

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 7 de l'ordre du jour

CX/MAS 09/30/8

PROGRAMME MIXTE FAO/OMS SUR LES NORMES ALIMENTAIRES

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

Trentième session

Balatonalmádi (Hongrie), 9 - 13 mars 2009

AVANT-PROJET DE DIRECTIVES SUR LES CRITÈRES POUR LES MÉTHODES POUR LA DÉTECTION ET L'IDENTIFICATION DES ALIMENTS DÉRIVÉS DES BIOTECHNOLOGIES

(À l'étape 3 de la procédure)

À sa vingt-neuvième session, le Comité sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage est convenu de proposer une nouvelle activité sur l'élaboration de critères pour les méthodes pour la détection et l'identification des aliments dérivés des biotechnologies. Il est convenu que, sous réserve de la décision de la Commission, l'avant-projet de directives présenté dans le document de travail (CX/MAS 08/29/8) serait diffusé à l'étape 3 pour observations (ALINORM 08/31/23, par. 87-93)

À sa trente et unième session, la Commission a approuvé la nouvelle activité sur les Directives sur les critères pour les méthodes pour la détection et l'identification des aliments dérivés des biotechnologies (ALINORM 08/31/REP, par. 94-97 et Annexe X).

En conséquence, l'Avant-projet de directives est diffusé à l'étape 3 pour observations et examen par le Comité sur la méthode d'analyse et d'échantillonnage, à sa trentième 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 1^{er} février 2009**.

ANNEXE I: DIRECTIVES POUR LA VALIDATION ET LES EXIGENCES DU CONTRÔLE DE QUALITÉ POUR L'ANALYSE DES ALIMENTS DÉRIVÉS DES BIOTECHNOLOGIES

INTRODUCTION

Critères des méthodes

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, y compris celui des aliments dérivés des biotechnologies, peu de méthodes d'analyses ont été pleinement validées. 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 la détection des aliments dérivés des biotechnologies 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.

De nombreuses méthodes sont actuellement élaborées pour la détection, l'identification et la quantification des aliments dérivés des biotechnologies. Avant qu'elles soient acceptées pour être utilisées par le Codex, elles doivent être validées pour garantir qu'elles sont aptes au but poursuivi.

Cependant, les deux approches les plus courantes (Anklam *et al.*, 2002) utilisent des méthodes qui sont fondées sur l'ADN pour déceler une séquence spécifique d'ADN (cible) (Lipp *et al.* 2005; Holst-Jensen *et al.*, 2004, Miraglia *et al.*, 2004) ou sur la détection des protéines elles-mêmes ou de leurs activités (Grothaus *et al.*, 2007). Pour l'analyse reposant sur l'ADN, l'approche PCR (amplification en chaîne par polymérase) est actuellement très largement appliquée, bien que d'autres méthodes fondées sur l'ADN permettant d'obtenir des mesures avec ou sans étape de PCR peuvent être employées si elles ont été validées correctement. Les approches fondées sur l'ADN et sur les protéines sont examinées ici.

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 concentrations et préférence accordée aux méthodes « générales »)
- limite de détection
- limite de quantification
- précision; répétabilité intralaboratoire (dans un laboratoire), reproductibilité interlaboratoires (dans un laboratoire et entre plusieurs laboratoires)
- sélectivité
- sensibilité
- linéarité

Les présentes directives traitent ces exigences dans le secteur des aliments dérivés des biotechnologies, et devront probablement être élargies (par exemple pour la PCR) par d'autres critères tels que:

pour les méthodes reposant sur l'ADN.

- longueur de l'amplicon
- si la méthode est spécifique à un instrument
- s'il existe des différences entre les méthodes de détection qualitative et quantitative fondées sur la PCR
- si des amplifications PCR de type singleplex ou multiplex sont effectuées

et

pour les méthodes fondées sur les protéines

- équivalence des réactifs dans le temps

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 la mesure

Démarche critère

La Commission du Codex Alimentarius a accepté la « démarche critère » pour les méthodes d'analyse. Cette démarche ne s'applique pas aux procédures du Type I du Codex qui sont empiriques ou analytiques. Il faut s'assurer que cette démarche est inscrite dans les directives du Codex sur la validation des méthodes d'analyse des aliments dérivés des biotechnologies.

Qualité des laboratoires

La Commission du Codex Alimentarius a adopté des directives 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 directives générales fournissent des informations et dictent les conditions que doivent remplir les laboratoires intervenant dans le secteur des aliments dérivés des biotechnologies.

Incertitude de mesure

Le Codex a élaboré des directives sur l'incertitude de mesures. Ces directives demandent que les laboratoires estiment l'incertitude de leurs mesures quantitatives. Cette disposition est particulièrement importante et a des conséquences sur les mesures dans le secteur concernant les aliments dérivés des biotechnologies où les contrôles ne sont pas toujours aussi efficaces que dans d'autres domaines d'analyse du secteur alimentaire. On ne se rend pas toujours compte que l'incertitude de la mesure est beaucoup plus importante dans ce secteur d'analyse que ce à quoi on pourrait normalement s'attendre.

Dans le cas des méthodes reposant sur l'ADN, l'incertitude peut être due à des facteurs biologiques. Par exemple, un échantillon peut contenir du matériel de grain hémizygote (par exemple, *Zea mays*) dans lequel la force du signal sera fonction de la voie de l'introduction de la séquence, c'est-à-dire par le parent mâle ou femelle. Par ailleurs, différentes séquences cibles (en particulier, dans le cas des méthodes de sélection) peuvent être empilées dans certains ou dans tous les grains de l'échantillon. Étant donné que l'ampleur du phénomène est une inconnue, son effet ne peut pas être déterminé avec précision, mais doit être inclus dans l'incertitude de toutes les mesures. Dans le cas des méthodes fondées sur les protéines, le niveau d'expression de la protéine et/ou l'efficacité de l'extraction des protéines peut varier. Cependant les deux types de méthodes (reposant sur l'ADN ou sur les protéines) peuvent être utilisées avec une approche de sous-échantillonnage, ou sur des semences uniques, où l'impact potentiel de ce type de variation biologique est minoré.

INFORMATIONS À FOURNIR AU CODEX LORSQU'UNE MÉTHODE POUR LES ALIMENTS DÉRIVÉS DES BIOTECHNOLOGIES DOIT ÊTRE EXAMINÉE PAR LE CCMAS POUR CONFIRMATION

Les informations qui doivent être fournies au CCMAS lorsqu'une méthode est examinée pour confirmation figurent à l'Annexe I où l'on trouvera une liste des considérations générales et des exigences spécifiques.

La méthodologie permettant d'identifier et de quantifier les aliments dérivés des biotechnologies ne cessant de se perfectionner, les exigences spécifiques sont converties au fur et à mesure en critères de performance conformément à la « démarche critère » déjà adoptée par le Codex.

DÉFINITIONS

Plusieurs définitions du Codex s'appliquent à l'analyse des aliments dérivés des biotechnologies. Les définitions suggérées figurent à l'Annexe II.

ÉLABORATION DES MÉTHODES AUX FINS D'UNE VALIDATION OFFICIELLE

Applicabilité de la méthode

Ce critère est particulièrement important dans l'analyse des aliments dérivés des biotechnologies. En principe, la méthode devrait être applicable à la matrice particulière au sein du système du Codex. S'il s'agit d'un aliment spécifique dérivé des biotechnologies, 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 aliments dérivés des biotechnologies, au moins une méthode d'extraction applicable à une matrice générale devrait être disponible.

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 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). 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'analyse PCR en temps réel, les **valeurs Ct** peuvent être utilisées pour estimer l'efficacité de la PCR. L'analyse des différences entre les dilutions de l'ADN matrice **correspond au facteur de dilution, par exemple, si l'ADN est dilué 10 fois la différence théorique des Ct devrait être approximativement 3,32**, et si l'ADN est dilué 4 fois, la différence devrait être 2. 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.

La quantité et la nature de l'ADN et des protéines cibles mesurables présentes 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 (farines de maïs et de soja, flocons de soja dégraissés, lait de soja, tofu, etc.), 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 la détectabilité de l'ADN cible.

Processus de validation

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 fidélité et de la justesse d'une certaine méthode d'analyse dans les conditions examinées.

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 2 à 4 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 nécessite des ressources considérables et devrait être effectuée seulement sur des méthodes qui ont été soumises à des essais préalables appropriés.

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.

Approche modulaire de la validation de la méthode

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 et de la quantification finale dans un système PCR. Dans un tel cas, toute la chaîne qui va de l'extraction à la

méthode PCR (ou équivalent) constitue une méthode, mais les différentes parties de la méthode peuvent être examinées de façon distinctes (c'est-à-dire validation modulaire). Il est cependant possible d'utiliser la même méthode de préparation des échantillons (par exemple, broyage) en association avec l'isolement du même ADN pour plusieurs analyses PCR ultérieures différentes (Holst-Jensen *et al.*, 2004). Dans ce cas, chaque méthode séparée doit être validée, mais le système tout entier peut être regroupé dans une approche modulaire, ce qui est avantageux sur le plan économique.

