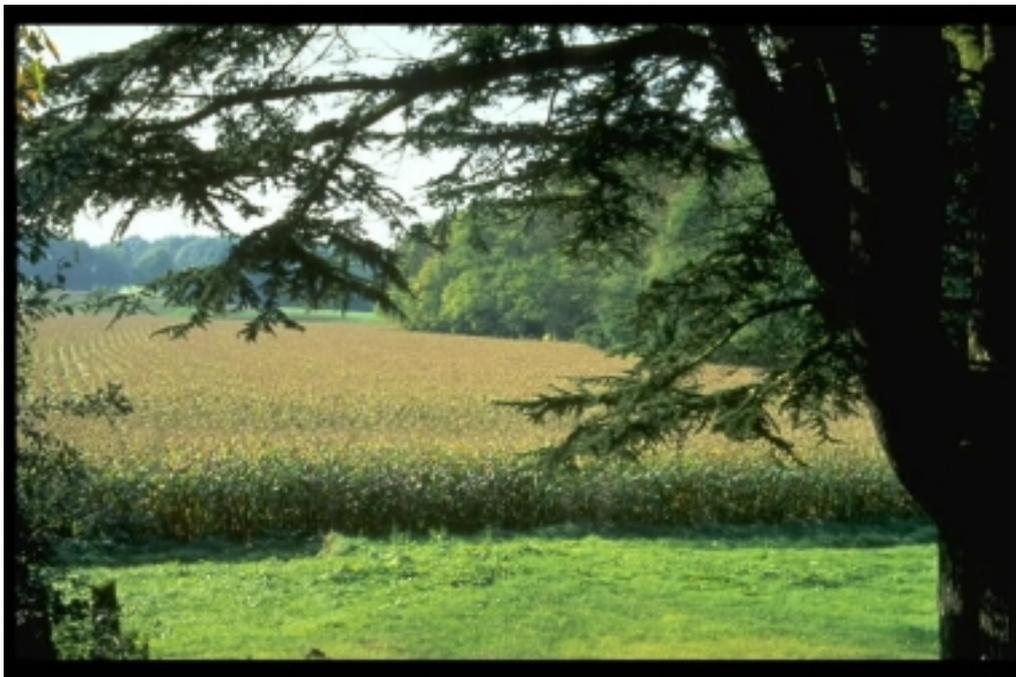


# **PROGRAMME DE RECHERCHE**

---

Pertinence économique et faisabilité d'une filière  
« sans utilisation d'OGM »



Elaboration d'un référentiel scientifique et technique  
permettant de caractériser les produits agricoles et  
alimentaires garantis « sans OGM »

Yves BERTHEAUX



# Sommaire

<b>0.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>3</b>
<b>I.</b>	<b>Définition du périmètre d'une filière « sans utilisation d'OGM » .....</b>	<b>4</b>
I.1	Produits .....	4
a	<i>Généralités.....</i>	<i>4</i>
b	<i>Plantes génétiquement modifiées (PGM).....</i>	<i>5</i>
c	<i>Animaux génétiquement modifiés.....</i>	<i>13</i>
d	<i>Microorganismes génétiquement modifiés (MGM) et produits dérivés .....</i>	<i>14</i>
e	<i>Conclusions .....</i>	<i>15</i>
I.2	Seuil .....	15
a	<i>Aspects analytiques.....</i>	<i>16</i>
b	<i>Aspects économiques et pratiques.....</i>	<i>16</i>
c	<i>Conclusions .....</i>	<i>17</i>
<b>II</b>	<b>La détection des OGM .....</b>	<b>18</b>
II.1	Principes généraux .....	18
II.2	Les plans de contrôle.....	19
a	<i>Plans de contrôles à un groupe (ou « plans simples »).....</i>	<i>19</i>
b	<i>Plans de contrôles à plusieurs groupes (plans par groupes ou « plans multiples » selon certaines terminologies).....</i>	<i>20</i>
c	<i>Domaines d'applications des plans de contrôles selon le nombre de groupes.....</i>	<i>21</i>
II.3	Les méthodes de détection des analytes .....	22
a	<i>Méthodes basées sur le phénotype.....</i>	<i>22</i>
b	<i>Méthodes basées sur les acides nucléiques .....</i>	<i>23</i>
c	<i>Compatibilité des méthodes .....</i>	<i>25</i>
d	<i>Recherche de PGM non autorisées.....</i>	<i>26</i>
II.4	Eléments de choix des méthodes et des laboratoires .....	27
a	<i>Eléments de choix.....</i>	<i>27</i>
b	<i>Méthodes validées par un test inter-laboratoires vs. méthodes intra-laboratoire basées sur des critères de performance. ....</i>	<i>28</i>
<b>III</b>	<b>La traçabilité .....</b>	<b>29</b>
<b>IV</b>	<b>Surcoûts éventuels dus aux analyses.....</b>	<b>29</b>
IV.1	Résultats de l'enquête menée avec le groupe 4 .....	29

IV.2	Origines d'éventuels surcoûts dus aux analyses.....	30
a	<i>Surcoûts dus aux analyses dans le cas des semences.</i> .....	31
b	<i>Répercussion du prix des semences sur celui des produits de première transformation</i> .....	34
IV.3	Certification de l'aval de la filière « sans utilisation d'OGM » et analyses.....	36
IV.4	Conclusion .....	36
<b>V</b>	<b>Développements méthodologiques.....</b>	<b>37</b>
V.1	Introduction .....	37
V.2	Résultats .....	37
a	<i>P35S</i> .....	37
b	<i>Gène de référence du maïs</i> .....	38
c	<i>Gène de référence du soja</i> .....	38
d	<i>Test PCR de suspicion de faux positifs P35S</i> .....	38
V.3	Conclusion .....	38
<b>VI</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>39</b>
	<b>Annexe : Les plans de contrôles simple et par groupe. André Kobilinsky (INRA).....</b>	<b>46</b>

## 0 Introduction

### *Objectifs*

Ce programme visait à :

définir les caractéristiques techniques du périmètre (produits, seuils, obligations...) d'une éventuelle filière « sans utilisation d'OGM »,

fournir aux autres programmes du projet, à partir des périmètres potentiels, des scénarii, devant leur permettre d'entamer leurs études de faisabilité et de pertinence économique, ainsi que de connaître les opinions et attitudes des consommateurs,

apprécier les éventuels surcoûts dus aux analyses d'une telle filière,

développer en 20 mois un test permettant, dans l'état actuel des autorisations (1998-2000), une certification des produits par la détection par PCR des OGM présents dans le soja et le maïs (cadre restreint du présent programme).

### *Dispositif de travail*

Le travail au cours des vingt mois de l'étude a consisté

à animer les réunions du groupe de travail (GT2) du programme et synthétiser avec I. Avelange les discussions,

solliciter les professionnels tant du groupe de travail qu'extérieurs, directement ou au travers de leurs syndicats professionnels,

compiler les documents bibliographiques ou connaissances d'autres origines ayant trait au programme,

élaborer un formulaire d'enquête et analyser les résultats de l'enquête qui s'est déroulée avec celle du programme 4,

développer au laboratoire de Versailles un ensemble de tests (criblage P35S, gènes de référence maïs et soja) permettant de détecter au minimum dans les produits peu ou pas transformés et de les quantifier au moins dans les produits purs.

## **I. Définition du périmètre d'une filière « sans utilisation d'OGM »**

### **I.1 Produits**

#### **a Généralités**

Le développement d'une telle filière doit s'inscrire au minimum dans le cadre réglementaire concernant les OGM, et en particulier les directives européennes 90/219/CEE (98/81/CEE), 90/220/CEE (2001/18/CEE), leur transcription dans le droit national comme la loi 92-654 du 13 Juillet 1992 et les décrets, arrêtés et circulaires d'application correspondants, enfin les règlements européens concernant les nouveaux aliments et nouveaux ingrédients, additifs et arômes (258/97/CE, 1139/98/CE, 49/2000/CE, 50/2000/CE).

Plus globalement, le développement d'une telle filière doit s'inscrire dans le cadre général législatif et réglementaire français, concerné en particulier par le code de la consommation mais aussi par le code rural et la récente loi d'orientation agricole, en ce qui concerne la biovigilance ou le contrôle des semences.

Malgré les similarités existant obligatoirement, au travers du cadre réglementaire européen, ou pouvant exister (cadre national non couvert par une directive ou un règlement européen comme celui des auxiliaires technologiques issus de micro-organismes génétiquement modifiés) entre les législations et réglementations des pays membres de l'UE, cet exercice est donc fondamentalement restreint à la France, avant toute éventuelle tentative d'harmonisation européenne. Les limites de cet exercice à la France sont d'autant plus nettes que certains pays comme la Suisse et l'Allemagne ont dorés et déjà défini les caractéristiques de telles filières « sans utilisation d'OGM ».

Rappelons enfin que le projet ne concernait que les OGM actuellement autorisés dans l'UE et plus particulièrement le soja et le maïs, ce dernier choix tenant compte, entre autres, des proportions en cultures OGM dans le monde de ces espèces. La durée du programme et les sommes allouées impliquaient donc que les développements se focalisent sur une technique générale de détection des OGM autorisés concernant le soja et le maïs, avec toutes les limites que l'on connaît à ce genre de détection / quantification (Bertheau 1998 ; Bertheau et Diolez 1999, 2000 ; Philipp *et al.* 2000).

## **b Plantes génétiquement modifiées (PGM)**

Malgré la limitation du programme aux OGM actuellement autorisés dans l'UE, il paraît important, en raison de l'impact des transactions commerciales avec des pays tiers, de synthétiser les données actuellement disponibles sur les PGM actuellement commercialisés de par le monde. Les USA, l'Argentine et le Canada concentrant à eux seuls plus de 95 % des surfaces cultivées en OGM (68, 23 et 7 % respectivement ; James 2000), nous rappellerons dans les tableaux suivants, les types d'OGM autorisés dans ces pays, sachant qu'ils sont des candidats à de futures demandes d'autorisation dans l'UE. Les autres pays représentent moins de 1% des surfaces cultivées en PGM, seules l'Australie et l'Afrique du Sud dépassant les 100 000 ha.

Remarquons qu'un nombre croissant d'OGM autorisés dans des pays tiers, et probablement bientôt dans l'UE, ne sont pas détectables par le test P35S proposé, qui visait à apporter rapidement une solution au cas des OGM pris en compte dans la présente étude.

### **USA**

Le tableau suivant présente l'ensemble des 52 PGM autorisés aux USA à la date du 1<sup>er</sup> Avril 2001.

## Petitions for Nonregulated Status Approved by APHIS

7/2/00

Abbreviations for Category: AP = agronomic properties; BR = bacterial resistant; FR = fungal resistant; HT = herbicide tolerant; IR = insect resistant; OO = other; PO = product quality; VR = viral resistant

Abbreviations: EPSPS- 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase; GOX- glyphosate oxidase; GUS - glucuronidase; NptII - neomycin phosphotransferase; ORF - open reading frame; Pat - Phosphinothricin acetyl transferase; PLRV- potato leaf roll virus; PRSV - papaya ringspot virus; PVY - potato virus Y; WMV2 - wtermelon mosaic virus 2; ZYMV - zucchini yellow mosaic virus

<i>Bp number</i>	<i>Approval Date</i>	<i>Unique ID</i>	<i>Institution</i>	<i>Regulated Article</i>	<i>Category</i>	<i>Phenotype</i>	<i>Gene</i>	<i>Donor</i>	<i>Selectable Marker</i>
92-196-01p	10/19/92	FLAVR SAVR	Calgene	Tomato	PQ	Fruit ripening altered	Polygalacturonase antisense	tomato	NptII
92-204-01p	12/07/94	ZW20	Upjohn	Squash	VR	WMV2, ZYMV resistant	Coat protein Coat Protein	WMV2 ZYMV	
93-196-01p	02/15/94	BXN	Calgene	Cotton	HT	Bromoxynil tolerant	Nitrilase	Klebsiella pneumoniae	NptII
93-258-01p	05/19/94	40-3-2	Monsanto	Soybean	HT	Glyphosate tolerant	EPSPS	Agrobacterium sp.	
94-090-01p	10/31/94	pCGN3828-212/86-18 & -23	Calgene	Rapeseed	PQ	Oil profile altered	ACP thioesterase	California bay	NptII
94-227-01p (92-196-01p)	10/03/94	N73 1436-111	Calgene	Tomato	PQ	Fruit ripening altered	Polygalacturonase antisense	Tomato	NptII
94-228-01p	01/17/95	1345-4	DNA Plant Tech	Tomato	PQ	Fruit ripening altered	ACC synthase	Tomato	NptII
94-230-01p (92-196-01p)	11/18/94	FLAVR SAVR	Calgene	Tomato	PQ	Fruit ripening altered	Polygalacturonase antisense	Tomato	NptII
94-257-01p	03/02/95	BT6, BT10, BT12, BT16, BT17, BT18, & BT23	Monsanto	Potato	IR	Coleopteran resistant	CryIIIA	Btt	NptII
94-290-01p	06/06/95	B, Da, & F	Zeneca & Petoseed	Tomato	PQ	Fruit polygalacturonase level decreased	Polygalacturonase Polygalacturonase antisense	Tomato Tomato	NptII
94-308-01p	06/22/95	531, 757, 1076	Monsanto	Cotton	IR	Lepidopteran resistant	CryIA(c)	Btk	NptII

<i>Bp number</i>	<i>Approval Date</i>	<i>Unique ID</i>	<i>Institution</i>	<i>Regulated Article</i>	<i>Category</i>	<i>Phenotype</i>	<i>Gene</i>	<i>Donor</i>	<i>Selectable Marker</i>
94-319-01p	05/17/95	176	Ciba-Geigy	Corn	IR	Lepidopteran resistant	CryIA(b)	Btk	Pat
94-357-01p	06/22/95	T14, T25	AgrEvo	Corn	HT	Phosphinothricin tolerant	Phosphinothricin acetyl transferase	Strep. viridochromogenes	
95-030-01p (92-196-01p)	03/02/95	FLAVR SAVR	Calgene	Tomato	PQ	Fruit ripening altered	Polygalacturonase antisense	Tomato	NptII
95-045-01p	07/11/95	1445, 1698	Monsanto	Cotton	HT	Glyphosate tolerant	EPSPS	Agro. tumefaciens	NptII
95-053-01p	09/27/95	8338	Monsanto	Tomato	PQ	Fruit ripening altered	ACC deaminase	Pseudomonas chlororaphis	NptII
95-093-01p	08/22/95	MON 80100	Monsanto	Corn	IR	Lepidopteran resistant	CryIA(b)	Btk	EPSPS/ GOX
95-145-01p	12/19/95	B16	DeKalb	Corn	HT	Phosphinothricin tolerant	Phosphinothricin acetyl transferase	Strep. hygroscopicus	
95-179-01p (92-196-01p)	07/28/95	FLAVR SAVR	Calgene	Tomato	PQ	Fruit ripening altered	Polygalacturonase antisense	Tomato	NptII
95-195-01p	01/18/96	Bt11	Northrup King	Corn	IR	European Corn Borer resistant	CryIA(b)	Btk	Pat
95-228-01p	02/22/96	MS3	Plant Genetic Systems	Corn	AP	Male sterile	Barnase	Bacillus amyloliquifaciens	Pat
95-256-01p	01/25/96	19-51a	Du Pont	Cotton	HT	Sulfonylurea tolerant	Acetolactate synthase	Tobacco	
95-324-01p	03/27/96	35 1 N	Agritope	Tomato	PQ	Fruit ripening altered	S-adenosylmethionine transferase	Bacteriophage T3	NptII
95-338-01p	05/03/96	SBT02-5, -7, ATBT04-6, -27, -30, -31, & -36	Monsanto	Potato	IR	Colorado potato beetle resistant	CryIIIA	Btt	NptII
95-352-01p	06/14/96	CZW-3	Asgrow	Squash	VR	CMV, WMV2, ZYMV resistant	Coat protein Coat protein Coat protein	CMV WMV2 WMV2	NptII
96-017-01p (95-093-	03/15/96	MON 809, MON 810	Monsanto	Corn	IR	European Corn Borer resistant	CryIA(b)	Btk	EPSPS

<i>Bp number</i>	<i>Approval Date</i>	<i>Unique ID</i>	<i>Institution</i>	<i>Regulated Article</i>	<i>Category</i>	<i>Phenotype</i>	<i>Gene</i>	<i>Donor</i>	<i>Selectable Marker</i>
01p)									
96-051-01p	09/05/96	55-1, 63-1	Cornell U	Papaya	VR	PRSV resistant	Coat protein	PRSV	NptII
96-068-01p	07/31/96	W62, W98, A2704-12, A2704-21, A5547-35	AgrEvo	Soybean	HT	Phosphinothricin tolerant	Phosphinothricin acetyl transferase	Strep. hygrosopicus	GUS
96-248-01p (92-196-01p)	10/09/96	FLAVR SAVR	Calgene	Tomato	PQ	Fruit ripening altered	Polygalacturonase antisense	Tomato	NptII
96-291-01p	03/28/97	DBT418	DeKalb	Corn	IR	European Corn Borer resistant	CryIA(c)	Btk	Pat
96-317-01p	05/27/97	MON802	Monsanto	Corn	HT/IR	Glyphosate tolerant European Corn Borer resistant	EPSPS Glyphosate oxidoreductase CryIA(b)	Agrobacterium Achromobacter Btk	NptII
97-008-01p	05/07/97	G94-1, G94-19, G-168	Du Pont	Soybean	PQ	Oil profile altered	Delta-12 desaturase	Soybean	GUS
97-013-01p	04/30/97	31807, 31808	Calgene	Cotton	HT/IR	Bromoxynil tolerant Lepidopteran resistant	Nitrilase CryIA(c)	Klebsiella pneumoniae Btk	
97-099-01p	11/18/97	GA21	Monsanto	Corn	HT	Glyphosate tolerant	EPSPS	Corn	
97-148-01p	11/07/97	RM3-3, RM3-4, RM3-6	Bejo	Cichorium	AP	Male sterile	Barnase	Bacillus amyloliquefaciens	NptII pat
97-204-01p	12/03/98	RBMT21-129, RBMT21-350	Monsanto	Potato	IR/VR	Colorado potato beetle resistant PLRV resistant	CryIIIA OFR 1 and 2	Btt PLRV	NptII
97-205-01p	01/29/98	T45	AgrEvo	Rapeseed	HT	Phosphinothricin tolerant	Phosphinothricin acetyl transferase	Strep. viridochromogenes	
97-265-01p	05/08/98	CBH-351	AgrEvo	Corn	HT/IR	Phosphinothricin tolerant Lepidopteran resistant	Phosphinothricin acetyl transferase Cry9C	Strep. hygrosopicus Bt tolworthi	
97-287-01p	03/26/98	5345	Monsanto	Tomato	IR	Lepidopteran resistant	CryIA(c)	Btk	NptII
97-336-01p	04/28/98	T-120-7	AgrEvo	Beet	HT	Phosphinothricin tolerant	Phosphinothricin acetyl transferase	Strep. viridochromogenes	

