

# commission du codex alimentarius



ORGANISATION DES NATIONS  
UNIES POUR L'ALIMENTATION  
ET L'AGRICULTURE

ORGANISATION  
MONDIALE  
DE LA SANTÉ



# F

BUREAU CONJOINT: Viale delle Terme di Caracalla 00153 ROME Tél: +39 06 57051 www.codexalimentarius.net Email: codex@fao.org Facsimile: 39 06 5705 4593

**Point 3 de l'ordre du jour**

**CX/MAS 10/31/3**

## **PROGRAMME MIXTE FAO/OMS SUR LES NORMES ALIMENTAIRES**

### **COMITÉ DU CODEX SUR LES MÉTHODES D'ANALYSE ET D'ÉCHANTILLONNAGE**

**Trente et unième session  
Budapest (Hongrie), 8 - 12 mars 2010**

#### **AVANT-PROJET DE LIGNES DIRECTRICES RELATIVES AUX CRITÈRES UTILISÉS DANS LE CADRE DES MÉTHODES DE DÉTECTION, D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION DE SÉQUENCES SPÉCIFIQUES D'ADN ET DE PROTÉINES SPÉCIFIQUES CONTENUES EN PARTICULIER DANS LES ALIMENTS DÉRIVÉS DES BIOTECHNOLOGIES MODERNES**

**(à l'étape 3)**

L'avant-projet de Lignes directrices, inclus dans l'annexe II du rapport du Groupe de travail, est diffusé à l'étape 3 pour observations et examen par le Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage, à sa trente et unième session. Les gouvernements et les organisations internationales qui souhaitent formuler des observations sont invités à le faire par écrit, de préférence par courrier électronique, en s'adressant au Secrétaire de la Commission du Codex Alimentarius, Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires, Via delle Terme di Caracalla – 00153 Rome (Italie), télécopie: +39 (06) 5705 4593, courriel: codex@fao.org, avec copie au point de contact du Codex pour la Hongrie, Service hongrois de la sécurité sanitaire des aliments, H-1097 Gyáli út 2-6. Budapest (Hongrie), télécopie:+36 13879400, courriel: HU\_CodexCP@mebih.gov.hu, **avant le 10 février 2010.**

**RAPPORT DU GROUPE DE TRAVAIL SUR L'AVANT-PROJET DE LIGNES DIRECTRICES  
RELATIVES AUX CRITÈRES UTILISÉS DANS LE CADRE DES MÉTHODES DE DÉTECTION,  
D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION DE SÉQUENCES SPÉCIFIQUES D'ADN ET DE  
PROTÉINES SPÉCIFIQUES CONTENUES EN PARTICULIER DANS LES ALIMENTS DÉRIVÉS  
DES BIOTECHNOLOGIES MODERNES.**

**17 août – 20 novembre 2009 (groupe de travail électronique)**

Le Comité du Codex sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage (CCMAS) a tenu sa trentième session du 9 au 13 mars 2009, à Balatonalmádi (Hongrie). Durant cette session, il a été décidé de constituer un groupe de travail électronique qui serait chargé de réviser (à l'étape 2 de la procédure) l'Avant-projet de lignes directrices relatives aux critères utilisés dans le cadre des méthodes de détection, d'identification et de quantification de séquences spécifiques d'ADN et de protéines spécifiques contenues en particulier dans les aliments dérivés des biotechnologies modernes, en tenant compte de observations soumises et formulées durant la session (ALINORM 09/32/23).

Les activités du Groupe de travail électronique susmentionné ont démarré le 17 août et pris fin le 20 novembre 2009. Le Groupe de travail était co-présidé par l'Argentine, le Royaume-Uni et l'Allemagne. L'Argentine a joué le rôle de pays hôte et a fourni une plateforme reposant sur Internet et courrier électronique pour le fonctionnement du Groupe<sup>1</sup>. Il était ouvert à tous les membres et à toutes les organisations ayant le statut d'observateur, et sa langue de travail était l'anglais. Le Groupe comprenait 81 participants, répartis en 31 délégations des États membres, organisations membres ou organisations internationales. On trouvera la liste des participants à l'annexe I du présent rapport.

On a enregistré au total 243 interventions durant la période où se sont déroulés les débats, qui étaient structurés comme décrit ci-après.

Du 17 au 21 août, un débat général s'est tenu sur l'ensemble du document et l'organisation du travail. Au cours de leurs premières interventions, certaines délégations ont évoqué l'applicabilité du document à différentes applications liées aux aliments, et proposé de réviser le nouveau titre et le paragraphe sur le champ d'application adopté durant la trentième réunion du CCMAS. En revanche, d'autres délégations étaient contre la révision de ces textes, étant donné qu'ils étaient le résultat d'un récent compromis et qu'il convenait de démarrer sans délai l'examen du contenu technique du projet.

Dans le souci de faire avancer les travaux, il a été proposé de procéder à une première révision ou "lecture" du texte des lignes directrices, dans lesquelles le titre et le paragraphe sur le champ d'application ne seraient pas modifiés, et les références subsidiaires au champ d'application seraient placées entre crochets et laissées de côté pour le moment. Il serait ainsi possible de se concentrer sur les détails techniques et d'adapter les orientations au nouveau champ d'application élargi. Après un premier examen de l'ensemble du texte en fonction du nouveau champ d'application, il serait procédé à un nouveau débat pour savoir s'il était besoin de modifier le titre et le libellé du champ d'application. Enfin, après ce débat spécifique, il y aurait une nouvelle lecture rapide de l'ensemble des lignes directrices pour finir de rationaliser le texte.

La première lecture du projet a eu lieu entre le 24 août et le 19 octobre. L'examen du document s'est déroulé de manière séquentielle, par phases d'environ une semaine axées sur différentes sections. La première lecture s'appuyait sur un projet de lignes directrices diffusé à l'avance, modifié en fonction des changements approuvés durant la trentième session du CCMAS. Ces modifications étaient les suivantes: a) le nouveau titre et le nouveau paragraphe sur le champ d'application, b) les modifications de la structure proposés à

---

<sup>1</sup> À cet effet, le pays hôte a élaboré une application ad hoc du logiciel en libre accès Moodle (<http://moodle.org/>), adaptée spécifiquement aux besoins d'un groupe de travail électronique du Codex. Les groupes de travail électronique facilitent considérablement la participation des pays en développement membres du Codex en tant que participants ou d'hôtes de groupes de travail entre les sessions des comités. Le Manuel de procédure du Codex indique que la préférence devrait être donnée à la création de groupes de travail électronique, dans la recherche d'un large consensus et d'une plus grande acceptabilité des normes du Codex. En conséquence, les modèles de documents et les connaissances développées durant cette expérience sont disponibles pour les autres membres intéressés et le site web restera affiché jusqu'en avril, 2010 à l'adresse suivante [www.agrobiotecnologia.gov.ar/ccmas](http://www.agrobiotecnologia.gov.ar/ccmas).

l'origine par le Japon (CX/09/30/8-Add.1) et c) la suppression des textes en relation avec les questions de procédure du Codex, étant donné que les lignes directrices étaient destinées à être utilisées par les gouvernements.

Les questions en suspens soulevées et soulevées durant la précédente session du CCMAS ont été traitées durant la première lecture. Elles portaient notamment sur les points suivants: la nécessité d'améliorer les parties touchant aux méthodes fondées sur les protéines, la mise à jour des méthodologies et des références techniques et scientifiques, l'estimation de l'incertitude de mesure, l'harmonisation de la terminologie et des modifications d'ordre rédactionnel.

Par ailleurs, la terminologie utilisée précédemment qui limitait l'applicabilité des lignes directrices aux produits dérivés des biotechnologies a été modifiée en faveur d'une terminologie plus générale applicable à toute séquence d'ADN spécifique et/ou protéine spécifique dans les aliments, conformément au nouveau champ d'application. Toutefois, quelques points de détail des orientations n'étant applicables ou nécessaires que pour les aliments dérivés des biotechnologies, la terminologie spécifique a été maintenue dans ces cas là.

Du 19 octobre au 6 novembre, les débats ont porté sur le libellé des textes en rapport avec le champ d'application. Il s'agissait du titre, du paragraphe consacré au champ d'application et celui consacré au But et une formule standard pour les références subsidiaires au champ d'application tout au long du texte. Certaines délégations faisaient valoir que la manière dont les aliments dérivés des biotechnologies modernes étaient mentionnés dans ces sections fondamentales faisait penser à tort que les lignes directrices s'appliquaient uniquement aux méthodes conçues pour ces produits. Elles ont donc proposé un autre libellé. Toutefois d'autres délégations n'étaient pas satisfaites du nouveau libellé et indiqué qu'elles étaient favorables au maintien du texte et de certaines allusions fondamentales aux aliments biotechnologiques, qui découlaient de la dernière session du CCMAS.

Du 26 octobre au 16 novembre, une seconde lecture du projet mis à jour a été effectuée. Elle a consisté en un examen simultané de l'ensemble des lignes directrices, ce qui a permis des améliorations transversales, des perfectionnements de détails techniques et une rationalisation d'ordre rédactionnel du document<sup>2</sup>.

Malgré tous les efforts déployés, il n'a pas été possible d'arriver à une version définitive pour ce qui concerne le texte en rapport avec le champ d'application. Néanmoins, un consensus s'est dégagé et de réels progrès ont été accomplis sur la plus grande partie du texte restant. En conséquence, le titre et le paragraphe sur le champ d'application décidés par le CCMAS à sa trentième session, qui étaient utilisés à titre de référence durant la révision technique, sont présentés dans le projet révisé comme l'option principale, tandis que les libellés et options pour les références subsidiaires au champ d'application sont inclus entre crochets.

Enfin, le présent rapport a été élaboré entre le 16 et le 20 novembre. Le Groupe de travail électronique a décidé de soumettre le projet révisé de lignes directrices au Président du CCMAS et au Secrétariat du Codex, afin de faciliter les étapes suivantes prévues dans le rapport de la trentième session du CCMAS: la diffusion du projet révisé pour observations à l'étape 3, en vue de son examen par le CCMAS à sa trente et unième session.

À titre de complément du présent rapport, les comptes rendus des débats du Groupe de travail électronique resteront disponibles dans leur intégralité sur son site web ([www.agrobiotecnologia.gov.ar/ccmas](http://www.agrobiotecnologia.gov.ar/ccmas)) jusqu'à la prochaine session du CCMAS.

Le document révisé de *"l'Avant-projet de lignes directrices relatives aux critères utilisés dans le cadre des méthodes de détection, d'identification et de quantification de séquences spécifiques d'ADN et de protéines spécifiques contenues en particulier dans les aliments dérivés des biotechnologies modernes "* figure à l'**Annexe II** du présent rapport.

---

<sup>2</sup> À diverses reprises durant la révision, certaines délégations ont suggéré que, compte tenu des modifications considérables apportées, une nouvelle structure du document en améliorerait la qualité. Les détails et les avantages d'une telle réorganisation n'ont toutefois pas été débattus afin de terminer la tâche confiée au Groupe de travail dans les délais prévus.

## ANNEXE I

### LISTE DES PARTICIPANTS

#### Working Group Co-Chairpersons:

**Prof. Martin Alfredo Lema**

Ministry of Agriculture,  
Livestock and Fisheries –  
Biotechnology Directorate.  
Av. Paseo Colón 922, piso 2, of.  
247 C1063ACW,  
Buenos Aires  
T: +54-11- 4349-2070  
F: +54-11- 4349-2178  
e-mail: mlema@minagri.gob.ar

**Dr. Roger Wood**

Food Standard Agency  
c/o Lincolne, Sutton and  
Wood.  
70-80 Oak Street, NR3 3AQ,  
Norwich  
T: +44 (0) 1603 624555  
F: +44 1603629981  
e-mail:  
roger.wood@foodstandards.gs  
i.gov.uk

**Dr. Gerd Fricke**

Federal Office of Consumer  
Protection and Food  
Safety.  
10117 Berlin, Mauerstrasse 39-42  
T: +49-301844410000  
F: +49-(0)301844410009  
e-mail: gerd.fricke@bvl.bund.de

#### CCMAS CHAIRPERSON

**Prof. Dr. Árpád Ambrus**

Hungarian Food Safety Office  
Gyáli út 2-6.  
Budapest, HU-1097  
T: +36 1 439 0356  
F: +36 1 387 9400  
e-mail arpad.ambrus@mebih.gov.hu

#### JOINT FAO/WHO SECRETARIAT

**Selma H. Doyran**

Senior Food Standards Officer  
Joint FAO/WHO Food Standards Programme  
FAO - Viale delle Terme di Caracalla  
00153 Rome, Italy  
T: +39 06 570 55826  
F: +39 06 570 54593  
e-mail: selma.doyran@fao.org

#### PAYS MEMBRES

##### ARGENTINA

**Ing. Agr. Perla Godoy**

Ministry of Agriculture, Livestock and Fisheries –  
Biotechnology Directorate  
Av. Paseo Colón 922, piso 2, of. 247 C1063ACW,  
Buenos Aires  
T: +54-11- 4349-2200  
F: +54-11- 4349-2178  
e-mail: pgodoy@minagri.gob.ar

**Ing. Agr. Gabriela Catalani**

Punto Focal del Codex Alimentarius  
Dirección de Relaciones Agroalimentarias  
Internacionales  
Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca.  
Av. Paseo Colón 922 Oficina 29  
Tél: (+5411) 4349-2549 Fax.: (+5411) 4349-  
2244  
gcatal@minprod.gov.ar

**Dr. Moisés Burachik**

Ministry of Agriculture, Livestock and Fisheries –  
Biotechnology Directorate  
Av. Paseo Colón 922, piso 2, of. 247 C1063ACW,  
Buenos Aires  
T: +54-11- 4349-2074  
F: +54-11- 4349-2178  
e-mail: mburac@minagri.gob.ar

**Lic. Verónica María Torres Leedham**

Director de Laboratorios y Control Técnico –  
SENASA SAGYP  
Paseo Colón 315 – 5TO Piso B,  
Buenos Aires C 1063ACD  
T: +541141215028  
F: +541141215029  
e-mail: vtorres@senasa.gov.ar

**Nora Angelini**  
*Coordinadora Científico Técnica*  
*Dirección de Laboratorios y Control Técnico-*  
*SENASA*  
*Secretaria Alterna CCMAS – Argentina*  
nangelin@senasa.gov.ar

**Lic. Cecilia Llabrés**  
*Dirección de Relaciones Agroalimentarias*  
*Internacionales*  
Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca  
e-mail: cllabr@minagri.gob.ar

**Dra. Ximena Pastorino**  
*CICVyA - INTA*  
Buenos Aires  
T: +54-11- 4621-1278/1447 int. 152

#### **AUSTRALIA**

**Mr. Richard Coghlan**  
*National Measurement Institute*  
P.O. BOX 385 Pymble, NSW 2073  
T: +61294490111  
F: +61294491653  
e-mail: richard.coghlan@measurement.gov.au

**Dr. Kerry Emslie**  
*National Measurement Institute*  
1 Suakim st., Pymble  
T: +61-2-9449-0141  
F: +61-2-9449-1653  
e-mail: kerry.emslie@measurement.gov.au

**Dr. Wolfgang Korth**  
*Department of Agriculture, Fisheries & Forestry*  
18 Marcus Clarke str. , 2601 Canberra  
T: +61 2 6272 4771  
F: +61 2 6272 4023  
e-mail: wolfgang.korth@daff.gov.au

**Mrs. Karina Budd**  
*Senior Scientist, National Residue Survey*  
*Australian Government Department of*  
*Agriculture,*  
*Fisheries and Forestry*  
18 Marcus Clarke str. 2601 Canberra  
T: +61 2 6272 5795  
F: +61 2 6272 4023  
e-mail: karina.budd@daff.gov.au

**Mr John Widdowson**  
*Manager, Chemical Testing*  
*National Association of Testing Authorities*  
*Australia*  
71-73 Flemington Road, North Melbourne Vic  
3057

T: + 613-93291633  
F: +613-93265148  
e-mail: John.Widdowson@nata.asn.au

**Robert Munro**  
*Manager Veterinary Residues,*  
*Australian Pesticides and Veterinary Medicines*  
*Authority.*  
PO Box 6182  
Kingston ACT 2611, Australia  
Tél: +61 2 6210 4832  
Télécopie: +61 2 6210 4741  
e-mail: robert.munro@apvma.gov.au

#### **BELGIUM**

**Mr. Rudi Vermeylen**  
*Laboratories' Administration*  
*Belgian Federal Agency for the Safety of the Food*  
*Chain*  
Kruidtuinlaan 55, 1000 Brussel  
tel.:+32 2 211 87 32  
fax:+32 2 211 87 39  
e-mail: rudi.vermeylen@favv.be

#### **BRAZIL**

**Shirley Abrantes**  
*Head of Brazilian delegation*  
*Researcher of Oswaldo Cruz Foundation*  
Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro,  
Brazil  
CEP 21040-900  
tel: +552125603427 or +552138655124  
e-mail: shirley.abrantes@incqs.fiocruz.br

#### **CANADA**

**Barbara Lee**  
*Director, Food Laboratory Services*  
*Laboratory Operations*  
T: (613) 773-5297  
e-mail: barbara.lee@inspection.gc.ca

**Bertrand Gagnon**  
*Deputy Director- Codex and Food Safety*  
*Coordination*  
T: (613) 773-6092  
e-mail: bertrand.gagnon@inspection.gc.ca

#### **COLOMBIA**

**Adriana Castaño Hernandez**  
*Bióloga M.Sc - Programa OGM*  
*Subdirección de Alimentos y Bebidas Alcohólicas*  
*INVIMA*  
e-mail: acastanoh@invima.gov.co

**Javier David Castellanos Pulido**  
Microbiologo M.Sc  
Laboratorio Central Interinstitucional de  
Detección y Monitorio de OGM  
INVIMA  
e-mail: jcastellanosp@invima.gov.co