L'approche de la validation modulaire n'a pas encore montré qu'elle pouvait s'appliquer aux méthodes fondées sur les protéines.

CRITÈRES D'ACCEPTATION DE LA MÉTHODE [Conditions requises pour la validation complète]

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'annexe I des détails sur ce point.

La méthode sera évaluée en fonction des informations fournies au Codex. 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.

Conditions de principe

La méthode de détection est destinée essentiellement à répondre aux exigences en matière de mesure des produits dérivés des biotechnologies. À cette fin, la méthode peut déceler et quantifier la séquence d'ADN spécifique du taxon et 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.

L'essai doit être réalisé à l'aide des matériaux de référence liés à l'évènement de transformation.

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;
- une description des séquences d'amorces oligonucléotidiques qui identifient uniquement la séquence de l'ADN cible;
- une description des séquences de sonde oligonucléotidique fluorescente qui identifient uniquement la séquence de l'ADN cible, le cas échéant;
- une description des séquences d'amorces oligonucléotidiques qui amplifient une séquence du gène endogène applicable à l'espèce hôte spécifique;
- un protocole décrivant les conditions, y compris l'appareil utilisé, dans lesquelles la PCR peut être utilisée pour déceler la séquence d'ADN cible;
- les échantillons témoins appropriés, le cas échéant. Cependant, la détection de l'ADN ou de la protéine provenant d'aliments dérivés de la biotechnologie inconnus ne permet pas d'utiliser les échantillons témoins étant donné qu'ils ne sont en général pas disponibles, mais le plasmide pourrait être élaboré et utilisé en tant qu'échantillons appropriés, si l'on dispose d'informations sur la séquence de l'ADN cible;
- la description des calculs utilisés pour obtenir le résultat.

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, et
- un tampon de lavage et un tampon d'extraction d'échantillon.

La quantification est faite en comparant la quantité de protéines observée dans le ou les extrait(s) avec la quantité de protéine exprimée dans la partie appropriée de la plante (par exemple, semence ou grain).

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, et
- un tampon absorbant assemblé sur un doublage plastique fin.

Le fournisseur de la méthode devait montrer que la méthode remplit les conditions ci-après:

- 2) Les méthodes spécifiques d'un événement de transformation fondées sur l'ADN devraient permettre la détection/identification/ quantification sans équivoque d'un événement de transformation.

Actuellement, le meilleur choix concernant la spécificité d'une méthode pour un événement de transformation, si PCR est la technique choisie, est de cibler une région génomique spécifique d'un événement de transformation 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.

- 3) Les essais qualitatifs sont réalisés de sorte que le nombre de sous-échantillons positifs et négatifs (pools) obtenus à partir d'un échantillon peut permettre d'estimer la teneur en grain dérivé de la biotechnologie du matériau (Remund *et al.*, 2001).
- 4) Toutes les méthodes devraient être applicables au matériau spécifié dans leurs champs d'applications, et aux matériaux de référence et de contrôle qualité appropriés, le cas échéant.

Il convient de noter qu'à l'heure actuelle seule l'analyse quantitative peut être effectuée ce qui signifie que le matériel d'ADN recombiné relatif à l'ingrédient ou espèce correspondant est mesuré.

EXIGENCES CONCERNANT LES ESSAIS COLLABORATIFS

Informations générales

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.

Les valeurs de tous les paramètres de performance obtenues dans des études de validation doivent 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 (c'est-à-dire PCR quantitative en temps réel par rapport à une chaîne de méthode allant de l'extraction à la quantification PCR en temps réel), du concept expérimental appliqué, par exemple, calibrage par opposition aux méthodes $\Delta\Delta C_t$, des formules du calcul exact utilisées pour déterminer les paramètres et de l'approche utilisée pour détecter et analyser les valeurs aberrantes. Afin que les « exigences de performance minimales » soient significatives, les facteurs ci-dessus doivent être traités de manière appropriée et normalisée.

Aux fins du Codex, la norme ISO 5725:1996 ou Protocole harmonisé AOAC/UIPAC 1¹ a été adopté. 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.

Exigences de performance minimale

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.

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

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 directives seront aussi complétées par des informations pratiques sur les étapes opérationnelles du processus de validation.

Matériaux d'essai à utiliser dans un essai collaboratif

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

L'ADN plasmidique et l'ADN génomique sont tous deux utilisés comme le calibrateur (pour une méthode reposant sur la PCR). Cependant, il est possible d'utiliser les matériaux ou matrices caractéristiques d'un type ou groupe de matériaux ou matrices si les effets des matériaux ou matrices sur la qualité de l'ADN à l'étape de l'extraction sont importants pour l'analyse.

VALIDATION DES MÉTHODES

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

On trouvera à l'Annexe V des renseignements sur la validation des méthodes quantitatives et qualitatives fondées sur les protéines.

UNITÉS DE MESURE

« Les mesures peuvent être exprimées de manière explicite en tant que poids ou grains 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 à moins d'être effectuées en tant qu'approche de sous échantillons multiples sur le grain. Dans le cas de la méthode fondée sur l'ADN utilisée pour la quantification des aliments dérivés des biotechnologies, les équivalents génomiques peuvent généralement être mesurés. Les méthodes fondées sur les protéines mesurent la quantité d'une protéine spécifique qui est présente et peuvent la rapprocher de la quantité désirée. Bien que des corrélations puissent exister entre les grains en pourcentage ou poids et la quantité d'ADN ou de protéine, respectivement, la nature même de ces relations est influencée par plusieurs facteurs biologiques ([ajout supprimé] Horst-Jensen, et al, 2004, Grothaus et al 2007). Par exemple, la quantité de matériau recombiné peut être surestimée ou sous estimée (sur la base de la semence), ou généralement surestimée en cas d'accumulation pyramidale de gènes par une approche fondée sur l'ADN ou sur la protéine. »

Cette question doit être traitée et des unités de mesure appropriées, des critères de performance et de présentation des données doivent être définis pour ces méthodes avant de les utiliser. L'interprétation des résultats nécessite toujours des orientations techniques et une grande prudence.

INCERTITUDE DE MESURE

La préparation de l'échantillon et les méthodes d'analyse sont deux sources importantes d'erreur qui doivent 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 directives 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.

Des travaux ont déjà été réalisés et publiés sur la validation de méthodes d'analyse spécifiques (<http://biotech.jrc.it/bioinformatics/methodsdatabase.htm>).

Le Codex a ou est en train d'élaborer et d'adopter des directives sur l'estimation et l'utilisation de l'estimation de l'incertitude des mesures (Directives du Codex sur l'incertitude des mesures et le projet de document d'orientation sur « L'utilisation des résultats d'analyse »).

ORIENTATIONS POUR LA MISE EN PLACE ET LE FONCTIONNEMENT DES LABORATOIRES

Les méthodes fondées sur l'ADN pour l'analyse des aliments dérivés des biotechnologies utilisent des techniques qui ne sont pas considérées comme aisément disponibles car elles font appel en général à un matériel et des techniques de manipulation spécifiques qui diffèrent de la plupart des méthodes d'analyse chimique. Cependant, l'utilisation des méthodes fondées sur l'ADN se développe dans d'autres champs de détection comme la microbiologie des pathogènes alimentaires. Étant donné l'absence actuellement de rétroaction des autres domaines de détection, 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 disponibles⁴.

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.

MATÉRIAUX DE RÉFÉRENCE

Plusieurs matrices peuvent être utilisées pour élaborer des matériaux de référence ou des normes de travail pour les méthodes de détection des aliments dérivés des biotechnologies. Chacune a ses propres avantages et inconvénients selon l'utilisation prévue.

Le Codex peut envisager de demander que la disponibilité de matériaux de référence appropriés fasse partie de la procédure d'approbation de la méthode. Il est cependant reconnu que l'élaboration de matériaux de référence pose des problèmes spécifiques, par exemple pour les matériaux de maïs faut-il examiner l'évènement de transformation ou les méthodes spécifiques de la construction génique.

Un matériau de référence approprié est en général exigé pour la validation d'une méthode. Des matériaux de référence appropriés deviennent disponibles pour de nombreux évènements de transformation commercialisés. Lorsqu'ils 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 .

Il est recommandé de travailler avec un matériau entièrement homozygote ou, lorsqu'il est disponible, sur un matériau de référence, si possible certifié avec un niveau connu de zygosity. D'autres matériaux peuvent toutefois convenir selon le cas.