<i>Bp number</i>	<i>Approval Date</i>	<i>Unique ID</i>	<i>Institution</i>	<i>Regulated Article</i>	<i>Category</i>	<i>Phenotype</i>	<i>Gene</i>	<i>Donor</i>	<i>Selectable Marker</i>
97-339-01p	02/25/99	RBMT15-101, SEMT15-02, SEMT15-15	Monsanto	Potato	IR/VR	Colorado potato beetle resistant PVY resistant	CryIIIA Coat protein	Btt PVY	NptII
97-342-01p	05/14/98	676, 678, 680	Pioneer	Corn	AP/HT	Male sterile Phosphinothricin tolerant	DNA adenine methylase Phosphinothricin acetyl transferase	E. coli Strep. viridochromogenes	
98-014-01p (96-068-01p)	04/30/98	A5547-127	AgrEvo	Soybean	HT	Phosphinothricin tolerant	Phosphinothricin acetyl transferase	Strep. viridochromogenes	
98-173-01p	12/23/98	GTSB77	Novartis Seeds	Beet	HT	Glyphosate tolerant	EPSPS	Agrobacterium	GUS
98-216-01p	01/27/98	RT73	Monsanto	Rapeseed	HT	Glyphosate tolerant	EPSPS Glyphosate oxidoreductase	Agrobacterium Achromobacter	
98-238-01p	10/14/98	GU262	AgrEvo	Soybean	HT	Phosphinothricin tolerant	Phosphinothricin acetyl transferase	Strep. viridochromogenes	
98-278-01p	03/22/99	MS8, RF3	AgrEvo	Rapeseed	AP/HT	Male sterile Phosphinothricin tolerant	Barnase Barstar Phosphinothricin acetyl transferase	Bacillus amyloliquefaciens Bacillus amyloliquefaciens Strep. hygrosopicus	
98-329-01p	04/15/99	LLRICE06, LLRICE62	AgrEvo	Rice	HT	Phosphinothricin tolerant	Phosphinothricin acetyl transferase	Strep. hygrosopicus	
98-335-01p	05/19/99	CDC Triffid	U of Saskatchewan	Flax	AP	Tolerant to soil residues of sulfonyleurea	Acetolactate synthase	Arabidopsis thaliana	Nos NptII
98-349-01p (95-228-01p)	04/22/99	MS6	AgrEvo	Corn	AP/HT	Male sterile	Barnase Phosphinothricin acetyltransferase	Bacillus amyloliquefaciens Strep. hygrosopicus	
99-173-01p (97-204-01p)	7/17/00	RBMT22-82	Monsanto	Potato	IR/VR	Colorado potato beetle resistant PLRV resistant	CryIIIA ORF 1 and 2	Btt PLRV	EPSPS
00-011-01p (97-099-01p)	Pending	NK603	Monsanto	Corn	HT	Glyphosate tolerant	EPSPS	Agrobacterium	
00-136-01p	Pending	Bt CryIF maize line 1507	Mycogen (Dow)-Pioneer	Corn	IR/HT	Phosphinothricin tolerant	CryIF Phosphinothricin acetyl	Bt aizawai	

<i>Bp number</i>	<i>Approval Date</i>	<i>Unique ID</i>	<i>Institution</i>	<i>Regulated Article</i>	<i>Category</i>	<i>Phenotype</i>	<i>Gene</i>	<i>Donor</i>	<i>Selectable Marker</i>
		line 1507	Pioneer			Lepidopteran resistant	transferase	Strep. viridochromogenes	
00-199-01p	Pending	Mon 853	Monsanto	Corn	IR	Colepteran resistant	Cry3Bb1	Bt kumanotoensis	NptII

Signalons que les surfaces cultivées avec des OGM résultant d'un empilage de gènes (« gene stacking ») représentent environ 20% des surfaces cultivées (USDA planting survey, 2001).

### **Plantes commercialement disponibles dans d'autres pays**

Continent américain. Fondamentalement les PGM autorisés dans les autres pays ont tous été au préalable autorisés à la commercialisation aux USA. Signalons pourtant quelques colza (Canola) autorisés au Canada et pas (encore ?) aux USA, à savoir NS1471 (Advanta) ; Westar Oxy-235 (Svalof Weibull) ; HCN28, MS1/RF1, MS1/RF2 (Aventis).

Asie. Même si de nombreux essais issus de transgénèses locales font l'objet d'essais au champ, la majorité des pays asiatiques n'ont jusqu'à présent autorisé à la commercialisation que des PGM préalablement autorisées, en particulier sur le continent américain. Quelques données publiques font état pour la Chine de la culture en 1996 de 1,6 millions d'hectares de tabac transgénique (majoritairement résistants à des virus) et vraisemblablement de 500 000 hectares, en 2001, correspondant à 2 cotons, 2 tomates, 1 poivron et 1 pétunia. La société Monsanto semble être une des rares sociétés occidentales à s'être implantée en Chine. Il est donc hautement probable, qu'à côté de quelques PGM spécifiques, on retrouvera petit à petit la majorité des PGM de cette société actuellement autorisés sur d'autres continents.

Russie et pays de l'Europe centrale et de l'Est. Certains pays comme la Roumanie semblent avoir entamé des cultures commerciales de PGM, du même type que celles du continent américain. La Russie, qui ne paraît pas avoir entamé des cultures commerciales à grande échelle, malgré vraisemblablement des importations illégales d'autres pays de l'ex URSS (CEI), comme une pomme de terre tolérante à un herbicide, effectue majoritairement des essais au champ de pomme de terre, betterave à sucre, soja et maïs.

### Bactéries recombinées autorisées

En sus des PGM actuellement autorisées, certaines bactéries recombinées et les toxines Bt (issues de *Bacillus thuringiensis*) dérivées, dont certaines font partie de l'arsenal couramment autorisé en lutte biologique, sont également autorisées.

Bt toxicity to caterpillar pests - Ecogen

Bt toxicity to Colorado Potato Hbeetle and caterpillar pests - Ecogen

Bt toxicity to caterpillar pests - Novartis

Bt toxicity to caterpillar pests (2 different formulations for different caterpillars) - Mycogen

*Rhizobium* for alfalfa (luzerne) - Urbana Labs / Research Seeds

Nous ne disposons pas d'informations pour divers pays tiers quant aux produits, tels que des auxiliaires technologiques, dérivés de MGM<sup>1</sup> autorisés (Hemmer 1997).

### OGM et produits dérivés autorisés dans l'UE

L'autorisation des OGM et produits dérivés fait l'objet, au sein de l'Union de deux cadres réglementaires. L'un concernant les OGM en milieu confiné (90/219/CEE, 98/81/CEE) et ceux faisant l'objet d'une autorisation de dissémination volontaire (90/220/CEE, 2001/18/CEE) et le règlement, non spécifique aux OGM, concernant les nouveaux aliments et nouveaux ingrédients (258/97/CE). Rappelons que la directive 90/219/CEE (98/81/CEE) s'applique en particulier à tout essai au laboratoire et en serre, notamment pour la recherche.

Différents sites Web permettent de connaître les procédures, le cadre réglementaire et les OGM actuellement autorisés et en cours d'instruction (<http://agriculture.gouv.fr/> puis suivre Alimentation, OGM et Biotechnologie, Commission du Génie bio-moléculaire ; <http://www.finances.gouv.fr/> puis suivre Consommation et Organismes génétiquement modifiés, et [http://europa.eu.int/comm/food/index\\_en.html/](http://europa.eu.int/comm/food/index_en.html/) pour connaître en particulier les avis des Comites scientifiques pour l'alimentation et pour les plantes).

#### OGM autorisés dans le cadre de la directive 90/220/CEE

A côté des produits concernés par l'alimentation humaine, signalons :

7 lignées d'œillet obtenus par la société Florigène qui présentent une coloration modifiée ou une meilleure tenue en vase, objet d'une autorisation suite au dossier instruit par les Pays-Bas.

plusieurs vaccins et un kit de détection d'antibiotique à l'aide de microorganismes recombinés.

Les PGM ayant fait l'objet d'une décision de la Commission d'autorisation de mise sur le marché sont présentés dans le tableau suivant.

#### 2 Plantes génétiquement modifiées ayant fait l'objet d'une autorisation communautaire (directive 90/220/CE).

Société	OGM	Caractéristiques	Pays	Date et objet de la décision de la Commission	"Consentement écrit"
Seita	Tabac hybride (ITB 1000 OX)	Tolérance herbicide stérilité mâle	France	08-06-94 : semences	Arrêté du 27/07/94
Bejo-Zaden	Chicorée	Tolérance herbicide stérilité mâle	Pays-Bas	20-05-96 : culture	Lettre des Pays-Bas
Monsanto	Soja	Tolérance herbicide	RU	03-04-96 : importation et transformation	Lettre du Royaume-Uni
PGS	Colza hybride (MS1/RF1)	Tolérance herbicide stérilité mâle	RU	06-02-96 : semences	Lettre du Royaume-Uni
Ciba-Geigy (Novartis)	Mais (Bt-176)	Tolérance pyrale et herbicide	France	23-01-97 : toute utilisation sans restriction*	Arrêté du 4 février 1997
PGS	Colza hybride	tolérance	France	06-06-97 : toute	

<sup>1</sup> Microorganismes Génétiquement Modifiés

	(MS1/RF1)	herbicide stérilité mâle		utilisation sans restriction*	
PGS	Colza hybride (MS1/RF2)	tolérance herbicide stérilité mâle	France	06-06-97 : toute utilisation sans restriction*	
AgreEvo	Colza (Topas19/2)	tolérance herbicide	RU	22-04-98 : importation et transformation	Lettre du Royaume-Uni
AgrEvo	Maïs (T25)	Tolérance herbicide	France	22-04-98 : toute utilisation sans restriction*	Arrêté du 3 août 1998
Monsanto	Maïs (MON 810)	Tolérance pyrale	France	22-04-98 : toute utilisation sans restriction*	Arrêté du 3 août 1998
Novartis	Maïs (BT 11)	Tolérance pyrale et herbicide	RU	22-04-98 : importation et transformation	Lettre du Royaume-Uni

\* : autorisations pour l'importation, la culture et la transformation industrielle.

Remarquons :

qu'une autorisation ne vaut que pour l'utilisation visée, d'où 2 décisions favorables de la Commission pour le même colza (MS1/RF1)

l'absence de « consentement écrit » national pour 2 colzas autorisés par décision communautaire. Ces OGM restent dès lors interdits dans l'ensemble de l'Union européenne.

que l'autorisation de type « toutes utilisations » permet en particulier la culture des PGM, si des variétés sont inscrites au catalogue européen des variétés. Cette inscription nécessite donc l'examen des nouvelles variétés par le CTPS<sup>2</sup>.

Que diverses PGM (maïs, colza, chicorées, betterave à sucre, tomate, pomme de terre et coton), qui sont en cours d'instruction au niveau européen, font l'objet d'un moratoire de fait en raison de l'opposition de certains pays de l'UE à toute nouvelle autorisation tant que des textes réglementaires et des procédures améliorées de traçabilité et de détection des OGM ne sont pas disponibles.

#### *Procédure d'autorisation des OGM et des produits dérivés dans le cadre du règlement 258/97/CE*

##### *Autorisation des OGM*

Pour résumer :

soit, lors de la consultation des Etats membres, aucune objection n'est émise dans un délai de 60 jours, l'OGM est alors autorisé par l'administration compétente du pays instructeur qui en informe le demandeur.

soit, lors de la consultation des Etats membres, un ou plusieurs Etats membres émettent une objection motivée ou demandent une évaluation complémentaire. Une décision finale sera prise au niveau communautaire par la Commission ou le Conseil ; cette décision est directement applicable.

A ce jour, aucun OGM n'est arrivé au terme de cette procédure.

##### *Autorisation de produits dérivés d'OGM mais n'en contenant pas :*

Dans le cadre de cette procédure:

soit le demandeur démontre que le nouvel aliment est substantiellement équivalent à l'aliment traditionnel comparable sur le plan nutritionnel, toxicologique... L'entreprise notifie alors ces données à la Commission qui se charge à son tour d'en informer les Etats membres et de publier une fois par an l'ensemble des produits ainsi autorisés.

<sup>2</sup> Comité Technique Permanent des Semences

C'est le cas des produits suivants :

Société	Aliment	Date de notification	Transmission aux Etats membres
AgrEvo	Huile obtenue à partir du colza Topas 19/2	09-06-97	24-06-97
PGS	Huile obtenue à partir du colza MS1/RF1	10-06-97	24-06-97
Monsanto	Huile obtenue à partir du colza GT73	10-11-97	21-11-97
Monsanto	Ingrédients obtenus à partir du maïs MON 810	10-12-97	05-02-98
AgrEvo	Ingrédients obtenus à partir du maïs T25	12-01-98	06-02-98
Novartis	Ingrédients obtenus à partir du maïs Bt11	30-01-98	06-02-98
Monsanto	Ingrédients obtenus à partir du maïs MON 809	14-10-98	23-10-98

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

Comme on peut le remarquer certains des OGM concernés avaient également fait l'objet d'une autorisation dans le cadre de la directive 90/22/CEE.

soit l'équivalence en substance n'est pas démontrée. Le produit doit suivre la même procédure que celle des OGM décrite ci-dessus.

### c Animaux génétiquement modifiés

A notre connaissance il n'existe pas actuellement d'animaux génétiquement modifiés commercialisés.

Les travaux en cours (ML Houdebine, INRA ; communication personnelle) portent sur des gènes :

ne modifiant pas les propriétés physiologiques des animaux (gènes de résistance aux maladies pour réduction de l'utilisation des antibiotiques, amélioration de la productivité, simplification des élevages, réduction du mal-être animal, réduction du transfert de la maladie à l'homme)

destinés à améliorer les méthodes d'élevage (gène de phytase chez le porc pour réduire les rejets polluants de phosphate)

destinés à améliorer les performances génétiques des animaux (gènes d'hormone de croissance chez le porc et les poissons, gènes de croissance de la laine, gènes permettant une meilleure utilisation de la ration alimentaire),

destinés à synthétiser des alicaments (suppression de certains composants du lait tels que le lactose, la  $\beta$ -lactoglobuline, des caséines ; sécrétion d'anticorps recombinants, d'oligo-saccharides dans le lait),

destinés à produire des médicaments dans le lait et intéressant donc les patients et pas les consommateurs.

Animal	Fonction	Addition de gènes
Lapin	Résistance aux maladies	En cours
Porc	Virus	"
Chèvre	"	"
Vache	" ; bactéries <sup>3</sup>	"
Truite	"	"
Poulet	"	"
porc	Croissance (GH, IGF1)	IGF1 : Animaux testés aux USA
Mouton	Croissance (GH)	Animaux nés en cours d'étude
Truite	Croissance (GH)	
Saumon	"	
Carpe	"	

<sup>3</sup> gène de la lysostaphine contre les infections mammaires

Poisson-chat Tilapia	" "	
porc	Croissance des porcelets ( $\alpha$ -lactalbumine : lait plus nourrissant) (IGF1)	Animaux testés aux USA Plus de porcelets par portée
mouton	Croissance de la laine (kératines, KAP, IGF1)	Beaucoup d'avancées
Vache Chèvre	Composition du lait (lactose, $\beta$ -lactoglobuline, allèles de caséines)	En cours

#### d Microorganismes génétiquement modifiés (MGM) et produits dérivés

L'utilisation des enzymes dans l'industrie alimentaire n'est pas encore soumise à une réglementation homogène dans tous les pays de l'UE. La France et le Danemark sont considérés comme les plus sévères au niveau réglementaire alors que d'autres pays n'ont aucune réglementation particulière pour les enzymes considérés comme des produits naturels (Hemmer 1997).

Lorsqu'il y a réglementation, elle dépend du type d'industrie utilisatrice des enzymes. Elle est évidemment beaucoup plus contraignante pour les enzymes destinées à l'agro-alimentaire et à la pharmacie et assez peu réglementée dans les autres domaines.

La France a une législation extrêmement sévère pour l'utilisation des enzymes dans l'agro-alimentaire. La législation française fonctionne par listes positives où « *tout ce qui n'est pas explicitement autorisé est interdit* ».

Le principal arrêté est celui du 5 septembre 1989 (JO du 1.10.89), constamment réactualisé. Il abroge et récapitule tous les arrêtés précédents sauf ceux qui relèvent de réglementations européennes particulières, comme l'œnologie et les jus de fruits. Il a été complété depuis sa première parution par quelques autres : 16-6-93, 27-9-93, 1-2-94, 18-8-94, 7-2-98, 28-4-98 qui ajoutent quelques enzymes supplémentaires.