#### **EUROPEAN COMMUNITY**

**Mr Niall Gerlitz**  
European Commission, DG Health and Consumers,  
Policy Officer  
B-1049 Rue Breydel 4, Brussels  
T: +3222951618  
F:+3222956043  
e-mail: niall.gerlitz@ec.europa.eu

**Dr. Jérôme Lepeintre**  
European Commission, DG Health and  
Consumers,  
Head of Unit  
Rue Froissart 101 (02/62), B-1049, Brussels  
T: +32 2 299 3701  
F:+32 2 299 8566  
e-mail: Jerome.lepeintre@ec.europa.eu

#### **GERMANY**

**Dr. Lutz Grohmann**  
Bundesamt für Verbraucherschutz  
und Lebensmittelsicherheit  
Federal Office of Consumer Protection  
and Food Safety (BVL)  
Mauerstrasse 39-42  
10117 Berlin, Germany  
T: +49 (0)30 18444-40510  
F: +49 (0)30 18444-40099  
e-mail: Lutz.Grohmann@bvl.bund.de

**Mr. Hermann Broll**  
Federal Institute for Risk Assessment  
Thielallee 88-92  
14195 Berlin, Germany  
Tel.: +49 (0)30 8412-3639  
Fax: +49 (0)30 8412-3685  
E-Mail: hermann.broll@bfr.bund.de

#### **GHANA**

**Prof. Victoria Dzogbefia**  
Professor of Biochemistry  
Faculty of Biosciences  
Kwame Nkrumah University of Science &  
Technology  
Kumasi, Ghana  
Email: vicdzogbefia@yahoo.com

**Prof Kwame Offei**  
College of Agric & Consumer Science  
University of Ghana  
Legon, Ghana  
Email: offei@ug.edu.gh

#### **JAPAN**

**Mr Taku Oohara**  
Assistant Director  
Inspection and Safety Division, Department of  
Food Safety,  
Ministry of Health, Labour and Welfare  
T:(+ 81) 3 5253-1111  
e-mail: codexj@mhlw.go.jp

**Dr Hidetaka Kobayashi**  
Associate Director  
Food Safety and Consumer Policy Division,  
Food Safety and Consumer Affairs Bureau,  
Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries  
1-2-1 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo  
T: +81-3-3502-5722  
F: +81-3-3597-0329  
e-mail: hidetaka\_kobayashi@nm.maff.go.jp

**Dr Akemi Yasui**  
Technical adviser  
National Food Research Institute  
(+ 81) 3 5253-4112  
e-mail: ayasui@affrc.go.jp

**Dr Takahiro WATANABE**  
National Institute of Health Sciences  
Division of Foods Section Chief  
Email:tawata@nihs.go.jp

#### **KENYA**

**Mr. Robert Koigi**  
Analytical Chemist  
Kenya Plant Health Inspectorate Service  
(KEPHIS)  
P.O BOX 49592-00100 Nairobi  
T: +254-020-3597201  
F: +254- 020-3536175  
e-mail:rkoigi@kephis.org

**Abed Kagundu Mathagu**  
Senior Plant Inspector  
Kenya Plant Health Inspectorate Service,  
KEPHIS  
Officer in charge, KEPHIS - Plant Quarantine  
Station  
Member to the National Biosafety Committee  
(NBC)  
Chairman of the Kenya Bureau of Standards

*Committee on rDNA*  
*Member: National Steering Committee on*  
*Creation of Awareness in Biotechnology,*  
P.O BOX 49592-00100 Nairobi  
T: +254-020-3597201  
F: +254- 020-3536175  
e-mail: akagundu@kephis.org

**Roselida Achieng Owuor**  
*Scientist*  
*Senior Science Secretary*  
NCST KENYA  
e-mail: aroselida@ncst.go.ke

**Mr. George Oyamo Osanjo**  
*Department of Pharmacology and*  
*Pharmacognosy,*  
*University of Nairobi*  
P. O. Box 30197, Nairobi  
e-mail: gosanjo@yahoo.com  
Tél: 0733-893296

#### **MALAYSIA**

**Mrs. Jasbeer Kaur**  
*Head Genetically Modified Organism (GMO)*  
*Unit,*  
*Biotechnology Section*  
*Department of Chemistry Malaysia*  
*Ministry of Science, Technology and Innovation*  
Jalan Sultan, 46661 Petaling Jaya, Selangor  
MALAYSIA.  
Tél: +603 7985 3000  
Télécopie: +603 7985 3028  
E-mail: jasbeer@kimia.gov.my;  
ccp\_malaysia@moh.gov.

#### **MEXICO**

**Michelle Vizueth Chávez**  
*Codex Contact Point Mexico*  
e-mail: codexmex@economia.gob.mx

**Sandra Patricia Piña Salinas**  
*Inter-Secretarial Commission on*  
*Biosafety of Genetically Modified Organisms*  
spina@conacyt.mx

**Sol Ortiz García**  
*Inter-Secretarial Commission on*  
*Biosafety of Genetically Modified Organisms*  
sortiz@conacyt.mx

**Natalie Campos Reales Pineda**  
*Inter-Secretarial Commission on*  
*Biosafety of Genetically Modified Organisms*  
ncampos@conacyt.mx

**Martha Elva Germán Sánchez**  
*Inter-Secretarial Commission on*  
*Biosafety of Genetically Modified Organisms*  
mgerman@conacyt.mx

#### **NEW ZEALAND**

**Dr. Paul Dansted**  
*New Zealand Food Safety Authority*  
68-86 Jervois Quay  
PO Box 2835 Wellington, NZ  
T: +64 4 894 2500  
F: +64 4 894 2501  
e-mail: paul.dansted@nzfsa.govt.nz

#### **NORWAY**

**Mrs. Marianne T. Werner**  
*Scientist*  
*National Veterinary Institute*  
PoBox 750 Sentrum  
T: +47 23 21 62 21  
F: +47 23 21 62 01  
e-mail: Marianne.werner@vetinst.no

**Mr. Knut Berdal**  
**Senior Researcher**  
*National Veterinary Institute*  
PoBox 750 Sentrum  
T: +47 23 21 62 21  
F: +47 23 21 62 01  
e-mail: knut.berdal@vetinst.no

**Ms. Solbjørg Hogstad**  
*Senior Adviser*  
*Norwegian Food Safety Authority/*  
P.O.Box 383, N-2381, Brumunddal  
e-mail: solbjorg.hogstad@mattilsynet.no

**Ms. Astrid Nordbotten**  
*Senior Adviser*  
*Norwegian Food Safety Authority*  
P.O. Box 383, N-2381, Brumunddal  
T: +4723216698  
F: +4723217001  
e-mail: asnor@mattilsynet.no

#### **POLAND**

**Zbigniew Sieradzki**  
*National Veterinary Research Institute*  
*Department of Hygiene of Animal Feeding stuffs*  
57 Partyzantow St., 24-100 Pulawy, POLAND  
e-mail: zbigniew.sieradzki@piwet.pulawy.pl

**Robert Karpinski**

*Meat and Fat Research Institute*  
4 Jubilerska St., 04-190 Warszawa, POLAND  
e-mail: robert.karpinski@ipmt.waw.pl

**PORTUGAL****Rogério Mendes**

*Investigador Auxiliar*  
*Unidade de Valorização dos Produtos da Pesca e*  
*Aquicultura*  
*Instituto Nacional de Recursos Biológicos - INRB*  
*I.P./L-IPIMAR*  
Av. Brasília, 1449-006 Lisboa, PORTUGAL  
T:+351 21 302 70 36/ 21 302 70 00  
F:+351 21 301 59 48  
e-mail: rogerio@ipimar.pt

**Helena Silva**

*IPIMAR oficial researcher.*  
e-mail: hsilva@ipimar.pt

**SLOVAK REPUBLIC****Dr. Miriam Filipová**

*State veterinary and Food Institute*  
*National Reference Laboratory for GMO in Food*  
*and Feed*  
T:+421 43 5837 132,  
F:+421 43 5837 153  
e-mail: filipova@svpudk.sk

**SOUTH AFRICA****Malose Daniel Matlala**

*Deputy Director: Inter-agency Liaison and*  
*Regulatory Nutrition*  
*Department of Health*  
*Directorate: Food Control*  
Private Bag X828  
Pretoria 0001  
SOUTH AFRICA  
T: +27-12 312 0158  
F: +27-12 312 3180  
e-mail: CACPSA@health.gov.za

**Ms Renusha Chanda**

*Assistant Director: Food Control*  
*National Department of Health*  
Private Bag X828, Pretoria, 0001  
South Africa  
Tél: +27 12 312 3161  
Télécopie: +27 12 312 3162  
e-mail: chandr@health.gov.za

**Chantal Arendse**

*Department of Agriculture*  
Tél: +012 3196199  
e-mail: DB@nda.agric.za

**Gillian Christians**

*Department of Agriculture*  
email: GillianC@daff.gov.za

**THAILAND****Ms. Chanchai Jaengsawang**

*Expert, Department of Medical Sciences, Ministry*  
*of Public Health*  
email: chanchai48@ymail.com;  
chanchai@dmsc.moph.go.th

**Ms. Usa Bamrungbhuet**

Senior Standards officer  
National Bureau of Agricultural Commodity and  
Food Standards  
Ministry of Agriculture and Cooperatives.  
email: usa@acfs.go.th

**Ms. Sasiwimon Tabyam**

Standards officer  
*Fish and Fishery Products Standard Group*  
*Office of Commodity and System Standards*  
*National Bureau of Agricultural Commodity and*  
*Food Standards*  
e-mail: sasiwimon@acfs.go.th

**THE NETHERLANDS****Henk Van der Schee**

*Food and Consumer Product Safety Authority*  
Hoogte Kadijk 401, 1018BK Amsterdam  
T:+0031 20 5244702  
F:+0031 20 5244700  
e-mail:henk.van.der.schee@vwa.nl

**Dr Saskia Van Ruth**

*Manager Research Cluster Authenticity and*  
*Identity RIKILT - Institute of Food Safety*  
PO BOX 230, Wageningen 6700AE  
T: +31317480250  
F: +31 317 417717  
e-mail: Saskia.vanruth@wur.nl

**Emile Laurensse**

*Senior Scientist*  
*Voedsel en Waren Autoriteit NW*  
Hoogte Kadijk 401  
1018 BK Amsterdam  
Nederland  
Tel. 020 5244675  
e-mail: emile.laurensse@vwa.nl



## **UNITED STATES of AMERICA**

### **Donald Kendall**

*U.S. alternate delegate to the Codex  
Committee on Methods of Analysis and  
Sampling - Deputy Director, Technical Services  
Division, U.S.D.A. Grain,  
Inspection, Packers & Stockyards Administration*  
e-mail: Donald.C.Kendall@usda.gov

### **Dr. Gregory Diachenko**

*Director, Division of Analytical Chemistry, Food  
and Drug Administration (HFS-706)  
5100 Paint Branch Parkway College Park,  
Maryland 20740*  
T: +01-301-436-1898  
F: +01-301-436-2634  
e-mail: Gregory.diachenko@fda.hhs.gov

### **Dr. Michael Wehr**

*Food and Drug Administration Center for Food  
Safety and Applied Nutrition  
5100 Paint Branch Parkway, (HFS-550), College  
Park, Maryland 20740*  
T: +301-436-1724  
F: + 301-436- 2618  
e-mail: michael.wehr@fda.hhs.gov

### **Michael Sussman Ph.D.**

*Directeur  
Field Laboratory Services  
Agricultural Marketing Service/USDA  
801 Summit Crossing Place, Suite B  
Gastonia, NC 28054*  
T: 704-833-1509  
e-mail: michael.sussman@usda.gov

## **INTERNATIONAL INTERGOVERNMENTAL ORGANIZATIONS**

### **FAO**

#### **Masami Takeuchi, Ph.D**

*Food Safety and Quality Officer  
Food Quality and Standards Service  
Viale delle Terme di Caracalla 00153 Rome  
ITALY*  
Tél: +39-06-5705-3076  
Télécopie: +39-06-5705-4593  
e-mail: Masami.Takeuchi@fao.org

### **IICA**

#### **Bryan Muñoz Castillo**

*Hemispheric Specialist in Biotechnology and  
Biosafety*

*San José, Costa Rica*

e-mail: [Bryan.munoz@iica.int](mailto:Bryan.munoz@iica.int)

## **INTERNATIONAL NON-GOVERNMENTAL ORGANIZATIONS**

### **AOCS (American Oil Chemists' Society)**

#### **Dr. Raymond Shillito**

*External Coordination Manager, BioAnalytics  
Bayer CropScience - BioScience*  
2, T.W. Alexander Drive, Durham NC 27517  
Research Triangle Park NC 27709  
T: +1 919 549 2210  
F: +1 919 549 3907  
e-mail: ray.shillito@bayercropscience.com

#### **Dr. Richard Cantrill**

*American Oil Chemists' Society, Technical  
Director*  
2710 S Boulder Drive  
Urbana IL, 61803-7190, USA  
T: +1 217 693 4830  
F: +1 217 351 8091  
e-mail: richard.cantrill@aocs.org

### **BIO (Biotechnology Industry Organization)**

#### **Michael Watch**

*Managing Director, Science and Regulatory  
Affairs  
Food and Agriculture Department  
Biotechnology Industry Organization  
1201 Maryland Avenue SW, Suite 900  
Washington, DC 20024*  
Desk: 202-962-6645  
Fax: 202-488-6301  
e-mail: mwach@bio.org

#### **Janet Collins**

*Government Affairs, Global Biotech Acceptance*  
e-mail: Janet.E.Collins@usa.dupont.com

### **CROPLIFE INTERNATIONAL**

#### **Dr. Craig Rickard**

*Director of Advocacy and Regulatory Affairs,  
Biotechnology  
CropLife International  
c/o CropLife America Offices  
1156 15th Street NW, Suite 400  
Washington DC, 20005*  
T: + 1-202-631-9737  
F: + 1-202-872-3878  
e-mail: craig.rickard@croplife.org

**Ms. Lucyna Kurtyka**

*Global Lead, International Organizations,  
Monsanto Company,  
1300 I Street, NW, Suite 450 East, Washington,  
D.C. 20005  
T: +202-351-9526  
F: +202-789-1748  
e-mail: lucyna.k.kurtyka@monsanto.com*

**ICGMA**

**Ms. Shannon Cole**

*Director of Science Operations, Grocery  
Manufacturers Association  
1350 I Street. NW, Suite 300, Washington, DC  
20005  
T: +202- 639-5979  
F: +202- 639-5991  
e-mail: scole@gmaonline.org*

**Peggy S. Rochette**

*Director of International Affairs  
Grocery Manufacturers Association (GMA)/  
Secretariat ICGMA  
1350 I Street NW  
Washington, DC 20005  
(202) 639-5921  
(202) 639-5991  
e-mail: prochette@gmaonline.org  
prochette@fpa-food.org*

**IFT**

**Rosetta Newsome**

*Director, Science and Communications  
Institute of Food Technologists  
525 W Van Buren Suite 1000  
Chicago, IL 60607  
312.604.0228 Ph  
312.782.8348 Fax  
e-mail: rlnewsome@ift.org*

**ILSI**

**Dr. Marci Levine**

*Senior Staff Scientist  
ILSI International Food Biotechnology Committee  
Washington, DC 20005,  
États-Unis d'Amérique  
e-mail: mlevine@ilsil.org*

**Dr. Guomin Shan**

*Technical Leader  
Biotech Regulatory Sciences  
Dow AgroSciences LLC  
9330 Zionsville Road  
Indianapolis, IN 46268  
USA  
T: +1 317 337 4118  
F: +1 317 337 3235  
e-mail: gshan@dow.com*

## ANNEXE II

### **AVANT-PROJET DE LIGNES DIRECTRICES RELATIVES AUX CRITÈRES UTILISÉS DANS LE CADRE DES MÉTHODES DE DÉTECTION, D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION DE SÉQUENCES D'ADN SPÉCIFIQUES ET DE PROTÉINES SPÉCIFIQUES CONTENUES EN PARTICULIER DANS LES ALIMENTS DÉRIVÉS DES BIOTECHNOLOGIES MODERNES.**

[Autre titre possible I:

**AVANT-PROJET DE LIGNES DIRECTRICES RELATIVES AUX CRITÈRES DE PERFORMANCE ET À LA VALIDATION DES MÉTHODES DE DÉTECTION, D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION DE SÉQUENCES D'ADN SPÉCIFIQUES ET DE PROTÉINES SPÉCIFIQUES CONTENUES DANS LES ALIMENTS]**

[Autre titre possible II:

**AVANT-PROJET DE LIGNES DIRECTRICES RELATIVES AUX CRITÈRES UTILISÉS DANS LE CADRE DES MÉTHODES DE DÉTECTION ET D'IDENTIFICATION DES ALIMENTS DÉRIVÉS DES BIOTECHNOLOGIES MODERNES]**

#### **SECTION 1. INTRODUCTION**

1. Les méthodes d'analyse moléculaire et immunologique sont actuellement les outils reconnus pour la détermination de l'ADN et des analytes protéiques dans les aliments [dérivés des biotechnologies modernes]. Cependant, pour que les résultats obtenus à l'aide de ces méthodes dans des laboratoires différents soient largement acceptés et jugés fiables, les méthodes d'analyse doivent remplir certains critères de qualité.
2. Les présentes lignes directrices fournissent des critères appropriés permettant de valider la performance des méthodes élaborées pour détecter des séquences d'ADN spécifiques ou des protéines spécifiques dans les aliments.
3. On trouvera dans la première partie de ces lignes directrices des (considérations d'ordre général pour la validation des méthodes utilisées pour l'analyse de séquences d'ADN spécifiques et de protéines spécifiques. Des appendices fournissent des renseignements sur les définitions, la validation des méthodes de PCR quantitatives, la validation des méthodes de PCR qualitative, la validation des méthodes fondées sur les protéines, et les essais d'aptitude.