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. 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 cible et sur la reproductibilité de la méthode du fait d'erreurs d'échantillonnage

ÉCHANTILLONNAGE

En général, les technologies fondées sur l'ADN et sur les protéines examinent un sous échantillon pris dans un échantillon plus important car le lot peut être énorme (par exemple, des tonnes) et que l'essai ne peut porter que sur de petits échantillons (des grammes). L'élaboration de plans d'échantillonnage appropriés peut aider à réduire le plus possible les erreurs attribuables à l'échantillonnage et garantissent que l'échantillon est représentatif du lot. Dans le domaine de l'analyse des aliments dérivés des biotechnologies, on peut s'attendre à ce que l'erreur d'échantillonnage contribue de manière importante à l'incertitude générale d'un résultat d'analyse, si elle n'en est pas la raison principale, en particulier lorsqu'il s'agit de produits bruts. Les technologies d'analyse s'appliquent en général à un sous échantillon provenant d'un échantillon plus important car le lot peut être considérable (par ex. plusieurs tonnes) et la méthode d'essai est destructive et ne peut utiliser que de petits échantillons (grammes à kilo). Des plans d'échantillonnages appropriés peuvent contribuer à réduire les erreurs dues à l'échantillonnage, et à garantir que l'échantillon est représentatif du lot. Comme c'est le cas pour toutes les analyses, l'erreur d'échantillonnage peut contribuer largement à l'incertitude générale d'un résultat d'analyse. C'est toutefois aussi le cas dans d'autres domaines d'analyse,

comme l'estimation du nombre de grains brûlés ou d'autres matériaux dans un échantillon en vrac. Les normes d'échantillonnage acceptées sont notamment ISO 6644, ISO 542 et ISO 13690, et Codex CAC/GL 50-2004.

Plusieurs organisations internationales se penchent maintenant sur la question des incertitudes dues à l'échantillonnage et à l'analyse, en particulier EURACHEM qui a constitué un nouveau groupe de travail sur l'incertitude de l'échantillonnage, et ISO, qui est en train d'organiser un forum sur l'échantillonnage. De nombreux travaux ont été effectués sur l'échantillonnage en général par le CCMAS et sur l'échantillonnage en vrac pour les aliments dérivés des biotechnologies par le Centre commun de recherche de l'Union européenne, (par ex., Paoletti *et al.*, 2006), le Comité européen de normalisation (CEN), le GIPSA (Freese et al), l'ISTA et l'ISO (TC/34 WG 7) qui recommande d'utiliser les méthodes d'échantillonnage existantes pour les produits de la biotechnologie moderne.

DISTRIBUTIONS DE LA CONCENTRATION

En principe les concentrations dans le domaine des aliments dérivés des biotechnologies sont considérées comme distribuées normalement. Une étude des données obtenues dans deux programmes d'aptitude pour les aliments dérivés des biotechnologies a été réalisée. Elle a porté sur les données obtenues à partir de 29 passages et 43 matériaux examinés sur une période de trois ans. Les résultats de deux programmes sont semblables et se renforcent mutuellement. Le processus d'amplification utilisé dans les déterminations PCR quantitatives prédissent un mélange de distributions normale, binomiale et log-normale, ces deux dernières étant dominantes. Comme prédit, les résultats de l'étude suivent systématiquement une distribution désaxée vers la droite. 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 normale⁸. Il convient donc d'examiner si une transformation logarithmique de toutes les données issues de déterminations quantitatives est nécessaire avant leur utilisation. Les conséquences pour les programmes d'essais d'aptitude sont présentées à l'Annexe VI.

RÉFÉRENCES

1. Protocole harmonisé ISO/AOAC/UIPAC (Protocole pour la conception, la conduite et l'interprétation des études de performance des méthodes (1995), Ed. Horwitz, Pure and Applied Chemistry. **67**: pp 331-343.
2. Directives sur l'incertitude des mesures (CAC/GL 54-2004)
3. Projet de document d'orientation du Codex sur « l'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 »
4. ISO/DIS 24276
5. Directives générales du Codex sur l'échantillonnage (CAC/GL 50-2004)
6. Paoletti, C., Heissenberger, A., Mazzara, M., Larcher, S., Grazioli, E., Van den Eede, G., Corbisier, P., Hess, N., Berben, G., Lübeck, P.S., De Loose, M., Moran, G., Henry, C., Brera, C., Folch, I. and J. Ovesna (2006). Kernel Lot Distribution Assessment (KeLDA): a study on the distribution of GMO in large soybean shipments. *European Food Research and Technology* 224:129-139.
7. EN ISO 21570 Foodstuffs - Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products – Quantitative nucleic acid based methods (ISO 21570:2005)
8. Scoring in Genetically Modified Organism Proficiency Tests Based on Log-Transformed Results, Michael Thompson, Stephen I. R. Ellison, Linda Owen, Kenneth Mathieson, Joanne Powell, Roger Wood and Andrew P Damant, *Journal of AOAC International*, 2006, 89(1), 232- 239
9. Holst-Jensen, A. and K. G. Berdal (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): pp 927-36.

10. Freese et al. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 6060-6066. Evaluating Homogeneity of LL601 Rice in Commercial Lots Using Quantitative Real-Time PCR
11. 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): pp136-155, 2005.
12. Grothaus, G. D. , 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.
13. Remund K.M., Dixon D.A., Wright D.L. Holden L.R. (2001). Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. *Seed Science Research*. **11**: pp 101-120.
14. E. Anklam, F. Gadani, P. Heinze , H. Pijnenburg, and G. Van den Eede (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
15. Miraglia, M., Berdal, K.G., Brera. C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E.J., Marvin, H.J.P., Schimmel, H., Rentsch, J., van Rie, J.P.P.F. and J. Zagon (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology* 42: 1157–1180.

ANNEXE I: INFORMATIONS À FOURNIR AU CODEX LORSQU'UNE MÉTHODE DOIT ÊTRE EXAMINÉE EN VUE DE SON APPROBATION PAR LE CCMAS

Afin de faciliter l'approbation par le Codex, et notamment par le CCMAS, d'une méthode d'analyse dans le secteur des aliments dérivés des biotechnologies, les informations suivantes devraient être fournies:

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

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:

Champ d'application et pertinence de la méthode

L'objectif de la méthode ainsi que sa pertinence au regard des exigences législatives devront être indiqués. En particulier, il faudra indiquer que les conditions de principes sont remplies pour la méthode.

Fondement scientifique

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.

Le modèle prédictif adopté pour interpréter les résultats et formuler des inférences devra être décrit de façon complète et détaillée.

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

Si le calcul des résultats s'appuie sur une relation mathématique, cette dernière doit être décrite et indiquée (par ex., méthode $\Delta\Delta Ct$, 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.

Le concept expérimental utilisé pour la validation et les analyses de routine, avec des détails sur le nombre d'essais, d'échantillons, de répétitions, de dilutions etc. devra être décrit.

INFORMATION SUR L'OPTIMISATION DE LA MÉTHODE

Paires d'amorces / sonde oligonucléotidique fluorescente testées

Pour ce qui concerne les méthodes PCR, une justification suffisante de la sélection des paires d'amorce ou des sondes oligonucléotiques fluorescentes proposées pour le gène cible et le gène de référence devra être fournie. Les limites du produit amplifié sont formées par les amorces aux deux extrémités. En conséquence le choix d'amorces ou de sondes appropriées est un facteur fondamental de l'analyse PCR.

Essai de sélectivité

Les résultats empiriques obtenus par l'essai de la méthode avec des événements de transformation d'ADN recombiné non ciblé et du matériel végétal à ADN non recombiné devront être présentés. Cet essai devrait comprendre des événements de transformation étroitement apparentés et des cas où les limites de sensibilité sont réellement testées. De plus, il peut être approprié, notamment pour les gènes de référence, de tester d'autres plantes afin de réduire la possibilité d'obtenir un faux positif.

Essai de stabilité

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 du gène de référence.

Essai de sensibilité

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 des plantes uniques, par exemple, « la limite de détection pour le soja Roundup Ready est de 0,1

pour cent de la totalité du soja *si le produit est composé de 100 pour cent de soja* ». 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 de l'ingrédient cible (par ex., le soja) présente dans le produit alimentaire et de la quantité totale d'ADN dérivée des autres ingrédients. 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.

La limite de détection devra être déterminée en termes d'équivalent-génome haploïde pour chaque système PCR séparément.

Essai de robustesse

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

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

APPLICATION PRATIQUE DE LA MÉTHODE

Applicabilité

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 matrices ou 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

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. Une indication des coûts serait particulièrement utile aux fins du Codex, ainsi que d'autres difficultés d'ordre pratique et de tout autre facteur qui pourrait être important pour les opérateurs.

Compétences requises de la part de l'opérateur

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

CONTRÔLES ANALYTIQUES

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. Il est toutefois admis que les échantillons de contrôle peuvent ne pas être disponibles, en particulier dans le cas de plantes inconnues/non approuvées /en cours d'approbation dérivées d'ADN recombiné.