Ces arrêtés définissent la nature des enzymes autorisées et le type d'industrie qui peut les utiliser. Ils précisent les règles devant garantir leur innocuité, les conditions d'obtention, les critères de pureté chimique et biologique, les préparations enzymatiques avec les conditions d'emploi et les normes d'étiquetage. Ils ne précisent pas le nom commercial, comme au Danemark qui possède également une réglementation sévère.

Les enzymes autorisées sont peu nombreuses. Ce sont le plus souvent des enzymes de dépolymérisation de polymères naturels des sous-classes suivantes de la classification des enzymes :

$\alpha$ -glucanases coupant les liaisons  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 et  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 (amylases et pullulanases)

$\beta$ -glucanases coupant les liaisons  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3 et  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 (cellulases...)

des di-holosidases (invertases) coupant les liaisons osidiques

des pectinases coupant les liaisons de la pectine

des protéases coupant les liaisons peptidiques des protéines

des phospholipases coupant les liaisons ester des phospholipides

des glucoses-isomérases transformant le glucose en fructose

malgré les avantages apportés par l'utilisation des enzymes issus de MGM, très peu sont autorisées : quatre l'ont été en 1994 et six en 1998, dont les trois chymosines « de veau » issues de fermentations.

#### 3 Enzymes issues de MGM autorisées par la réglementation française.

Enzyme	Origine	Utilisation
$\alpha$ -amylase	<i>Bacillus licheniformis</i> (gène de <i>B. stearothermophilus</i> )	Hydrolyse de l'amidon; bière; alcool
exo- $\alpha$ -amylase maltogène	<i>Bacillus subtilis</i> (gène de <i>B. stearothermophilus</i> )	Panification; sirops de maltose
Pullulanase	<i>Bacillus licheniformis</i> (gène de <i>B. deramificans</i> )	Sirops de glucose

Xylanase	<i>Aspergillus oryzae</i> (gène de <i>Thermomyces lanuginosus</i> )	Panification courante ou spéciale
Lipase	<i>Aspergillus oryzae</i> (gène de <i>Humicola lanuginosa</i> = <i>Thermomyces lanuginosus</i> )	Panification courante ou spéciale
$\alpha$ -acétolactate décarboxylase	<i>B. subtilis</i> (gène de <i>B. brevis</i> )	Bière; alcool
aspartyl-protéase	<i>Aspergillus oryzae</i> (gène de <i>Rhizomucor meihe</i> )	Fromages non AOC
Chymosine	<i>Escherichia coli</i> K12 <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>A. niger</i> var. <i>awamori</i> (gène de veau pour les trois)	Fromages non AOC

Rappelons que les enzymes utilisées en œnologie ou dans l'industrie des jus de fruits relèvent d'une réglementation communautaire à part (Hemmer 1997). Les arômes, régis par la directive 88/388/CEE, ne comporteraient pas de produits issus de MGM.

## e Conclusions

Si elle devait incorporer des produits tels que les auxiliaires technologiques, une filière « sans utilisation d'OGM » se heurterait à l'absence d'harmonisation réglementaire européenne et à l'absence de données publiques disponibles sur les séquences introduites et/ou modifiées. Si l'alimentation animale devait être incorporée, nous ne disposons pas actuellement de données permettant de savoir si l'ADN ou les protéines de PGM, par exemple, pourraient être retrouvées, au moins temporairement, dans les animaux ou leurs produits dérivés (lait...). La traçabilité s'avérerait dans ce cas un facteur primordial de certification d'une telle filière.

Dans le cadre d'un périmètre assez large de la filière, la disponibilité de méthodes de mutagenèse dirigée, recombinaison homologue... pour les animaux et microorganismes nécessiterait probablement l'utilisation de méthodologies de détection autres que celles décrites ci-dessous (LCR ou Ligase Chain Reaction en particulier). Il serait en outre sans doute difficile, dans le cas de mutagenèses portant sur un ou quelques nucléotides, de certifier l'origine « OGM » de tels changements. Plus globalement, on peut se demander si les modifications introduites par recombinaison homologue aboutiraient à la qualification d'OGM des organismes en résultant.

## I.2 Seuil

Sémantiquement une filière « sans utilisation d'OGM » devrait s'entendre par l'absence totale d'OGM, ou de produits dérivés. Cette définition, reprise par divers interlocuteurs du programme, se heurte néanmoins à la réalité des faits :

scientifiquement et techniquement, prouver l'absence d'un élément quelconque (OGM ou autre) demeure une des tâches les plus ardues du domaine analytique, sans compter les aspects pratiques organisationnels et de production. Le minimum généralement « certifiable » dépend en pratique de la limite de détection des méthodes analytiques, avec une certaine probabilité (intervalle de confiance) d'atteinte de cette limite. Cette contrainte technique est valable autant pour des produits toxiques (farines animales contaminées par le prion, métaux lourds, dioxines) que pour des produits *a priori* sans effet néfaste sur la santé, car autorisés au cas par cas comme les PGM. Comme dans d'autres domaines non concernés par les OGM, le type de méthode utilisée, l'échantillonnage et les plans de contrôles utilisés jouent donc un rôle déterminant dans les limites de détection et de quantification qui peuvent servir à établir le cahier des charges d'une filière « sans utilisation d'OGM ».

toutes les transactions commerciales reconnaissent, explicitement ou non, la possibilité d'une présence fortuite d'éléments étrangers (par exemple terre, cailloux, animaux, autres espèces végétales... dans des lots de graines... ou autres produits). Ce seuil de présence fortuite est fonction du domaine et du produit concerné (le seuil d'impureté acceptable sera plus bas pour de l'or ou du platine que pour des graines de maïs ou si le contaminant - mycotoxine, métaux lourds... est toxique...). Hormis certains cas, ce domaine relève généralement du contrat établi entre les opérateurs (producteur/vendeur vs. acheteur/consommateur). Cette logique a d'ailleurs prévalu à l'établissement de la réglementation européenne concernant la dispense d'étiquetage (258/97/CE, 1139/98/CE, 49/2000/CE) en deçà d'un seuil de présence fortuite de 1% pour les ingrédients, additifs et arômes (258/97/CE et 50/2000/CE), faute de quoi toutes les transactions commerciales

pouvaient se retrouver paralysées. Economiquement, plus le seuil est bas, plus les analyses et plans de contrôle sont compliqués, longs et coûteux.

certaines filières de production (bière sans alcool, agriculture biologique...) sont réglementairement définies par une limite supérieure de présence de produit (alcool, produits non issus de l'agriculture biologique...). Pourquoi n'en serait-il pas de même pour une filière « sans OGM ».

C'est en considérant ces divers aspects techniques que des valeurs de seuils ont été proposées dans les scénarii, proposés en particulier au GT1 pour l'étude des opinions et attitudes des consommateurs.

## a Aspects analytiques

### **Le seuil analytique**

Comme nous venons de le rappeler, toute méthode analytique présente des limitations sous forme d'une limite de détection, et d'une limite de quantification pour les méthodes quantitatives. Dès lors, pour une taille donnée d'échantillon de laboratoire et de prise d'essai, un seuil doit obligatoirement être associé à toute méthode avec évidemment un intervalle de confiance d'obtenir le résultat. Une filière doit donc connaître au minimum les limites des méthodes devant permettre de la certifier.

Soulignons que la limite de détection d'une méthode est fonction de la taille d'échantillons analysés et de la teneur en analyte de cet échantillon. Une technique ayant ainsi une limite de détection de 0,01% sur ADN ou semences peut avoir une limite de détection de 30 ou 50%, par exemple, sur certains produits comme des huiles raffinées.

Par ailleurs la variabilité des méthodes d'analyse s'accroît avec la valeur absolue des limites de détection et de quantification (Horwitz *et al.* 1980). Des guides entiers et des réunions internationales sont consacrés aux seuls aspects de la meilleure façon d'obtenir des résultats vrais dans diverses circonstances (Codex Alimentarius 2001, AFNOR 2001, Vernimont 1996, Bertheau *et al.* 2001).

Globalement, une limite de détection ou de quantification peut s'exprimer en termes absolus de molécules d'analyte détectable ou quantifiable. Dans le cas des OGM, si la PCR est ainsi théoriquement capable de détecter une molécule d'analyte (de l'ADN cible en l'occurrence), des considérations diverses (présence d'inhibiteurs, aspects statistiques de l'efficacité d'amplification selon les dilutions...) réduisent cette limite de détection à une dizaine de molécules, voire plus d'une centaine de molécules en routine, selon les types de matrices analysées (Kay and van den Eede 2001). Par ailleurs, divers facteurs, comme l'effet « ballast » de l'ADN non cible, limitent également la valeur de la limite de détection relative.

S'il est ainsi communément admis que la limite de détection fiable de la PCR est d'environ 0,01% dans de l'ADN pur, les problèmes de variabilité observés, et les discordances de résultats induites, et les impératifs techniques des méthodes utilisées, militent plutôt pour l'utilisation de la limite de quantification de 0,1%, pour les analyses de routine.

### **L'importance des plans de contrôle et de l'échantillonnage**

Toute méthode de détection ne vaut que par la qualité de l'échantillonnage qui l'a précédé, les procédures d'homogénéisation et de broyage des échantillons dans le cas de produits solides. Un plan de contrôle, et le plan d'échantillonnage associé, peut être de « type simple » (1 seul groupe analysé comme généralement réalisé en Europe sur produits transformés ou graines) ou par groupe, en une étape ou plusieurs (Schilling 1982, AFNOR 1991, Daudin et Tapiéro 1996, Remund *et al.* 2001, voir annexe).

Comme dans d'autres domaines analytiques, les statistiques permettent d'estimer la fiabilité des mesures analytiques (cas de mesures quantitatives) et les plans de contrôle permettent d'introduire la notion de risques acceptables pour le vendeur/producteur et pour l'acheteur/consommateur (Schilling 1982, AFNOR 1991, Daudin et Tapiéro 1996, Cochran 1997, Montgomery 1997, Remund *et al.* 2001, annexe).

La négociation ente le vendeur et l'acheteur, et donc le contrat en résultant qui déterminera les risques acceptés par chacun des acteurs avec le plan de contrôle effectivement utilisé, est fonction de facteurs tels que, par exemple, la sécurité, alimentaire ou non, les coûts des analyses et des produits analysés, le positionnement « marketing » des acteurs...

## b Aspects économiques et pratiques

La capacité de détection d'une méthode peut être améliorée en augmentant la taille des prises d'essai ou en augmentant le nombre d'analyses. Les aspects pratiques et économiques peuvent devenir dès lors des facteurs importants des négociations entre les opérateurs économiques.

Au point de vue pratique, les laboratoires d'analyse utilisant tant les techniques immunologiques que moléculaires sont limités tant par la taille des échantillons de laboratoire que par celle des prises d'essai analysables en routine. Atteindre par exemple une limite de détection de 0,01% (pour une probabilité de détection de 99,9%) nécessite par exemple sur graines de disposer d'un échantillon de laboratoire d'environ 70 000 graines (soit plus de 20 kg pour le maïs), admettre une probabilité de détection de 95% diminue la taille des échantillons (cf. 4.2.1), réduit les coûts et durées d'analyse et facilite le travail des laboratoires. Il n'existe, par exemple, actuellement pas de systèmes de broyage facilement lavable (l'ADN doit être éliminé et il peut être nécessaire de nettoyer les récipients à l'eau de javel) capables de broyer en routine (donc plusieurs fois par jour) ces quelques kg. Un autre exemple pratique peut être relevé concernant l'extraction des protéines ou de l'ADN à partir des prises d'essai. La majorité des méthodes d'extraction, et le matériel disponible pour des analyses de routine rapide dont les kits d'extraction, sont capables de traiter en routine des prises d'essai d'une taille inférieure à 1 g (généralement 10 à 300 mg). La définition d'une prise d'essai de 1 g dans la norme AFNOR (AFNOR 2000) pose ainsi de nombreux problèmes pratiques aux laboratoires et nécessite une adaptation des kits commerciaux.

Par ailleurs le prix de l'échantillon soumis à analyse ne saurait être oublié. Augmenter la taille de l'échantillon de laboratoire et des prises d'essai pour améliorer les limites de détection et de quantification rendrait le coût d'analyse prohibitif pour certains produits à haute valeur ajoutée ou produits en faibles quantités (exemple des supports d'arôme ou des semences de base et pré-base).

### c Conclusions

Compte tenu des PGM actuellement autorisées ou potentielles, des limites des méthodes analytiques, de l'impact des plans de contrôles et du coût des produits soumis à analyse, les scénarii proposés aux autres programmes du projet ont tenté de résumer les différentes contraintes et demandes, souvent contradictoires. Ces scénarii proposaient, en particulier au programme 1 chargé de l'étude des opinions et attitudes des consommateurs, d'étudier les combinaisons suivantes :

produits à prendre en compte : plantes génétiquement modifiées, animaux génétiquement modifiés, microorganismes génétiquement modifiés et l'ensemble des produits dérivés (auxiliaires technologiques en particulier tels que les enzymes, acides aminés... produits par des organismes génétiquement modifiés), sachant qu'automatiquement une filière « sans utilisation d'OGM » devait au minimum concerner les produits actuellement couverts par la réglementation européenne (ingrédients, additifs et arômes),

filières concernées : alimentation humaine (cadre du projet), alimentation animale, autres produits tels que les produits d'emballage en contact avec des denrées alimentaires, le papier à écrire, le carton, les vaccins pour animaux...

seuils de définition possible d'une éventuelle filière sans OGM (en pourcentage par rapport à l'espèce concernée) :

5% pour tenir compte d'une éventuelle augmentation de la pression en OGM, soit actuelle (continent américain) soit future si de nouveaux OGM venaient à être autorisés dans l'UE,

1% en référence à la réglementation européenne en matière de dispense d'étiquetage dans le cas de présence fortuite,

0,1% en référence à la limite de quantification requise pour les tests PCR par la norme AFNOR (AFNOR 2000) sur ADN pur et semences,

0,01% en référence à la limite de détection par les tests PCR par la norme AFNOR (AFNOR 2000) sur ADN et semences, sachant qu'en deçà de 0,1% les difficultés techniques et les points critiques (produits agro-alimentaires à faible teneur en analyte) s'accroissent et que la variabilité des mesures augmente fortement, risquant d'occasionner de nombreuses discordances de résultats, sources de litiges commerciaux.

la nécessité d'une obligation de moyens voire de résultats (certaines filières possèdent un cahier des charges reposant exclusivement sur une obligation de moyens). Cette obligation de moyens ne prévoyait pas la possibilité d'existence d'une « liste négative » de produits comme celle proposée, mais toujours vide, dans le règlement 258/97/CE. La double obligation de moyens et de résultats devait s'appliquer enfin, au minimum, aux produits déjà pris en compte par la réglementation européenne.

Remarquons

que toute filière « sans utilisation d'OGM » devra faire l'objet d'un accord avec les administrations concernées, en particulier la DGCCRF, pouvant aboutir à une réglementation particulière. Une allégation négative n'est éventuellement acceptable qu'après un tel accord, faute de quoi les services de contrôle de l'Etat recherchent une application « au pied de la lettre » d'une telle mention. Comme l'indiquait un courrier à l'ANIA<sup>4</sup>, l'administration française (DGAL, DGCCRF...) a défini, au cours du déroulement du projet, une doctrine inter-ministérielle visant à éviter toute tromperie du consommateur. Cette définition reprend une définition « sémantique » de ce que pourrait être une filière « sans utilisation d'OGM ».

qu'il faut éviter de faire l'amalgame entre filière « sans utilisation d'OGM » et les filières américaines IP<sup>5</sup>, mises en place ces dernières années, qui visent essentiellement à fournir aux importateurs européens des produits correspondant au seuil réglementaire de 1%. Certains opérateurs américains incitent par ailleurs les opérateurs à contourner la réglementation européenne en mélangeant des produits à teneurs différentes en OGM afin de ramener la teneur finale en deçà du seuil réglementaire de 1% de présence fortuite. La présence d'OGM dans ce cas ne saurait plus être qualifiée de « fortuite » et le produit doit donc être étiqueté.

## **II La détection des OGM**

Une éventuelle filière « sans utilisation d'OGM » reposerait au minimum sur une obligation de moyens, c'est à dire l'utilisation de produits contenant fortuitement des OGM en dessous d'un seuil reconnu par les acteurs et l'administration. La certification d'une telle filière ne peut donc se faire sans un minimum de moyens de contrôles, sur les produits en amont (semences, produits agricoles au sortir du champ...) et de temps à autre plus en aval, tant en raison de l'obligation de moyens que de l'obligation de résultats découlant de la réglementation européenne, au moins pour les ingrédients, additifs et arômes. Quelles sont les méthodes disponibles, ou en cours de développement, proposées aux opérateurs d'une telle filière ?

### **II.1 Principes généraux**

La réglementation européenne retient jusqu'à présent, fort logiquement, deux cibles de détection : les protéines et les acides nucléiques (1139/98/CE). La prépondérance de chaque type de technique varie selon le côté de l'Atlantique où on se trouve.

Sans entrer dans les détails du processus analytique (Bertheau 1998, Bertheau et Dioloz 1999, 2000, Philipp *et al.* 2000), une détection d'OGM comprend :

un prélèvement d'échantillon de laboratoire, supposé représentatif du lot à analyser (certains produits ont tendance à s'agréger, certains produits de masse ou morphologie particulière ont plus tendance à sédimenter... l'ensemble peut alors conduire à des lots à analyser très hétérogènes). Les méthodes d'échantillonnage doivent donc être adaptés aux types de matrices à analyser (ISO 542 1992 ; ISO 13690 1994 ; ISO 6644 1999...).

un broyage, pour les produits solides, suivie d'une homogénéisation de l'échantillon de laboratoire. Une « réduction » permet ensuite de prélever les « prises d'essai » (deux fois un gramme dans le cas de la norme française, AFNOR 2000 ; ISO 664 1990...) sur lesquelles les méthodes analytiques sont appliquées,

une extraction de l'analyte pour son dosage. Cette étape primordiale pour la qualité des analyses extérieures (les méthodes enzymatiques, comme la PCR, ou de réaction antigène - anticorps, pour les techniques immunologiques sont très sensibles à la présence d'inhibiteurs). Le rendement et la qualité des produits extraits conditionne tant les capacités de quantification, que la simple aptitude à suspecter la présence de la cible. A chaque fois une bonne connaissance des méthodes et de la matrice est donc nécessaire pour s'assurer de l'emploi de la méthode d'extraction adéquate. Le domaine d'application devra être précisé dans les normes européennes en cours d'élaboration.

une analyse des extraits afin de déterminer, par des méthodes qualitatives ou quantitatives, la présence des cibles recherchées (OGM, espèces végétales...), ou leur quantité. Là aussi une bonne connaissance des limites de chaque méthode d'analyse est nécessaire. La détermination du domaine d'application fait donc l'objet d'une demande formelle des normes française et européenne en cours d'écriture. Il doit indiquer par exemple sur quels OGM, espèces végétales... le test a été validé.