#### **SECTION 1.1 – BUT ET OBJECTIFS**

4. Le présent document a pour objet d'appuyer l'élaboration de méthodes moléculaires et immunologiques pour la détection, l'identification et la quantification de séquences d'ADN spécifiques et de protéines spécifiques dans les aliments [dérivés des biotechnologies modernes] qui produisent des résultats avec une reproductibilité comparable lorsqu'elles sont appliquées dans des laboratoires différents
5. Les lignes directrices donnent des indications sur la manière d'élaborer des méthodes permettant de détecter et d'identifier des séquences d'ADN et des protéines spécifiques dans les aliments, en définissant des critères de validation appropriés, et en établissant si une méthode est conforme ou non à ces critères sur la base des caractéristiques de performance d'une méthode.  
Les lignes directrices spécifieront les critères pertinents et donneront des explications sur la manière de considérer ces critères, c'est-à-dire:
  - en indiquant le bien-fondé des critères les plus importants; et
  - en montrant comment établir si une méthode est conforme ou non aux critères établis.

## **SECTION 1.2 CHAMP D'APPLICATION**

6. Les présentes lignes directrices contiennent des informations aux fins de la validation des méthodes de détection, d'identification et de quantification de séquences spécifiques d'ADN et de protéines spécifiques contenues dans les aliments dérivés des biotechnologies modernes. On pourra également y trouver des informations sur la validation des méthodes applicables à d'autres séquences spécifiques d'ADN et à des protéines particulières contenues dans d'autres aliments.

6 autrement [Les présentes lignes directrices contiennent des critères d'information aux fins de la validation des méthodes d'analyse des aliments comportant la détection, l'identification et la quantification de séquences d'ADN spécifiques et de protéines spécifiques pouvant être présentes dans les aliments et qui seront utilisées par les laboratoires chargés de l'analyse des aliments. Ces méthodes peuvent prévoir des approches moléculaires et immunologiques pour, entre autres, déterminer l'authenticité des aliments et les biomarqueurs pour les aliments contenant du matériau dérivé d'organismes à ADN recombiné.].

## **SECTION 3 – DÉFINITIONS**

7. On trouve dans le Manuel de procédure du Codex et dans d'autres documents, différents termes utilisés dans le cadre des méthodes d'analyse, qui peuvent s'appliquer aussi à l'analyse [de séquences d'ADN et de protéines particulières dans les aliments], [aliments dérivés des biotechnologies]. Des définitions sont proposées pour ces termes à l'appendice II.

## **SECTION 4 – VALIDATION DES MÉTHODES**

8. La Commission du Codex Alimentarius accorde une place importante à l'acceptation des méthodes d'analyses qui ont été « pleinement validées » dans le cadre d'essais collaboratifs réalisés conformément à un protocole accepté au plan international. Dans plusieurs secteurs, les méthodes d'analyses pleinement validées sont peu nombreuses. En conséquence, le Codex entérine aussi par référence des protocoles de validation par un laboratoire unique. Dans ce domaine, des pressions peuvent être exercées pour adopter à titre provisoire une validation officielle par un laboratoire unique en l'absence de données d'essais collaboratifs. Cependant, les méthodes utilisées pour l'analyse [des séquences d'ADN et des protéines] [des aliments dérivés des biotechnologies modernes] peuvent et sont faites pour être appliquées par de multiples laboratoires et devraient donc être validées par des études collaboratives interlaboratoires le plus rapidement possible

### **Section 4.1 – Démarche critère**

9. La Commission du Codex Alimentarius a accepté la « démarche critère » pour les méthodes d'analyse. Il faut s'assurer que cette démarche est inscrite dans les présentes lignes directrices

### **Section 4.2 – Critères généraux des méthodes**

10. Les critères conventionnels qui ont été adoptés par le Codex pour l'évaluation des méthodes d'analyse sont les suivants:

- justesse
- applicabilité (matrice, fourchette de concentration et préférence accordée aux méthodes «générales»)
- limite de détection
- limite de quantification
- précision: répétabilité intralaboratoire des résultats (dans un laboratoire), reproductibilité interlaboratoires des résultats (dans un laboratoire et dans plusieurs laboratoires)
- sélectivité
- sensibilité
- linéarité
- robustesse

### Section 4.3 – Processus de validation

11. La validation des méthodes est un processus qui permet d'établir les caractéristiques et les limites de performance d'une méthode d'analyse et d'identifier les facteurs qui peuvent modifier ces caractéristiques – et dans quelle mesure. Les résultats d'un processus de validation décrivent les analytes qui peuvent être déterminés dans quels types de matrice en présence de quelle interférence. Le processus de validation détermine des valeurs de la précision et de la justesse d'une certaine méthode d'analyse dans les conditions examinées.

12. Le processus de validation des méthodes accepté par le Codex comprend la définition des exigences relatives à la méthode, l'essai de la méthode afin de vérifier qu'elle répond à ces exigences lorsqu'elle est appliquée, par exemple, par différents laboratoires dans différents pays, et la documentation de la performance de la méthode et de l'incertitude de mesure.

13. La validation formelle d'une méthode est la conclusion d'un long processus, qui comprend les principales étapes suivantes:

- **Prévalidation de la méthode.** La prévalidation peut être recommandée mais devrait être réalisée au cas par cas selon les besoins. Elle devrait assurer qu'une méthode fonctionne d'une telle manière qu'elle permet une conclusion satisfaisante de l'étude de validation, c'est-à-dire elle doit démontrer qu'elle est conforme à la performance requise ou aux réglementations. La prévalidation devrait de préférence être effectuée par deux à quatre laboratoires. Les analyses statistiques (par exemple, de « répétabilité » et de « reproductibilité ») devraient être réalisées conformément à la procédure de validation qui sera utilisée par la suite.
- **Validation complète de la méthode.** La validation complète dans le cadre d'essais collaboratifs est coûteuse et n'est effectuée en général que si la performance de la méthode s'est avérée acceptable à la fois dans une étude de laboratoire unique et dans une étude de prévalidation

## SECTION 5 – CONSIDÉRATIONS SPÉCIFIQUES POUR LA VALIDATION DES MÉTHODES DE DÉTECTION, D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION [DE SÉQUENCES D'ADN ET DE PROTÉINES] [D'ALIMENTS DÉRIVÉS DES BIOTECHNOLOGIES MODERNES]

### Section 5.1 – Élaboration des méthodes aux fins d'une validation officielle

14. Avant qu'elles soient acceptées aux fins d'utilisation, les méthodes doivent être validées pour garantir qu'elles sont aptes au but poursuivi.

15. Les méthodologies courantes pour l'analyse fondée sur l'ADN (Anklam *et al.*, 2002; Poms *et al.*, 2004) sont les méthodes à base de PCR utilisées pour déceler une séquence spécifique d'ADN (cible) (ISO21570:2005; Asensio 2007; Holst-Jensen & Berdal, 2004; Lipp *et al.* 2005; Miraglia *et al.*, 2004). Les approches courantes pour les protéines utilisent les tests ELISA et les dispositifs de flux latéral (ISO21572:2004; Grothaus *et al.*, 2006). Pour l'analyse reposant sur l'ADN, l'approche PCR est actuellement très largement appliquée, bien que d'autres méthodes fondées sur l'ADN permettant d'obtenir le même objectif puissent être employées si elles ont été validées correctement. Les approches fondées sur l'ADN et sur les protéines sont examinées ici.

#### Section 5.1.1 – Critères d'acceptation de la méthode (Conditions requises pour la validation complète)

16. Afin d'évaluer une méthode avant sa validation complète, des renseignements concernant la méthode et l'essai de la méthode sont demandés. On trouvera à l'appendice I des détails sur ce point.

17. La méthode sera évaluée en fonction des informations fournies. L'évaluation devrait permettre de vérifier que les conditions de principe préalables pour l'utilisation de la méthode aux fins du Codex sont remplies. La présente section décrit les critères d'acceptation de la méthode qui doivent être remplis avant de mener une prévalidation et des essais collaboratifs complets.

### Section 5.1.2 – Applicabilité de la méthode

18. L'applicabilité des méthodes peut être établie en confirmant si les méthodes peuvent ou non être utilisées dans les aliments prévus avec la performance requise et ce point devrait être clairement indiqué. En particulier, dans l'analyse des séquences d'ADN et des protéines, une méthode qui peut être appliquée à une matrice simple crue ne s'applique pas nécessairement aux matrices complexes et/ou aux aliments transformés, étant donné que l'ADN et les protéines sont facilement dénaturés.

19. [Ce critère est particulièrement important dans l'analyse des aliments dérivés des biotechnologies modernes.] En principe, la méthode devrait être applicable à la matrice particulière au sein du système du Codex. [Si la méthode est utilisée pour analyser les séquences d'ADN et les protéines, l'information devrait être fournie] [S'il s'agit d'un aliment spécifique issu des biotechnologies modernes, il est utile de demander aux auteurs de la demande de confirmation de fournir des renseignements] sur la méthode d'analyse appropriée pour le produit en question et, ce qui serait l'idéal, la matrice dans laquelle elle sera vraisemblablement utilisée. Dans le cas des méthodes « à usage général » visant à identifier et à quantifier [les séquences d'ADN et les protéines] [les aliments dérivés des biotechnologies modernes] dans une série de matrices alimentaires, au moins une méthode d'extraction applicable à une matrice alimentaire générale devrait être disponible.

20. La quantité et la nature de l'ADN et des protéines cibles mesurables présents dans les aliments et les ingrédients alimentaires peuvent être considérablement altérées par les étapes de la transformation. Les modifications que subit une protéine durant la transformation peuvent entraîner sa dénaturation, et tandis que les essais fondés sur les protéines peuvent s'appliquer aux produits d'alimentation humaine et animale transformés, il faut veiller à ce que l'essai soit validé et adapté à l'objectif voulu. En règle générale, les essais à base de protéine sont appliqués à des produits très peu transformés (grain et farine de maïs et de blé), mais des applications spécifiques ont été mises au point pour les produits à forte transformation comme les farines de soja grillées et les isolats de protéine. La transformation peut avoir une incidence semblable sur l'aptitude à détecter l'ADN cible.

### Section 5.1.3 – Condition de principe

21. Les méthodes fondées sur l'ADN devraient détecter, identifier et quantifier les niveaux relatifs des séquences d'ADN spécifique du taxon et de la cible spécifique tandis que les méthodes fondées sur les protéines devraient détecter et quantifier le niveau de la protéine spécifique dans le produit.

[21 autrement. La méthode de détection est destinée essentiellement à répondre aux exigences en matière de mesure des produits dérivés des biotechnologies modernes. À cette fin, la méthode peut détecter et quantifier la séquence d'ADN spécifique du taxon et de la cible spécifique ou la protéine qui en est dérivée dans le produit; cela peut être réalisé dans la plupart des cas à l'aide des deux types de méthodes fondées soit sur les protéines soit sur l'ADN.]

22. L'essai doit être réalisé à l'aide de matériaux de référence préparés à partir d'une matrice contenant l'analyte spécifique, si disponible. En l'absence d'échantillons témoin ou de matériaux de référence, un plasmide contenant les séquences appropriées de l'ADN spécifique du taxon et de la cible pourrait être élaboré et utilisé comme témoin approprié si l'on dispose d'informations sur la séquence de l'ADN cible.

23. Actuellement, la méthode de détection fondée sur l'ADN est en général une méthodologie PCR et inclut:

- un protocole décrivant une méthode d'extraction qui est applicable à la matrice pertinente;
- un protocole décrivant les conditions, y compris l'appareil utilisé, dans lesquelles la PCR peut être utilisée pour détecter la séquence de l'ADN cible;
- une description des séquences d'amorces oligonucléotidiques qui amplifient uniquement la séquence de l'ADN cible;
- le cas échéant, une description des séquences de sonde oligonucléotidique fluorescente qui identifie uniquement la séquence de l'ADN cible;
- une description des séquences d'amorces oligonucléotidiques qui amplifient une séquence de l'ADN spécifique du taxon qui devrait être présent dans la matrice de l'aliment conventionnel indépendamment de la présence de l'analyte spécifique, afin de pouvoir

différencier un résultat négatif d'un processus d'extraction et/ou d'amplification n'ayant pas abouti, et de quantifier la quantité d'ADN cible par rapport à l'ADN spécifique du taxon.

- le cas échéant, une description de la séquence de sonde oligonucléotidique fluorescente qui identifie uniquement la séquence de l'ADN spécifique du taxon.
- une description de la méthode de détection de l'ADN lorsqu'on utilise une méthode à base de gel.
- des échantillons témoins et des standards appropriés.
- la description des calculs utilisés pour obtenir le résultat.

24. Les méthodes fondées sur les protéines sont en général de type quantitatif ou qualitatif. Les premières sont en général un système ELISA, et consistent en:

- une plaque de microtitrage enduite d'anticorps,
- un anticorps secondaire conjugué enzyme
- des standards,
- des témoins,
- un substrat enzymatique pour le développement chromogène,
- un tampon de lavage et un tampon d'extraction d'échantillon.

25. La quantification est faite en comparant la quantité de la protéine spécifique observée dans le ou les extraits avec la quantité de protéine extractible totale présente dans l'extrait ou la protéine totale dans la matrice alimentaire. Il faudra peut-être corriger cette mesure pour tenir compte de l'efficacité l'extraction.

26. Alors que la méthode qualitative peut consister en un ELISA, ou un dispositif de flux latéral qui est constitué de ce qui suit:

- un tampon échantillon,
- un tampon conjugué,
- une membrane de nitrate de cellulose,
- un tampon absorbant assemblé sur un doublage plastique fin.

27. Le fournisseur de la méthode devrait montrer que la méthode remplit les conditions ci-après:

- les méthodes fondées sur les protéines devraient permettre la détection, l'identification et/ou la quantification sans équivoque d'un antigène ou d'épitope spécifique.
- les méthodes de sélection fondées sur l'ADN qui sont utilisées pour détecter des événements de transformation multiples devraient permettre la détection et l'identification sans équivoque d'une séquence d'ADN cible qui est commune à plusieurs événements de transformation.
- les méthodes spécifiques de la cible fondées sur l'ADN utilisées pour la détection ou la quantification relative d'un événement de transformation unique devraient permettre la détection, l'identification et/ou la quantification sans équivoque d'une séquence d'ADN cible qui est unique ou spécifique de cet événement de transformation.
- les méthodes spécifiques du taxon fondées sur l'ADN utilisées pour la détection ou la quantification relative de l'ADN cible devrait permettre la détection, l'identification et la quantification sans équivoque d'une séquence d'ADN qui est unique ou spécifique de ce taxon
- pour les méthodes spécifiques du taxon et de la cible utilisées dans la quantification relative, l'identification du fragment amplifié, par exemple par hybridation de sonde ou tout procédé équivalent approprié, est recommandée.

[27 autrement. Si la méthode d'analyse choisie est la PCR, elle devrait cibler une séquence d'ADN qui n'est pas présente dans l'aliment examiné. Actuellement, le meilleur choix concernant la spécificité d'un événement devrait être la technique PCR, parce qu'elle cible une région génomique spécifique d'un événement en utilisant une série d'oligonucléotides (amorces) qui déclenchent l'amplification de cette région. Parmi les différents types de régions génomiques spécifiques d'un événement de transformation, celle relative à la jonction entre l'insert recombiné et l'ADN génomique hôte sera probablement l'emplacement préférable. Cependant, lorsqu'une séquence unique d'ADN peut être observée dans l'insert recombiné, cette séquence (appelée en général spécifique du gène hybride) peut aussi être ciblée par des amorces

oligonucléotides et amplifiée par PCR. L'identification du fragment amplifié, par exemple par hybridation de sonde ou tout procédé équivalent approprié, est recommandée].

#### **Section 5.1.4 – Approche modulaire de la validation de la méthode**

28. La « méthode » s'entend de toutes les procédures expérimentales requises pour estimer le mesurande dans une matrice particulière. Il peut s'agir pour un matériau particulier des méthodes d'extraction de l'ADN ou de la protéine et de la quantification finale dans un système PCR ou ELISA, ou d'une détermination de la présence ou de l'absence de l'analyte par une méthode qualitative. Dans un tel cas, toute la chaîne qui va de l'extraction à l'étape d'analyse constitue une méthode. Il est cependant possible d'utiliser la même méthode de préparation des échantillons (par exemple, broyage) en association avec le processus d'isolement du même ADN ou de la même protéine pour plusieurs analyses PCR ultérieures différentes (Chapela *et al.*, 2007; Holst-Jensen & Berdal, 2004; Turci *et al.*, 2009) pour des raisons d'efficacité économique à condition que les processus de la méthode validée restent les mêmes.

29. Il serait inapproprié de substituer des processus, comme un processus d'isolement de protéine ou d'ADN différent, dans une méthode validée sans mener des études supplémentaires pour montrer que la substitution n'a pas d'incidence sur la performance de la méthode.

#### **Section 5.2 – Exigences concernant les essais collaboratifs**

##### **Section 5.2.1 – Informations générales**

30. Un essai collaboratif a pour but de valider complètement les données obtenues lors d'essais précédents réalisés dans le cadre d'activités de prévalidation ou de laboratoire unique et de déterminer la fidélité de la méthode sur le plan de la répétabilité et de la reproductibilité.

31. Les valeurs de tous les paramètres de performance obtenues dans des études de validation devraient être interprétées et comparées avec soin. Les valeurs exactes et leur interprétation peuvent dépendre – outre de la performance de la méthode – de l'étendue de la méthode.

32. Aux fins du Codex, la norme ISO 5725:1996 ou le Protocole harmonisé AOAC/UIPAC (Horwitz, 1995)<sup>1</sup> ont été adoptés. Lorsqu'un essai collaboratif a déjà été réalisé conformément à un protocole accepté au plan international, les données ainsi obtenues peuvent être utilisées pour apprécier l'acceptabilité de la méthode aux fins du Codex.