Il faudra indiquer notamment ce qui suit:

- Les contrôles positifs et négatifs utilisés
- Les échantillons de contrôle, les plasmides et autres utilisés
- Les matériaux de référence utilisés, le cas échéant.

VALIDATION/PERFORMANCE DE LA MÉTHODE

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 et linéarité) et une évaluation que la méthode est apte au but poursuivi.

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

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

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 endogène et la séquence cible devrait se situer dans la même fourchette.

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

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 .

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 halogène et de filtres pour sélectionner une longueur d'onde spécifique. La détection et la quantification de la fluorescence pourrait aussi varier selon les instruments d'enregistrement et le logiciel utilisés.

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.

Compte tenu de toutes les différences, il est impossible 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

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 singleplex ou multiplex sont effectuées***

On entend par PCR multiplex 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 (par ex., un système spécifique d'évènement de transformation est associé à un taxon cible spécifique en vue d'une quantification relative). À moins qu'une optimisation appropriée du multiplex n'ait été effectuée, il faut souligner que la présence non équilibrée de l'une des séquences cibles conduira à une amplification préférée par la polymérase durant la PCR. De plus, la combinaison de différentes séries d'amorces est limitée 7 à 10 dans une seule réaction .

Les informations fournies devraient montrer la robustesse de la méthode aux fins de la transférabilité interlaboratoires. Cela signifie que la méthode devra avoir été essayée 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.

Et pour les méthodes fondées sur les protéines et celles fondées sur l'ADN:

- ***s'il y a des différences entre les méthodes PCR et les méthodes immunologiques en ce qui concerne les critères de validation***

Les techniques fondées sur l'ADN ou sur les protéines utilisées pour détecter et quantifier les aliments dérivés des biotechnologies 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 la modification génétique 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.

ANNEXE II: DÉFINITIONS CODEX APPLICABLES À L'ANALYSE DES ALIMENTS DÉRIVÉS DES BIOTECHNOLOGIES

La présente annexe porte sur les définitions nécessaires dans l'analyse des aliments dérivés des biotechnologies. (*Note: plusieurs définitions ont été regroupées sous un seul titre; il peut en résulter des contradictions qui devront être résolues. La définition figurant dans le Manuel de procédure du Codex doit être utilisée et amplifiée le cas échéant. Les définitions du Codex qui ne soulèvent aucune réserve aux fins de cette analyse n'ont pas été reproduites*).

Exactitude

L'exactitude est définie comme l'écart entre un résultat d'essai ou le résultat mesuré et la valeur vraie¹. 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.

Applicabilité

Les analytes, matrices et concentrations pour lesquels une méthode d'analyse peut être utilisée².

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.

Il n'est pas possible de fournir des matériaux de référence pour chacune des nombreuses matrices alimentaires disponibles, ce qui fait que l'utilisation d'une matrice représentative est en général nécessaire. L'utilisation de la méthode dans une nouvelle matrice devra être validée au minimum par un laboratoire unique, en général par des expériences d'ajout connu et de récupération et, le cas échéant, le matériau de référence utilisé devrait être décrit dans le rapport consigné au consommateur.

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 d'exactitude approprié.

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 (≤ 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 d'exactitude, comme démontré de manière satisfaisante par un essai collaboratif ou une validation par un laboratoire unique^{3 4}. Autrement elle peut être tirée de la dernière valeur obtenue avec des données fiables utilisées pour déterminer la limite de quantification.

Praticabilité

La 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 spécifique⁵.

¹ Définition tirée de ISO 3534-1.

² Légèrement modifié par rapport à la définition fournie dans le document du Codex portant la cote CX/MAS 02/4: Avant-projet de directives pour évaluer les méthodes d'analyse acceptables. Version novembre 2002.

³ 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.

⁴ Légèrement modifié par rapport à EN/ISO 24276:2006 (E).

⁵ Repris de EN/ISO 24276:2006 (E).

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

Écart-type de répétabilité (RSD_r)

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.⁶

Écart-type de reproductibilité (RSD_R)

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 le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même équipement dans un court intervalle de temps.⁷

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 normale⁸.

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.

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'une série importante de résultats d'essais et la valeur de référence acceptée⁹.

La mesure de la justesse est habituellement exprimée en termes de biais. La justesse a été aussi appelée « exactitude de la moyenne ».

⁶ Définitions reprises de ISO 3534-1.

⁷ Définitions reprises de ISO 3534-1

⁸ 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>

⁹ Repris de ISO 3534.

ANNEXE III: VALIDATION D'UNE MÉTHODE PCR QUANTITATIVE

INTRODUCTION

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). L'ADN étant une molécule qui est facilement dégradée durant les opérations de transformation des aliments (par exemple, par la chaleur, les enzymes et le cisaillement mécanique) nous demandons instamment que ce phénomène soit pris en compte dans l'évaluation des critères de performance de cette technique. En effet, dans la plupart des aliments les ingrédients sont présents non pas à l'état naturel mais transformés, ce qui a une incidence sur les protéines et/ou l'ADN qu'ils contiennent. Par ailleurs, la ou les protéine(s) et/ou l'ADN peuvent être dégradés, ou leur quantité totale peut être réduite du fait de la transformation. Toutes les méthodes de détection courantes (fondées sur l'ADN ou les protéines) sont donc concernées.

Il arrive souvent que les résultats d'une détermination soient exprimés en pourcentage d'un échantillon contenant une séquence dérivée d'une biotechnologie particulière. Dans un essai quantitatif, cette mesure implique en réalité deux déterminations fondées sur la PCR – celle de l'analyte principal (par exemple, une séquence de gène inséré) et celle de l'endogène, ou de la séquence de référence (par exemple, 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, l'analyte principal sera présent à faibles concentrations, et celui de référence 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.

En conséquence, l'analyse de l'ADN, en particulier dans les aliments transformés, cherche à détecter une très petite quantité d'analyte. Bien que le résultat d'une analyse PCR soit souvent exprimé en pourcentage comme la quantité relative d'un ADN spécifique pour les aliments dérivés de la biotechnologie moderne par rapport à la quantité totale d'ADN pour une espèce spécifique, la quantité réelle d'ADN spécifique pour les aliments dérivés des biotechnologie moderne est souvent de l'ordre du nanogramme/gramme ou moins. L'analyse de ces faibles quantités d'analyte s'accompagne d'une incertitude de mesure considérable, ce que les utilisateurs des résultats d'analyse doivent prendre en compte.

VALIDATION

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.

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 l'exactitude, 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.

Note: L'interprétation des valeurs en pourcentage fait encore 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. Pour le moment, les calculs poids/poids et nombre de copie/nombre de copie sont acceptables.

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 cible et du taxon**. L'ordre dans lequel ils sont énumérés ne reflète pas nécessairement leur ordre d'importance.

Exactitude

Comme pour toute méthode, l'exactitude d'une méthode devrait être comparée à des valeurs connues calculées à partir de matériaux de référence, théoriquement les mieux caractérisés. La fidélité sera déterminée de la manière courante à partir d'études dans un laboratoire unique (répétabilité) et dans plusieurs laboratoires (reproductibilité). Il convient toutefois de prendre en compte l'incidence de la différence des matrices entre l'échantillon à analyser et le matériau de référence.

Applicabilité

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

Fourchette dynamique – Fourchette de quantification

Le champ d'application des méthodes définit la fourchette de concentration dans laquelle l'analyte sera déterminé de façon fiable. La fourchette pour un aliment dérivé de la biotechnologie se situera entre près de zéro et 100 pour cent et pour le contrôle endogène la fourchette sera proche de 100 pour cent, à moins que l'on n'envisage d'analyser des mélanges complexes. 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.

La fourchette d'une méthode quantitative est en principe conçue pour se situer entre près de zéro et 100 pour cent (pourcentage d'ADN / molécules / molécules, génomes haploïdes / génomes haploïdes). 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 ex., 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 (limité uniquement par la pureté des matériaux végétaux utilisés) 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^{1,2,3}. Si l'on choisit d'utiliser l'ADN (génomique ou plasmidique) 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 d'exactitude 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.

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 limite de détection et de la limite de quantification du fait de la distribution non normale des variances dans les valeurs de cette fourchette.

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

Lorsque la validation d'un essai PCR quantitatif montre que l'essai peut mesurer une plante à ADN recombiné à (par exemple) 0,1 pour cent avec une justesse et une fidélité acceptable, il est souvent inutile de déterminer la limite de détection et la limite de quantification, 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 limite de détection et de la limite de quantification (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.

Il convient de noter qu'il n'est pas toujours nécessaire d'établir les limites de détermination et de quantification 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 limite de détection. Cependant, la limite de quantification sera toujours fixée et incluse dans l'étude de validation.