Le choix d'une méthode analytique de préférence à une autre est dépendante de plusieurs facteurs :

<sup>4</sup> Association Nationale des Industries Agro-alimentaires.

<sup>5</sup> Identity Preservation

la matrice analysée : les procédés agro-industriels peuvent dénaturer voire détruire l'analyte. C'est en particulier le cas des protéines, généralement plus sensibles, par exemple aux températures élevées, que l'ADN. La disparition, plus ou moins importante, des analytes fait apparaître un « point critique » de contrôle.

le type de pureté des produits : un produit résultant du mélange de plusieurs ingrédients, arômes et additifs nécessitera une technique d'identification des OGM et des espèces végétales, alors qu'un produit présumé pur comme une semence peut, *a priori* et dans certaines limites définies par son domaine d'application, être analysée avec un test de criblage, dans l'état actuel des autorisations.

le nombre et le type d'OGM autorisés. Un insert<sup>6</sup> peut être présent dans plusieurs OGM (événements de transformation). En effet, une même construction génétique peut avoir servi à la transformation de plusieurs espèces et être au minimum à l'origine, pour une même espèce, de plusieurs OGM (Ricroch *et al.* 1998, Altman 1998). Un test « spécifique d'insert » devient dès lors inopérant pour la quantification par espèce requise par la réglementation, mais peut encore servir comme test de criblage avec un domaine d'application restreint.

Les risques négociés, et contractuellement acceptés, par les vendeurs/producteurs et acheteurs/consommateurs quant aux proportions acceptables de faux positifs, faux négatifs... (cf. 2.2).

La majorité des points concernant les techniques faisant l'objet d'une littérature abondante, nous nous focaliserons plutôt sur (i) les plans de contrôle (en particulier de graines) et leur impact sur la faisabilité des méthodes et (ii) les méthodes analytiques elles-mêmes.

## II.2 Les plans de contrôle

Les plans de contrôle revêtent à la fois la stratégie statistiquement validée et concrètement utilisée pour s'assurer de la présence/absence avec une certaine tolérance et une probabilité associée d'un composé à détecter et le plan d'échantillonnage. Cet échantillonnage peut s'avérer plus ou moins facile à réaliser (Cochran 1997, USDA GIPSA 1995, 1997, 2000). Selon les produits concernés, les techniques analytiques disponibles et les coûts tant des méthodes d'analyse que des matrices à analyser, la stratégie peu différer sensiblement entre opérateurs. De telles différences peuvent déjà induire des problèmes de compatibilité des méthodes et donc des discordances de résultats, sources de litiges (Schilling 1982, AFNOR 1991, Daudin et Tapiéro 1996, Remund *et al.* 2001, USDA-GIPSA 2000).

### a Plans de contrôles à un groupe (ou « plans simples »)

Ceux-ci, les plus aisément compréhensibles, consistent à analyser un seul échantillon de laboratoire (un groupe de graines par exemple).

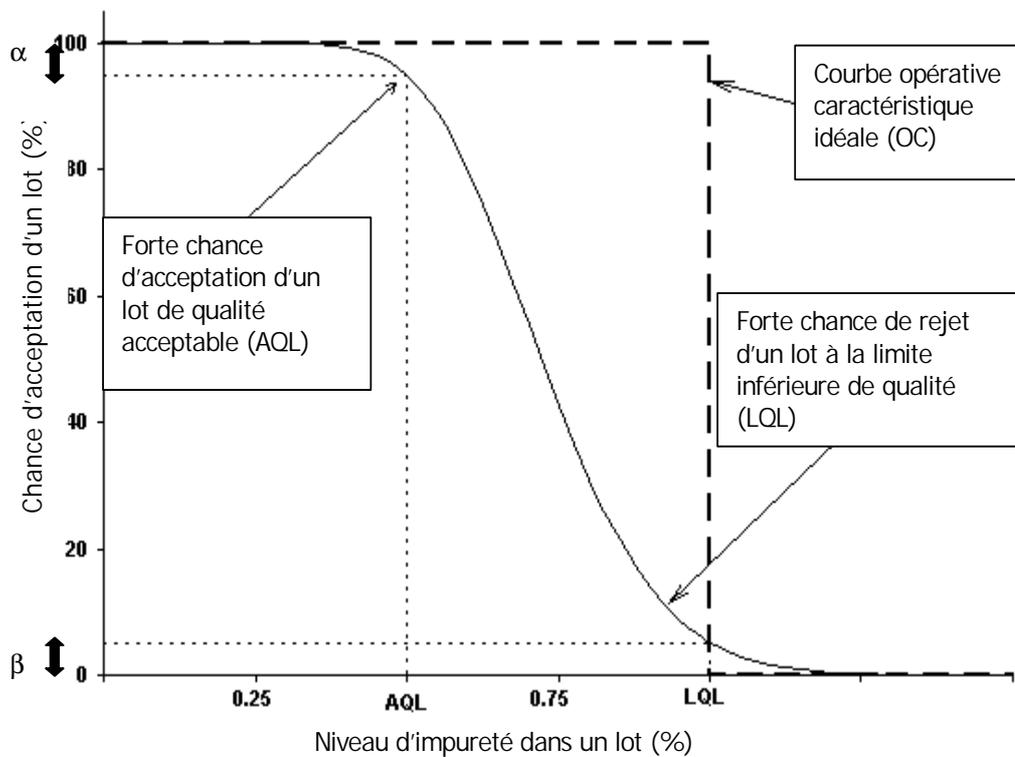
La taille du groupe va conditionner la limite de détection accessible et le type de méthode analytique utilisable. Ainsi un groupe de 300 graines permet d'atteindre une limite de détection de 1% avec un test immunologique en « dipstick » (bandelette ; cf. 4.2.1), un groupe de 3 000 graines permet d'atteindre par PCR un seuil de 0,1%. Cette stratégie à un seul groupe protège essentiellement, pour un bon échantillonnage, l'acheteur / consommateur aux dépens du vendeur / producteur (cf. 2.2.2 et annexe).

En fonction de la limite de détection recherchée pour les analyses, ce plan de contrôle nécessite de disposer de techniques très sensibles, fiables et reproductibles... Pour la quantification, on doit en outre disposer de standards de calibration. La robustesse (fiabilité) d'un tel plan de contrôle repose donc majoritairement sur celle des méthodes analytiques employées (limites de détection et de quantification faibles, répétabilité et reproductibilité des mesures, calibration et stabilité des appareils, qualité des méthodes de calibration avec les standards, disponibilité et continuité de standards de quantification stables, corrélation du mesurande à la quantité d'analyte...) (Vernimont 1996, Bertheau *et al.* 2001). Les premiers résultats de PCR quantitative en temps réel commencent à paraître (BgVV 2000, Hübner 2001). Le recul par rapport à ces nouvelles techniques, et donc leur variabilité, est donc assez faible, même si des résultats sont déjà disponibles dans le domaine médical par exemple.

Le coût d'un tel type d'analyse sensible sera généralement élevé, alors que le coût de la matrice analysée doit être le plus faible possible, ou tout au moins relativement négligeable. Dans le cas de graines, la spécification d'une limite de détection de 0,01% oblige par exemple à fournir à l'analyse un échantillon de

---

<sup>6</sup> La séquence d'ADN insérée en tout ou partie, en une ou plusieurs copies, dans le génome, nucléaire jusqu'à présent pour les plantes, de l'espèce soumise à transformation. On parle pour chaque cellule transformée et régénérée sous forme de plante d'un « événement de transformation ».



laboratoire de 70 000 graines pour une probabilité de détection de 99,9%, ou de 30 000 graines pour une probabilité de détection de 95% (cf. 4.2.1).

Ce type de plan de contrôle à 1 groupe est celui retenu dans la norme française (AFNOR 2000) et couramment utilisé en Europe, à l'exception des semences pour lesquelles référence est faite aux plans de contrôle d'organismes internationaux comme l'ISTA<sup>7</sup>. Dans ce cas, la faible disponibilité et le prix unitaire élevé des semences constituent des contraintes majeures du coût d'analyse et de son applicabilité, mais les semences ne constituent pas les seules matrices concernées...

#### b Plans de contrôles à plusieurs groupes (plans par groupes ou « plans multiples » selon certaines terminologies)

Plusieurs groupes d'une taille prédéterminée (nombre de graines) sont analysés soit pour une analyse en une seule étape, soit pour une analyse en plusieurs étapes (plans dits « doubles » ou « multiples ») : le passage à l'étape 2 est conditionné par le résultats de l'étape 1 (Schilling 1982, AFNOR 1991, Daudin et Tapiéro 1996, Remund *et al.* 2001, annexe).

Le choix de la stratégie repose sur la détermination de seuils de contaminations tolérables ou non par l'acheteur et le vendeur et le coût toléré en analyses et matières premières.

La négociation entre les contractants porte sur 4 paramètres :

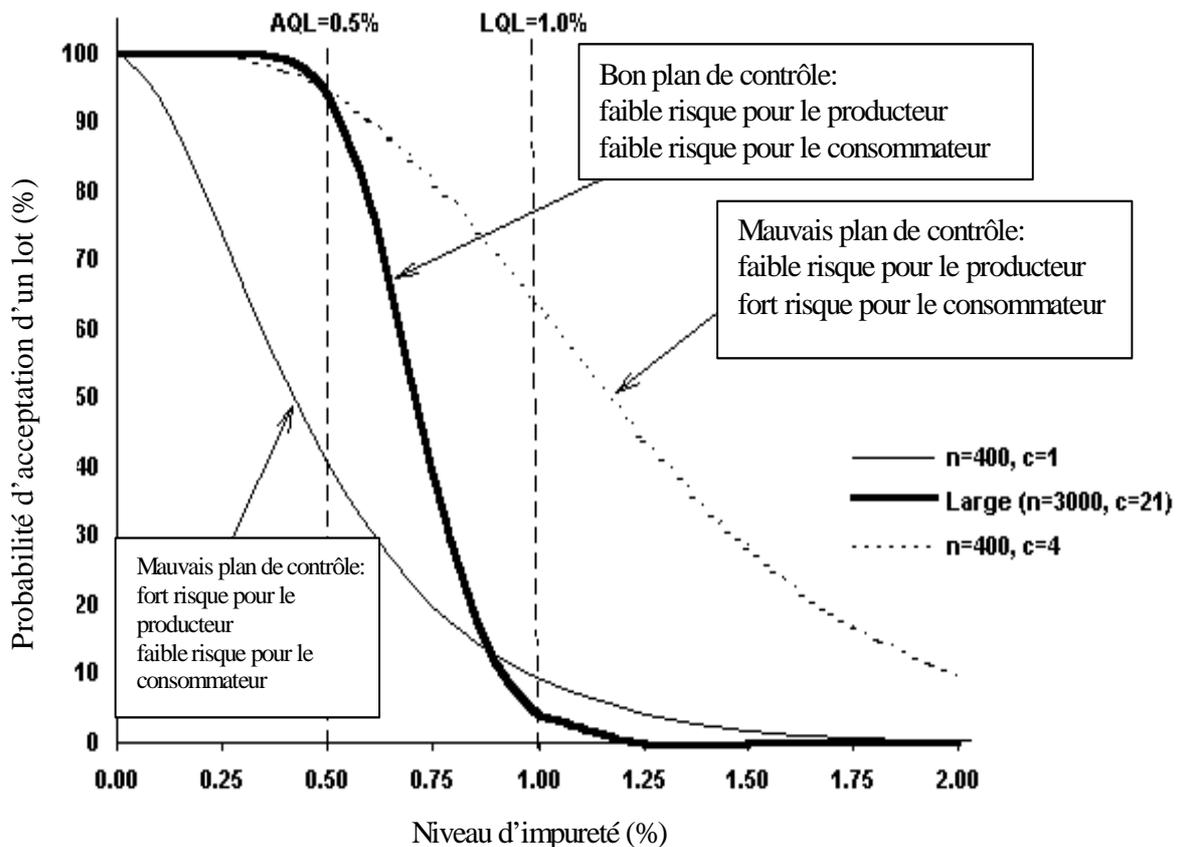
LQL (Lower Quality Limit) : le plus faible niveau de pureté d'un lot acceptable par l'acheteur / consommateur. Ce peut être le niveau minimum de pureté d'une matrice (lot de graines ou fèves...) nécessitant par exemple d'être défendue réglementairement. Si le lot est accepté, il peut être étiqueté comme ayant un niveau de pureté à ou au dessus cette LQL avec un haut niveau de confiance. La LQL est souvent appelée seuil de pureté (ou d'impureté).

AQL (Acceptable Quality Level) : niveau de pureté par lequel le vendeur veut faire accepter son lot avec une bonne probabilité (selon les produits concernés, ce peut être par exemple le cinquième du LQL...). Les producteurs désirent un haut degré de probabilité d'acceptation de lots avec des niveaux ayant au minimum ce degré de pureté.

Risque  $\alpha$  (PR : Producer's risk) : la probabilité (tolérance) de rejet d'un lot ayant la pureté requise AQL.

Risque  $\beta$  (CR : Consumer's risk) : la chance d'accepter un lot ayant une pureté au niveau LQL. C'est à dire la probabilité d'accepter un lot « impur ».

<sup>7</sup> International Seed Testing Association.



(Source : Remund *et al.* 2001.)

Il est donc important de définir un plan de contrôle respectant au mieux les risques négociés. Un outil graphique permettant de visualiser les paramètres des plans de contrôle avec une courbe de caractéristique d'opération (OC) est généralement utilisé (cf. figure ci-dessous). Il donne en ordonnée la probabilité d'acceptation du lot pour chaque niveau d'impureté, en particulier pour les LQL et AQL choisis.

### c Domaines d'applications des plans de contrôles selon le nombre de groupes.

(Source : Remund *et al.* 2001).

Si, fondamentalement, les deux stratégies de contrôles (plans à 1 groupe et plans par groupes séquentiels ou non) précédemment évoquées peuvent être utilisées dans toutes les circonstances, leur domaine d'application pratique et leur mise en œuvre va dépendre de plusieurs facteurs :

le coût, la durée et le nombre des analyses individuelles. Pour certains produits comme les « bulk commodities », les facteurs propres aux analyses, comme la durée et le coût de ces analyses constituent un paramètre important qui favorise généralement l'utilisation des plans de contrôle par groupes, par exemple lors du déchargement d'un camion transportant des graines, lors du nettoyage des graines d'un silo, ou au chargement d'une barge de transport pour chargement ultérieur d'un cargo destiné à l'exportation. L'utilisation de techniques immunologiques peu chères comme les tests en bandelettes (« dipstick ») (cf. ci-dessous) et donnant une réponse en moins d'une heure, favorise largement l'utilisation, pour certains OGM, des plans de contrôles par groupes, la plus faible sensibilité des tests immunologiques étant largement compensée par la faible taille des groupes, de graines par exemple, à analyser.

le type de cible de détection choisi. Les techniques immunologiques, particulièrement au format « dipstick », donnent une réponse, extraction comprise, en moins d'une heure. En quelques heures, un ensemble de résultats est donc obtenu permettant d'atteindre des niveaux de sensibilité équivalents à des PCR quantitatives en temps réel demandant généralement 24, et le plus souvent 48 heures, d'attente. Par contre, le domaine d'application (matrices, cibles...) des tests immunologiques est plus restreint (cf. ci-dessous).

la protection négociée du vendeur/producteur et de l'acheteur/consommateur... prise en compte dans les protocoles d'utilisation des tests « dipsticks », de la société SDI par exemple (<http://www.sdix.com>), ceux-ci ne permettent pas déterminer pas le pourcentage exact de graines PGM, mais déterminent la probabilité qu'un échantillon contienne plus de PGM qu'un seuil de

concentration initialement spécifié. La quantification est permise par l'utilisation des tests ELISA, par plans de contrôle simples ou par groupes.

le coût des matières analysées. Un plan de contrôle multiple séquentiel peut permettre, au final, de réduire les quantités de matrice analysée...

Remarquons enfin que l'approche par groupes permet dans certaines conditions une quantification avec une remarquable précision (Maury *et al.*, 1985). L'approche immunologique par groupe constitue généralement la méthode de référence de pays tiers exportateurs (USDA / GIPSA 2000).

### **II.3 Les méthodes de détection des analytes**

La réglementation européenne (258/97/CE, 49/2000/CE ; 50/2000/CE) a retenu jusqu'à présent comme cibles d'analyse (les analytes) les protéines et les acides nucléiques et en particulier l'ADN. Chacune des méthodes utilisées pour détecter ces analytes est disponible sous la forme qualitative, semi-quantitative ou quantitative (Bertheau 1998, Bertheau et Dioloz 1999, 2000, Philipp *et al.* 2000). Rien n'interdit de penser que d'autres analytes (lipides, polysaccharides...) ne devront pas être pris en compte ultérieurement, lorsque les besoins s'en feront sentir.

#### **a Méthodes basées sur le phénotype**

Celles-ci sont basées sur les protéines, au terme de la réglementation européenne, mais d'autres approches sont possibles dans les pays tiers.