##### **Section 5.2.2 – Exigences de performance minimale**

33. Dans un essai collaboratif, la performance de la méthode devrait être conforme aux éléments pertinents des critères d'acceptation de la méthode et aux exigences de performance de la méthode ci-après établies spécifiquement pour l'essai collaboratif. Ce dernier devrait donc confirmer les résultats obtenus durant les phases antérieures d'évaluation de la méthode et fournir des informations supplémentaires sur la performance de la méthode dans un contexte multilaboratoires. Il faudrait évaluer en particulier la conformité aux critères en matière de sensibilité, d'écart-types de répétabilité/reproductibilité et de justesse.

34. Outre les critères d'acceptation de la méthode, il faudrait au moins évaluer les exigences de performance des méthodes énumérées à l'Appendice I en fonction des données expérimentales obtenues dans un essai collaboratif. La définition et ensuite les exigences sont décrites.

35. Les méthodes confirmées et les données de validation qui y sont associées seront l'objet d'un examen périodique, car les connaissances scientifiques et l'expérience acquise dans les essais collaboratifs et la validation dans un seul laboratoire sont amenées à évoluer. Les présentes lignes directrices seront aussi complétées par des informations pratiques sur les étapes opérationnelles du processus de validation.



### **Section 5.2.3 –Matériaux d’essai à utiliser dans un essai collaboratif**

36. En principe, la méthode devrait être applicable à la matrice concernée (c’est-à-dire pour laquelle une spécification a été formulée) et testée sur elle.

37. Les effets des matériaux ou matrices sur l’étape d’extraction dans un protocole sont importants pour toutes les analyses. Lorsque les résultats d’une étude de validation sont communiqués, il importe d’inclure dans le rapport les détails concernant la matrice analysée, et de signaler aussi si une protéine ou un ADN purifié ont été utilisés comme cible.

### **Section 5.2.4 –Renseignements spécifiques sur la validation des méthodes**

38. Des renseignements spécifiques sur la validation des méthodes PCR quantitatives et qualitatives figurent aux Appendices III et IV respectivement.

39. On trouvera à l’Appendice V des renseignements sur la validation des méthodes quantitatives et qualitatives fondées sur les protéines.

### **Section 5.3 – Unités de mesure**

40. Des unités de mesure appropriées (par exemple, nombre de copies cibles par mg d’aliment ou équivalents molaires, etc.), des critères de performance et de présentation des données devraient être définis pour ces méthodes avant de les utiliser. Pour l’analyse quantitative, les résultats peuvent être exprimés comme présent (+) ou absent (-) ce qui explique qu’il n’y a pas d’unité de mesure.

41. Les mesures peuvent être exprimées de manière explicite en tant que poids/poids ou en pourcentage relatif. Cependant, aucune des méthodes de détection actuelles (qu’elles soient fondées sur l’ADN ou sur les protéines) ne sont à même de mesurer cela directement. Dans le cas d’une méthode fondée sur l’ADN utilisée pour la quantification d’un ADN spécifique, les équivalents génomiques peuvent généralement être mesurés; noter qu’ils peuvent être influencés par plusieurs facteurs biologiques (Grothaus *et al.* 2007; Holst-Jensen & Berdal, 2004), selon la partie de la semence utilisée à l’origine pour la préparation de la farine ou d’autres composants de l’aliment (par exemple, l’endosperme, le germe), et si l’ADN ou la protéine sont conservés dans cette portion. Les méthodes fondées sur les protéines mesurent la quantité d’une protéine spécifique qui est présente et qui peut être influencée par l’efficacité de l’extraction.

### **Section 5.4 –Incertitude de mesure**

42. Comme le mentionne les Directives du Codex sur l’incertitude des mesures (CAC/GL54-2004), les laboratoires doivent estimer l’incertitude de leurs mesures quantitatives. La préparation de l’échantillon et les méthodes d’analyse sont deux sources importantes d’erreur qui devraient être prises en compte lors de l’évaluation d’une mesure d’analyse. Les analystes utilisant des méthodes qui ont été validées conformément aux présentes lignes directrices disposeront d’informations suffisantes pour leur permettre d’estimer l’incertitude des résultats. L’analyse quantitative fondée sur la protéine exprimée peut aussi contribuer de manière importante à l’incertitude de l’analyse.

43. Pour de plus amples détails, consulter les Directives du Codex sur l’incertitude des mesures (CAC/GL 54-2004), le Manuel de procédure du Codex, section intitulée “*Utilisation des résultats analytiques: plans d’échantillonnage, rapports entre les résultats analytiques, l’incertitude de mesure, les facteurs de récupération et les dispositions dans les normes Codex*” et (Trapman et al., 2009).

## **SECTION 6 – EXIGENCES DU CONTRÔLE DE QUALITÉ**

### **Section 6.1 – Qualité des laboratoires**

44. La Commission du Codex Alimentarius a adopté des lignes directrices concernant la « qualité » des laboratoires auxquels il est fait appel dans le cadre de l’importation et de l’exportation de denrées alimentaires. Ces caractéristiques de qualité reposent sur la conformité à la norme ISO/IEC Standard 17025, les essais d’aptitude et le contrôle interne de la qualité ainsi que l’utilisation de méthodes d’analyse validées

conformément aux exigences du Codex. Ces lignes directrices générales fournissent des informations et dictent les conditions que doivent remplir les laboratoires intervenant dans le secteur [des séquences d'ADN et des protéines] [des aliments dérivés des biotechnologies modernes].

45. Les laboratoires doivent être dotés de pratiques normalisées de contrôle de qualité, afin d'éviter la contamination croisée du matériel qui pourrait résulter en résultats faux positifs. Plusieurs exemples sont disponibles (Dieffenbach & Dveksler, 1993; Kwok & Higuchi, 1989; Mifflin, 2007; Newton, 1995). Les normes ISO 21569:2005 et ISO 21570:2005 peuvent aussi servir de guide pour les méthodes fondées sur l'ADN.

## **Section 6.2 –Orientations pour la mise en place et le fonctionnement des laboratoires**

46. Les méthodes fondées sur l'ADN pour l'analyse [des séquences d'ADN et des protéines] [des aliments dérivés des biotechnologies modernes] font appel à un matériel et des techniques de manipulation spécifiques qui diffèrent de la plupart des méthodes d'analyse chimique. L'utilisation des méthodes fondées sur l'ADN se développe dans d'autres champs de détection comme la microbiologie des pathogènes alimentaires. Il est nécessaire de fournir des informations et des instructions sur les différences essentielles qui existent en matière d'établissement des laboratoires et des techniques de manipulation. Des exemples sont disponibles (ISO/DIS 24276:2006).

47. Les méthodes d'analyse immunologiques (fondées sur les protéines) sont bien comprises, sont utilisées dans de nombreux laboratoires pour nombre d'analyses, et se présentent souvent sous forme de trousse, ce qui en simplifie l'usage; il est toutefois à noter que les limites de détection fondées sur les protéines sont inférieures à celles des méthodes fondées sur l'ADN.

48. Outre le problème de la contamination croisée examiné dans la section précédente, il est recommandé d'observer les directives de biosécurité nécessaires minimales (OMS, 2004).

## **Section 6.3 –Matériau de référence**

49. Un matériau de référence approprié est en général exigé pour la validation d'une méthode. Plusieurs matrices peuvent être utilisées pour élaborer des matériaux de référence ou des normes de travail pour les méthodes de détection [des séquences d'ADN et des protéines] [des aliments dérivés des biotechnologies modernes]. Chacune a ses propres avantages et inconvénients selon l'utilisation prévue. La présentation physique du matériau de référence détermine son utilisation pour une méthode donnée. En ce qui concerne les matériaux broyés, les différences dans la répartition granulométrique entre les matériaux de référence et les échantillons de routine peuvent avoir une incidence sur l'efficacité de l'extraction de la protéine ou de l'ADN cible et sur la reproductibilité de la méthode du fait d'erreurs d'échantillonnage.

50. Lorsqu'on analyse les séquences d'ADN spécifique du taxon et de la cible, il est recommandé d'utiliser un matériau de référence entièrement homozygote ou un matériau de référence, si possible certifié avec un niveau connu de zygosité. D'autres matériaux peuvent toutefois convenir selon le cas.

51. Les matériaux de référence pour les méthodes de détection des protéines peuvent être la protéine elle-même purifiée de microbes recombinant comme *E. coli*, une matrice de plante broyée (en général feuille ou grain), ou une fraction de l'aliment transformé.

52. Lorsque des matériaux de référence ne sont pas disponibles, on peut envisager de recourir à des matériaux de contrôle de qualité provenant de programmes d'essais d'aptitude ou de l'utilisation d'ADN plasmidique ou amplifié. En cas d'utilisation d'ADN plasmidique ou amplifié, l'ADN spécifique de la cible et/ou du taxon à incorporer dans le plasmide ou dans l'amplicon doit être choisi après un examen attentif afin d'assurer que l'ADN plasmidique ou amplifié est apte au but poursuivi.

## SECTION 7 – RÉFÉRENCES

Allmann M, Candrian U, Hoefelein C and Luethy J (1993). Polymerase Chain Reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. *Lebensm. Unters. Forsch* 196:248-251.

Anklam E, Gadani F, Heinze P, Pijnenburg H and Van den Eede G (2002). Analytical methods for Detection and Determination of Genetically Modified Organisms (GMO's) in Agricultural Crops and Plant-derived Food Products. *European Food Research and Technology* 214:3-26.

Asensio L (2007). Examen PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science & Technology* 18(11): 558-566.

Asensio L, Gonzalez I, Garcia T and Martin R (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 19:1-8.

Carnegie, PR (1994). Quality control in the food industries with DNA technologies. *Australas. Biotechnol.* 4(3):146-9.

Chapela MJ, Sotelo CG, Pérez-Martín RI, Pardo MA, Pérez-Villareal B, Gilardi P and Riese J (2007). Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification. *Food Control.* 18(10):1211-1215

Manuel de procédure de la Commission du Codex Alimentarius (Dix-septième édition). Utilisation des résultats analytiques: plans d'échantillonnage, rapports entre les résultats analytiques, l'incertitude de mesure, les facteurs de récupération et les dispositions dans les normes Codex.

CAC/GL 54-2004. Directives du Codex sur l'incertitude des mesures.

Colgan S, O'Brien LO, Maher M, Shilton N, McDonnell K and Ward S (2001). Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Research International* 34(5):409-414.

Dahinden I, von Büren M and Lüthy J (2001). A Quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. *European Food Research and Technology* 212(2):228-233.

Dieffenbach CW and Dveksler GS (1993). Setting up a PCR laboratory. *PCR Methods Appl.* 3(2):S2-7.

Norme ISO 5725-1996: Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes. Genève: Organisation internationale de normalisation

Norme ISO 21569:2005 Produits alimentaires -- Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés -- Méthodes qualitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques. Genève: Organisation internationale de normalisation.

Norme ISO 21570:2005 Produits alimentaires -- Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés -- Méthodes quantitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques. Genève: Organisation internationale de normalisation.

Norme ISO/DIS 24276:2006. Produits alimentaires -- Méthodes d'analyse basées sur l'utilisation des acides nucléiques pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés -- Exigences générales et définitions. Genève: Organisation internationale de normalisation

Norme ISO/IEC 17025:2005. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essai. Genève: Organisation internationale de normalisation.

- Grothaus GD, Bandla M, Currier T, Giroux R, Jenkins R, Lipp M, Shan G, Stave J., and V. Pantella (2007). Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International*. 85: 3, pp 780-786.
- Holst-Jensen A. and Berdal KG (2004). The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. *Journal of AOAC International* 87(4):927-36.
- Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.
- Kwok S and Higuchi R (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339(6221):237-238.
- Lipp M, Shillito R, Giroux R, Spiegelhalter F, Charlton S, Pinero D and Song P (2005) Polymerase Chain Reaction Technology as an analytical tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International* 88 (1):36-155.
- Meyer R, Candrian U (1996). PCR-based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 29(1-2):1-9.
- Mifflin TE (2007) Setting Up a PCR Laboratory. *Cold Spring Harbor Protocols* 14 (doi:10.1101/pdb.top14)
- Miraglia M, Berdal KG, Brera C, Corbisier P, Holst-Jensen A, Kok EJ, Marvin HJP, Schimmel H, Rentsch J, van Rie JPPF and Zagon J (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology* 42:1157-1180.
- Newton CR, Herbitter A and Gubler U (1995). PCR: Essential Data. Hoboken (NJ): J. Wiley & Sons.
- Olexova L, Dovičovičová L, Švec M, Siekel P, Kuchta T. (2006). Detection of gluten-containing cereals in flours and “gluten-free” bakery products by polymerase chain reaction. *Food Control* 17(3):234-237.
- Poms, RE; Klein CL, Anklam E (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.* 21(1):1-31.
- Trapmann S, Burns M, Broll H, Macarthur R, Wood RKS, Žel Jana (2009). Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories. *EUR - Scientific and technical research series*. Luxembourg: Office for official publications of the European communities.
- Turci M, Sardaro MLS, Visioli G, Maestri E, Marmiroli, M and Marmiroli N (2010). Evaluation of DNA extraction procedures for traceability of various tomato products. *Food Control*. 21(2):143-149.
- Williams R. (2005). Gene tests served up to tell fine foods from fakes. *Nature* 434:262.
- OMS (2004). Manuel de biosécurité en laboratoire, troisième édition. Genève: Organisation mondiale de la santé.
- Woolfe M and Primrose S (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in Biotechnology* 22(5):222-6.

## **APPENDICE I: INFORMATIONS EXIGÉES LORSQUE DES MÉTHODES DOIVENT ÊTRE EXAMINÉES EN VUE DE LEUR UTILISATION**

### **DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**

1. Une description complète et détaillée de toutes les composantes de la méthode devra être fournie. L'utilisation de plaques multiples pour les méthodes fondées sur la PCR ou sur les protéines, par exemple, devra être traitée de manière explicite. La description inclura aussi des informations sur le champ d'application de la méthode et l'unité de mesure sera clairement indiquée, ainsi que ce qui suit:

#### ***Objectif et pertinence de la méthode***

2. L'objectif de la méthode devra être indiqué. La méthode devra être apte à l'usage prévu.

#### ***Fondement scientifique***

3. Les grandes lignes des principes scientifiques sur lesquels la méthode est fondée (par ex., la biologie moléculaire sur laquelle repose l'utilisation d'une méthode PCR en temps réel) devront être présentées.

#### ***Spécification du modèle prédictif ou du modèle mathématique requis pour la méthode***

4. Les techniques fondées sur l'ADN ou sur les protéines utilisées pour détecter et quantifier [les séquences d'ADN et les protéines] [les aliments dérivés des biotechnologies modernes] reposent sur différents principes. Dans les méthodes PCR, l'ADN cible est amplifié de manière exponentielle, c'est-à-dire qu'une petite différence au début du processus PCR entraînera une grosse différence dans la quantité d'ADN amplifié après 35 à 45 cycles. De plus, l'analyse quantitative par PCR en temps réel repose souvent sur deux systèmes PCR indépendants: un pour l'ADN cible et un autre pour la séquence du taxon spécifique. Contrairement à la PCR, les essais de détection immunologique ne comportent pas de cycles multiples dans lesquels le produit de l'étape d'amplification antérieure est lui-même amplifié.

5. Si le calcul des résultats s'appuie sur une relation mathématique, cette dernière doit être décrite et indiquée (par ex., méthode  $\Delta\Delta C_t$ , ou une droite de régression ou une courbe de calibrage obtenue par d'autres moyens). Des instructions permettant une application correcte du modèle devront être fournies. Il pourra s'agir, selon la méthode, d'un nombre et d'une fourchette recommandés des niveaux à analyser, du nombre minimal de répliques et/ou de dilutions à inclure pour les analyses de routine ou les moyennes et intervalles de confiance pour évaluer la qualité de l'ajustement

### **INFORMATIONS SPÉCIFIQUES REQUISES POUR LES MÉTHODES FONDÉES SUR L'ADN**

6. Les autres informations énumérées ci-après devront être fournies pour les procédures fondées sur l'ADN, en particulier:

- ***Longueur de l'amplicon***

7. La transformation des aliments entraîne en général une dégradation de l'ADN cible. La longueur du produit amplifié peut avoir une incidence sur la performance de la PCR. La sélection d'amplicons de plus petite taille (dans des limites raisonnables) augmentera la possibilité d'obtenir un signal positif dans l'analyse des produits alimentaires ayant subi une forte transformation. En général, la longueur du fragment amplifié pour la séquence spécifique du taxon et la séquence cible devrait se situer dans la même fourchette.

- ***si la méthode est spécifique d'un instrument ou d'une substance chimique***

8. Plusieurs instruments ou substances chimiques en temps réel sont à l'heure actuelle disponibles. Ces instruments et substances chimiques peuvent avoir des performances différentes comme la stabilité des réactifs, les caractéristiques de chauffage et de refroidissement, qui ont une incidence sur la vitesse de montée et sur le temps requis pour un essai PCR complet.

9. Outre les différences dans le système de chauffage et de refroidissement, il existe des différences dans la technique et le logiciel utilisés pour induire et ensuite enregistrer la fluorescence. Certains instruments en temps réel utilisent la technique du laser pour induire la fluorescence, d'autres sont équipés uniquement d'une lampe et de filtres pour sélectionner une longueur d'onde spécifique. La détection et la quantification de la fluorescence pourraient aussi varier selon les instruments d'enregistrement et le logiciel utilisés.

10. Les méthodes qualitatives peuvent employer, par exemple, un système à base de gel pour interpréter les résultats. En outre, les méthodes qualitatives tendent en général à être moins spécifiques à un instrument que les méthodes quantitatives.