Si la limite de détection 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 limite de détection 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 limite de détection doit être déterminée expérimentalement, à moins que les concentrations visées ne dépassent largement la limite de détection, dans ce cas celle-ci n'a plus d'importance. Pour les méthodes quantitatives, la limite de détection 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 (≤ 5 pour cent de résultats faux négatifs. La limite de détection et le taux de faux positif, sont donc les seuls paramètres autres que la sélectivité requis pour une méthode qualitative .

Pour une méthode quantitative, il importe de savoir si la limite de quantification pour une matrice particulière est proche des valeurs à mesurer. En utilisant l'approche classique, la limite de quantification peut être exprimée comme la force du signal d'un blanc égale à la limite de détermination 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 limite de quantification qu'il devient inutile de la connaître. Toutefois, cette méthode de détermination ne fournit qu'une estimation de la limite de quantification réelle qui peut être une approximation artificiellement élevée ou basse.

Dans la pratique, deux procédures ont été utilisées pour déterminer la limite de quantification. La première consiste à doser des échantillons conventionnels auxquels on a ajouté des quantités connues d'analyte. La limite de détection est alors la teneur à laquelle la variabilité du résultat est conforme à certains critères préétablis. 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 que 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'aliments dérivés des biotechnologies. 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 l'évènement de transformation analysé.

La validation des méthodes comportent 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 due à une description ambiguë est très coûteuse. Par ailleurs, il convient d'indiquer que la mise en œuvre 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.

Pour une méthode quantitative, il importe de savoir si la limite de quantification pour une matrice particulière est proche des valeurs à mesurer. Les méthodes classiques qui consistent à se rapprocher de la limite de quantification (valeur zéro plus 6 à 10 écarts-types) reposent sur la distribution gaussienne normale des mesures du blanc autour de zéro. Cette approche n'est pas valable dans les méthodes comme la PCR quantitative, dans laquelle la distribution des valeurs de mesure pour les blancs est en général tronquée à zéro et n'est donc pas distribuée normalement. La limite de quantification doit donc être déterminée expérimentalement.

Praticabilité

La praticabilité de la méthode doit être démontrée.

Écart-type de répétabilité (RSD_r)

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

Écart-type de reproductibilité (RSD_R)

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.

Robustesse

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 ex., 29

vs. 30µl), la température d'anneau (par ex., plus et moins 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 plus de ±35 pour cent dans les expériences de reproductibilité par rapport à la réponse obtenue dans les conditions originales.

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.

Sensibilité

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 ou de la cible individuelle. 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 ≤30 pour cent.

Afin d'obtenir une courbe d'étalonnage pour les essais quantitatifs spécifiques d'un événement de transformation, des mélanges d'ADN étalon peuvent être préparés en associant de l'ADN génomique purifié provenant de matériau de plantes à ADN recombiné et non recombiné comme des semences ou des feuilles. La teneur en plante à ADN recombiné dans les mélanges peut être 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, et 0 pour cent ou selon qu'il convient pour une fourchette de concentration plus faible. Deux répétitions au moins doivent être analysées pour chaque point de la courbe d'étalonnage. Il faut signaler que les effets de matrice peuvent avoir une incidence sur les résultats car l'échantillon à analyser et le matériau de référence utilisé pour le calibrage peuvent être des matrices différentes et sont extraits séparément.

Pour les essais quantitatifs sur les gènes endogènes d'une plante, les mélanges d'ADN étalon peuvent être préparés en associant de l'ADN génomique purifié obtenu de l'espèce végétale cible et celui d'une espèce végétale non cible, sous réserve que les impuretés de l'ADN extrait n'interfèrent pas avec l'amplification. Par exemple, pour la validation d'un essai quantitatif de l'Adh1 du maïs, l'espèce végétale cible est le maïs et l'espèce végétale non ciblée peut être le soja ou une autre espèce. La teneur en ADN de l'espèce végétale cible dans les mélanges et en général 100, 50, 25, 10, 5, 1 et 0 pour cent ou selon qu'il convient. Au moins deux répétitions doivent être analysées pour chaque point de la courbe d'étalonnage. Il faut signaler que les effets de matrice peuvent avoir une incidence sur les résultats car l'échantillon à analyser et le matériau de référence utilisé pour le calibrage peuvent être des matrices différentes et sont extraits séparément.

Dans les cas où un laboratoire emploie la méthode ΔCT 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 de la cible

La spécificité de la détection et des gènes de références devrait être démontrée en fournissant des preuves expérimentales obtenues par l'essai de la méthode avec des événements de transformation d'ADN recombiné non cible et des plantes à ADN non recombiné. Cet essai devrait inclure des événements de transformation, et de préférence des cas où les limites de détection sont réellement vérifiées. Étant donné que la méthode devrait être spécifique à un événement de transformation, elle devrait fonctionner uniquement avec le produit alimentaire dérivé de la biotechnologie et ne devrait pas fonctionner lorsqu'elle est appliquée à d'autres événements de transformation déjà autorisés ou non. De plus, si un système de gène de référence fait partie de la méthode, il ne devrait pas reconnaître de séquences correspondant à des espèces même de parenté phylogénétique, et devrait donner des valeurs Ct analogues, non différentes statistiquement, lorsqu'on amplifie des quantités égales d'ADN provenant de différents cultivars d'origines très différentes du même taxon.

L'adéquation de l'essai doit être analysée pour chaque méthode. Il est nécessaire de fournir au Codex des renseignements sur l'essai de la spécificité de la cible en cas de gènes empilés à un moment quelconque.

Recommandation: La spécificité de la cible est le point de départ d'une méthode et doit être prise en compte durant la conception de l'amorce et des sondes. Les amorces devraient être confrontées à la séquence connue de l'insert pour l'événement de transformation et aux bases de données des séquences pertinentes pour d'éventuelles homologues. Après une telle évaluation théorique de la spécificité de la cible, la sélectivité doit

être démontrée de manière expérimentale. Les indications ci-après proposent une procédure d'expérimentation raisonnable qui pourrait être mise en œuvre durant la prévalidation d'un essai.

Pour les essais spécifiques d'un évènement de transformation:

- Analyser au moins dix évènements de transformation d'ADN recombiné non cible et toute plante à ADN non recombiné pouvant se trouver couramment comme contaminant dans le produit.
- 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.

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

Pour les essais sur les gènes (de référence) endogènes des plantes:

- Analyser au moins dix échantillons différents d'une plante comprenant des variétés différentes avec des origines génétiques très différentes de la même espèce végétale ainsi que d'autres espèces végétales importantes pour la production alimentaire (comme le blé, le riz, le maïs, la pomme de terre et le soja) et qui peuvent être présents couramment dans le produit.
- Tester un échantillon provenant de chaque source (un nombre approprié d'échantillons d'ADN).
- Analyser de deux répétitions pour chaque échantillon d'ADN qui donnera des résultats dans les limites d'une valeur Ct de 0,5.

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

Justesse

Recommandation: La justesse devrait être \pm [30 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.

CRITÈRES D'ACCEPTATION DU CONTRÔLE ANALYTIQUE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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 est souhaitable de s'écarter des dits critères et règles, il est nécessaire de 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.

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

- Le résultat du contrôle positif de l'ADN cible, avec par exemple 0,9 pour cent d'ADN recombiné, la moyenne des répétitions 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. 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.

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.

RÉFÉRENCES POUR L'ANNEXE III

1. Horwitz W; Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure and Applied Chemistry*, 67, 331 (1995)
2. Huebner P, Waiblinger H U, Pietsch K, Brodmann P (2001) Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *Journal of AOAC International* 84(6) 1855-1864;
3. Kay, S. and G. Van den Eede. The limits of GMO detection (2001). *Nature Biotechnology*. **19**(5): p 504.
4. Residue Chemistry Test Guidelines OPPTS 860.1340 "Residue Analytical Method" United States Environmental Protection Agency, August 1996, (Mihaliak & Berberich, 1995).

ANNEXE IV: VALIDATION D'UNE MÉTHODE PCR QUALITATIVE

Introduction

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 donne 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 microbiens¹. Ce concept peut s'appliquer aux essais de PCR qualitative. 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. Il est toutefois reconnu que dans certains cas il n'y a pas de matériau de référence disponible, par exemple lorsqu'il s'agit d'un produit non approuvé de la biotechnologie moderne.

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 l'exactitude 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

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:

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

Taux de faux négatifs

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'essai 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:

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

Note: Les définitions diffèrent selon les secteurs.

Afin de montrer le taux de faux négatifs dans un essai qualitatif, une série d'échantillons (par ex., pools de grains ou de semences) avec une concentration connue constante de matériau positif dans un pool de matériau négatif (par ex., 1 grain positif pour 199 grains de maïs classique) 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 permet 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 de grains positifs (exprimée comme le nombre de grains positifs dans un pool de grains négatifs).

Robustesse

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 qui pourraient intervenir pour des raisons techniques.