##### **Détection en proche Infra-Rouge**

Cette technique en développement aux USA permettrait, grâce à l'étude comparée du spectre en proche Infra-Rouge de soja non transformé et de soja RoundUp Ready®, de distinguer la présence de soja génétiquement modifié. La robustesse de cette méthode, pas plus que son domaine d'application, ne sont actuellement connus tandis que sa sensibilité serait au mieux de l'ordre de 0,5% sur graines.

Cette méthode ne paraît pas être utilisée en routine dans des laboratoires de détection des OGM.

##### **Méthodes enzymatiques**

Ce type de méthode est applicable dès lors que le caractère modifié ou introduit porte sur une activité enzymatique, de préférence aisément dosable. Une méthode de dosage de l'activité EPSPS, permettant la tolérance à l'herbicide RoundUp®, a ainsi, par exemple, été développée.

Ce genre de méthode se heurte pourtant souvent à la présence d'activités similaires chez les plantes (exemple des activités polygalacturonase des tomates à maturation retardée). Dans ce cas seules des variations quantitatives, variables selon la variété et les conditions environnementales de culture, peuvent permettre de soupçonner la présence d'OGM. L'interprétation des résultats peut s'avérer difficile tandis que le domaine d'application reste limité aux produits peu ou pas transformés.

Ces méthodes sont quelquefois utilisées dans les laboratoires de développement des OGM, mais ne paraissent pas l'être en routine dans les laboratoires de détection des OGM.

##### **« Biotests »**

Ceux-ci sont plus particulièrement pratiqués lorsque le phénotype (caractère introduit ou modifié) est aisément repérable, comme par exemple la tolérance d'une plantule à un herbicide. Ainsi l'AOSCA<sup>8</sup> a-t-elle établi ses certifications pour la détection du soja RoundUp Ready® sur le comptage, à partir d'un échantillon statistiquement représentatif, de plantules de soja tolérantes à l'application de l'herbicide.

Ce type de méthode, bien que limité à certains phénotypes d'OGM et aux produits bruts, est utilisé en routine en raison de son faible coût et de sa facilité de mise en œuvre. Sa généralisation paraît pourtant limitée par la durée nécessaire aux analyses (germination des graines puis attente de l'effet de l'application de l'herbicide) et surtout nécessité de disposer de graines ou fèves à bonne capacité germinative.... Des études de variantes de ce test, du type germination en présence de l'herbicide, tentent actuellement de remédier à cet inconvénient.

Ces méthodes, intéressantes à divers titres, possèdent donc un domaine d'application restreint, mais largement satisfaisant pour les exportations américaines, de soja par exemple, généralement constituées de produits peu ou pas transformés, dans l'état actuel des autorisations.

---

<sup>8</sup> Association of Official Seeds Certifying Agencies (<http://www.aosca.org/>)

### **Méthodes immunologiques**

Ces méthodes sont parmi les plus répandues, en particulier chez les industriels et exportateurs américains, en raison de leur faible coût, de la rapidité d'obtention des résultats et de leur capacité à assurer autant des tests quantitatifs, que des tests qualitatifs (par méthode ELISA ou par plans de contrôles par groupes ; Maury *et al.* 1985).

Selon la stabilité des antigènes et des épitopes (conformationnels ou séquentiels) reconnus par les anticorps, elle ne peuvent être appliquées qu'à des produits peu ou pas transformés. Une stratégie portant sur la production d'anticorps dirigés contre des épitopes stables, résistants aux procédés agro-alimentaires, est en cours de développement (laboratoire CEA INRA).

Hormis quelques laboratoires comme celui du TNO (NL) utilisant des méthodes développées en interne, la majorité des laboratoires prestataires de service utilisent des kits commerciaux (SDI<sup>9</sup> <http://www.sdix.com/> ; Envirologix <http://www.envirologix.com/> ; Agdia, [http://www.agdia.com/...](http://www.agdia.com/)). Des tests sont disponibles pour les protéines Cry1A(b), Cry1A(c), Cry1C, Cry2A, Cry3A, Cry9C, EPSPS et PAT (cf. tableau 1). Quelques uns de ces tests commerciaux ont fait l'objet de validation inter-laboratoires (Lipp and Anklam 2000) tandis que d'autres sont en cours (test AACCC<sup>10</sup> sur Cry9C...).

Il est regrettable que relativement peu de laboratoires européens, français en particulier, se soient investis dans cette approche méthodologique.

#### *« Dipstick »*

Cette technique est basée sur la révélation, colorimétrique en général, sur une bandelette de papier ou de plastique de la réaction antigène anticorps. Ce genre de test est un des plus utilisés, en particulier avec des plans de contrôle par groupes, la taille (nombre de graines) des groupes étant choisie en fonction de la limite de détection de ces tests.

#### *Méthodes ELISA*

Cet ensemble de technique permet une quantification dans une gamme dynamique relativement faible (en général 2 logs de concentration) de tout épitope reconnu par des anticorps. Elles peuvent donc tout à fait convenir pour des produits ayant une présence fortuite proche du seuil d'étiquetage de la réglementation européenne, et des valeurs nettement plus proches des limites de détection des méthodes PCR pouvant donc qualifier une filière « sans utilisation d'OGM ». Les méthodes ELISA sont utilisées aussi bien pour des plans de contrôle avec un que plusieurs groupes, séquentiels ou non.

### **Conclusion**

Les méthodes basées sur le phénotype sont avant tout des techniques de criblage (voir la liste des antigènes détectés et celle des OGM autorisés), généralement sur produits peu ou pas transformés. Elles ne permettent une quantification selon l'ingrédient, au sens de la réglementation européenne, que dans le cas de produits purs (semences, graines voire quelques produits peu transformés issus d'un seul ensemble de produits agricoles non mélangés). Elles ne permettent ainsi pas de différencier deux événements d'insertion (donc 2 OGM au sens de la réglementation européenne), de la même espèce ou d'espèces différentes, comportant donc la même cible.

Cet ensemble de technologies pourrait, associé à une bonne traçabilité, satisfaire une bonne partie des besoins en analyse d'une filière « sans OGM » particulièrement pour les produits peu ou pas transformés.

#### **b Méthodes basées sur les acides nucléiques**

La résistance des acides nucléiques aux procédés agro-alimentaires étant meilleure que les protéines, les méthodes basées sur celles-ci peuvent être appliquées à un plus grand nombre de matrices alimentaires. Cette meilleure résistance aux procédés agro-alimentaires explique en grande partie l'intérêt pour ces méthodes en Europe, qui visent les contrôles de la fourche à la fourchette. Les techniques d'amplification, la PCR en particulier, sont les plus communément utilisées. Des techniques d'hybridation, sous forme de puces à ADN (ou « micro-array »), généralement précédées de PCR, commencent à être commercialisées (Société GeneScan, RFA) et font également l'objet d'un programme de recherche européen (<http://www.GMOchips.org/>).

---

<sup>9</sup> Strategic Diagnostic Inc.

<sup>10</sup> American Association of Cereal Chemists

Comparées aux techniques basées sur le phénotype, ces techniques offrent l'avantage d'une sensibilité meilleure, de pouvoir prendre en compte tous les OGM (par exemple ceux résultant de l'emploi de stratégies anti-sens conférant une maturation retardée ou une résistance à des virus) et surtout de pouvoir être utilisée avec divers niveaux de spécificité.

On distingue classiquement 3 grands types de méthodes de détection :

celles dites de criblage. Elles permettent de détecter des séquences présentes dans les inserts de nombreux OGM non reliés entre eux, qu'ils appartiennent ou non à la même espèce. L'exemple le plus connu est celui du P35S, séquence du promoteur du virus de la mosaïque du chou fleur, très utilisé dans les premières constructions d'OGM, et dans tous les OGM actuellement autorisés au sein de l'UE. D'autres séquences communes comme les terminateurs Tnos, T35S, le gène de résistance à un antibiotique nptII... peuvent également être utilisées mais avec un domaine d'application plus restreint.

celles dites « spécifiques d'insert ». Celles-ci peuvent être communes à plusieurs OGM, d'une même espèce ou d'espèces différentes. Elles résultent soit de l'utilisation d'une même construction (plasmide, promoteur, gène d'intérêt, terminateur...) pour obtenir des OGM avec le même caractère introduit dans différentes espèces (par exemple la résistance à un lépidoptère) soit des divers événements d'insertion issus d'une même expérience de transformation sur une seule espèce (Ricroch *et al.* 1998, Altman 1998). Elles sont également spécifiques d'insert, par le fait qu'elles sont rarement ciblées sur un seul type de séquence (promoteur ou terminateur ou région codante) mais plus souvent sur une combinaison de séquences, comme une jonction entre plusieurs types de séquences, par exemple entre un promoteur et un cadre ouvert de lecture, comme dans le cas du soja RR® (Pietsch *et al.* 1997). Dans l'état actuel des autorisations européennes, un certain nombre de ces séquences spécifiques d'insert sont encore actuellement spécifiques d'OGM. Cette situation devrait disparaître avec l'autorisation d'OGM possédant la même construction insérée.

Celles dites spécifiques d'évènements. Dans l'état actuel des techniques de transgénèse végétale, l'insertion d'une séquence dans un chromosome du noyau s'effectue au hasard. La séquence du (des) fragment(s) de bordure de l'insert constitue(nt) donc une signature univoque, non ambiguë, de la PGM. Chaque fragment de bordure étant présent à l'état d'une seule copie, elle permet en outre une quantification correcte de la teneur en PGM par espèce, s'il ne s'agit pas d'un OGM résultant d'un empilage de gène<sup>11</sup> (« gene stacking »). Un programme européen a débuté en 2000 pour déterminer ces fragments de bordure, en premier lieu sur les OGM actuellement autorisés dans l'UE, et développer les tests PCR quantitatifs associés(<http://www.rikilt.wageningen-ur.nl/euprojects/entransfood.html>). Il est clair qu'au final une filière « sans utilisation d'OGM » devrait utiliser ce type de séquence cible. Il n'était pas possible de développer en 20 mois l'ensemble des tests nécessaires...

Signalons que la disponibilité de mutagenèse dirigée, recombinaison homologue, dans le cas des animaux et microorganismes, nécessiterait probablement - avec leur incorporation dans une filière « sans utilisation d'OGM » - le recours à des méthodologies différentes (LCR...) et surtout de disposer d'informations extrêmement précises sur les constructions, si ces organismes étaient réglementairement qualifiés d'OGM.

En parallèle des séquences d'ADN cible permettant de détecter, identifier et quantifier les OGM, il est nécessaire, pour satisfaire les critères de quantification de la réglementation européenne, de quantifier, en particulier pour les produits résultant d'un mélange, l'ingrédient dont est issu l'OGM. Cette notion réglementaire de dosage de la teneur en OGM par rapport à l'ingrédient, puis de l'additif et de l'arôme, a été traduite en termes analytiques par la teneur en chaque espèce végétale dans la matrice analysée. Toute méthode de quantification d'OGM doit donc disposer d'une technique de PCR quantitative permettant d'apprécier la teneur, en nombre de copies de la séquence cible (séquence dite de référence ou endogène ou encore « housekeeping gene »), de chaque espèce végétale. Si, *a priori*, ce besoin est moindre pour les graines et semences, elle peut s'avérer toutefois nécessaire si le transport ou le stockage de ces graines ou semences peut avoir induit, dans les bennes, camions ou silos, des contaminations fortuites par la présence de graines d'autres espèces végétales due à un précédent transport ou stockage. Comme pour les séquences de détection des OGM, les caractéristiques des tests PCR de ces gènes de référence ont été répertoriées dans les documents de travail de la normalisation européenne (CEN/TC 275/WG 11).

L'ensemble des critères, de performance en particulier comme les limites de détection et de quantification ou la taille des fragments amplifiés, auxquels doit répondre une méthode de détection basée sur les acides

---

<sup>11</sup> OGM, au sens de la réglementation européenne, résultant du croisement classique entre 2 OGM précédemment autorisés.

nucléiques a été recensé dans la norme expérimentale XP V 03-020-1 (AFNOR 2000) et dans les avant-projets de normes européennes.

La quantification des acides nucléiques initiaux (PGM et espèces végétales) peut être assurée de différentes manières.

La PCR en point final, compétitive ou double compétitive, constituait jusqu'à ces dernières années la méthode de référence avec néanmoins une gamme dynamique relativement restreinte (pourtant jusqu'à 5 logs dans certains articles) de quantification que ce soit par analyse de la quantité d'amplicons<sup>12</sup> des gels d'électrophorèse après amplification ou PCR-ELISA. Ce type de méthode est peu coûteuse en investissements, mais est par contre plus lourde en développements (plasmides de PCR compétitive, recherche des points d'équivalence...). La durée des analyses est plus ou moins longue selon la variante utilisée.

Les méthodes de PCR quantitative en temps réel plus récentes à technologie FRET<sup>13</sup>, telles par exemple que le déplacement de sondes à l'exo-nucléase (chimie TaqMan®), nécessitent un investissement coûteux en appareils permettant le suivi en continu de la fluorescence dégagée lors de l'amplification. Ces techniques, brevetées et commercialisées, bénéficient d'un excellent marketing et d'un engouement qui en font *de facto* quasiment un standard.

Les méthodes faisant appel aux dilutions limites et tests MPN, utilisés lors des développements, ne paraissent guère utilisées pour les analyses de routine.

Les PCR qualitatives, associées à des plans de contrôles par groupes, restent peu employées, probablement en raison du désavantage des durées assez longues des extractions et de la possibilité d'utiliser des groupes de taille suffisamment petite pour les PGM bénéficiant de tests immunologiques moins coûteux et plus rapides.

Le coût élevé des tests PCR et leur durée assez longue (48 heures en moyenne) résultent majoritairement de l'étape d'extraction des acides nucléiques.

Un certain nombre de kits de détection PCR quantitative sont dorénavant et déjà commercialisés (sociétés Takara, BioInside, Roche, Applied Biosystems...) alors que les analyses employant des puces à ADN sont déjà proposées (GeneScan...).

On peut se demander si une filière « sans utilisation d'OGM » devrait reprendre, à l'instar de la réglementation sur la présence fortuite, une quantification par rapport à l'espèce végétale, ou si une quantification par rapport à l'analyte total (ADN par exemple) ne serait pas mieux perçue du consommateur.

### c Compatibilité des méthodes

A notre connaissance, il n'existe actuellement aucune étude ayant porté sur la compatibilité des différentes méthodes utilisées dans les laboratoires, que ce soit selon les plans de contrôle utilisés ou entre méthodes basées sur le phénotype ou l'ADN, pas plus qu'il n'existe d'études complètes de la variabilité acceptable des techniques quantitatives. La première étude connue sur la variabilité observée lors d'un test européen organisé par le BgVV<sup>14</sup> a mis en évidence une variabilité inter-laboratoires de plus de 20% pour l'ABI 7700 SDS de Perkin Elmer Applied BioSystems autour du seuil réglementaire de 1% (BgVV 2000). Bien qu'il soit recommandé de fournir les résultats de PCR quantitatives avec des indications de la variabilité observée, celle-ci est rarement fournie dans les rapports des laboratoires. La seconde étude, impliquant moins de laboratoires, indique une variabilité (sous forme de RSD) de 10 à 39% selon les niveaux de présence d'OGM étudiés.

De nombreux problèmes subsistant pour les méthodes quantitatives peuvent affecter leur fiabilité. Pour n'en citer que quelques uns...

Quelle est la meilleure manière (spectrophotométrie, analyse de gels d'électrophorèse, « pre-run » de PCR quantitative temps réel..) de doser en routine l'ADN extrait de façon à assurer par tube PCR une teneur en ADN adéquate permettant de calculer les nombres de copies en PGM et en gène de référence, calculer les limites de détection et de quantification pour les échantillons à faible teneur en ADN... ?

<sup>12</sup> Fragments d'ADN amplifiés par exemple par PCR.

<sup>13</sup> Fluorescence Resonance Energy transfert

<sup>14</sup> Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin.

Peut-on établir une relation fiable entre la teneur en ADN (OGM et gène de référence) et par exemple la masse de l'ingrédient de chacune des cibles ou le nombre de graines présentes ? Quel est l'impact de l'origine maternelle sur les teneurs en ADN des graines ? Quel est l'impact de l'endo-reduplication (jusqu'à 389 C par cellule végétale) des tissus végétaux sur la relation teneur en ADN / masse des semences utilisées pour produire les standards certifiés de calibration (Kowles 1985, Lemontey *et al.* 2000, Schweizer *et al.* 1995) ?

Sachant que les OGM actuellement autorisés ont fait l'objet d'une autorisation au cas par cas devant assurer leur absence d'effet néfaste sur la santé humaine et animale, doit-on fixer arbitrairement une taille de prise d'essai fixe pour toute matrice à analyser (ingrédient, arôme, additif...) ou prendre en compte la teneur variable en analytes de ces matrices ? Dans ce dernier cas on risquerait de voir augmenter les tailles de prises d'essai jusqu'à des valeurs économiquement et techniquement inacceptables (l'analyse devrait ainsi porter sur quasiment toute la production mondiale pour certains produits à très faibles teneurs en ADN, comme des supports d'arôme, ce qui éliminerait *de facto* le produit du marché...) ?

Faut-il favoriser des PCR multiplex (plusieurs PCR dans un même tube) sachant que les limites de détection et de quantification en sont affectées, que certains appareils ne peuvent effectuer de telles mesures et que les calibrations entraînent des biais, dont la solution est loin d'être triviale ?

Quel est le nombre de mesures PCR (réplications) par ADN extrait fournissant une variabilité acceptable tant pour les transactions commerciales qu'en termes de coûts d'analyses ? Cette variabilité acceptable peut-elle - ou doit-elle - différer, et dans quelles limites, entre les faibles teneurs en OGM (présence fortuite) et celles des fortes teneurs en OGM (OGM à intérêt médical par exemple) ?