11. Compte tenu de toutes les différences, il n'est pas approprié de changer l'instrument sans adaptation de la méthode PCR. Les méthodes étant en général tributaires des instruments et des chimies, elles ne peuvent donc pas être transférées à d'autres matériels et substances chimiques sans évaluation et/ou modification.

12. La situation est analogue sous de nombreux aspects à la méthode du Codex de type I et devrait être examinée sous le même angle.

- ***si des amplifications PCR de type uniplexe ou multiplexe sont effectuées***

13. On entend par PCR multiplexe l'utilisation de plusieurs amorces fixées dans une réaction unique. L'utilisation d'une telle approche a pour objectif de réduire les coûts et la durée de l'analyse de cibles différentes dans un échantillon unique.

14. Les informations fournies devront montrer la robustesse de la méthode aux fins de la transférabilité interlaboratoires. Cela signifie que la méthode aura été testée par au moins un autre laboratoire outre celui qui en est l'auteur. Il s'agit d'une condition préalable pour que la validation de la méthode soit menée à bonne fin.

## **INFORMATIONS SPÉCIFIQUES EXIGÉES POUR LES MÉTHODES FONDÉES SUR LES PROTÉINES**

15. Les autres informations énumérées ci-après devront être fournies pour les procédures fondées sur Les protéines, en particulier:

### **Applicabilité de l'essai**

16. La transformation des aliments entraîne en général une dégradation ou une dénaturation de la protéine cible, ce qui peut se traduire par une modification importante de l'immuno-réactivité. L'applicabilité des immuno-essais aux produits transformés cibles devra être évaluée. Les résultats empiriques obtenus par l'essai de la méthode pour son applicabilité aux aliments transformés cibles devront être présentés.

### **Effet crochet**

17. Dans un essai sur plaque avec dispositif de flux latéral fondé sur un anticorps, un effet crochet (saturation) pourrait donner un résultat faux négatif. Il faudra démontrer de façon détaillée que la plage de mesure de concentration couvre largement les besoins pratiques des échantillons analytiques cibles. Les résultats empiriques obtenus par l'essai effectué pour déceler un éventuel effet crochet dans les matrices cibles devront donc être présentés.

### **Méthode de confirmation**

18. Pour un immuno-essai quantitatif, il peut y avoir réaction croisée entre les anticorps et d'autres protéines présentes dans la matrice; il est donc nécessaire de démontrer la crédibilité des essais. On peut utiliser une autre méthode comme CLHP, CPL-SM, transfert de Western ou essai biologique pour confirmer les résultats. Les résultats empiriques obtenus par les deux méthodes avec des aliquotes des mêmes échantillons d'analyse de concentration connue peuvent être présentés.

## **INFORMATION SUR L'OPTIMISATION DE LA MÉTHODE**

### ***Paires d'amorces***

19. Les méthodes générales doivent fournir les paires d'amorces définies et la séquence qu'elles ciblent ainsi que différentes amorces le cas échéant. Les recommandations relatives à l'efficacité et/ou l'utilisation des amorces doivent être clairement énoncées, y compris si les amorces sont aptes à la sélection et/ou la quantification.

### ***Essai de sélectivité***

20. La méthode doit préciser clairement l'utilisation de témoins négatifs appropriés, comme le matériau dérivé de plante ou d'animal, les différentes souche ou la séquence cible qui devront être utilisées à cette fin, si elles ont été définies.

21. Les résultats empiriques obtenus par l'essai de la méthode avec l'ADN d'espèces ou de variétés non cibles et l'ADN du matériau de l'espèce ou de la variété de référence devront être présentés. Cet essai devra comprendre des matériaux étroitement apparentés et des cas où les limites de sensibilité sont réellement testées. De plus, il peut être approprié, notamment pour l'ADN spécifique du taxon, de tester d'autres sources d'aliments semblables afin de réduire la possibilité d'obtenir un faux positif.

22. De même, pour les méthodes fondées sur les protéines, les résultats obtenus par l'essai de la méthode avec des protéines d'espèces/variétés/caractères non cibles et étroitement pertinents et la protéine cible purifiée et/ou des matériaux témoins positifs de référence devront être présentés.

### ***Essai de stabilité***

23. Les résultats empiriques obtenus par l'essai des méthodes (pour détecter les séquences d'ADN de référence et d'ADN cible, ou les protéines) avec des variétés différentes, selon qu'il convient, peuvent être fournis afin de montrer, par exemple, la stabilité de la conservation du nombre de copies et de la séquence de l'ADN du gène spécifique du taxon de référence, ou la stabilité de l'expression de la protéine.

24. Pour les méthodes fondées sur les protéines, les résultats obtenus par l'essai des méthodes avec le matériau cible et ses produits dérivés et/ou transformés, selon qu'il convient, devront être présentés afin de démontrer la stabilité de la forme immunoréactive de la protéine.

### ***Essai de sensibilité***

25. Les résultats pratiques obtenus par l'essai de la méthode à différentes concentrations afin de tester sa sensibilité devront être fournis. Les résultats empiriques obtenus par l'essai de la méthode à différentes concentrations afin de tester sa sensibilité devront être fournis. Les limites de détection doivent être définies à l'aide d'échantillons comprenant seulement des ingrédients uniques. Pour les produits alimentaires comprenant de multiples ingrédients, la sensibilité réelle sera réduite, car la totalité de l'ADN extrait sera calculée à partir de plusieurs ingrédients ce qui fait que le montant de départ du mesurande réel sera diminué. Cet effet de dilution sera fonction de la quantité relative d'ADN spécifique du taxon (par exemple, ADN dérivé de soja) présente dans l'ADN total après extraction du produit alimentaire. Certains ingrédients apporteront une grande quantité d'ADN, comme la farine de blé ou de maïs et les œufs, alors que d'autres n'en produiront pas, comme le sucre raffiné, l'eau pure ou les huiles très traitées.

26. La limite de détection devra être déterminée pour chaque méthode séparément.

27. Dans le cas des analyses fondées sur les protéines, la limite de détection devra être déterminée conformément aux procédures établies pour les immunoanalyses de chaque matrice.

### ***Essai de robustesse***

28. Les résultats empiriques obtenus par l'essai de la méthode en fonction de variations faibles mais délibérées de paramètres de la méthode devront être fournis.

### ***Réactivité croisée***

29. La réactivité croisée, les interférences et les effets de matrice devront être évalués.

### ***Efficacité de l'extraction***

30. Les résultats empiriques obtenus par l'essai de la méthode fondée sur les protéines pour l'efficacité de son extraction dans chaque matrice devront être présentés pour démontrer que l'extraction est suffisante et reproductible. Pour la détection quantitative, il peut être nécessaire de fournir la méthode de calibrage pour l'extraction incomplète.

## **APPLICATION PRATIQUE DE LA MÉTHODE**

### ***Applicabilité:***

31. La matrice (par ex., aliment transformé, matières brutes, etc.), le type d'échantillons (par ex., semences, farine, pizza, biscuits, etc.) et la fourchette dans laquelle la méthode peut s'appliquer devront être indiquées. Les limites pertinentes de la méthode devront aussi être traitées (par ex., inférence par d'autres analytes ou inapplicabilité à certaines situations). Les limites peuvent aussi inclure, autant que possible, les éventuelles restrictions dues aux coûts, au matériel ou aux risques spécifiques ou non spécifiques pour l'opérateur et/ou pour l'environnement.

### ***Caractéristiques opérationnelles et possibilité d'application pratique de la méthode***

32. Le matériel nécessaire pour l'application de la méthode devra être énoncé clairement, en ce qui concerne l'analyse elle-même et la préparation des échantillons. Des renseignements sur les coûts, les difficultés d'ordre pratique et tout autre facteur qui pourrait être important pour les opérateurs devront aussi être présentés.

### ***Concept expérimental***

33. Le concept expérimental, avec des détails sur le nombre d'essais, d'échantillons, de répétitions, de dilutions etc. devra être décrit.

### ***Compétences requises de la part de l'opérateur***

34. Une description des compétences pratiques nécessaires pour appliquer comme il convient la méthode proposée devra être fournie.

## **CONTRÔLES ANALYTIQUES**

35. L'utilisation correcte des contrôles durant l'application de la méthode devra, le cas échéant, être indiquée. Les contrôles devront être clairement spécifiés et leur interprétation consignée. Ils peuvent inclure des contrôles positifs ou négatifs, leur contenu détaillé, dans quelle mesure ils doivent être utilisés et l'interprétation des valeurs obtenues.

36. Il faudra indiquer notamment ce qui suit:

- Types de contrôles analytiques utilisés:
  - i. Contrôles positifs et négatifs
  - ii. Contrôle interne le cas échéant (compétitif ou non compétitif).
  - iii. Autres types de contrôle comme contrôle de la matrice (pour confirmer que l'échantillon a été ajouté à la PCR) ou opérations d'extraction.



- Échantillons témoins.
- Matériaux de référence utilisés.

## **VALIDATION/PERFORMANCE DE LA MÉTHODE**

37. Voir la liste de vérification du Codex (c'est-à-dire, exactitude, applicabilité (matrice, fourchette de concentration et préférence accordée aux méthodes « générales »), limite de détection, limite de quantification, fidélité, récupération, sélectivité, sensibilité, efficacité de l'extraction et parallélisme/linéarité) et une évaluation que la méthode est apte au but poursuivi.

## **APPENDICE II: DÉFINITIONS APPLICABLES À L'ANALYSE DES [SÉQUENCES D'ADN ET PROTÉINES] [ALIMENTS DÉRIVÉS DES BIOTECHNOLOGIES MODERNES]**

### **Exactitude**

L'exactitude est définie comme l'étroitesse de l'accord entre un résultat d'essai ou le résultat mesuré et la valeur vraie. Dans la pratique, la valeur de référence acceptée est substituée à la valeur vraie. Le terme exactitude, lorsqu'il s'applique à une série de résultats d'essais et de résultats de mesure, implique une combinaison de composantes aléatoires et une composante d'erreur systématique courante ou de biais.

### **Essai**

Opération technique qui consiste à déterminer une ou plusieurs caractéristiques d'un produit, d'un processus ou d'un service en se conformant à une procédure particulière.

### **Applicabilité**

Les analytes, matrices et concentrations pour lesquels une méthode d'analyse peut être utilisée<sup>3</sup>.

Les analytes, matrices et concentrations devraient être appropriées aux fins du contrôle pour lequel la méthode est proposée. La description peut aussi inclure des avertissements concernant des interférences connues provenant d'autres analytes, ou l'inapplicabilité à certaines matrices ou situations.

### **Authentification**

Confirmation de l'origine biologique du matériau d'essai.

### **Fourchette dynamique – fourchette de quantification**

L'intervalle de concentration dans lequel il a été démontré par un essai collaboratif que la procédure d'analyse offre un niveau de fidélité et de justesse approprié.

### **Identification**

Série d'opérations ayant pour but de décider si l'objet est bien celui qui est spécifié.

### **Limite de détection (LOD)**

La limite de détection est la concentration ou la teneur en analytes la plus faible qui puisse être détectée, mais pas nécessairement quantifiée, comme démontrée par un essai collaboratif ou la validation par un laboratoire unique. Autrement elle peut être tirée de la dernière valeur obtenue avec des données fiables utilisées pour déterminer la limite de détection. Cette dernière est généralement exprimée comme le montant d'analyte auquel la méthode d'analyse décèle la présence de l'analyte dans au moins 95 pour cent des cas ( $\leq 5$  pour cent de résultats faux négatifs).

### **Limite de quantification (LOQ)**

La limite de quantification d'une procédure d'analyse est la quantité ou la concentration la plus faible d'analyte dans un échantillon, qui peut être déterminée de manière quantitative avec un niveau acceptable de fidélité et de justesse, comme démontré de manière satisfaisante par un essai collaboratif ou une validation par un laboratoire unique<sup>4 5</sup>. Autrement elle peut être tirée de la dernière valeur obtenue avec des données fiables utilisées pour déterminer la limite de quantification.

### **Linéarité**

Aptitude d'un essai à fournir des résultats (dans une gamme donnée) qui varient dans une mesure proportionnelle aux modifications apportées dans la concentration (quantité) de l'analyte dans l'échantillon, ou par une transformation mathématique bien définie.

---

<sup>3</sup> Légèrement modifié par rapport à la définition fournie dans le document du Codex portant la cote CX/MAS 02/4: Avant-projet de lignes directrices pour évaluer les méthodes d'analyse acceptables. Version novembre 2002.

<sup>4</sup> Par exemple: Thompson et al. 2002. IUPAC Technical Report: Harmonised guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. Pure Appl. Chem. 74(5): 835-855.

<sup>5</sup> Légèrement modifié par rapport à EN/ISO 24276:2006 (E).

## **Praticabilité**

Facilité des opérations, sur le plan du débit et du coût des échantillons, pour réaliser les critères de performance définis et donc atteindre le but spécifique<sup>6</sup>.

De façon générale, la méthode devrait être facile à appliquer pour les fins prévues.

## **Fidélité**

Étroitesse de l'accord entre des résultats d'essai/de mesure indépendants obtenus sous des conditions stipulées.

## **Matériau de référence**

Matériau ou substance dont les valeurs d'une ou de plusieurs propriétés sont suffisamment homogènes et bien connues pour permettre de les utiliser pour l'étalonnage d'un appareil, pour évaluer une méthode de mesure ou attribuer une valeur à d'autres matériaux.

## **Écart-type de répétabilité (RSD<sub>r</sub>)**

L'écart-type des résultats d'essais obtenus dans des conditions de répétabilité. Il s'agit des conditions dans lesquelles des résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des matériaux identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même équipement dans un court intervalle de temps<sup>7</sup>.

## **Écart-type de reproductibilité (RSD<sub>R</sub>)**

L'écart-type des résultats d'essais obtenus dans des conditions de reproductibilité. Il s'agit des conditions dans lesquelles des résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des matériaux identiques dans différents laboratoires, par différents opérateurs utilisant un équipement différent<sup>8</sup>.

## **Récupération**

C'est la partie de la quantité d'analyte, présent ou ajouté à la portion analysée du matériau d'essai, qui est extraite et présentée pour la mesure.

## **Robustesse**

La robustesse se rapporte aux variations de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans différents laboratoires par différents « techniciens ». Les termes utilisés ici sont tirés des directives harmonisées. La robustesse devrait être démontrée par la validation de la méthode dans 8 à 12 laboratoires, comme défini dans les directives harmonisées. Il est préférable, du point de vue du Codex, que ces laboratoires soient répartis sur plusieurs continents ou blocs commerciaux.

La robustesse d'une méthode d'analyse est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode; elle donne une indication de sa fiabilité durant une utilisation normale<sup>9</sup>.

## **Sensibilité**

La sensibilité d'une méthode est une mesure de l'amplitude de la réponse causée par une certaine quantité d'analyte.

La méthode devrait être suffisamment sensible pour pouvoir déceler/quantifier par rapport aux seuils établis par la législation pertinente.

La sensibilité étant fonction de la méthode et de l'objectif, elle devrait être spécifiée dans le protocole. Un but raisonnable de sensibilité est celui qui permet de respecter les teneurs précisées dans les contrats, avec une certitude raisonnable que la teneur ne dépasse pas la limite requise.

---

<sup>6</sup> Repris de EN/ISO 24276:2006 (E).

<sup>7</sup> Définitions reprises de ISO 3534-1.

<sup>8</sup> Définitions reprises de ISO 3534-1

<sup>9</sup> Définitions reprises du thème Q 2 A de ICH «Validation de méthodes analytiques: définitions et terminologie» Agence européenne d'évaluation des produits médicaux . CPMP/ICH/381/95. Version novembre 1994.

<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/038195en.pdf>

Le terme sensibilité est utilisé de deux façons différentes: limite de détection et réponse de l'instrument. Il est préférable d'utiliser « limite de détection » pour la mesure de l'aptitude d'une méthode à détecter une petite quantité d'analyte. Voir aussi les observations précédentes concernant la sensibilité dans le présent document.

### **Sélectivité**

Propriété d'une méthode à répondre exclusivement à la caractéristique ou à l'analyte concerné.

### **Justesse**

Étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'un nombre infini de valeurs de quantités mesurées de répétitions et une valeur de quantité de référence.

*Note: La mesure de la justesse est habituellement exprimée en termes de biais ou de rapport entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs de quantités mesurées de répétitions et une valeur de quantité de référence dans ce secteur analytique.*

*La justesse a aussi été appelée « exactitude de la moyenne ». Cet usage n'est pas recommandé.*

*Dans la pratique, la valeur de référence acceptée est substituée à la valeur vraie.*

*L'espérance mathématique est la valeur prévue d'une variable aléatoire, par exemple une valeur attribuée ou une moyenne à long terme (ISO 5725-1).*

### **Incertitude**

Paramètre associé au résultat d'un mesurage, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement lui être attribuées en mesurant la grandeur.

## **APPENDICE III: VALIDATION D'UNE MÉTHODE PCR QUANTITATIVE**

### **INTRODUCTION**

1. L'analyse fondée sur l'ADN est en général effectuée par amplification en chaîne par polymérase (PCR). Cette technique amplifie un segment spécifique (court) d'ADN jusqu'au point où sa quantité peut être mesurée par un instrument (par exemple, par des moyens fluorométriques), cas dans lequel il sera nécessaire de spécifier la longueur minimale du segment à mesurer. Les opérations de transformation des aliments (par exemple, par la chaleur, les enzymes ou le cisaillement mécanique) peuvent entraîner une dégradation ou une réduction de la quantité totale d'ADN. Il sera préférable de concevoir des méthodes permettant d'amplifier des séquences d'ADN spécifiques de la cible ou du taxon relativement courtes.