Valeur des critères d'acceptation et interprétation des résultats

Une méthode validée inclut les valeurs des critères de performance qui permettent d'apprécier si un résultat de mesure observée peut être considéré comme acceptable. Il importe de respecter ces critères et les systèmes d'aide à la décision pour l'analyse et l'interprétation des données. Il est donc important de s'assurer que le résultat du contrôle positif de l'ADN cible, le cas échéant, est positif. De même, le contrôle du réactif d'amplification doit être négatif. En plus de ces contrôles, il est souhaitable d'effectuer une réaction parallèle sur le même échantillon d'ADN à l'aide d'une série d'amorces qui détecte une séquence endogène en copie unique pour déterminer l'impact des inhibiteurs de la PCR qui pourraient être présents. Cette réaction sera effectuée sur chaque échantillon d'ADN sur lequel aucune amplification n'a été observée, et peut être effectuée dans la même réaction (multiplexée) ou comme une réaction distincte sur le même extrait d'ADN. Dans le cas de réactions multiplexées, il est important que la réaction endogène n'élimine pas la réaction spécifique de l'évènement de transformation pour les réactifs, car il est probable que la séquence endogène sera présente jusqu'à 1000 fois la quantité de la séquence cible. L'optimisation des conditions de la PCR aura pris en compte ces éléments. La réaction du contrôle de l'inhibition avec la séquence endogène donne une indication de la qualité de l'ADN en tant qu'étalon pour la PCR. Le Tableau 1 établit les critères d'acceptation/de rejet pour la PCR par ligne, en utilisant les résultats de la PCR avec une séquence endogène.

Autrement, cette réaction du contrôle de l'inhibition peut être réalisée avec de l'ADN dopé et l'essai PCR approprié, n'interférant pas.

Tableau 1: Critères pour évaluer les analyses PCR quantitatives

Résultat de la PCR (analyte GM)	Résultat de la PCR (endogène)	Évaluation de l'essai
Positif	Positif	Positif
Négatif	Positif	Négatif
Positif	Négatif	Répéter
Négatif	Négatif	Répéter

Une autre complication intervient toutefois du fait que les PCR qualitatives sont en général effectuées au moins en duplicats. Il peut donc arriver que les duplicats ne donnent pas les mêmes résultats. Il est courant de répéter les réactions PCR au moins une fois sur les échantillons d'ADN qui sont rejetés pour incohérence des résultats obtenus lors des répétitions. Un résultat indéterminé répété indique que l'analyte ne peut être détecté de façon fiable (Tableau 2), et que l'essai est réalisé en dessous de la limite de détection car, par définition, un taux de détection d'au moins 95 pour cent devrait être obtenu à la limite de détection. L'échantillon sera donc évalué en dessous de la limite de détection. Les mêmes critères s'appliquent si plusieurs répétitions sont effectuées sur chaque échantillon d'ADN.

Tableau 2: Critères pour évaluer les duplicats des analyses PCR qualitatives notées selon le tableau 1.

Résultat 1	Résultat 2	Résultat de l'analyse
Positif	Positif	Positif
Négatif	Positif	Répéter /Indéterminé
Positif	Négatif	Répéter /Indéterminé
Négatif	Négatif	En dessous de la LOD

RÉFÉRENCES POUR L'ANNEXE IV

1. AOAC[®] Official MethodsSM Program Manual, Appendix X p14f, May 2002, AOAC International; <http://www.aoac.org/vmeth/omamannual/htm>.

ANNEXE V: VALIDATION D'UNE MÉTHODE FONDÉE SUR LES PROTÉINES¹

ESSAI QUANTITATIF

Les immuno-essais quantitatifs sont utilisés pour déterminer les concentrations de l'analyte protéique dans des parties spécifiques de la plante (par ex., semence, feuille, racine, tige, etc.) d'un cultivar ou d'un mélange de cultivars. On trouvera des applications courantes au tableau 1. Afin d'appliquer une méthode de détection immunologique comme une ELISA sur microplaque pour la détermination quantitative d'un analyte protéique dans du tissu végétal, il convient d'abord d'obtenir un échantillon représentatif du matériau végétal. 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 détergents ou des surfactants sont parfois ajoutés en fonction de l'essai et des matrices validés. Certaines protéines nécessitent des procédures plus rigoureuses comme l'homogénéisation ou la cuisson dans des solvants, détergents, sels, etc.

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 exprimées dans des plantes à ADN recombiné.

Après la réalisation des parties plus ou moins spécifiques des essais de détection comme l'immobilisation de l'anticorps de capture sur la surface des puits d'une microplaque, un volume précis de la solution étalon ou d'extrait de l'échantillon est ajouté à chaque puits. L'analyte dans la solution d'essai se fixe à l'anticorps de capture. Le second anticorps marqué par l'enzyme est alors ajouté et se fixe aussi à l'analyte, formant un sandwich. À ce moment, le puits est lavé pour éliminer l'analyte et les anticorps non fixés, laissant uniquement le complexe anticorps-analyte-anticorps fixé à la surface du puits. Un substrat colorimétrique est ajouté qui est transformé par l'enzyme et forme un produit coloré. La réaction est interrompue après une période de temps déterminée et l'absorbance de la couleur à une longueur d'onde donnée est mesurée par un photomètre. La courbe d'étalonnage est obtenue en reportant la densité optique sur l'axe des y et la concentration sur l'axe des x , ce qui donne une courbe dose/réponse utilisant une équation quadratique ou autre modèle de courbe ajustée requis par la méthode.

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 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 du matériau végétal 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.

On peut utiliser différents contrôles pour prouver la performance de l'essai. Un échantillon blanc comme un puits vide ou une solution tampon peuvent être insérés 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 de contrôle 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 contrôles négatifs, les contrôles positifs, les extraits d'échantillon fortifié le cas échéant, les matériaux de référence, les extraits de matériau de référence et les répétitions sont en général passés sur chaque microplaque pour contrôler les variations d'une plaque à l'autre.

MATÉRIAUX DE RÉFÉRENCE

Le matériau de référence comprend la même matrice que le produit agricole à tester. Par exemple, si la matrice à tester est la graine de soja, le matériau de référence normalisé sera de la graine de soja contenant une proportion connue de graine de soja à ADN recombiné. Autrement, un échantillon ou un extrait pur de la protéine particulière 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 (par ex. l'amidon) 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 introduites dans les produits agricoles à ADN

recombiné. Le meilleur matériau de référence disponible devrait être utilisé afin de respecter les règlements et les exigences d'essai.

Dans le cas de produits comme les grains ou les semences, où le produit est formé d'unités discrètes, il est très aisé de préparer un échantillon de référence avec une proportion déterminée de matériau à ADN recombiné. Dans d'autres cas, créer des échantillons de référence pour certaines matrices 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, il sera difficile d'associer des matériaux à ADN recombiné et à ADN non recombiné de façon à obtenir un échantillon de référence homogène avec une proportion déterminée de matériau à ADN recombiné. 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 matériau à ADN non recombiné et à ADN recombiné qui serviront de contrôles négatifs et positifs.

En cas de manque de continuité dans la fourniture des étalons, comme par exemple le retrait du marché d'une plante à ADN recombiné, des solutions appropriées devront être trouvées pour se procurer des contrôles positifs.

Durant la mise au point d'un essai, le matériau de référence est utilisé pour aider à sélectionner les paramètres de l'essai qui réduiront le plus possible les effets d'interférence de la matrice (par ex., liaison non spécifique de composants de l'échantillon aux anticorps ou inhibiteurs d'enzymes). Durant la validation et l'exécution de l'essai, les matériaux de référence peuvent être extraits et analysés en même temps que les échantillons pour essai de sorte que les résultats puissent être comparés directement.

VALIDATION D'UNE MÉTHODE QUANTITATIVE FONDÉE SUR LES PROTÉINES

Les principes de la validation des méthodes décrits aux Annexes III et IV pour les méthodes PCR s'appliquent aussi aux méthodes fondées sur les protéines. En ce qui concerne les trousseaux d'immuno-essai disponibles dans le commerce, la performance de l'essai est généralement validée par le fabricant dans un laboratoire unique ou dans des essais collaboratifs et est documentée dans le mode d'emploi.

La validation devrait être menée conformément au protocole harmonisé ISO/UIPAC/AOAC pour les méthodes d'analyse chimique. Ce document définit les procédures nécessaires pour valider une méthode².

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).

Efficacité de l'extraction: 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. La protéine introduite exprimée étant endogène de la plante, l'efficacité de la procédure d'extraction peut être difficile à démontrer vraiment. 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 chaque type d'analyte protéique introduit 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 la protéine ne puisse plus être détectée (Stave, 1999).

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 de tissu de plante à ADN recombiné et un autre extrait de tissu de plante à ADN non recombiné. Ces extraits seront stockés congelés 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). La fidélité des méthodes quantitatives fondées sur les protéines est en général plus grande que pour les méthodes PCR.