Comment peut-on différencier et quantifier un OGM résultant d'un empilage de gènes (« gene stacking »), considéré comme un nouvel OGM au sens de la réglementation européenne, des OGM parents ayant servi à le produire par croisement classique ? Dans l'état actuel des techniques de détection, la détection, même par les fragments de bordure, surestimerait la teneur en OGM, hormis une détection menée graine à graine, ce qui favorise les consommateurs...

Comment peut-on assurer la stabilité et la continuité de fourniture des standards certifiés de calibration ? Doit-on par exemple établir deux centres publics de référence pour la production de ces standards (un aux USA et un en Europe par exemple) et définir une variété (cultivar) pour chaque OGM comme standard, quelle que soit la variété présente dans la matrice analysée ?

Doit-on n'utiliser que des méthodes validées lors de tests inter-laboratoires, longs et coûteux, ou le développement de méthodes validées en interne, ou commerciales au vu du fort développement des kits de détection, mais satisfaisant à des critères de performance définis dans les normes permettra-t-elle de développer rapidement et au moindre coût les méthodes (Bertheau *et al.* 2001) ?

Faut-il commencer à considérer des méthodes de détection prenant en compte des analytes (polysaccharides, lipides...) autres que les protéines et l'ADN pour les matrices analysées contenant peu ou très peu de ces analytes (huiles très raffinées, supports d'arômes...) pour satisfaire, par exemple, les besoins d'une éventuelle filière « sans utilisation d'OGM » ?

Un grand nombre de ces questions font l'objet d'intenses discussions dans les instances normatives nationales comme l'AFNOR, et internationales comme le CEN<sup>15</sup>/TC 275/WG 11, l'ISO<sup>16</sup>. Un recensement des méthodes disponibles est en cours au niveau d'un groupe de travail du *Codex Alimentarius*.

Comme dans d'autres domaines, les développements en méthodes analytiques peinent à suivre rapidement les décisions réglementaires.

#### **d Recherche de PGM non autorisées.**

Bien que le présent projet de recherche soit limité aux PGM autorisées au sein de l'UE, on ne peut totalement éviter d'évoquer la problématique de la détection des PGM non autorisées, OGM pour lesquels généralement peu d'informations sont disponibles dans l'UE, sur l'éventuel développement de filières « sans utilisation d'OGM ».

En préambule rappelons qu'on ne peut trouver que ce qu'on cherche...

Quels sont dès lors les cibles et techniques utilisables pour la détection d'OGM non autorisés ?

---

<sup>15</sup> Comité Européen de Normalisation

<sup>16</sup> International Standard Organization

Le premier besoin identifié est celui d'une base de données recensant les différents OGM autorisés de par le monde avec les outils de détection afférant. Une telle base est prévue dans le cadre du protocole de Carthagène (réunion de Montréal, Janvier 2000). Quand une telle base sera t-elle disponible et qui fournira, et validera, les éléments nécessaires en particulier à la détection : les sociétés fournissant les informations ou les autorités compétentes des pays ? Différentes bases nationales (BgVV, BATS) ou internationales (CCR d'Ispra, Biotrack Biobin de l'OCDE) pourraient constituer l'amorce de cette base de référence.

Dans l'attente d'une telle base internationale, différentes stratégies sont utilisées par les importateurs et laboratoires. En premier lieu un importateur doit obtenir un certificat de l'exportateur d'un pays tiers quant à la conformité des produits importés avec la réglementation européenne, c'est à dire l'absence d'OGM, à un certain seuil et avec un certain intervalle de confiance, non autorisés dans l'UE. Certains laboratoires de pays tiers semblent pouvoir satisfaire les besoins de leurs exportateurs... Les laboratoires de contrôle peuvent se baser sur les quelques éléments connus d'OGM autorisés dans des pays tiers pour détecter ou au moins suspecter la présence d'OGM non autorisés. Citons quelques unes des stratégies couramment utilisées ou en développement :

Il doit, par exemple, y avoir concordance, au moins pour une espèce donnée, entre la teneur en P35S, élément actuellement commun à tous les OGM autorisés dans l'UE et la somme des teneurs en OGM autorisés déterminées par des méthodes spécifiques ( $P35S = Bt176 + Bt11 + T25 + Mon810$ ). La difficulté s'accroît évidemment avec les mélanges d'espèces végétales ou l'autorisation d'OGM sans P35S (cas du maïs GA21, par exemple, en cours d'instruction au niveau européen).

Il ne doit pas y avoir, dans un échantillon, de séquence(s) absente(s) des OGM autorisés. Par exemple, les séquences Cry9C doivent être actuellement absentes, aux limites de détection près, de tout produit importé.

L'ensemble des plantes dicotylédones actuellement transformées l'ont été à l'aide d'un vecteur bactérien, *Agrobacterium tumefaciens* ou *rhizogenes*. Ce type de transformation laisse une (des) signature(s) dans le(s) chromosome(s) sous forme de fragments de bordure (dits LB et RB) encadrant l'insert ou une de ses parties. Dans un certain nombre de matrices brutes comme les graines, l'amplification par PCR de l'ADN entre ces fragments et une approche matricielle par hybridation sur sondes de puces à ADN (micro-arrays) doit permettre de distinguer des spots d'hybridation ne correspondant pas à ceux des OGM autorisés. Des variantes de type AFLP<sup>17</sup> devraient permettre de répondre aux mêmes besoins. Une telle approche est en cours d'étude dans un programme européen débuté en 2001 (<http://www.GMOchips.org/>). D'autres approches similaires sont également étudiées pour les OGM de monocotylédones, donc non transformées par les bactéries précédemment nommées.

L'ensemble de ces stratégies nécessite dans tous les cas une veille technologique, des développements, des validations et des tests assez lourds en routine... Notons la volonté de coopération de la majorité des sociétés de biotechnologie, même dans le cas de la détection de PGM encore non autorisées dans l'UE.

## II.4 Eléments de choix des méthodes et des laboratoires

### a Eléments de choix.

Il n'existe pas de recette type permettant de recommander un ensemble de techniques et encore moins un laboratoire prestataire de services. Une première détection par criblage P35S est l'étape préliminaire, voire unique, utilisée par la majorité des opérateurs européens (cf. ci-dessous).

En France, on peut en premier lieu considérer qu'un laboratoire de détection des OGM ne peut faire l'impasse de son appartenance à la commission AFNOR V03E, ce qui ne décerne en soi aucune garantie de fiabilité des résultats. C'est néanmoins un lieu d'échanges d'informations qu'il vaut mieux fréquenter.

Un laboratoire de détection doit être sous assurance qualité, suivre un minimum de bonnes pratiques de laboratoire et au mieux l'ensemble des recommandations d'organisation du travail et du laboratoire recensés dans la norme XP V 03-020-1 (AFNOR 2000). Les laboratoires d'analyse peuvent utiliser des techniques normalisées quand elles existent et au minimum utiliser des méthodes satisfaisant aux critères de performance de la norme AFNOR. Bien que progressant à grand pas, la normalisation en cours ne permet

---

<sup>17</sup> Amplified Fragments Length Polymorphism

pourtant pas de disposer actuellement d'un corpus de techniques validées et normalisées couvrant l'ensemble des besoins recensés.

Enfin la participation à des tests d'aptitude (BIPEA et/ou FAPAS par exemple) et, si possible, à des validations inter-laboratoires sont hautement recommandées, en particulier si une accréditation est envisagée. Pourtant ces tests d'aptitude pèchent par l'absence de retour (« feed-back ») aux laboratoires, devant leur permettre d'analyser les défauts et d'améliorer leurs techniques.

**b Méthodes validées par un test inter-laboratoires vs. méthodes intra-laboratoire basées sur des critères de performance.**

L'utilisation en routine de techniques validées par un test inter-laboratoires est une pratique commune habituelle dans le domaine analytique, concerné ou non par la détection des OGM.

Bien que la validation inter-laboratoires soit encore demandée dans de nombreuses instances tels que les groupes de travail CEN et ISO, le nombre d'OGM à détecter, le nombre de matrices à analyser et le type de méthodes à utiliser (protéines vs. ADN, criblage ou spécifique d'insert ou spécifique d'événement de transformation, qualitative ou quantitative, plans de contrôles par groupes unique ou multiples) laisse entrevoir l'inanité de vouloir procéder à un nombre aussi important de validations. Il est de plus en plus communément admis que la validation inter-laboratoires constitue un exercice coûteux, vorace en temps, et, surtout, d'intérêt limité car ne constituant qu'un instantané, une chambre d'enregistrement, de tout ou partie des résultats, sans retour aux laboratoires leur permettant d'améliorer leurs pratiques, ni objectif véritablement formalisé.

Dans un certain nombre de cas, les méthodes et mesures validées en interne et basées sur des critères de performance (méthodes dites de type III) constituent le fondement d'une approche systémique qui pourrait satisfaire plus aisément les besoins des utilisateurs, producteurs et analystes en « méthodes validées ». L'intérêt croissant, en particulier au niveau du *Codex Alimentarius*, pour ces méthodes et mesures basées sur les critères de performance proviennent de leur moindre coût en argent et en temps, particulièrement au niveau des validations, et de leur probable capacité à assurer une meilleure comparabilité et la compatibilité des méthodes, et, au delà, de leurs résultats. Cette approche fournit des critères objectifs formalisés d'acceptation ou de rejet tant des méthodes que des résultats (Bertheau *et al.* 2001).

Cette approche « critères de performance », retenue par l'AFNOR, a présidé à l'établissement de la norme récemment parue. Pourtant, au vu de l'état de l'art des méthodes de détection et des habitudes actuelles un compromis devra certainement être encore recherché, pendant un certain temps, entre les ancien et nouveau schémas de validation. Elle n'a que récemment été prise en compte au CEN pour l'établissement d'un document général.

### III La traçabilité

La traçabilité, et le contrôle documentaire associé, constitue, aux côtés des méthodes analytiques, le deuxième volant de la certification d'une filière de production de qualité et donc d'une éventuelle filière « sans utilisation d'OGM ». Nécessaire, mais non suffisante, cette traçabilité devrait permettre de contenir les coûts de mise en place d'une telle filière. Elle s'avère indispensable en particulier à chaque étape de la production (dite « point critique ») faisant disparaître tout ou partie des analytes actuellement utilisés par les méthodes analytiques (chauffage en milieu acide, extrusion, fermentations et réactions enzymatiques pouvant réduire les teneurs en analyte...). La traçabilité doit donc se préoccuper de l'origine et des procédés mis en œuvre.

Si la notion de traçabilité, déjà utilisée *de facto* dans les filières conventionnelles, a déjà été normalisée dans certains cas, comme la documentation ou les filières bovines, elle n'a pourtant fait jusqu'à présent l'objet d'aucun travail de normalisation dans le cas des OGM, en particulier pour les transactions entre entreprises. L'enquête menée en 1998 en France sur les méthodes de détection a mis en évidence l'utilisation de nombreux certificats, généralement sur l'honneur, d'absence d'OGM dans les procédés de production, sans que la validité de ces certificats puisse être clairement établie. On est loin d'une traçabilité organisée, comme dans le cas de la filière bovine.

L'importance de la traçabilité pour la filière « sans utilisation d'OGM » s'accroît avec le nombre de points critiques présents au long d'une filière de production, en fonction du périmètre retenu pour la filière « sans utilisation d'OGM », du nombre d'analyses nécessaires et du type de méthodes d'analyse disponibles, eux-mêmes fonction de la pression en OGM.

L'incorporation, par exemple, des auxiliaires technologiques dans le périmètre de la filière et l'absence de méthodes de détection pour leur certification d'origine renforcerait les besoins en traçabilité d'origine de ces auxiliaires et de process des produits y faisant appel.

### IV Surcoûts éventuels dus aux analyses

Une filière « sans utilisation d'OGM » aurait-elle un surcoût, ce qui ne veut pas forcément dire un prix plus élevé, que la filière « conventionnelle » pouvant contenir des OGM, à un niveau inférieur ou non au seuil réglementaire européen de dispense d'étiquetage (258/97/CE, 1139/98/CE, 49/2000/CE) ? Cette partie du programme s'attache à estimer quelques montants et définir les origines de surcoûts d'une telle filière dus aux analyses, et aux analyses seulement.

Cette partie ne prétend donc en rien rendre compte des éventuels surcoûts de la filière en général pour lesquelles des estimations sont disponibles par ailleurs (DG Agriculture 2000). Rappelons à nouveau que nos estimations ne prennent en compte que le maïs et le soja dans la limite des autorisations européennes actuelles.

Notre stratégie a consisté à rassembler et analyser des données sur les pratiques actuelles de détection des PGM, en appréciant autant que possible l'impact de la réglementation actuelle (seuil de 1% de dispense d'étiquetage) par rapport à la situation avant son entrée en vigueur, à estimer l'impact, de l'amont vers l'aval, des coûts actuels de certification des produits dispensés d'étiquetage et enfin à discerner les paramètres qui pourraient accroître ou non ces coûts d'analyse.

#### IV.1 Résultats de l'enquête menée avec le groupe 4

L'enquête, réalisée avec le programme 4 auprès de 21 entreprises françaises (18 filières maïs et 11 filières soja), ne permet pas de disposer d'éléments quantitatifs suffisants pour apprécier le surcoût réel dus aux analyses dans le cadre des différents scénarii élaborés. Dans la majorité des cas, il ne semble pas exister de comptabilité analytique permettant de discerner les coûts de certification au seuil réglementaire des autres coûts de certification et plus globalement d'assurance qualité. Cette enquête donne, au mieux, un aperçu de la situation actuelle et de la prise en compte, de façon variable selon les entreprises ayant accepté de répondre, de la réglementation européenne sur la dispense d'étiquetage en deçà d'un seuil de présence fortuite en OGM de 1%, ou de seuils plus drastiques dans quelques cas correspondant quasiment tous à des opérateurs de l'amont.

La majorité des entreprises déclarant viser la mise en place de filières « sans utilisation d'OGM » annoncent :

des périmètres ne comprenant que les produits pris en compte par la réglementation européenne, à l'exception de certaines sociétés prenant également en compte les aliments pour bétails. Aucune ne cite par exemple les auxiliaires technologiques (enzymes, acides aminés...) parmi les produits à surveiller. Il semble pourtant que la majorité des entreprises françaises soient globalement réticentes à l'utilisation d'auxiliaires technologiques issus d'OGM, ce qui pourrait expliquer les observations...

des seuils de définition de 0,01% en OGM, soit la limite de détection préconisée par l'AFNOR pour 20 % des entreprises ayant répondu, de 0,1% par ingrédient, seuil de quantification recommandé par la norme AFNOR, pour 40 % des entreprises ayant répondu et enfin de 1%, pour les 40% d'entreprises restantes. Comme précédemment dit – et comme on pouvait s'y attendre, les seuils les plus drastiques sont généralement retrouvés chez les opérateurs de l'amont (semences et première transformation en particulier).

un nombre décroissant d'analyses (majoritairement P35S) au fur et à mesure qu'on s'éloigne de l'amont de la production (de plusieurs centaines d'analyses annuelles avec des budgets par entreprise de plus de 200 000 F pour l'amont à quelques dizaines d'analyses au fur et à mesure qu'on se rapproche du consommateur).

quelques rares investissements importants, pour les opérateurs en amont, sont annoncés, tant en matériel, recrutement de personnel que formation, alors que l'aval se caractérise plus par la demande de certificats que par des investissements. D'une manière générale, la « certification OGM » semble avoir été relativement facilement intégrée dans les plans d'assurance qualité des entreprises ayant répondu.

Rappelons néanmoins les limites de cette enquête : un nombre relativement restreint d'entreprises ayant répondu et la taille relativement importante de celles-ci. Au vu des types d'entreprises et des secteurs concernés, nous pensons néanmoins disposer d'un instantané assez représentatif de la situation actuelle, induite par l'entrée en vigueur de la réglementation concernant le seuil de présence fortuite de 1%, ce qui devrait fournir des indicateurs sur les implications des périmètres des scénarii de l'éventuelle filière « sans utilisation d'OGM ».

## **IV.2 Origines d'éventuels surcoûts dus aux analyses**

Puisque la filière « sans utilisation d'OGM » n'existe pas, et que les données manquent, quels peuvent être alors les sources d'éventuels surcoûts d'analyses ?

Une filière « sans utilisation d'OGM » doit, comme dans le cas des filières conventionnelles, éviter toute présence fortuite et ne peut donc recourir à des dilutions de produits ayant une teneur fortuite en OGM supérieure au seuil de la filière. Chaque lot doit donc être conforme au cahier des charges. On peut dès lors conclure à un fort impact de la réglementation actuelle dans l'organisation pratique d'une éventuelle filière « sans utilisation d'OGM ».

Quel que soit le produit analysé et la qualification de la filière, d'éventuels surcoûts peuvent être attendus :

- du développement des méthodes d'analyses nécessaires,

- de l'achat de matériel et du temps consacré à d'éventuels prélèvements spécifiques,

- du recrutement et de la formation de personnel spécifique,

- des coûts de gestion et d'envoi des échantillons pour analyses, si ceux-ci ne sont pas analysés en interne,

- du type de plan de contrôle utilisé, nécessitant plus ou moins de matériel et donc plus ou moins de prélèvements et de l'intervalle de confiance recherché.

D'une manière générale, ces sources induiraient d'éventuels surcoûts déjà majoritairement pris en charge par les besoins des filières conventionnelles régies par le seuil de présence fortuite de 1%.

Restent donc des surcoûts à attendre :

- de l'éventuel accroissement du nombre d'analyses en fonction du seuil retenu pour la filière, de la pression environnante en PGM (faible à nulle dans l'état actuel de la production européenne mais à prendre en compte en raison des délocalisations de la production de certains produits comme les semences...), et des niveaux de risques négociés et acceptés par le producteur/vendeur et l'acheteur/consommateur.

- du coût des matières analysées, dans le cas de matrices chères ou peu disponibles et de l'impact de leur destruction pour analyse, en particulier en production de semences,

des déclassements dus au non respect du cahier des charges, dont l'importance peut varier selon les techniques de production (flux continu ou non...).