2. Il arrive souvent que les résultats d'une détermination soient exprimés en pourcentage d'une séquence d'ADN spécifique de la cible par rapport à une séquence d'ADN spécifique du taxon. Dans un essai quantitatif, cette mesure implique en réalité deux déterminations fondées sur la PCR – celle de la séquence d'ADN spécifique de la cible (par exemple, une séquence d'ADN provenant d'une autre espèce) et celle de la séquence endogène ou spécifique du taxon (par exemple, une séquence d'un gène de maïs endogène). Chacune de ces déterminations a ses propres incertitudes, et vraisemblablement des caractéristiques de mesure différentes. Dans la plupart des applications, la séquence d'ADN cible sera présente à de faibles concentrations, et la séquence d'ADN spécifique du taxon sera présente à des concentrations 10 à 1000 fois supérieures. Il est donc important que les deux mesures soient correctement validées. Dans les cas où la mesure est exprimée directement en pourcentage, ces facteurs doivent être pris en compte dans la validation de la méthode. Les résultats peuvent être indiqués dans d'autres unités de mesure comme les nombres de copies.

3. En conséquence, l'analyse de l'ADN, en particulier dans les aliments transformés, cherche à détecter une très petite quantité d'ADN spécifique de la cible, souvent de l'ordre du nanogramme/gramme ou moins. Le résultat d'une analyse PCR quantitative est souvent exprimé en pourcentage comme la quantité relative de l'ADN cible par rapport à la quantité totale d'ADN du taxon de référence/de l'espèce dans une matrice alimentaire spécifique. La matrice alimentaire peut aussi contenir des quantités importantes d'ADN provenant d'un grand nombre d'autres espèces/taxons.

4. La validation des méthodes comporte deux phases. La première est une validation interne de tous les paramètres énoncés ci-dessus à l'exception de la reproductibilité. La seconde est un essai collaboratif, dont le principal produit est une mesure de la répétabilité et de la reproductibilité en même temps que des renseignements détaillés sur la transférabilité des méthodes entre les laboratoires. Il est fortement recommandé d'effectuer un essai collaboratif à petite échelle afin de vérifier la robustesse générale d'une méthode particulière avant de faire la dépense d'un essai à grande échelle. Lorsqu'il s'avère nécessaire d'améliorer une méthode ou sa description, l'essai préalable n'entraîne que des dépenses limitées alors que l'échec d'une validation complète interlaboratoires dû à une description ambiguë est très coûteux. Par ailleurs, il convient d'indiquer que l'application d'une méthode déjà validée dans un laboratoire doit inclure les expériences nécessaires pour confirmer que la méthode en question donne les mêmes résultats dans les conditions locales que lors de la validation interlaboratoires. Il importe de noter qu'une méthode devrait être validée en utilisant les conditions dans lesquelles elle sera appliquée.

### **VALIDATION**

5. Un essai PCR quantitatif devrait être validé pour l'utilisation ou l'application prévue. La norme ISO 5725:1996 ou le Protocole harmonisé AOAC/UIPAC ont été élaborés pour les méthodes d'analyse chimique. Ils définissent les procédures requises pour valider une méthode. Il importe de souligner que tous les principes et règles du protocole harmonisé s'appliquent aux méthodes PCR quantitatives.

6. Plusieurs paramètres concernant la validation de la performance d'un essai PCR quantitatif seront examinés en détail. Il s'agit du champ d'application, des limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ), de la justesse, de la fidélité, de la sensibilité et de la robustesse. Les autres facteurs importants sont les critères d'acceptation et l'interprétation des résultats, ainsi que les unités dans lesquelles sont exprimés les résultats.

7. *Remarques: L'interprétation des valeurs en pourcentage fait l'objet d'une discussion scientifique générale. Il est jusqu'ici admis qu'il n'existe pas de relation fiable entre le poids et le nombre de copies en raison de l'incertitude de la corrélation entre le poids des ingrédients et le nombre de molécules d'ADN. Les calculs poids/poids et nombre de copies/nombre de copies sont acceptables à condition de les mentionner clairement au moment de donner les résultats.*

8. Tous les paramètres énumérés ci-après, notamment la sélectivité et la sensibilité, doivent être évalués individuellement pour chacun des essais concernés, y compris les réactions PCR spécifiques de la référence et de la cible. L'ordre dans lequel ils sont énumérés ne reflète pas nécessairement leur ordre d'importance.

### **Justesse**

9. Comme pour toute méthode, la justesse d'une méthode doit être déterminée en comparant les résultats obtenus par l'analyse d'un matériau de référence avec la valeur connue ou assignée du matériau de référence. Il conviendra de prendre en compte l'incidence des effets de la matrice de l'échantillon, en particulier lorsque celle-ci diffère de celle du matériau de référence.

10. *Recommandation: la justesse devrait être  $\pm 25$  pour cent de la valeur de référence acceptée dans toute la fourchette dynamique. Cela concerne l'étape de la PCR sous réserve que l'approche modulaire ait été appliquée.*

### **Applicabilité**

11. Les analytes, matrices et concentrations pour lesquels une méthode d'analyse peut être utilisée devraient être indiqués.

12. À titre d'exemple, il est demandé qu'une méthode d'extraction, indépendamment de la matrice à laquelle elle doit être appliquée, produise de l'ADN ou des protéines dont la quantité, l'intégrité structurelle et la pureté sont suffisantes pour permettre une évaluation appropriée de la performance des étapes ultérieures de la méthode à effectuer (par exemple, amplification adéquate de l'ADN durant l'étape PCR, détection des protéines) (par exemple, Chapela et al. 2007; Turci et al. 2009).

13. Dans l'analyse PCR en temps réel, les valeurs Ct peuvent être utilisées pour estimer l'efficacité de la PCR. Pour s'en assurer, on peut par exemple établir des séries de dilution de l'ADN matrice et déterminer pour chaque dilution la valeur Ct (Le nombre limite de cycles auquel le signal de fluorescence mesuré traverse une valeur limite définie par l'utilisateur entre les dilutions). Dans l'idéal, lorsque l'efficacité de l'amplification est de 100 pour cent, une double réduction de la quantité d'ADN cible ajoutée à la PCR entraînera une augmentation de la valeur Ct de un. Il s'ensuit que si l'ADN est dilué 10 fois, la différence théorique des Ct entre l'ADN dilué et non dilué devrait être approximativement de 3,32. Ces chiffres sont théoriques et peuvent ne pas être obtenus dans des situations réelles. Des écarts significatifs par rapport à cette relation peuvent indiquer que l'ADN extrait contient des inhibiteurs de PCR, que la solution d'ADN n'est pas homogène ou que la quantité d'ADN est si faible que la variation stochastique de la quantité d'ADN dans les réactions produit des estimations quantitatives non fiables (Cankar et al. 2006). Cela est aussi le cas pour les réactions PCR en point final effectuées en utilisant des sondes fluorescentes.

### **Fourchette dynamique – Fourchette de quantification**

14. Le champ d'application des méthodes définit la fourchette de concentration dans laquelle l'analyte sera déterminé de façon fiable. La quantité relative d'ADN spécifique du taxon par rapport à l'ADN total dans un extrait d'ADN variera, selon que l'ADN provient d'un ingrédient unique ou d'une matrice alimentaire complexe. Cette fourchette de concentration souhaitée définit les courbes d'étalonnage et un nombre suffisant d'étalons doit être utilisé, le cas échéant par exemple avec des courbes de calibrage, afin de définir de façon adéquate la relation entre la concentration et la réponse. Cette relation devrait être démontrée comme étant continue, reproductible et devrait être linéaire après transformation appropriée.

15. La fourchette d'une méthode quantitative spécifique de la cible est en principe conçue pour se situer entre près de zéro et 100 pour cent concernant l'ADN spécifique du taxon (poids/poids). Il est toutefois

courant de valider une méthode pour une fourchette de concentrations correspondant à la portée de l'application. Si une méthode est validée pour une fourchette de valeurs donnée, la fourchette ne peut pas être étendue sans une nouvelle validation. Pour certaines applications (par exemple, l'analyse de grains ou d'aliments), on peut envisager d'utiliser l'ADN génomique pour la préparation de la courbe d'étalonnage (voir plus loin l'examen de l'utilisation de l'ADN plasmidique). S'il est facile d'établir un étalon 100 pour cent nominal, il est difficile de produire de manière fiable des solutions-étalons en dessous de 0,1 pour cent. De plus, le nombre de sites cibles (séquences d'ADN à amplifier) devient si petit que les erreurs stochastiques commenceront à dominer et l'analyse risque d'être moins fiable (Huebner *et al.*, 2001; Horwitz, 1995; Kay & Van den Eede, 2001).

16. Si l'on choisit d'utiliser l'ADN comme calibrateur, il importe de le retracer (au sens métrologique) jusqu'à une référence d'un ordre métrologique plus élevé, par exemple un matériau de référence certifié. La fourchette sera établie en confirmant que la procédure PCR fournit un degré acceptable de linéarité et de justesse lorsqu'elle est appliquée à des échantillons contenant des quantités d'analyte se situant dans ou aux extrémités de la fourchette spécifiée de la procédure.

17. Les caractéristiques uniques de la PCR quantitative imposent des restrictions particulières sur l'extrémité basse de la fourchette dynamique d'une PCR quantitative. Il est en effet difficile de déterminer les valeurs de la LOD et de la LOQ du fait de la distribution non normale des variances dans les valeurs de cette fourchette.

### **Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)**

18. Lorsque la validation d'un essai PCR quantitatif montre que l'essai peut mesurer [l'ADN] [des aliments dérivés des biotechnologies modernes] à (par exemple) 0,1 pour cent avec une justesse et une fidélité acceptables, il est souvent inutile de déterminer la LOD et la LOQ, car la méthode n'est appliquée qu'au-dessus de la fourchette où elles sont pertinentes. Toutefois, si la méthode est utilisée à des concentrations proches de la LOD et de la LOQ (en général, entre 0,01 et 0,05 pour cent) l'évaluation de ces limites (LOD et LOQ) doit faire partie de la procédure de validation.

19. Il convient de noter qu'il n'est pas toujours nécessaire de fixer la LOD et la LOQ pour établir la validité d'une méthode pour une application donnée. Par exemple, cela n'apporte pas grand-chose si l'on établit que la limite de détermination est de 1ng/kg, tandis que la validation de la méthode ne porte que sur des concentrations de l'ordre du g/kg. Dans un cas de ce genre, la fiabilité de la méthode sera prouvée par d'autres paramètres et aucune action ne sera prévue dans la validation de la méthode pour évaluer la LOD. Cependant, la LOQ sera toujours fixée et incluse dans l'étude de validation.

20. Si la LOD est nécessaire, on suppose en général qu'il s'agit de la force du signal d'un blanc augmenté de trois fois l'écart-type du blanc. Cependant, cette méthode fournit au mieux une estimation, peut s'appuyer sur une distribution gaussienne normale des mesures du blanc autour de zéro, et peut donner une valeur inférieure à la LOD réelle. Son utilisation n'est pas valable dans les méthodes comme la PCR quantitative, dans lesquelles la distribution des valeurs de mesure pour les blancs est en général tronquée à zéro et n'est donc pas distribuée normalement. Ainsi, la LOD doit être déterminée expérimentalement, à moins que les concentrations visées ne dépassent largement la LOD, dans ce cas celle-ci n'a plus d'importance. Pour les méthodes quantitatives, la LOD est la quantité d'analyte à laquelle la méthode d'analyse détecte la présence de l'analyte dans au moins 95 pour cent des cas ( $\leq 5$  pour cent de résultats faux négatifs). Avec le taux de faux positifs, ce sont les seuls paramètres autres que la sélectivité et la répétabilité requis pour une méthode qualitative.

21. Pour une méthode quantitative, il importe de savoir si la LOQ pour une matrice particulière est proche des valeurs à mesurer. La LOQ doit être déterminée expérimentalement étant donné que la mesure de la distribution pour la PCR quantitative n'est pas normalement distribuée. En utilisant l'approche classique, la LOQ peut être exprimée comme la force du signal d'un blanc égale à la LOD augmentée de 6 à 10 fois l'écart-type du blanc, à moins que l'on sache par d'autres sources que les valeurs mesurées sont tellement supérieures à la LOQ qu'il devient inutile de la connaître. Toutefois, cette méthode de détermination ne fournit qu'une estimation de la LOQ réelle qui peut être une approximation artificiellement élevée ou basse.

22. Dans la pratique, deux procédures ont été utilisées pour déterminer la LOQ. La première consiste à doser un certain nombre d'échantillons conventionnels auxquels on a ajouté des quantités connues d'analyte. La

LOQ est alors la teneur à laquelle la variabilité du résultat est conforme à certains critères préétablis (comme +/- 2 écarts-type à partir du point de données d'étalonnage le plus bas, etc.). L'extraction de l'ADN peut toutefois s'avérer difficile pour certaines matrices, par exemple, les amidons ou le ketchup, et il faudra dans certains cas accepter des efficacités d'extraction inférieures. Lorsque ces dernières sont basses, il faudra l'indiquer dans les données de validation et dans le rapport d'analyse. Une procédure plus complète consiste à tester la méthode en utilisant des échantillons qui contiennent des quantités connues d'analyte. Cette procédure est plus compliquée car elle nécessite d'avoir accès à des quantités importantes de matériaux de référence contenant une fourchette connue de concentrations [de séquences d'ADN ou de protéines] [d'aliments dérivés des biotechnologies modernes].

### **Praticabilité**

23. Il y a lieu de démontrer la praticabilité de la méthode.

### **Écart-type de répétabilité (RSD<sub>r</sub>)**

24. *Recommandation: L'écart-type de répétabilité relatif devrait être  $\leq 25$  pour cent ou le plus près possible dans toute la fourchette dynamique de la méthode.*

### **Écart-type de reproductibilité (RSD<sub>R</sub>)**

25. *Recommandation: L'écart-type de reproductibilité relatif devrait être inférieur à 35 pour cent ou aussi près que possible de la concentration cible et supérieur à la majorité de la fourchette dynamique.  $RSD_R \leq 50$  pour cent ou aussi près que possible de l'extrémité inférieure de la limite de quantification.*

### **Robustesse**

26. L'évaluation de la robustesse démontre la fiabilité d'une méthode en présence d'une variation involontaire des paramètres d'un essai. Les variations qui peuvent être incluses sont les volumes de réaction (par exemple, 29 vs. 30  $\mu$ l), la température d'anneauage (par exemple, +/- 1°C) et/ou d'autres variations pertinentes. Les expériences doivent être effectuées au moins en triplicats. La réponse d'un essai en présence de ces petits changements ne devrait pas s'écarter de plus de  $\pm 35$  pour cent dans les expériences de reproductibilité par rapport à la réponse obtenue dans les conditions originales.

27. Le caractère approprié de l'essai de robustesse doit être démontré pour chaque méthode. Par exemple, pour une méthode PCR en temps réel, les facteurs suivants et leur origine / source devraient en principe être pris en compte: différents modèles de thermocycleur, ADN polymérase, uracyl-n-glycosylase, concentration de chlorure de magnésium, concentration directe et inversée de l'amorce, concentration de la sonde, profil de température, profil de la durée, concentrations de dNTP (y compris de dUTP, le cas échéant).

### **Sensibilité**

28. Pour une méthode PCR quantitative, on devrait obtenir dans toute la fourchette de la méthode une fonction linéaire de Ct en tant que fonction du logarithme de la concentration de la cible. Le coefficient de corrélation, le point d'intersection y et la pente de la droite de régression devraient être indiqués. Le pourcentage de résidus pour chacun des calibrateurs devrait de préférence être  $\leq 30$  pour cent.

29. On indiquera, outre les paramètres de la courbe, quelle fourchette des valeurs de la pente est acceptable afin de procéder à la quantification car elle est aussi importante que le calcul de l'efficacité de la réaction. (par exemple, -2,9 à -3,3 pour la détection de l'ADN ou les valeurs optimales correspondantes qui indiquent une efficacité de l'amplification proche de 100 pour cent).

30. Dans les cas où un laboratoire emploie la méthode  $\Delta$ CT au lieu d'une méthode quantitative reposant sur le calibrage, il appartiendra à l'analyste de garantir que la quantité totale d'ADN se situe bien dans la fourchette pour laquelle l'essai a été validé.



## Spécificité

31. La spécificité de la cible de l'analyse de l'ADN cible devrait être démontrée par des preuves expérimentales. Cette démonstration devrait comprendre des échantillons contenant l'ADN cible et des échantillons où les limites de détection (si elles se situent dans la fourchette dynamique) sont réellement vérifiées. Étant donné que la méthode devrait être spécifique à l'ADN cible, elle ne devrait donner un résultat positif qu'avec une matrice alimentaire contenant l'ADN cible.

32. Un essai spécifique d'un taxon ne devrait pas reconnaître de séquences correspondant à des espèces phylogénétiquement apparentées et devrait donner des valeurs Ct analogues, non différentes statistiquement, lorsqu'on amplifie des quantités égales d'ADN provenant de différentes variétés/différents cultivars d'origines très différentes du même taxon.

33. Un essai spécifique d'une espèce ne devrait pas reconnaître de séquences correspondant à des espèces étroitement apparentées et devrait donner des valeurs Ct analogues, non différentes statistiquement, lorsqu'on amplifie des quantités égales d'ADN provenant de différentes variétés/différents cultivars d'origines très différentes de la même espèce.

34. L'adéquation de l'essai doit être analysée pour chaque méthode.

35. La conception des amorces et de la sonde est le point de départ d'une méthode. Les amorces et les sondes devraient être confrontées à la séquence connue de la cible que l'essai doit détecter et aux bases de données des séquences pertinentes pour d'éventuelles homologues ou par rapport à des organismes cibles connus/séquences de pathogènes. Après une telle évaluation théorique de la spécificité de la cible, la sélectivité doit être démontrée de manière expérimentale.