Recommandation: L'exactitude devrait se situer entre [± 25 pour cent] de la valeur de référence acceptée dans l'ensemble de la fourchette dynamique.

Sensibilité:

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 dérivée de la plante à ADN recombiné pouvant être détectée lorsqu'elle est associée à la protéine extraite de l'échantillon d'ADN non recombiné (Rogan *et al*, 1999). Des divergences peuvent apparaître lorsque la protéine d'intérêt est la même pour plusieurs événements de transformation bien qu'ils aient différents taux d'expression de la protéine. Par exemple, deux événements de transformation peuvent exprimer la même protéine mais les taux d'expression de la protéine sont différents dans le grain récolté (ainsi que dans d'autres parties de la plante). De même, il y a probablement une grande variabilité dans les expressions de protéine selon les conditions de croissance. Si le matériau de référence (utilisé pour le calibrage d'une méthode ELISA) a un taux d'expression relativement élevé, le test sous-estimera la présence dans le matériau provenant de plantes cultivées dans des conditions qui induisent des niveaux d'expression plus faibles

Fourchette dynamique – Fourchette de quantification

Le champ d'application d'une méthode définit la fourchette de concentration au-dessus de laquelle l'analyte sera déterminé avec exactitude. Dans la plupart des cas la fourchette d'analyse se situe, pour un aliment dérivé de la biotechnologie, entre un dixième de point de pourcentage et quelques points de pourcentages. Cette fourchette de concentration souhaitée définit les courbes d'étalonnage et un nombre suffisant d'étalons doit 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.

L'interprétation des valeurs en pourcentage (par ex., fourchette dynamique entre 10 et 500 pour cent de la valeur cible) peut être difficile lorsqu'on utilise des méthodes quantitatives. Les méthodes quantitatives fondées sur les protéines donnent en général une estimation de la concentration de la protéine dérivée de plantes à ADN recombiné dans la matrice, étant donné les variations dans l'expression de la quantité de protéine présente dans les différents tissus des plantes ou entre les cultivars, et dans le même tissu à différents emplacements. L'utilisation des méthodes qualitative fondées sur les protéines est donc beaucoup plus répandue. Par ailleurs, il faut veiller 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 que l'ADN; il convient donc de tenir compte de la perte de signal due aux effets de la transformation des aliments.

Il est intéressant de noter qu'il n'est pas toujours nécessaire de déterminer la limite de détection ou la limite de quantification pour établir la validité d'une méthode pour une application donnée. Par exemple, cela n'ajoute pas grand-chose si une limite de détection est déterminée comme étant de 1ng/kg, alors que le champ d'application de la validation de la méthode porte uniquement sur des concentrations de l'ordre du g/kg. Dans ce cas, la fiabilité de la méthode sera prouvée par d'autres paramètres et aucune mesure ne sera prévue dans la validation de la méthode pour évaluer la limite de détection. En revanche, la limite de quantification sera toujours établie et incluse dans l'étude de validation.

Limite de détection (LOD)

La limite de détection est définie à l'Annexe II. Les protéines sont présentes dans les aliments dérivés des biotechnologies à des niveaux de concentration plus élevés que l'ADN cible pour les méthodes PCR. Les effets stochastiques ont donc moins d'influence sur la détermination de la limite de détection que lorsqu'on utilise la PCR.

Il est courant lorsqu'on estime la limite de détection 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 mesure du blanc autour de zéro. Cette hypothèse convient en général pour des méthodes comme ELISA, mais la meilleure détermination de la limite de détection s'obtient de façon expérimentale. Autrement, la limite de détection 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)

Pour une méthode quantitative, il importe de savoir si la limite de quantification pour une matrice particulière est proche des valeurs à mesurer. Avec une approche classique, la limite de quantification peut

être exprimée comme étant la force du signal d'un blanc égale à la limite de détermination 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 limite de quantification que cette connaissance devient inutile. Cependant, cette façon de déterminer la limite de quantification ne produit qu'une estimation de la limite de quantification réelle qui peut se révéler être une approximation artificiellement élevée ou faible .

Dans la pratique, deux procédures ont été employées pour déterminer la limite de quantification. La première consiste à doser un nombre d'échantillons conventionnels auxquels ont été ajoutés des quantités connues d'analyte. La limite de quantification 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 CV de ≤ 20 pour cent et une récupération de 70 à 120 pourcent³. La récupération de la protéine peut, toutefois, être difficile pour certaines matrices, par ex., 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 de l'aliment dérivé des biotechnologies. 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 l'évènement de transformation concerné. Les procédures d'évaluation de la limite de détection et de la limite de quantification durant la validation de méthodes PCR quantitatives sont également examinées dans les Annexes III et IV.

Spécificité de la cible

On entend par spécificité de la cible la mesure dans laquelle des analogues ou d'autres molécules se fixent aux anticorps; elle devrait être caractérisée et décrite dans la méthode. La spécificité de la cible devrait être démontrée par des résultats expérimentaux obtenus en testant la méthode avec des événements de transformation d'ADN recombiné non cible et des plantes à ADN non recombiné. Ce test devrait inclure des événements de transformation étroitement apparentés et des cas où les limites de détection sont vraiment testées. Étant donné que la méthode devrait être spécifique à une protéine, elle devrait être fonctionnelle uniquement avec l'aliment dérivé des biotechnologies étudié et ne devrait pas l'être si elle est appliquée à des événements de transformation qui n'expriment pas la protéine en question. Le potentiel d'interférences des réactifs et du matériel de laboratoire peut être évalué en dosant des extraits de matériau végétal à ADN non recombiné.

Effets de matrice: 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) de gérer les effets de matrice consiste à préparer les solutions-étalons dans des extraits provenant de matrice à ADN non recombiné, c'est-à-dire des étalons correspondant à la matrice. On pourrait ainsi garantir que les effets de matrice sont constants entre les étalons et les échantillons.

Robustesse

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 ± 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 l'exactitude et de la fidélité dans les échantillons fortifiés utilisant du matériau de contrôle provenant de plusieurs sources.

ESSAI QUALITATIF (SEUIL)

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 . Si c'est le cas,

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. 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.

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 des protéines dérivées de plantes à ADN recombiné au-dessus ou au-dessous du seuil, il faut doser simultanément une référence négative et une référence seuil contenant une proportion connue de la plante à ADN recombiné. La référence négative est un échantillon de la matrice de test 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 d'échantillons est analysé pour garantir que la sensibilité de l'essai est adéquate pour déterminer si le niveau dans l'échantillon test 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

Les mêmes principes s'appliquent aux essais qualitatifs fondés sur les protéines qu'aux essais qualitatifs PCR. 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, il faut utiliser des puits doubles.

Les mêmes types d'échantillon de contrôle, et les critères d'acceptation ou de rejet du résultat peuvent être utilisés que pour les méthodes PCR qualitatives. La limite de détection 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 limite de détection.

RÉFÉRENCES POUR L'ANNEXE V

1. 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.
2. Horwitz W; Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure and Applied Chemistry*, **67**: 331 (1995).
3. Mihaliak, C.A. and Berberich S.A. "Guidelines to the Validation and Use of Immunochemical Methods for Generating Data in Support of Pesticide Registration", in: Nelson, J.O., Karu, A.E. and Wong, R.B. (eds.) (1995). *Immunoanalysis of Agrochemicals: Emerging Technologies*, ACS Symposium Series No. 586, American Chemical Society: pp. 288 – 300
4. J.W. Stave (1999) Detection of the new or modified proteins in novel foods derived from GMO-future needs, *Food Control* **10**: pp. 367–374.
5. Rogan G.J., Dudin Y.A., Lee T.C.; Magin K.M., Astwood J.D., Bhakta N.S., Leach J.N., Sanders P.R., Fuchs R.L. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready(R) soybeans (1999) *Food Control* **10**(6): pp. 407-414.

ANNEXE VI: ESSAIS D'APTITUDE DES ALIMENTS DÉRIVÉS DES BIOTECHNOLOGIES: Interprétation des z-scores calculés à partir de données log-transformées

NOTE: RSC Analytical Methods Committee Technical Brief 18: téléchargé à l'adresse suivante www.rsc.org/lap/rsccom/amc/amc_index.htm

Dans certains essais d'aptitude concernés par la mesure de la proportion d'aliments dérivés des biotechnologies dans les aliments, les résultats produits sont log-transformés (convertis en logarithmes) avant de calculer les z-scores [1]. La transformation peut se justifier à la fois dans la théorie et dans la pratique. Cependant, la transformation donne lieu à des z-scores qui ne sont pas du même type d'échelle que les données originales, et sont donc moins facilement interprétées. Quelques indications générales sur la transformation logarithmique peuvent être utiles.

Qu'est-ce qu'une distribution log-normale?