Comme les semences constituent la première étape obligée conditionnant la création d'une filière « sans utilisation d'OGM », chaque lot doit dès lors présenter une teneur en OGM inférieure, voire égale, au seuil de présence fortuite définissant cette filière.

Nous avons donc dans un premier temps, toujours dans le cadre prédéfini de l'étude restreinte aux maïs et soja :

déterminé les éventuels surcoûts au niveau de la production des semences (celles-ci étant produites autant sur le continent européen que sur d'autres continents en contre-saison ou non),

estimé l'impact des coûts des semences sur les produits agricoles au sortir du champ,

enfin apprécié l'impact du coût des semences sur les produits transformés, au moins pour la première transformation, sachant qu'il est impossible de déterminer les surcoûts selon toutes les utilisations possibles des produits.

Le coût des analyses ne constituant qu'une partie du prix de revient des semences, nous pensons ainsi disposer d'un indicateur de la répercussion possible des surcoûts qu'engendrerait une augmentation des coûts d'analyses des semences sur l'aval de la filière. Les analyses du secteur aval devaient être prises en compte grâce aux éléments fournis par l'enquête (obligations de moyens et de résultats).

#### a Surcoûts dus aux analyses dans le cas des semences.

Les semences constituent un domaine à part, tant comme point de départ obligé de toute filière mettant en jeu des produits végétaux, que par les coûts des matrices analysées ou les plans de contrôles généralement utilisés...

Le tableau suivant donne un exemple de la taille des échantillons, en nombre de grains, à analyser en fonction des seuils de détection visé et de l'intervalle de confiance recherché.

4 *Effet du seuil de présence fortuite toléré sur la taille des échantillons de graines (semences ou de consommation) à analyser dans le cas d'un plan de contrôle « simple » (un seul groupe [échantillon de laboratoire] broyé pour analyse).*

Intervalle de confiance recherché	Nombre minimal de graines à analyser par lot		
	95%	99%	99,9%
Seuil de présence fortuite			
5%	59	90	135
1%	299	459	638
0,5%	598	919	1379
0,1%	2 995	4 603	6 905
0,01%	29 956 (soit près de 9 kg de maïs)	46 050 (soit plus de 13 kg de maïs)	69 075 (soit plus de 20 kg de maïs)

L'examen de ce tableau montre que :

des difficultés pratiques, difficiles à gérer en routine pour un laboratoire d'analyses moléculaires, apparaissent pour les faibles valeurs de présence fortuite même avec un intervalle de confiance de 95%, ceci quelque soit le type de graines utilisées (semences ou consommation).

s'il s'agissait de semences de base ou pré-base, la quantité nécessaire :

rendrait le coût d'analyse prohibitif, du seul fait du prix de revient de ces semences,

réduirait la capacité de production des semences commerciales, ou retarderait fortement leur disponibilité.

Cet ensemble de considérations milite à nouveau pour l'utilisation d'un seuil raisonnable de définition de la filière.

#### **Coût du matériel analysé.**

Ce coût est particulièrement élevé pour du matériel à haute valeur ajoutée (en particulier les semences de base et pré-base, mais concernerait aussi de futurs OGM à application médicale, certains produits de l'aval...).

Dans le cas d'une importante société semencière, le surcoût annuel dû uniquement au prix de revient du matériel analysé, et donc détruit, a ainsi été estimé à plus de 100 000 F, et encore ne s'agissait-il que de s'assurer d'être, avec un bon intervalle de confiance, en dessous du seuil de 1% (cf. ci-dessous).

### Nombre et type d'analyses et stratégies d'analyse.

Le surcoût éventuel serait fonction :

du coût unitaire de la méthode employée (biotest, test immunologique, test PCR, micro-arrays). La grande majorité des entreprises enquêtées font appel aux tests PCR, plus polyvalents en particulier par la capacité de criblage, même quand les produits soumis à analyse pourraient l'être par des méthodes moins coûteuses, adéquates dans l'état actuel des autorisations européennes mais plus nombreuses à mettre en œuvre. La production sur divers continents favorise généralement le recours à des méthodes polyvalentes, et donc généralement à la PCR.

du nombre et du type d'OGM à détecter et quantifier. La majorité des entreprises se contentent actuellement d'un test de criblage P35S quelquefois suivi parfois de tests d'identification qualitative des OGM autorisés mais généralement sans quantification de ces OGM. Fondamentalement, cette deuxième série de tests PCR n'apporte donc rien aux premiers résultats. La disponibilité de tests de PCR quantitative spécifiques des événements de transformation paraît particulièrement cruciale pour les firmes de semences.

du nombre d'analyses pratiquées, qui est fonction de la pression environnante en OGM (le nombre de test pratiqués par une des sociétés enquêtées est ainsi multiplié par 20 selon le lieu de production de semences - Europe vs. USA) et des risques acceptés par le vendeur et l'acheteur.

du nombre d'analyses, fonction du seuil de tolérance de présence fortuite et des risques acceptés des vendeurs et acheteurs. Le tableau suivant donne une idée de l'impact des différentes valeurs du seuil de tolérance de présence fortuite sur le nombre d'analyses nécessaires (plan de contrôle par groupe) pour certifier les lots de semences.

- 5 *Comparaison des durées et coûts de plans de contrôles « simple » et par groupes (non séquentiel) pour un seuil de détection de 1% (seuil réglementaire). Exemples de plans pour satisfaire, avec 3 000 graines au total, un client au seuil de 1% (LQL) c'est à dire le seuil réglementaire européen. Dans cet exemple théorique, le vendeur choisit un seuil (AQL) de 0,2% (5 fois moindre que le LQL) pour faire accepter son lot avec une bonne probabilité et dispose de tests immunologique et PCR.*

		Prix unitaire moyen (exemple d'un caractère détectable par PCR et immunologie)		Durée approximative (hors durée d'échantillonnage)	Prix total de l'analyse (HT (hors prix de la matrice))	AQL= 1%, LQL=0,2%, $\alpha$ , $\beta$	Nombre maximum de groupe(s) positif(s) (OGM) pour que l'acheteur accepte le lot	
		Test immunologique « dipstick » (limite de détection inférieure à 0,5 %)	PCR qualitative (limite de détection de 0,01%)	PCR quantitative (limite de quantification de 0,1%)				
Plan de contrôle simple (1 groupe de 3 000 graines)			Criblage 700 F HT	Criblage 1 000 - 2 500 F	48 h	1 700 - 3 200	$\alpha=99,8\%$ , $\beta=0\%$	0
Plan de contrôle par plusieurs groupes, non séquentiel	2 groupes de 1500 graines	10 - 60 F HT			2 h	20 - 120	$\alpha=90,3\%$ , $\beta=0\%$	1
	4 groupes de 750 graines				2 h	40 - 240	$\alpha=36,5\%$ , $\beta=0,2$	3
	6 groupes de 500 graines				3 h	60 - 360	$\alpha=6,4\%$ , $\beta=3,9\%$	5
	20 groupes de 150 graines				6 h	200 - 1 200	$\alpha=0,1\%$ , $\beta=1,9\%$	11
	50 groupes de 60 graines				8 h	500 - 3 000	$\alpha=0\%$ , $\beta=3,9\%$	16
	60 groupes de 50 graines				8 h	600 - 3 600	$\alpha=0\%$ , $\beta=4,9\%$	17

En fait ce tableau basé, sur un exemple théorique pour un OGM, sous-estime considérablement les coûts d'analyses par échantillon, car ne considérant qu'un seul OGM. Rien que dans la situation actuelle des PGM autorisés dans l'UE, le coût des analyses immunologiques devrait être multiplié au minimum par 2 (Bt176, Bt11 et Mon810 possèdent un gène CryIA(b) tandis que T25 possède un gène PAT). Par contre ce tableau souligne les risques d'incompréhension qui risquent de surgir si l'acheteur de semences, une coopérative par exemple, fait procéder à une analyse par plan simple (un groupe analysé) et refuse de partager tout risque avec le vendeur (producteur de semences).

Le tableau suivant présente une situation concrète, avec un plan de contrôle utilisé réellement pour satisfaire au minimum le seuil de 1% réglementaire.

- 6 *Surcoût (hors main d'œuvre pour prélèvements et surcoûts dus aux destructions de semences pour analyse et déclassements) dus aux analyses de contrôle selon le stade (recherche, développement, production) pour 500 lots de semences (établi selon le plan de contrôle actuel d'une société semencière). Coût d'analyse moyen de 1 000 F (criblage en PCR quantitative P35S avec un coût constaté en prestation de service de 900 à 2 500 F.).*

Seuil de tolérance de présence fortuite d'OGM (%)		0,1	0,5	1	5
		Nombre d'analyses			
Stade	Recherche	210	210	210	50
	Développement	90	90	90	70
	Production de semences	2000	500	100	30
Nombre total d'analyses		2 300	800	300	150
Coût total des analyses (F) PCR effectuées dans un laboratoire prestataire de service (hypothèse haute)		2 300 000 (+1530%)	800 000 (+ 530%)	300 000 (+ 200 %)	150 000 (100%)

Ce tableau sous-estime également le nombre de PCR nécessaires et donc les surcoûts, le test PCR P35S n'étant valable que dans certaines circonstances (fonction du domaine d'application et des autorisations de dissémination).

La filière semencière française réalise un chiffre d'affaires de 4 milliards de F. (France et export). L'application par l'interprofession d'un tel plan de contrôle par PCR P35S entraînerait pour les 15 000 lots de semences commercialisés annuellement (incluant semences de bases et semences certifiées) une augmentation des prix de revient (coûts d'analyses hors coût de main d'œuvre, de destruction de produits pour analyses et déclassements) des semences de 1% pour un seuil de 0,1% de présence fortuite, dans la situation actuelle d'autorisations de l'UE. Certains semenciers nous ont par ailleurs relaté, qu'avec leur plan de contrôle et en tenant compte de plus de PGM à contrôler, les surcoûts dus aux analyses avaient été de 7% pour le seuil de présence fortuite de 1%, et seraient de 12% pour un seuil de 0,1%.

Les plans de contrôle variant selon les sociétés, il paraît pourtant difficile d'extrapoler à partir des données d'une seule de celles-ci. Plus globalement nous ne saurions fournir avoir une vue synthétique des surcoûts imputables aux seules analyses sans une analyse exhaustive des pratiques, si les sociétés l'acceptaient dans le contexte concurrentiel fort que l'on connaît et les implications que ces données auraient dans leur relation avec les autres acteurs (première transformation...) des filières.

#### **Déclassement des lots non conformes.**

On peut estimer que, pour les semences comme pour les autres produits en aval, les déclassements de lots non conformes constitueraient la source majeure de surcoûts.

Dans le cas des semences, le seul pour lequel des données soient disponibles, 37% des semences atteignent actuellement 99,9% de pureté et 72% le seuil de 99% (donc 28% présentent plus de 1% d'impuretés). Ces données s'appliquent aux critères classiques actuels de pureté variétale, hors OGM.

Les opérateurs interrogés estiment qu'avec les pratiques actuelles de production de semences, les déclassements, qui auraient déjà induit un surcoût d'environ 25% au seuil de présence fortuite de 1% d'OGM, induiraient un surcoût d'environ 60% pour un seuil de présence fortuite de 0,1%.

Quelles que soient les valeurs exactes de surcoûts dus aux déclassement, il est évident que les surcoûts effectifs des analyses seront dans ce domaine fonction des capacités à valoriser les lots déclassés, probablement plus comme semences...

## Conclusion

Tant les limites analytiques des méthodes (variabilité...) que les coûts des matières premières utilisées pour les analyses militent dans le secteur des semences pour un seuil techniquement et économiquement réaliste, supérieur ou égal à 0,1% de présence fortuite. Il est vraisemblable que même un seuil de 0,1% nécessite une certaine réorganisation, coûteuse, des systèmes de production des semences, ne serait-ce qu'en évitant les zones à forte pression en OGM.

Signalons par ailleurs que le projet de directive européenne sur les semences en cours de discussion dans les groupes de travail de la DG-SANCO, envisage un seuil de tolérance de présence fortuite de 0,5% pour les plantes autogames, 0,3% pour les plantes allogames et un seuil de tolérance « zéro » (aux limites de détection près) pour les OGM non autorisés avec un risque de 0,1%.

Il serait donc peu logique de définir une éventuelle filière « sans utilisation d'OGM » avec un seuil inférieur à 0,1%, tant en raison des limites des méthodes analytiques, des coûts des analyses nécessaires que de l'implication de la réglementation européenne sur les semences, à moins de n'accepter un surcoût en analyses, et donc des prix de revient, important.

### b Répercussion du prix des semences sur celui des produits de première transformation

Il n'est malheureusement pas possible de faire une étude exhaustive de l'impact du coût des semences sur le prix de revient de chaque produit final ou intermédiaire. Nous avons donc cherché, au travers de 3 exemples, à connaître l'impact actuel du coût de ces semences sur les produits de première transformation, sachant que cet impact s'atténue ensuite au long de la filière. Cette estimation devrait fournir une indication quant à l'éventuelle répercussion des surcoûts d'analyses prévisibles.

Cette approche ne couvre qu'en partie tous les cas possibles. C'est ainsi que les produits à consommation directe (tels que le maïs doux s'il venait à être concerné ou d'autres produits de consommation directe comme des fruits ou légumes) seraient largement plus sensibles au prix de revient des semences, et donc aux surcoûts dus aux analyses d'une filière « sans utilisation d'OGM ».

#### Semences et amidonnerie

L'amidonnerie constitue un des premiers débouchés du maïs dans l'alimentation humaine. De nombreux produits dérivés sont retrouvés tout au long des filières de production.

#### 7 Impact actuel du prix des semences de maïs sur ceux de l'amidonnerie.

Coût moyen de la semence à l'hectare : 650 F / ha		
	Production moyenne de 90 q vendus environ 70 F / q : 6 300 F / ha (hors aides compensatoires)	
	Impact du prix de la semence dans le prix de revient du grain, environ 10 %	
	Première transformation en amidon : 5,355 tonnes (vendus env. 1 800 F/T) soit	
30 % (1,6 T) en amidon séché natif vendu environ 2 000 F/T	50 % (2,6775 T) transformés en sirop de glucose vendus environ 3 000 F / T	20 % (1,07 T) en amidon modifié vendu environ 2-3 000 F / T
	Nombreux produits (sorbitol, etc.) vendus à plus de 4 000 F / T	
3 200 F	8 032 F (hypothèse basse ne prenant pas en compte la production de sorbitol, etc.)	2 140 F (hypothèse basse)
	Hypothèse basse du revenu après première transformation : 13 372 F	
Impact du prix de la semence dans le prix des amidons et produits dérivés (hypothèse haute) : 5,6 %		

Les résultats de l'enquête montrent qu'à chaque ensemble d'analyses PCR, d'un coût unitaire moyen de 1 000 F., il faut ajouter environ 250 F de frais de prélèvement pour les échantillons, 150 F. de coût logistique et des coûts en personnel traitant la logistique et les agréments de lots. A ces coûts on peut également ajouter dans certains cas des analyses spécifiques des inserts (quand la PCR de criblage s'avère positive), soit à la demande du fabricant, soit à la demande du client, sur produit fini ou en cours de production (certains clients exigent une analyse PCR par citerne de produit livré) et enfin des frais annexes de l'incorporation des critères OGM dans le plan d'assurance qualité de la société.

Globalement, dans l'environnement actuel de faible pression en OGM, l'ensemble des surcoûts, relevés pour le seuil actuel de 1%, est de l'ordre de 3,3 à 3,5 F par tonne de maïs mise en œuvre.

### Semences et semoulerie

Il s'agit là aussi d'un débouché important du maïs dans l'alimentation humaine.

#### 8 Impact actuel du prix des semences de maïs sur ceux de la semoulerie.

Coût moyen de la semence : 800 F / ha
Production moyenne de 90 q vendus environ 80 F / q : 7 200 F (hors aides compensatoires)
Impact du prix de la semence dans le prix de revient du grain, environ 12,5%
Transformation en semoule 5 T vendu env. 1 700 F / T soit 8 500 F.
Impact du prix de la semence dans le prix de la semoule : env. 9,41 %

Là aussi les frais de logistique, difficilement chiffrables car généralement non différenciés par les firmes - dans leur réponse à l'enquête - des frais généraux liés à l'assurance qualité, s'ajoutent aux frais d'analyse proprement dits.

### Semences et dérivés du soja

L'alimentation humaine ne constitue, en volume, qu'un faible débouché de la production de soja.

#### 9 Impact actuel du prix des semences sur ceux des dérivés du soja.

Coût moyen de la semence : 1 000 F / ha		
	Production moyenne de 25 q / ha soit vendus en moyenne 120 F/q : 3 000 F / ha (hors aides compensatoires)	
75 % (1,875 T) en tourteau vendu en moyenne à 1 700 F : 3 187 F /ha	Autres valorisations de la fève (valeurs non connues)	Moins de 2% en Lécithine (0,05 T) à 3 000 F/T : 350 F /ha
	L'impact (%) du coût de la semence sur le prix de vente moyen des dérivés de 1 <sup>ère</sup> transformation du soja est donc largement inférieur à 25% (tous produits confondus)	

Le principal débouché du soja est constitué par l'alimentation animale, l'impact du surcoût des analyses sur les semences de soja varierait selon le périmètre retenu pour la filière et la répartition des surcoûts entre les filières d'alimentation humaine et d'alimentation animale.

Signalons qu'en 2000, on trouvait sur le marché des lécithines « tracées », dites « PCR négatives » généralement originaire du Brésil, à 7 000 F / T, alors qu'une lécithine « conventionnelle » se négociait aux environs de 4 000 F / T (3 000 F/T choisi dans le tableau). De même la revue Agrodistribution signalait dans son numéro de Septembre 2000 l'importation de 25 000 T de tourteaux « non OGM » avec un surcoût de 125 F/T. Divers articles de presse signalaient cette même année des « primes » de 50 à 80 F/T pour du tourteau « PCR négative ».