36. Pour les essais spécifiques de l'ADN cible. Comme preuves expérimentales concernant la spécificité de l'ADN cible, il faudrait notamment:

- Analyser au moins dix échantillons provenant de différents lots d'aliments ou d'ingrédients exempts de séquences d'ADN cible, encore que les échantillons devraient contenir l'ADN spécifique du taxon. Tous ces essais devraient donner un résultat négatif. Par exemple, si l'ADN cible correspond à un événement de transformation d'une plante à ADN recombiné spécifique, des échantillons devraient être tirés d'autres événements de transformation (non-cible), ainsi que de plantes à ADN non recombiné appartenant à la même espèce végétale.
- Tester un échantillon provenant de chaque source (un nombre approprié d'échantillons d'ADN).
- Analyser deux répétitions pour chaque échantillon d'ADN, qui donnera des résultats dans les limites d'une valeur Ct de 0,5.

37. Les résultats des essais indiqueront clairement qu'aucun effet de chimie ou de lecture instrumentale n'a été observé.

38. Pour les essais sur des séquences d'ADN endogènes (spécifiques du taxon). Comme preuves expérimentales concernant la spécificité pour des essais endogènes ou spécifiques du taxon, il faudrait notamment:

- Analyser au moins dix échantillons provenant de différents lots d'aliments ou d'ingrédients issus d'organismes appartenant au taxon concerné, mais classés en différentes catégories de sous-taxons. Tous ces essais devraient donner un résultat positif. Par exemple, si l'on suppose que la spécificité du taxon correspond à une espèce végétale comme le maïs, les échantillons pourraient correspondre à des variétés de maïs d'origines génétiques différentes.
- Analyser au moins dix échantillons provenant de différents lots d'aliments ou d'ingrédients issus d'organismes appartenant au taxon concerné, qui peuvent être présents dans les matrices alimentaires pertinentes. Tous ces essais devraient donner un résultat négatif. Par exemple (et dans le sillage de l'exemple précédent), si les dix premiers essais étaient appliqués à différentes farines de maïs, dans le second groupe d'essais, il pourrait être approprié d'analyser la farine de blé/soja/riz.
- Tester un échantillon provenant de chaque source (un nombre approprié d'échantillons d'ADN).

- Analyser deux répétitions pour chaque échantillon d'ADN qui donnera des résultats dans les limites d'une valeur Ct de 0,5.

39. Les résultats des essais indiqueront clairement qu'aucun effet de chimie ou de lecture instrumentale n'a été observé.

### **RÉFÉRENCES POUR L'APPENDICE III**

AOAC (2002). International Methods Committee: Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis.

Cankar K, Štebih D, Dreo T, Žel J, Gruden K (2006). Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnol.* 6(37).

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

Huebner P, Waiblinger HU, Pietsch K and Brodmann P (2001). Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *Journal of AOAC International* 84(6):1855-1864.

Kay S and Van den Eede G (2001). The limits of GMO detection. *Nature Biotechnology* 19(5):504.

## **APPENDICE IV - CRITÈRES D'ACCEPTATION DU CONTRÔLE ANALYTIQUE, ESSAIS D'APTITUDE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS POUR DES MÉTHODES PCR QUANTITATIVES**

1. Une méthode validée inclut aussi des valeurs de critères permettant de présumer de la validité d'un résultat de mesure observé. Il importe de respecter ces critères et le système d'aide à la décision pour l'analyse et l'interprétation des données. Au cas où il serait souhaitable de s'écarter des dits critères et règles, il faudrait procéder à une nouvelle étude de validation de la méthode afin de démontrer la validité du nouveau système d'aide à la décision et des nouvelles procédures.

2. Au minimum, les critères d'acceptation suivants sont communs à toutes les méthodes PCR quantitatives et applicables à chaque cycle PCR:

- La moyenne des répétitions du contrôle positif de l'ADN cible, à une concentration pertinente, s'écarte de moins de 3 écarts-types par rapport à la valeur attribuée. Le cas échéant, un contrôle de l'ADN cible est défini comme un ADN de référence ou un ADN extrait d'un matériau de référence certifié ou connu pour être un échantillon positif représentatif de la séquence ou de l'organisme à l'étude. Le contrôle est destiné à démontrer ce que devrait être le résultat des analyses des échantillons d'essai contenant la séquence cible.
- Le contrôle du réactif d'amplification est  $\leq$ LOD. (Il faut donc toujours déterminer la limite de détection pour valider la méthode). Le contrôle du réactif d'amplification est défini comme étant le contrôle contenant tous les réactifs, excepté l'ADN matrice extrait de l'échantillon d'essai. Au lieu de l'ADN matrice, un volume correspondant d'eau exempte d'acide nucléique est ajouté à la réaction.
- Le pourcentage de résidus pour chacun des étalons devrait être  $\leq$ 30 pour cent ou s'en approcher autant que possible.

3. Pour accepter le résultat provenant d'un échantillon inconnu, l'écart-type relatif des répétitions de l'échantillon devrait être  $\leq$ 35 pour cent ou s'en approcher autant que possible.

4. Le processus d'amplification utilisé dans les déterminations PCR quantitatives démarre souvent avec un petit nombre de copies de l'ADN cible et le processus d'échantillonnage dans sa phase initiale, de même que la forme log-linéaire de la fonction d'étalonnage à l'étape PCR, conduit à un résultat asymétrique. Comme prévu, les résultats de l'étude suivent systématiquement une distribution désaxée vers la droite (Thompson et al., 2006). La transformation logarithmique avant de calculer les écarts réduits est efficace pour établir les distributions presque symétriques qui sont suffisamment proches de la normale pour justifier une interprétation sur la base de la distribution normale. Les conséquences pour les programmes d'essais d'aptitude sont présentées dans *RSC Analytical Methods Committee Technical Brief 18*.

### **RÉFÉRENCES POUR L'APPENDICE IV**

RSC Analytical Methods Committee Technical Brief 18 [En ligne].  
[http://www.rsc.org/images/brief18\\_tcm18-25962.pdf](http://www.rsc.org/images/brief18_tcm18-25962.pdf).

Thompson M, Ellison SR, Owen L, Mathieson K, Powell J, Wood R and Damant AP (2006). Scoring in Genetically Modified Organism Proficiency Tests Based on Log-Transformed Results. *Journal of AOAC International* 89(1): 232- 239.

## APPENDICE V: VALIDATION D'UNE MÉTHODE PCR QUALITATIVE

### Introduction

1. Une méthode PCR qualitative doit être validée autant que possible de la même façon qu'il est prévu de l'utiliser pour les analyses de routine – ce qui signifie qu'il doit être démontré que la sensibilité de la méthode est telle qu'elle permet détecter de manière fiable un échantillon positif et ne produit pas un nombre important de faux positifs. Un concept visant à utiliser des taux de faux-positifs et de faux-négatifs pour décrire l'exactitude et la fidélité d'un essai qualitatif a été élaboré pour les essais microbiens (AOAC 2002). Ce concept peut s'appliquer aux essais PCR qualitatifs. Un problème fondamental que pose la validation de ce type de méthode est la disponibilité de matériaux d'essai connus pour être positifs ou négatifs. La fourniture de matériaux de référence négatifs est particulièrement importante et déterminante dans le cas d'une méthode qualitative.

2. De par leur nature même, les résultats d'un essai qualitatif font référence à l'identification au-dessus ou au-dessous d'une limite de détection. Les mesures de la fidélité et de la justesse sont les fréquences des résultats faux négatifs et/ou faux positifs à la limite de détection. Les résultats faux négatifs indiquent l'absence d'un analyte donné lorsqu'en fait il est présent dans l'échantillon, alors que les résultats faux positifs indiquent la présence d'un analyte qui en réalité est absent de l'échantillon. Compte tenu de la nature même de la technique d'analyse, une augmentation des résultats faux négatifs sera observée lorsque la quantité d'analyte approche la limite de détection de la méthode. Comme pour les méthodes quantitatives, la limite de détection d'une méthode qualitative peut être définie comme la concentration à laquelle un échantillon positif donne un résultat positif dans au moins 95 pour cent des cas. Il en découle que le taux de résultats faux négatifs est au plus de 5 pour cent. Durant la validation d'un essai PCR qualitatif, il est également important de déterminer le nombre de résultats faux positifs (un résultat positif obtenu en utilisant un échantillon que l'on sait être négatif). Ces résultats peuvent aussi s'exprimer en taux ou pourcentage.

### Taux de faux positifs

3. C'est la probabilité qu'un échantillon d'essai négatif connu ait été classé comme positif par la méthode. Le taux de faux positifs est le nombre de négatifs connus classés de façon erronée divisé par le nombre total d'échantillons d'essai négatifs (positifs classés de façon erronée plus le nombre de négatifs connus classés correctement) obtenus avec la méthode:

Pour des raisons de commodité, ce taux peut être exprimé en pourcentage:

$$\% \text{ résultats faux positifs} = x \frac{\text{nombre d'échantillons négatifs connus mal classés}}{\text{nombre total de résultats d'essais négatifs}} \\ \text{[y compris mal classés]}$$

### Taux de faux négatifs

4. C'est la probabilité qu'un échantillon positif connu ait été classé comme négatif par la méthode. Le taux de faux négatifs est le nombre de positifs connus classés de façon erronée divisé par le nombre total d'échantillons d'essais positifs (positifs classés de façon erronée plus le nombre de positifs connus classés correctement) obtenus avec la méthode.

Pour des raisons de commodité, ce taux peut être exprimé en pourcentage:

$$\% \text{ résultats faux négatifs} = x \frac{\text{nombre d'échantillons négatifs connus mal classés}}{\text{nombre total de résultats d'essais positifs}} \\ \text{[y compris mal classés]}$$

Remarque: Les définitions diffèrent selon les secteurs.

5. Afin de montrer le taux de faux négatifs dans un essai qualitatif, une série d'échantillons avec une concentration connue constante de matériau positif dans un pool de matériaux négatifs doivent être analysés et les résultats évalués. Il importe de noter que le concept d'intervalles de confiance et d'incertitude statistique doit être appliqué au risque de résultats faux positifs et/ou faux négatifs. Le niveau de confiance souhaité détermine la taille et le nombre des pools qui doivent être analysés. Par exemple, 100 résultats d'essai positifs obtenus à partir de 100 mesures indépendantes sur des échantillons vraiment positifs permettent de conclure que le niveau de résultats faux négatifs se situe en dessous de 4,5 pour cent à un niveau de confiance de 99 pour cent pour la concentration testée.

**Robustesse**

6. Comme pour toute méthode validée, des efforts raisonnables doivent être déployés pour démontrer la robustesse de l'essai. Il s'agit notamment de l'optimisation et de l'analyse minutieuse de l'incidence des petites modifications apportées à la méthode pour des raisons techniques.

**Applicabilité**

7. Dans le cas de méthodes PCR qualitatives qui utilisent des gels comme procédé pour obtenir des données, il est conseillé d'appliquer les méthodes à des niveaux dépassant largement la limite de détection, afin d'assurer une interprétation facile et aussi objective que possible des données.

**RÉFÉRENCES POUR L'APPENDICE V**

AOAC (2002). Official Methods Program Manual, Appendix X p14f. *AOAC International* [On line]  
<http://www.aoac.org/vmeth/omamannual/htm>.

## **APPENDICE VI: VALIDATION D'UNE MÉTHODE FONDÉE SUR LES PROTÉINES ESSAI QUANTITATIF**

1. Les immuno-essais quantitatifs sont utilisés pour déterminer les concentrations de l'analyte protéique cible dans des produits alimentaires ou des matières premières particulières destinées à la production alimentaire. Afin d'appliquer une méthode de détection immunologique comme une ELISA sur microplaque pour la détermination quantitative d'un analyte protéique dans des échantillons d'aliments ou des tissus comestibles, il convient d'abord d'obtenir un échantillon représentatif de la matrice cible. La quantité d'échantillon et la procédure employée pour préparer les prises d'essai auront une incidence sur la limite de détection ou la sensibilité de l'essai. L'analyte est ensuite extrait du matériau végétal en ajoutant le liquide approprié et en mélangeant, en agitant ou par cisaillement ou sonication. Les liquides utilisés généralement sont l'eau ou des solutions tampons salines. Des surfactants ou des additifs comme l'albumine bovine sont parfois ajoutés en fonction de l'essai et des matrices validés. Il importe que les méthodes d'extraction ne dénaturent pas les protéines afin que les anticorps ne puissent les reconnaître, à moins que l'essai n'ait pour but de détecter des protéines dénaturées.
2. La procédure qui est décrite ci-après est seulement l'une des procédures pouvant être employées pour effectuer un essai de détection immunologique des protéines [d'intérêt] [exprimées en organismes dérivés d'ADN recombiné].
3. Dans un essai de détection immunologique typique pour détecter les protéines, on mesure la densité optique (OD) du produit de la réaction immunologique. La courbe d'étalonnage est obtenue en reportant la densité optique sur l'axe des y et la concentration des étalons sur l'axe des x, ce qui donne une courbe dose/réponse utilisant une équation quadratique ou un autre modèle de courbe ajustée requis par la méthode. Pour obtenir une valeur quantitative exacte, la densité optique pour les solutions de dosage échantillon doit appartenir à la portion linéaire de la courbe de calibrage. Si la densité optique est trop élevée, la solution de dosage doit être diluée jusqu'à ce que la densité optique tombe dans la fourchette de quantification de l'essai. La concentration de l'analyte protéique dans l'échantillon original est calculée en corrigeant de tout facteur de dilution qui a été introduit en préparant l'échantillon à appliquer sur la microplaque. Le facteur de dilution est calculé en utilisant le poids initial de l'échantillon et le volume du liquide d'extraction, ainsi que les dilutions effectuées ultérieurement.
4. Pour obtenir une valeur quantitative exacte et fidèle, la densité optique pour les solutions de dosage échantillon doit appartenir à la portion linéaire de la courbe de calibrage. Si la densité optique est trop élevée, la solution de dosage devrait être diluée jusqu'à ce que la densité optique tombe dans la fourchette de quantification de l'essai. La concentration de l'analyte protéique dans l'échantillon original est calculée en corrigeant de tout facteur de dilution qui a été introduit en préparant l'échantillon à appliquer sur la microplaque. Le facteur de dilution est calculé en utilisant le poids initial de l'échantillon et le volume du liquide d'extraction, ainsi que les dilutions effectuées ultérieurement.
5. On peut utiliser différents échantillons témoins pour prouver la performance de l'essai. Un échantillon blanc comme un puits vide ou une solution tampon peut être inséré dans l'essai afin de déterminer toute réponse de fond qui sera soustraite des réponses de l'échantillon et du calibrage si on le souhaite. Un échantillon témoin négatif (c'est-à-dire la solution d'extrait de matrice dont on sait qu'elle ne contient pas d'analyte) sera utilisé pour montrer tout effet de matrice ou réponse non spécifique se produisant dans l'essai. Un contrôle positif ou un extrait de matrice auquel a été ajouté une quantité déterminée d'analyte peut être effectué pour démontrer l'exactitude du test. Les étalons et les échantillons peuvent être soumis à un nombre de répétition approprié pour estimer la fidélité du test. Les blancs, les échantillons témoins négatifs, les échantillons témoins positifs, les matériaux de référence et les répétitions peuvent être passés sur chaque microplaque pour contrôler les variations d'une plaque à l'autre.

### **MATÉRIAUX DE RÉFÉRENCE**

6. Lorsqu'il y a lieu, le matériau de référence comprend la même matrice que l'échantillon cible à analyser. Il comprend en général des échantillons témoins négatifs et des matériaux de référence positifs. Par exemple, si la matrice à tester est de la farine de soja, le matériau de référence positif normalisé sera de la farine de soja contenant une proportion connue de [la protéine d'intérêt] [aliments dérivés des biotechnologies modernes]. Autrement, un échantillon ou un extrait pur de la protéine d'intérêt peut être utilisé à condition que l'utilisation de ces protéines de référence ait été validée pour la matrice en question. Dans certains cas, la matrice de référence n'est pas disponible. L'accès aux matériaux de référence est important durant la mise au

point, la validation et l'utilisation des immuno-essais pour l'analyse des protéines dans la matrice alimentaire. Le meilleur matériau de référence disponible devrait être utilisé afin de respecter les règlements et les exigences d'essai.

7. Lorsque des produits positifs et négatifs sont disponibles, il est très aisé de préparer un échantillon de référence avec une proportion déterminée du matériau cible. Dans d'autres cas, créer des échantillons de référence pour certaines matrices et certains analytes peut s'avérer difficile. La stabilité et l'uniformité sont des éléments importants. Par exemple, si la matrice à tester est formée d'un mélange de matériaux, l'analyste devra associer des matériaux de référence positifs et des témoins négatifs à obtenir un échantillon de référence homogène avec une quantité connue de la protéine. La stabilité de ces matériaux devra être évaluée dans les conditions de stockage et de test. Il est en tous cas utile de disposer de matériaux de référence positifs et négatifs qui serviront d'échantillons témoins négatifs et positifs.

## **VALIDATION D'UNE MÉTHODE QUANTITATIVE FONDÉE SUR LES PROTÉINES**

8. Les principes de la validation des méthodes décrits dans le protocole harmonisé ISO/UIPAC/AOAC (Horwitz 1995) s'appliquent tant à la méthode PCR qu'à la méthode fondée sur les protéines. L'ISO a élaboré des directives internationales pour la validation d'immuno-essais pour la détection et la quantification de denrées alimentaires génétiquement modifiées (ISO21572:2004). Ces directives s'appliquent également à d'autres denrées alimentaires.

9. Les paramètres pour la validation d'une méthode quantitative comprennent: exactitude/justesse, spécificité, efficacité de l'extraction, sensibilité, fourchette de quantification, fidélité, robustesse, applicabilité, praticabilité et parallélisme (Grothaus *et al.*, 2006).

