériel non GM) ne peut servir qu'à prouver l'absence de cet événement en dessous du seuil mentionné sur le certificat.

Pour chaque MRC de quantification des OGM, les conditions de conservation recommandées sont indiquées sur le certificat. Le producteur de MR ne peut être tenu responsable des changements survenant pendant que le matériel est conservé dans les locaux du client, en particulier les échantillons ouverts. Si un MRC de quantification des OGM est utilisé à plusieurs reprises, le niveau d'absorption d'eau des matériaux hygroscopiques doit être réduit en refermant la bouteille aussitôt l'échantillon prélevé.

MÉTHODE DE QUANTIFICATION DES OGM

La réaction en chaîne de la polymérase quantitative (qPCR) est fréquemment utilisée pour quantifier les éléments GM dans des échantillons de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux. Cette technique de quantification basée sur la détection de l'ADN mesure le rapport entre l'acide désoxyribonucléique (ADN) transgénique, c'est-à-dire résultant d'une modification génétique, et l'ADN endogène, propre à l'espèce biologique considérée.

Les MRC de quantification des OGM du CCR sont destinés à être utilisés en combinaison avec la méthode de référence de PCR quantitative spécifique d'un événement, validée par le EU-RL GMFF. Les méthodes de détection par PCR quantitative qui ont été proposées et validées en vertu du règlement (CE) n° 1829/2003 sont accessibles au public sur la page d'accueil du EU-RL GMFF (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/StatusOfDossiers.aspx>). Si les MRC sont utilisés dans des essais de criblage, l'utilisateur doit garder à l'esprit que les MRC ne servant pas à quantifier des OGM peuvent produire des signaux positifs dans le cadre dudit essai de criblage, alors qu'il s'agit de vrais

négatifs dans le cadre de la méthode spécifique d'un événement. Les signaux de criblage positifs doivent donc être interprétés avec prudence.

Lors de la préparation des MRC pour la quantification des OGM, on a tout particulièrement veillé à ce que les poudres GM et non GM soient semblables du point de vue de leur distribution granulométrique, un élément particulièrement important étant donné que cette dernière est corrélée à la quantité d'ADN extractible. En effet, si les deux types de poudre avaient des rendements d'extraction d'ADN différents, ceci aurait une influence sur la teneur GM mesurée par la PCR quantitative. En outre, il convient d'utiliser uniquement les méthodes d'extraction d'ADN dont la conformité aux exigences applicables à la quantification des OGM a été validée et dont il a été prouvé qu'elles fonctionnent avec différentes variétés de la même espèce. Durant la certification, la fraction massique GM du MRC est contrôlée grâce à une méthode de PCR quantitative spécifique d'un événement. Si une différence d'extractibilité de l'ADN a été observée, cette information est fournie.

La composition génétique des différentes parties des graines de monocotylédones (par ex. albumen, tégument et germe du maïs) varie et la valeur du rapport d'ADN de la farine complète produite à partir de grains entiers diffère de celle de la farine produite à partir de grains raffinés (comprenant uniquement l'albumen). Le CCR utilise des farines à grains entiers pour ses MRC de quantification des OGM.

Tous les MRC de quantification des OGM du CCR sont produits de façon gravimétrique au moyen de matériaux végétaux non GM et GM purs. Ils sont certifiés pour la fraction massique GM sous-tendant le respect des seuils de fraction massique établis dans la législation européenne ad hoc relative aux produits destinés à l'alimentation humaine et animale. La plupart des MRC de quantification des OGM sont destinés à être utilisés comme étalons pour des mesures de PCR quantitative.

Le système de mesure utilisé pour quantifier les OGM dans le contexte juridique de l'Union européenne est défini par le MRC officiel, spécifié dans la décision d'autorisation, et par la méthode de mesure validée par le EU-RL. Aucune correction ne doit donc être réalisée. De même, il ne faut pas tenir compte ici de la commutabilité, qui constitue une caractéristique centrale des matériaux de référence lorsque différentes méthodes de mesure sont utilisées.