La Figure 1 montre la densité d'une variable à distribution logarithmo-normale. Elle est asymétrique, avec une asymétrie positive et toutes les valeurs de x nécessairement supérieures à zéro. Autrement, si nous représentons graphiquement la densité en fonction du logarithme de x , on observe la forme familière d'une distribution normale (Figure 2). (Les logarithmes de base dix sont utilisés dans la présente note.)

Définition: une variable x a une distribution log-normale si $\log x$ est distribué normalement.

Alors que toutes les distributions normales ont essentiellement la même forme, la forme d'une distribution log-normale est fonction de son écart type relatif (exprimé ici en fraction). Par exemple, la distribution fortement asymétrique de la figure 1 a un écart-type relatif de 0,3, tandis que la figure 3, également log-normale mais avec un écart-type relatif de 0,1, montre seulement une faible asymétrie. (À des fins de référence, les résultats d'un cycle d'essai d'aptitude d'une plante à ADN recombiné a en général un écart-type relatif d'environ 0,7).

Données provenant d'essais d'aptitude d'aliments dérivés des biotechnologies

À l'heure actuelle, presque toutes les mesures quantitatives d'une espèce génétiquement modifiée dans un aliment reposent sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR). Dans les études interlaboratoires comme l'essai d'aptitude, les résultats montrent presque invariablement une distribution fortement asymétrique des résultats, par exemple Figure 4. Un certain nombre de raisons font que ce résultat est prévisible. Tout d'abord, la procédure peut démarrer avec un petit nombre de copies du gène, de sorte qu'il y a une distribution binomiale des copies dans l'échantillon pris pour la PCR. Les distributions binomiales sont désaxées vers la droite pour les petits nombres de copies. Si l'ADN est associé à un petit nombre de particules, l'échantillonnage de ces particules pourrait donner lieu à un résultat asymétrique même si le nombre de copies est raisonnablement important. La fonction de calibrage dans la PCR est de forme log-linéaire ce qui tend à produire une distribution log-normale des résultats à partir d'un intrant normal. Enfin, il y a la distribution normale usuelle des erreurs provenant du système d'affichage instrumental.

Il ressort de ce qui précède que la distribution des erreurs devrait en principe être une convolution complexe de types de distribution, mais tendant vers une asymétrie positive. Il est donc tentant de suggérer que la log-transformation des résultats des participants peut être appropriée avant la formation des z-scores. Une étude détaillée des données provenant d'essais d'aptitude a justifié cette mesure dans la pratique [2]. Mais comment établir une relation entre ces z-scores et la pratique quotidienne et la performance des laboratoires?

Établissement des z-scores dans les essais d'aptitude de plantes dérivées d'ADN recombiné

Il ne faut pas perdre de vue que, dans les essais quantitatifs des aliments dérivés des biotechnologies, les erreurs semblent davantage se multiplier que s'additionner comme c'est le cas dans la plupart des autres travaux d'analyse. Dans ce contexte, la log-transformation a une propriété très utile, à savoir que différents ensembles de données avec le même écart-type *relatif* dans l'échelle originale ont le même écart-type *absolu* dans l'échelle logarithmique. Dans le cas de l'essai d'aptitude d'aliments dérivés des biotechnologies, cette propriété permet d'établir une seule valeur σ_p pour le programme, quelque soit la concentration de l'analyte (excepté, bien sûr, lorsque la concentration est zéro, ou très proche de zéro). Un z-score peut alors être calculé à partir d'un résultat x et d'une valeur attribuée x_a (tous deux dans l'échelle originale) selon l'équation

$$z = (\log x - \log x_a) / \sigma_p = \log(x/x_a) / \sigma_p .$$

$\log x_a$ sera en général la moyenne robuste des valeurs de $\log x$. La valeur σ_p (l'écart-type pour l'aptitude, appelé auparavant la 'valeur cible') devrait, si possible, être un critère de conformité aux besoins.

Ainsi, si la conformité aux besoins nécessite qu'un résultat satisfaisant se situe dans les limites de (par exemple) $0.5x_a$ et $2.0x_a$, il faudra fixer σ_p de sorte que ces résultats limites produisent des z-scores de -2 et $+2$ respectivement. En substituant dans l'équation ci-dessus les valeurs correspondantes $z=2$ et $x=2.0x_a$ on obtient

$$2 = (\log 2x_a - \log x_a) / \sigma_p \text{ ou}$$

$$\sigma_p = \frac{1}{2} \log 2 = 0.1505 .$$

(En utilisant $z=-2$ et $x=0.5x_a$ on obtient le même résultat: à essayer!)

En généralisant, si les limites données par x_a/q et qx_a sont demandées, il faut $\sigma_p = \frac{1}{2} \log q$. De plus, on peut facilement commuter un z-score et la valeur correspondante de $r = x/x_a$ (le facteur par lequel un résultat diffère de la valeur attribuée) en utilisant les équations $r = 10^{z\sigma_p}$ et $z = \log r / \sigma_p$. Par exemple, si $z=3.5$ et $\sigma_p = 0.1505$, on obtient $r = 10^{0.527} = 3.36$: le résultat dépasse la valeur attribuée par un facteur de 3,36.

Conclusion

Le point essentiel ici est que les erreurs majeures semblent être multiplicatives dans les essais quantitatifs des aliments dérivés des biotechnologies reposant sur la PCR. En conséquence, l'incertitude de l'échelle de mesure originale n'est pas distribuée symétriquement autour du résultat. Néanmoins, les z-scores reposant sur des données log-transformées peuvent quant même être traitées comme étant symétriques: un z-score de $-3,5$ a la même importance qu'un z-score de $+3,5$. Des considérations du même ordre peuvent s'appliquer à tout système de mesure (comme la microbiologie quantitative) reposant sur une procédure multiplicative.

NOTE: Le présent résumé technique a été préparé pour le Comité des méthodes d'analyse par le sous-comité des statistiques (Président M Thompson) avec l'appui de la Food Standards Agency.

RÉFÉRENCES POUR L'ANNEXE VI

1. Powell, J. and L Owen (2002). Reliability of food measurements: the application of proficiency testing to GMO analysis. Accreditation and quality assurance. **7**: 392-402.
2. Thompson, M., Ellison, S. I. R., Owen, L., Mathieson, K., Powell, J., Wood, R. and Andrew P Damant (2006). Scoring in Genetically Modified Organism Proficiency Tests Based on Log-Transformed Results, , Journal of AOAC International, **89(1)**: 232- 239

Figures:

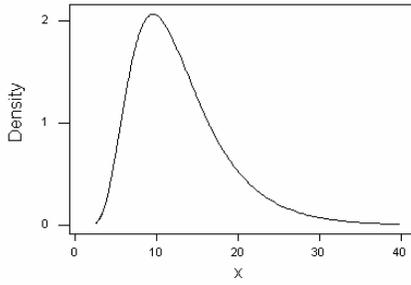


Figure 1. Une distribution log-normale avec un écart-type relatif de 0,3.

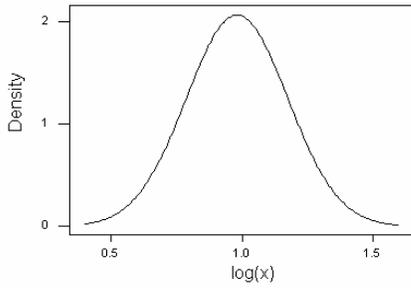


Figure 2. La même distribution que pour la Figure 1, la densité étant représentée en fonction de $\log x$.

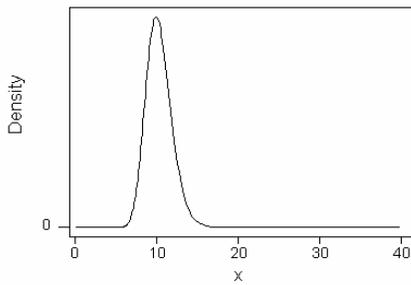


Figure 3. Une distribution log-normale avec un écart-type relatif de 0,1.

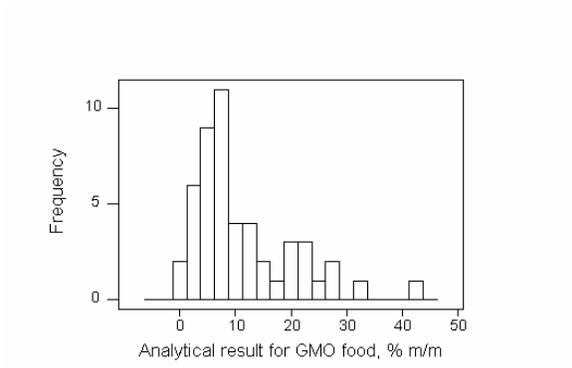


Figure 4. Résultats obtenus par un cycle unique d'un essai d'aptitude impliquant la mesure de la concentration d'une plante de soja à ADN recombiné.