10. Exactitude: l'exactitude est démontrée en mesurant la récupération de l'analyte à partir des échantillons fortifiés et est exprimée comme étant la récupération moyenne à plusieurs niveaux dans toute la fourchette quantitative. En théorie, les méthodes quantitatives doivent avoir des taux de récupération démontrés se situant entre 70 et 120 pour cent et un coefficient de variation (CV) inférieur à 20 pour cent pour les récupérations mesurées à chaque niveau de fortification (Mihaliak & Berberich, 1995).

11. La récupération des protéines [exprimée en organismes dérivés de l'ADN recombiné] devrait être déterminée en comparant les résultats obtenus à partir de l'analyse d'un matériau de référence ayant une valeur connue ou assignée pour ce matériau de référence. On tiendra compte de l'incidence des effets de la matrice de l'échantillon, particulièrement lorsque celle-ci diffère de celle du matériau de référence.

*Recommandation: le taux de récupération devrait se situer entre 70 et 120 pour cent.*

12. Écart-type de répétabilité (RSD<sub>r</sub>)

*Recommandation: L'écart-type de répétabilité relatif devrait être  $\leq 25$  pour cent ou le plus près possible dans toute la fourchette dynamique de la méthode*

13. Écart-type de reproductibilité (RSD<sub>R</sub>)

*Recommandation: L'écart-type de reproductibilité relatif devrait être inférieur à 35 pour cent ou aussi près que possible à la concentration cible et supérieur à la majorité de la fourchette dynamique.  $RSD_R \leq 50$  pour cent ou aussi près que possible à l'extrémité inférieure de la limite de quantification.*

### **Efficacité de l'extraction**

14. Il s'agit de la mesure de l'efficacité avec laquelle une méthode d'extraction donnée sépare l'analyte protéique de la matrice. Elle est exprimée en pourcentage de l'analyte récupéré à partir de l'échantillon. L'efficacité de la procédure d'extraction peut être difficile à démontrer. Il peut ne pas y avoir d'autre méthode de détection permettant de comparer les résultats de l'immuno-essai. Une façon de traiter le problème de l'efficacité de l'extraction consiste à démontrer la récupération de l'analyte protéique cible à partir de chaque type de fraction d'aliment par extraction exhaustive, c'est-à-dire en procédant à l'extraction de l'échantillon jusqu'à ce que la protéine ne puisse plus être détectée (Stave, 1999).

15. Fidélité: la fidélité intra-essai décrit la variation observée dans un essai. Elle peut s'évaluer en déterminant la variation (CV exprimé en pourcentage) entre les essais répétés à différentes concentrations sur la courbe d'étalonnage et sur la variation groupée (CV en pourcentage) calculée à partir des valeurs d'absorbance dans les étalons provenant d'essais indépendants effectués des jours différents. La fidélité inter-essai décrit la variation observée entre des essais distincts et peut se mesurer par l'analyse des échantillons de contrôle qualité sur chaque microplaque. Les échantillons de contrôle qualité nécessaires

consistent en deux pools d'extraits, un extrait des échantillons contenant l'analyte cible et un autre extrait des échantillons témoins. Si la protéine est stable dans l'extrait, elle sera stockée congelée et une portion sera dégelée et dosée sur chaque microplaque. La fidélité inter-essai peut être évaluée dans le temps et exprimée en pourcentage CV (Rogan *et al*, 1999).

16. Le parallélisme de la dilution permet d'estimer si l'essai peut donner des résultats équivalents indépendamment de la fourchette quantitative de la courbe d'étalonnage que la densité optique de l'échantillon interpole. Pour mener ces expériences, il est conseillé de diluer des échantillons qui sont positifs pour la protéine cible de façon à ce qu'au moins trois des dilutions donnent des valeurs qui occupent toute la fourchette quantitative de la courbe. Le coefficient de variation des résultats ajustés provenant de plusieurs dilutions d'un extrait d'échantillon unique devrait en théorie être  $\leq 20\%$ .

### **Sensibilité**

17. La sensibilité de l'essai pourrait être définie comme la quantité d'analyte qui peut être mesurée par lecture de l'absorbance de deux écarts-types au-dessus de l'absorbance du fond (Rogan *et al*, 1992). La limite de détection pourrait être exprimée comme la dilution la plus faible de la protéine d'intérêt pouvant être détectée lorsqu'elle est associée au reste de la protéine extraite de l'échantillon (Rogan *et al*, 1999).

### **Fourchette dynamique – Fourchette de quantification**

18. Le champ d'application des méthodes définit la fourchette de concentration au-dessus de laquelle l'analyte sera déterminé avec exactitude. Cette fourchette de concentration souhaitée définit les courbes d'étalonnage et un nombre suffisant d'étalons devrait être utilisé pour définir correctement la relation entre la concentration et la réponse du test. La relation entre la réponse et la concentration devrait être démontrée comme étant continue, reproductible et devrait être linéaire après transformation adéquate.

19. Les méthodes quantitatives fondées sur les protéines donnent en général une estimation de la concentration de la protéine d'intérêt dans la matrice. Pour les OGM, il peut être difficile d'interpréter des valeurs en pourcentage (par exemple, une fourchette dynamique de 10 pour cent à 500 pour cent de la valeur cible) lorsqu'on utilise des méthodes quantitatives, étant donné les variations dans l'expression de la quantité de protéine présente dans les différents tissus des plantes ou les cultivars, et dans le même tissu à différents emplacements. On veillera à employer une méthode capable de détecter la protéine dans la matrice analysée. Par exemple, on pense que les protéines se modifient ou se dégradent davantage du fait de la transformation jusqu'à une concentration plus élevée que l'ADN; il convient donc de tenir compte de la perte de signal due aux effets de la transformation des aliments.

20. Il convient de noter que si la LOD ou la LOQ sont établies à des niveaux très inférieurs à la fourchette dans laquelle la méthode devra être utilisée, il n'est pas nécessaire de procéder à une détermination précise. Cela serait le cas, par exemple, lorsque la LOD est de 1 ng/kg, alors que la fourchette de la validation de la méthode ne s'étend que pour des concentrations de l'ordre du g/kg.

### **Limite de détection (LOD)**

21. La LOD est définie à l'appendice II. Les protéines sont normalement présentes dans les aliments [dérivés des biotechnologies modernes] à des concentrations plus élevées que l'ADN cible pour les méthodes PCR. Les effets stochastiques ont donc moins d'influence sur la détermination de la LOD que lorsqu'on utilise la PCR.

22. Il est courant lorsqu'on estime la LOD de supposer qu'elle est la force du signal d'un blanc augmentée de trois fois l'écart-type du blanc. Cette méthode donne au mieux une estimation, et s'appuie sur une distribution gaussienne normale des mesures du blanc autour de zéro. Cette hypothèse convient en général pour des méthodes comme ELISA, mais la meilleure détermination de la LOD s'obtient de façon expérimentale. Autrement, la LOD est couramment définie comme une concentration égale à l'étalon le plus faible utilisé dans l'essai, si une valeur positive est constamment obtenue avec cet étalon.

### **Limite de quantification (LOQ)**

23. Pour une méthode quantitative, il importe de savoir si la LOQ pour une matrice particulière est proche des valeurs à mesurer. Avec une approche classique, la LOQ peut être exprimée comme étant la force du signal d'un blanc égale à la LOD augmentée de six à dix fois l'écart-type du blanc, à moins que d'autres sources montrent que les valeurs mesurées se situent tellement au-dessus de la LOQ que cette connaissance devient inutile. Cependant, cette façon de déterminer la LOQ ne produit qu'une estimation de la LOQ réelle qui peut se révéler être une approximation artificiellement élevée ou faible.



24. Dans la pratique, deux procédures ont été employées pour déterminer la LOQ. La première consiste à doser un nombre d'échantillons conventionnels auxquels ont été ajoutés des quantités connues d'analyte. La LOQ est alors le niveau auquel la variabilité du résultat et le pourcentage de récupération de l'analyte sont conformes à certains critères préétablis. Pour les petites molécules, ces critères sont en général un RSDr de  $\leq 20\%$  et une récupération de 70 à 120 pour cent (Mihaliak & Berberich, 1995). La récupération de la protéine peut, toutefois, être difficile pour certaines matrices, par exemple, les amidons et les huiles, et des taux d'efficacité de la récupération plus faibles doivent être acceptés. Lorsque l'efficacité de la récupération est faible, il faut l'indiquer dans les données de validation et dans le rapport d'analyse. Une procédure plus complète consiste à tester la méthode à l'aide d'échantillons contenant des quantités connues du matériau cible. Cette procédure est plus compliquée car elle nécessite d'avoir accès à des quantités importantes de matériaux de référence contenant une fourchette connue de concentrations de la [protéine d'intérêt] [aliments dérivés des biotechnologies modernes]. Les procédures d'évaluation de la LOD et de la LOQ durant la validation de méthodes PCR quantitatives sont également examinées dans les appendices III et IV.

### **Réactivité croisée**

25. On entend par réactivité croisée ou spécificité de l'essai la mesure dans laquelle des analogues ou d'autres molécules peuvent se lier aux anticorps de détection; elle devrait donc être caractérisée et décrite dans la méthode. La réactivité croisée devrait être démontrée par des résultats expérimentaux obtenus en testant la méthode avec des protéines ou des molécules provenant d'espèces/variétés non cibles et étroitement apparentées, et des protéines cibles purifiées et/ou des matériaux de référence et témoins positifs pour le contrôle. Le potentiel d'interférences des réactifs et du matériel de laboratoire peut être évalué en dosant des extraits de matériau exempt d'analyte.

### **Effets de matrice**

26. Si la réponse de la méthode est modifiée par une substance dans l'extrait final autre que l'analyte protéique spécifique, la réponse non spécifique est appelée un effet de matrice. Une façon de gérer les effets de matrice consiste à démontrer que la méthode d'analyse donne des résultats identiques avec ou sans la présence de la matrice échantillon dans l'extrait. Avec cette procédure, l'absence d'effets de matrice devrait être démontrée dans toutes les matrices pour lesquelles l'essai doit être utilisé. Une autre procédure (même si elle est moins souhaitable) pour gérer les effets de matrice consiste à préparer les solutions-étalons dans des extraits provenant de matrice exempte d'analyte. On pourrait ainsi garantir que les effets de matrice sont constants entre les étalons et les échantillons.

### **Robustesse**

27. L'évaluation de la robustesse démontre la fiabilité d'une méthode lorsqu'elle est soumise à des variations involontaires qui pourraient intervenir dans les paramètres de l'essai. Les variations qui peuvent être incluses sont la température d'incubation des volumes de réaction (par exemple, plus et moins 5-10°C) et/ou d'autres variations pertinentes. Les expériences doivent être réalisées au moins en triplicats et la récupération doit être calculée. La réponse d'un essai en ce qui concerne ces petites variations ne devrait pas s'écarter de plus de  $\pm 30$  pour cent de la réponse obtenue dans les conditions stipulées à l'origine. Les expériences qui peuvent être réalisées pour établir la robustesse comprennent notamment l'analyse répétée d'un échantillon ou d'échantillons sur plusieurs jours et la mesure de la justesse et de la fidélité dans les échantillons fortifiés utilisant du matériau de contrôle provenant de plusieurs sources.

### **ESSAI QUALITATIF (SEUIL)**

28. Les dispositifs de flux latéral sont des instruments utiles pour les tests de seuil sur place ou sur le terrain. Les méthodes classiques ELISA peuvent aussi être utilisées pour les essais qualitatifs. Afin de garantir des résultats fiables, les fabricants de ces essais doivent effectuer une validation de la méthode et fournir une description des caractéristiques de performance dans la notice d'accompagnement du produit, notamment pour la sensibilité, la spécificité, l'applicabilité et l'effet crochet. Si cela a été fait, les utilisateurs des dispositifs de flux latéral n'ont en général pas besoin de réaliser des études de validation pour appliquer la technique dans leur laboratoire, à condition qu'ils aient suivi les instructions du fabricant. Chaque dispositif de flux latéral est une unité indépendante capable de fonctionner aux normes décrites dans la notice d'accompagnement du produit conformément au programme d'assurance qualité du fournisseur. En ce qui concerne les méthodes ELISA, la validation devrait être effectuée afin de s'assurer que la méthode donne les résultats attendus dans le laboratoire.

29. Afin d'établir une procédure sur le site pour l'essai de seuil, le niveau du seuil doit d'abord être fixé. Pour déterminer si le dispositif de flux latéral peut faire la différence entre les échantillons contenant la protéine cible au-dessus ou au-dessous du seuil, il faut doser simultanément une référence négative et une référence seuil contenant une proportion connue de la matrice avec la protéine cible. La référence négative est un échantillon de la matrice testée dont on sait qu'il ne contient pas l'analyte protéique et qui est dosé pour démontrer que la méthode peut faire la différence entre zéro et le niveau de seuil. Un nombre suffisant de ces échantillons (par exemple, USDA, 2004) est analysé pour garantir que la sensibilité de l'essai est adéquate pour déterminer si le niveau dans l'échantillon pour essai est supérieur ou inférieur au niveau seuil. Durant les essais de routine d'échantillons de produit en vrac, les dispositifs de flux latéral seront en général utilisés sans être appliqués simultanément aux échantillons de référence négatifs et de seuil.

### **VALIDATION D'UNE MÉTHODE QUALITATIVE FONDÉE SUR LES PROTÉINES**

30. Les mêmes principes s'appliquent aux essais qualitatifs fondés sur les protéines et aux essais PCR qualitatifs. Ces procédures, y compris le calcul des taux de faux positifs et de faux négatifs, peuvent donc s'appliquer aux méthodes fondées sur les protéines. En général, compte tenu de la plus grande fiabilité des méthodes en flux latéral et bande fondées sur les protéines, les tests ne sont pas répétés sur chaque échantillon. En revanche, si un test ELISA est effectué (étant de type quantitatif), il faut utiliser des puits doubles.

#### **Applicabilité**

31. Les analytes, matrices et concentrations pour lesquels une méthode d'analyse peut être utilisée devraient être indiqués.

32. L'extraction des protéines peut être un facteur déterminant dans la performance d'une méthode fondée sur les protéines, et les tampons utilisés peuvent aussi influencer sur la performance au moment de la détection. Cette optimisation attentive est nécessaire pour garantir que les méthodes de détection des protéines sont fiables. S'il s'agit par exemple d'une méthode Elisa, elle devrait afficher une fidélité raisonnable et un faible biais, et devrait pouvoir être répétée avec un  $RSD_R$  raisonnable. Les critères applicables pour déterminer la limite de détection (LOD) devraient être établis pour la méthode. La LOD de l'essai peut être déterminée par lecture de l'absorbance pour un certain nombre d'extraits qui ne contiennent pas la protéine cible (répétitions à la dose zéro), ou en utilisant à titre expérimental des échantillons contenant des quantités connues de la protéine cible (Keith et al., 1983). De plus, il devrait être possible d'établir une courbe d'étalonnage à l'aide de la protéine spécifique présente dans la matrice testée. Pour de nouvelles matrices, un échantillon de chaque matrice fortifié avec la protéine spécifique peut être utilisé pour établir l'efficacité de la récupération et utilisée pour estimer la limite de quantification (LOQ) (Keith et al., 1983). Il est difficile de démontrer l'extractibilité d'une protéine; cela nécessite des extractions répétées pour des protéines relativement stables), pour l'emploi d'échantillons prélevés aux caractéristiques bien connues.

33. Pour déterminer la LOD dans des essais qualitatifs, des niveaux d'enrichissement proches de la LOD peuvent être utilisés, pourvu que l'un des niveaux utilisés réponde au critère selon lequel il doit dépasser la LOD mais en être proche. Si ces procédures peuvent donner une indication de la performance de la méthode, des échantillons prélevés aux caractéristiques bien connues (s'ils sont disponibles) constituent la meilleure matrice à partir de laquelle on pourra établir l'applicabilité d'une méthode.

#### **Praticabilité**

34. La praticabilité de la méthode doit être démontrée.

35. Les mêmes types d'échantillons témoins et les critères d'acceptation ou de rejet du résultat peuvent être utilisés que pour les méthodes PCR qualitatives. La LOD est exprimée comme étant la quantité d'analyte à laquelle la méthode d'analyse détecte la présence de l'analyte dans au moins 95 pour cent des cas (<5 pour cent de résultats faux négatifs). Cependant, les tests en flux latéral et bande sont en général appliqués aux concentrations de test qui sont au moins deux fois au-dessus de la LOD.

### **RÉFÉRENCES POUR L'APPENDICE VI**

Grothaus GD, Bandla M, Currier T, Giroux R, Jenkins GR, Lipp M, Shan G, Stave JW and Pantella V. (2006). Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *AOAC International* 89:913-928

Guidelines for the Validation and Use of Immunoassays for Determination of Introduced Proteins in Biotechnology Enhanced Crops and Derived Food Ingredients. Lipton et al., *Food and Agricultural Immunology*, 2000, 12, 153-164.

Horwitz E. ISO/AOAC/IUPAC Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies (1995). *Pure and Applied Chemistry* 67:331-343.

ISO 21572:2004. Foodstuffs-Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products-protein based methods. Geneva: International Organization for Standardization.

Mihaliak CA and Berberich SA (1995). Guidelines to the Validation and Use of Immunochemical Methods for Generating Data in Support of Pesticide Registration, in: Nelson JO, Karu AE and Wong RB (eds.) *Immunoanalysis of Agrochemicals: Emerging Technologies. ACS Symposium Series 586:288-300.*

Stave JW (1999). Detection of the new or modified proteins in novel foods derived from GMO: future needs. *Food Control* 10:367-374.

Rogan GJ, Dudin YA, Lee TC, Magin KM, Astwood JD, Bhakta NS, Leach JN, Sanders PR and Fuchs RL (1999). Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready(R) soybeans. *Food Control* 10(6):407-414.

USDA (2004). U.S. Department of Agriculture/Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration Directive 9181.2. [en ligne] <http://archive.gipsa.usda.gov/reference-library/directives/9181-2.pdf>.