CODE DES MRC DE QUANTIFICATION DES OGM

Chaque MRC de quantification des OGM est doté d'un code individuel consistant en une combinaison de lettres et de chiffres, qui se présente sous le format général ERM-BF123xy. « ERM[®] » spécifie la marque (marque protégée pour « matériel de référence européen ») et « BF » précise qu'il s'agit d'un MRC végétal certifié pour la teneur en OGM. Les trois chiffres qui suivent sont spécifiques à chaque événement particulier. Le x est une lettre minuscule allant de a à g et ajoutée à la suite du code de l'événement pour indiquer le niveau de fraction massique (par ex. ERM-BF412a = valeur nominale de 0 g/kg, ERM-BF412b = valeur nominale de 1000 g/kg, ERM-BF412c = valeur nominale de 1 g/kg, ERM-BF412d = valeur nominale de 10 g/kg, ERM-BF412e = valeur nominale de 100 g/kg). Le y est une lettre minuscule allant de k à z et indiquant la deuxième, troisième, etc., série de production de MRC. La première série de production est dépourvue de cette lettre y supplémentaire.

Dans la majorité des cas, cinq niveaux de concentration différents sont produits par série : les valeurs nominales 0 et 100 % et les mélanges 0,1, 1, 10 (m/m) %. Des bouchons avec codes de couleur sont utilisés pour reconnaître plus facilement les différents niveaux de fraction massique : valeur nominale de 0 g/kg = argenté, valeur nominale de 1000 g/kg = noir, valeur nominale de 1 g/kg = doré, valeur nominale de 10 g/kg = rouge, valeur nominale de 100 g/kg = brun.

Chaque série de production de MRC a été traitée à l'aide de matériaux végétaux différents (par ex. lots de semences). En outre, la distribution granulométrique est susceptible de varier, quels que soient les efforts consentis pour assurer sa constance entre l'ancienne et la nouvelle série. Les lignes d'étalonnage établies avec une nouvelle série de MRC peuvent donc différer des lignes établies avec l'ancienne série et un nouveau graphique de contrôle de la qualité doit être réalisé à la première utilisation d'un MRC d'une nouvelle série. De même, il est recommandé de passer de l'ancienne série à la nouvelle pour toutes les applications, étalonnage et contrôle de la qualité inclus. Pour des raisons de traçabilité, le MRC spécifique utilisé pour l'étalonnage doit toujours être indiqué.

s'assurer d'utiliser les valeurs certifiées (voir exemple).



Figure 1 : Série de MRC de quantification des OGM

ASPECTS SPÉCIFIQUES DE LA CERTIFICATION

Tant une poudre non OGM pure qu'une poudre OGM pure sont disponibles pour la majorité des MRC de quantification des OGM. La poudre non OGM est certifiée avoir une teneur en OGM « inférieure » à une fraction massique donnée, sur la base de la limite de détection (LD) de la méthode utilisée pour la caractérisation. La poudre OGM pure est certifiée avoir une teneur en OGM « supérieure » à une fraction massique donnée, sur la base du nombre de semences testées et de l'évaluation statistique. Lors d'un usage à des fins d'étalonnage, le laboratoire doit

Certains MRC de quantification des OGM sont certifiés pour leur identité (c'est-à-dire ERM-BF421b). Ces MRC sont destinés à être utilisés comme échantillons de contrôle positifs, par exemple dans des exercices de criblage. Ils doivent être utilisés pour confirmer la présence (ou absence) d'un événement spécifique d'OGM, mais ne se prêtent pas à la quantification des OGM.

Certains MRC de quantification des OGM ont été certifiés avec une incertitude asymétrique. Si ce type de MRC est utilisé pour réduire l'erreur systématique (voir ERM Note d'application 1), l'incertitude « positive » doit être utilisée lorsque le résultat moyen de la mesure dépasse la valeur certifiée, et l'incertitude « négative » doit être utilisée lorsque le résultat moyen de la mesure est inférieur à la valeur certifiée.

Certains MRC de quantification des OGM présentant un niveau de concentration spécifique ont été certifiés non seulement pour leur fraction massique GM, mais aussi pour leur rapport du nombre de copies d'ADN (par ex. ERM-BF413e, ERM-BF415e, ERM-BF425c, ERM-BF427c). Un étalon correspondant à base de plasmide a été fourni (par ex. ERM-AD413, ERM-AD415, ERM-AD425, ERM-AD427). Si l'objectif est de vérifier la conformité légale au sein de l'Union européenne, les résultats de mesure doivent être convertis des rapports du nombre de copies d'ADN en fractions massiques. Il est à noter que le EU-RL GMFF fournit à cette fin des facteurs de conversion établis.

EXEMPLE D'UTILISATION DE MRC DE QUANTIFICATION D'OGM PURS ET DE LEURS INCERTITUDES

Les informations qui suivent figurent sur les certificats d'analyse de ERM-BF412ak et ERM-BF412bk (<https://crm.jrc.ec.europa.eu/>):

	Fraction massique du maïs Bt11 ¹⁾	
	Valeur certifiée [g/kg]	Incertitude [g/kg] ⁴⁾
ERM-BF412ak	< 0,12 ²⁾	-
ERM-BF412bk	> 970 ³⁾	-

1) Maïs génétiquement modifié doté de l'identifiant unique SYN-BTØ11-1.

2) Le matériel de référence certifié a été produit à partir de semences de maïs conventionnelles non modifiées. Un essai de réaction en chaîne de la polymérase quantitative spécifique d'un événement ciblant l'événement de maïs Bt11 n'a permis de détecter aucune contamination dans ce matériel. La limite de détection (LD) était de 0,12 g/kg. Avec un taux de confiance de 95 %, la vraie fraction massique de maïs Bt11 du matériel est inférieure à 0,12 g/kg. La valeur certifiée est traçable au Système international d'unités (SI).

3) Ce matériel de référence certifié a été produit à partir de semences de maïs Bt11 génétiquement modifiées. La valeur certifiée est basée sur la pureté génétique de la poudre de maïs au niveau du maïs Bt11. Au total, 209 semences ont été analysées individuellement pour détecter la présence de l'événement de maïs Bt11 ; 207 d'entre elles ont été testées positives. Avec un taux de confiance de 95 %, la vraie fraction massique de maïs Bt11 du matériel est supérieure à 970 g/kg. La valeur certifiée est traçable au Système international d'unités (SI).

4) L'incertitude est l'incertitude élargie avec un facteur d'élargissement de $k = 2$ correspondant à un taux de confiance d'environ 95 %, estimé conformément au Guide ISO/CEI 98-3, Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure (GUM:1995), ISO, 2008.

On peut conclure des informations qui précèdent que le MRC ERM-BF412ak est certifié contenir moins de 0,12 g de Bt11/kg et qu'aucune contamination n'a été détectée dans le matériel de poudre. Avec un taux de confiance de 95 %, la vraie fraction massique de maïs Bt11 du matériel est inférieure à 0,12 g/kg. Aussi convient-il d'utiliser la valeur de 0 g/kg pour tout calcul supplémentaire, en ce compris pour définir des courbes d'étalonnage.

Le MRC ERM-BF412bk a été certifié contenir moins de 970 g/kg. Sur 209 semences testées, 207 se sont révélées positives à la présence de l'événement de maïs Bt11. Avec un taux de confiance de 95 %, la vraie fraction massique de maïs Bt11 du matériel est supérieure à 970 g/kg. Il y a lieu d'utiliser la pureté génétique estimée de 990 g/kg pour tout calcul supplémentaire et pour définir une courbe d'étalonnage pour ce GM. Par ailleurs, la valeur de 1000 g/kg doit être utilisée pour les MRC de poudre d'OGM pure dans lesquels aucune contamination n'a été constatée.

Dans tous les cas, l'incertitude devant être utilisée est calculée par la différence entre la valeur numérique et la limite donnée divisée par $\sqrt{3}$. Par exemple :

ERM-BF412ak : la valeur utilisée est de 0,0 g/kg ; l'incertitude est de $0,12 \text{ g/kg} - 0 \text{ g/kg} / \sqrt{3} = 0,07 \text{ g/kg}$

ERM-BF412bk : la valeur utilisée, basée sur la pureté génétique, est de $207 / 209 * 1000 = 990 \text{ g/kg}$. L'incertitude « négative » est de $990 - 970 / \sqrt{3} = 11,5 \text{ g/kg}$. L'incertitude « positive » est de 10 g/kg, étant donné que la teneur GM possible ne peut dépasser 1000 g/kg.