### Conclusion

Comme nous l'avons vu précédemment, par les trois exemples pour lesquels des données chiffrées ont pu être obtenues, l'impact des coûts des semences sur les produits de première transformation est, dans l'état actuel de la situation, relativement faible, mais peut varier selon le périmètre retenu pour la filière, la répartition retenue (alimentation animale vs. alimentation humaine), le type de consommation (directe vs. produits transformés) et la valorisation des lots déclassés.

Cette dilution du prix des semences pour les produits de première transformation, induirait donc une première dilution d'un éventuel surcoût du aux analyses pour la détection des OGM dans les semences.

Les surcoûts prévisibles dus aux analyses à cette étape de la chaîne de production seraient proportionnellement moindres qu'à celle de la production de semences. Pourtant certains aspects, de type flux et production continus, accroîtraient les surcoûts dus aux déclassements. Dans l'état actuel de faibel

pression en OGM, et de politique générale des producteurs d'évitement des OGM, les coûts de déclassement en 1<sup>ère</sup> transformation apparaissent relativement limités.

### **IV.3 Certification de l'aval de la filière « sans utilisation d'OGM » et analyses**

Les limites de l'exercice d'appréciation des surcoûts à attendre des analyses apparaissent plus clairement au fur et à mesure que le produit se rapproche du consommateur. Les données de l'enquête deviennent de moins en moins nombreuses et la diversité des types de contrôles (nombre d'analyses pratiquées et importance relative du contrôle documentaire) s'accroît.

L'enquête menée avec le programme 4 auprès des opérateurs permet pourtant d'estimer que le nombre des analyses n'évoluerait que peu en fonction du seuil de présence fortuite en PGM. Trois raisons principales soutiennent cette hypothèse:

le fort impact de la réglementation actuelle sur le taux de présence fortuite à 1%. Des procédures de contrôle ont été mises en place par les opérateurs qui paraissent pouvoir largement suffire à la mise en place d'une filière « sans utilisation d'OGM ». Les coûts d'infrastructure et de logistique sont donc déjà majoritairement pris en charge par la filière « conventionnelle » actuelle.

la progression du producteur vers le consommateur et les procédés agro-industriels l'accompagnant font généralement disparaître en partie les analytes, diminuant d'autant les limites de détection et de quantification atteignables, donc leur capacité à certifier la filière, et du coup les besoins en analyse. S'il devient de plus en plus difficile de s'assurer que le seuil de définition de la filière est atteint, il est donc de plus en plus difficile, coûteux et inutile de procéder à de nombreuses analyses.

l'importance du contrôle documentaire (les certificats des fournisseurs) s'accroît en conséquence avec l'éloignement des sites de production agricoles, ne nécessitant donc à nouveau que peu d'analyses supplémentaires dédiées à la filière « sans utilisation d'OGM ». Une formalisation des procédures, voire une normalisation, apparaît nécessaire.

La solution à une bonne partie de la problématique au delà de la première transformation devrait être recherchée dans une traçabilité, efficace et normalisée, d'origine et de process, donc sans surcoût appréciable.

### **IV.4 Conclusion**

Si un seuil de certification techniquement réaliste est choisi, il ne paraît pas nécessaire, dans la situation actuelle de faible pression en OGM et des présentes autorisations, d'attendre une augmentation ni du nombre, ni de la qualité des tests de détection, pour une éventuelle filière « sans utilisation d'OGM ». La majorité des efforts de certification de la filière, et donc des surcoûts dus aux analyses, resteraient circonscrits aux acteurs de l'amont. Une filière « sans utilisation d'OGM » devrait donc chercher à répartir de l'amont à l'aval les surcoûts dus aux analyses, si l'option de non répercussion au consommateur final des surcoûts était retenue.

Un accroissement de la pression en OGM augmenterait le nombre et les coûts des analyses, particulièrement pour les acteurs de l'amont, à un niveau que nous ne pouvons chiffrer, ceci sans compter les surcoûts dus à des déclassements plus importants.

La faisabilité technique diminue, voire disparaît avec l'incorporation de certains constituants comme les auxiliaires technologiques, les vaccins pour animaux... actuellement non pris en compte dans la filière « conventionnelle », pour lesquels aucun test de détection n'est disponible en routine. Seule une certification documentaire fiable permettrait l'établissement d'une filière à large périmètre. Une filière restreinte aux seules PGM serait en effet, sémantiquement, difficilement compréhensible en particulier du consommateur.

## V Développements méthodologiques

### V.1 Introduction

La durée du programme de recherche et les sommes disponibles ne permettaient pas de proposer de développer, même en se restreignant comme prévu dans le cadre de cette étude aux cas du maïs et du soja, des méthodes de détection quantitatives spécifiques de chacun des maïs et soja autorisés dans l'UE (donc basées sur les fragments de bordure). L'ensemble des PGM autorisées au long de cette étude, comportant toutes une ou plusieurs copies du promoteur P35S, et l'ensemble des techniques de détection étant plus facilement applicables aux produits agricoles peu ou pas transformés, il avait été proposé de développer ou recommander une technique de détection par criblage du P35S. La quantification pouvant être réalisée pour les produits purs.

L'enquête menée auprès des opérateurs 1 an et demi plus tard, a montré le bien fondé de cette proposition initiale, le criblage P35S, qualitatif voire quantitatif, reste de loin la méthode la plus utilisée en certification des produits destinés à l'alimentation humaine mais aussi à l'alimentation animale pour les quelques sociétés qui s'en préoccupent.

La stratégie du laboratoire INRA de Versailles a consisté non pas à développer une nouvelle méthode, à ajouter à une « collection » de tests P35S déjà existant, mais à recenser et comparer la spécificité et l'efficacité des tests PCR P35S existant, puis à améliorer l'un de ceux ainsi discernés en tenant compte des critères de performance retenus dans les normes AFNOR et CEN,

développer un test spécifique de l'ensemble des virus CaMV<sup>18</sup>, de façon à éliminer les faux positifs voire quantifier la part de P35S provenant d'un CaMV, ce type de faux positifs pouvant provenir de contaminations de crucifères par ce virus.

à rechercher, et si nécessaire développer, un test d'identification et de quantification des deux espèces végétales concernées par le projet, toujours en tenant compte des critères de performance de la norme AFNOR,

à valider par un test international les systèmes ainsi développés, sous forme de PCR simplex devant permettre l'utilisation de ces méthodes sur tout type d'appareil<sup>19</sup> et en cherchant à optimiser le nombre de PCR à réaliser, de façon à minimiser les coûts d'analyse.

### V.2 Résultats

Nous proposerons donc à la normalisation, après la validation internationale en cours de préparation :

#### a P35S

Les efficacités de six tests PCR ont été comparés si nécessaire après adaptation à la PCR quantitative temps réel par chimie TaqMan®.

Deux couples d'amorces se sont avérés statistiquement équivalents et plus efficaces que les 4 autres (rendement plus élevé de PCR). Un de ces tests a été retenu.

La spécificité du test retenu a été évaluée sur l'ensemble des PGM disponibles, dont celles actuellement autorisées dans l'UE.

Un séquençage des amplicons obtenus à partir de l'ensemble de ces PGM a permis de vérifier la conservation des séquences et de s'assurer que l'hybridation avec la sonde n'induirait pas de différences quantitatives selon l'origine de l'OGM.

Le nombre de copies détectables par PGM actuellement autorisées dans l'UE a été déterminée.

La limite de quantification a été définie par la méthode de dilution limite MPN<sup>20</sup> sur l'ADN de plusieurs PGM.

<sup>18</sup> Virus de la mosaïque du chou fleur d'où est issu le promoteur P35S.

<sup>19</sup> Si l'ABI 7700 SDS d'Applied BioSystems peut effectuer plusieurs mesures simultanées de fluorescence, permettant ainsi d'utiliser des PCR multiplex (plusieurs PCR dans un même tube), cela n'est pas le cas de tous les appareils de PCR quantitative en temps réel commercialisés.

<sup>20</sup> Most Probable Number

Le test est actuellement utilisé en routine en comparaison d'un test commercial.

#### **b Gène de référence du maïs**

Plusieurs gènes de référence candidats ont été étudiés. Plusieurs candidats ont été rejetés car

soit présentant de trop fortes homologues avec le gène homologue présent dans des espèces éloignées (problèmes de spécificité),

soit présentant des variations internes des séquences amplifiées ou un nombre de copies variable entre cultivars, génétiquement distants, de maïs, génétiquement modifiés ou non qui auraient pu induire des différences de quantification selon les variétés présentes dans l'échantillon analysé.

Un gène candidat a été retenu car

les séquences utilisées paraissent spécifiques de l'espèce après examen d'un ensemble d'espèces plus ou moins proches, dont la teosinte.

le nombre de copies, aux séquences conservées, apparaît constant chez les 20 cultivars génétiquement distants étudiés, ce qui devrait assurer une quantification similaire de toutes les variétés cultivées de maïs, donc de l'ingrédient au sens de la réglementation européenne.

Un test PCR quantitatif (chimie Taqman®) a été développé et optimisé et sa limite de quantification établie par dilution limite MPN

#### **c Gène de référence du soja**

Un gène candidat a pu être retenu pour le soja pour les mêmes raisons énoncées pour le maïs

#### **d Test PCR de suspicion de faux positifs P35S**

Les séquences des divers CaMV (virus de la mosaïque du chou fleur dont est issu le P35S) ont été comparées et des amorces sélectionnées dans les séquences conservées chez tous les CaMV.

La spécificité du test a été examinée sur une collection représentative de la diversité des CaMV

Le test PCR qualitatif va être optimisé et sa limite de détection établie par dilution limite MPN

### **V.3 Conclusion**

Ce test P35S, avec les gènes de référence correspondant, ne prétend pas constituer la panacée en détection. Seuls des test d'identification (fragmente de bordure...) permettraient, hormis pour les OGM résultant d'un « empilage de gènes » pour lesquels il n'existe pas actuellement de solution (sauf analyse grain à grain) permettraient de répondre à l'ensemble des besoins d'une telle filière, comme ils répondent aux besoins de la réglementation actuelle. Ces test sont en cours de développement dans divers programmes et devraient être disponibles pour cette filière.

Une validation internationale des tests développés, selon la norme ISO 5725 et d'après les recommandations IUPAC, est en préparation. Elle devrait permettre de disposer dans quelques mois d'une méthode validée à soumettre à la normalisation.

## VI Conclusion

Sachant que le « zéro OGM » est statistiquement inatteignable à moins d'analyser graine à graine l'ensemble des productions et de connaître absolument toutes les cibles, les scénarii proposés pour la qualification d'une filière « sans utilisation d'OGM » ont porté en premier lieu sur des seuils de présence fortuite de 0,01 % et 0,1 % correspondant respectivement aux limites de détection et de quantification proposés dans la norme AFNOR parue en Décembre 2000, à un seuil de 1% retenu par la réglementation européenne quant à la dispense d'étiquetage en cas de présence fortuite et enfin un seuil supérieur, de 5%, seuil de repli par exemple en cas d'augmentation de la pression en OGM (surfaces et types).

Les difficultés d'analyses et sources de surcoûts recensés selon les valeurs de seuil

sont fonction des types de plans de contrôles régissant les relations contractuelles entre clients et acheteurs. Il s'agira dès lors de trouver un compromis entre, d'une part les risques de faux positifs et faux négatifs acceptés par l'acheteur et le vendeur, d'autre part la quantité de produits analysés nécessaire en particulier pour ceux à forte valeur ajoutée comme des semences de base ou de pré-base.

s'accroissent évidemment

avec la diminution du seuil de qualification de la filière. Plus ce seuil sera bas, plus les difficultés techniques ainsi que la variabilité des résultats s'accroîtront, ce qui ne manquera pas d'introduire des discordances de résultats, sources de litiges. Un seuil de 0,1% ou supérieur apparaît comme un compromis technique réaliste accessible.

au fur et à mesure des transformations que subissent les produits alimentaires et donc généralement de la disparition des analytes,

On aboutit ainsi globalement à une multiplication du nombre de produits « critiques », c'est à dire de plus en plus difficiles à analyser et pour lesquels la traçabilité, qui reste à normaliser, deviendra dès lors le critère prédominant de certification des produits de la filière.

Le périmètre de la filière doit également être qualifié par les types de produits qui la composeraient. Si la prise en compte des ingrédients, des arômes et additifs va de soi car déjà soumis à l'obligation réglementaire d'étiquetage au delà d'un seuil de présence fortuite de 1%, se posait la question de l'incorporation de divers produits comme les auxiliaires technologiques, tels que les enzymes, les supports d'arômes, etc. bref des produits généralement utilisés en cours de process mais à de très faibles quantités et inactifs dans le produit final. L'exercice peut se poursuivre en incluant l'alimentation animale, les vaccins voire même les emballages en contact avec les produits alimentaires, le papier à écrire... même s'ils n'étaient pas formellement inscrits dans le projet initial portant sur l'alimentation humaine.

Remarquons que les produits de l'alimentation humaine actuellement non pris en compte par la réglementation (auxiliaires technologiques...), sont très généralement des « produits critiques » c'est à dire à très faibles teneurs en analyte (protéine ou ADN), présents en faibles quantités dans le produit final. La détection sur de tels produits s'avérera particulièrement ardue tant en raison des faibles teneurs en analyte qu'en l'absence actuelle d'outils de détection appropriés (séquences non connues, emploi de mutagénèse dirigée pouvant faire différer deux organismes de quelques nucléotides...). Il en est de même pour d'autres produits tels que les vaccins...

A nouveau, dans ces derniers cas, une bonne traçabilité d'origine et de process sera indispensable si ces produits doivent être inclus dans le périmètre d'une filière « sans utilisation d'OGM ».

Comme toute filière, la filière « sans utilisation d'OGM » pouvait *a priori* se fonder soit sur une obligation de moyens, comme par exemple les produits « issus de l'Agriculture Biologique », soit sur une obligation de résultats, soit sur les deux obligations. A l'instar de la réglementation européenne sur le seuil de présence fortuite (1%), la filière « sans OGM » devrait comporter les deux obligations. Il est préférable que la quantification en OGM soit exprimée, à l'instar de la réglementation européenne, par rapport à l'espèce concernée, et non pas par la somme des contaminations de toute origine.

Pour résumer :

la filière devrait être basée sur la double obligation de moyens et de résultats.

les contrôles analytiques ne pourront, dans l'état actuel des données publiquement disponibles et des obligations réglementaires concerner que les PGM.

selon le seuil et les produits retenus, le périmètre de la filière « sans OGM » fera plus ou moins appel à une traçabilité d'origine et de process qui reste à normaliser.

Sachant que le contrôle analytique ne peut facilement porter que sur les PGM, comment pourrait-on certifier la filière, au moindre coût et avec la meilleure assurance pour les consommateurs, par l'absence en dessous d'un certain seuil de PGM ?

Partant de l'observation que les importateurs, et les services de contrôles de l'Etat, sont les garants de l'absence d'introduction sur le territoire de l'UE de PGM non autorisés, le contrôle analytique ne devrait donc porter que sur les PGM autorisés au sein de l'UE. En raison du temps et des sommes allouées, il était nécessaire de rechercher un test de détection le plus polyvalent possible. Les PGM actuellement autorisées comportent toutes une séquence commune dite P35S (promoteur du virus de la mosaïque du chou fleur). Détecter cette séquence constitue donc pour le soja et le maïs et leurs produits dérivés un bon élément de suspicion de présence d'OGM, qui peut ensuite être confirmé par l'identification des PGM, pourvu qu'un test permette de discriminer les faux positifs dus à la présence d'un CaMV (Virus de la mosaïque du chou fleur d'où est issu le P35S). Un test de détection PGM par P35S peut également constituer un test quantitatif dans les produits purs. Dans les autres cas elle peut entraîner une surestimation de la teneur en OGM, du fait d'un nombre de copies de P35S variable selon les PGM. Cette surestimation n'est donc en rien préjudiciable au consommateur mais introduirait un risque supplémentaire pour le producteur/vendeur.

Associé à une bonne traçabilité d'origine et de process, ce test pourrait satisfaire, dans l'état actuel des PGM autorisés dans l'UE, la majorité des besoins des opérateurs, en particulier de l'amont.

Cette hypothèse formulée il y a plus de 20 mois a été confirmée par les enquêtes auprès des opérateurs. La majorité utilisent divers tests PCR P35S non normalisés.

Le laboratoire INRA de Versailles propose donc un ensemble de tests PCR qualitatifs et quantitatifs. Plutôt que de rajouter un nième test PCR P35S, la stratégie a consisté à comparer les tests existant mais quelquefois aussi à en développer de nouveaux quand nécessaire, à déterminer les meilleurs en terme de spécificité et de sensibilité, à les améliorer afin de pouvoir les valider prochainement par un test inter-laboratoires avant de les proposer à la normalisation.

Nous avons vu que les contrôles analytiques au moins sur PGM étaient nécessaires en parallèle avec une bonne traçabilité. Quels peuvent être dès lors les surcoûts d'une filière « sans OGM » imputables aux analyses ? C'est un exercice difficile car la seule situation concrète permettant de supporter des hypothèses en fonction des scénarii élaborés auparavant est celle de l'étiquetage au delà du seuil réglementaire de présence fortuite de 1%. L'enquête a montré que l'actuel seuil réglementaire a induit pour de nombreuses entreprises des coûts d'analyse se chiffrant à plusieurs centaines de milliers de francs par an, en particulier pour les opérateurs en amont des filières.

En ce qui concerne donc ces surcoûts dus aux analyses, et à périmètre égal, le seuil réglementaire d'étiquetage a un impact important minorant sur les éventuels surcoûts dus aux analyses d'une filière « sans OGM ». A la fois parce

qu'une obligation de moyens et de résultats est *de facto* en place,

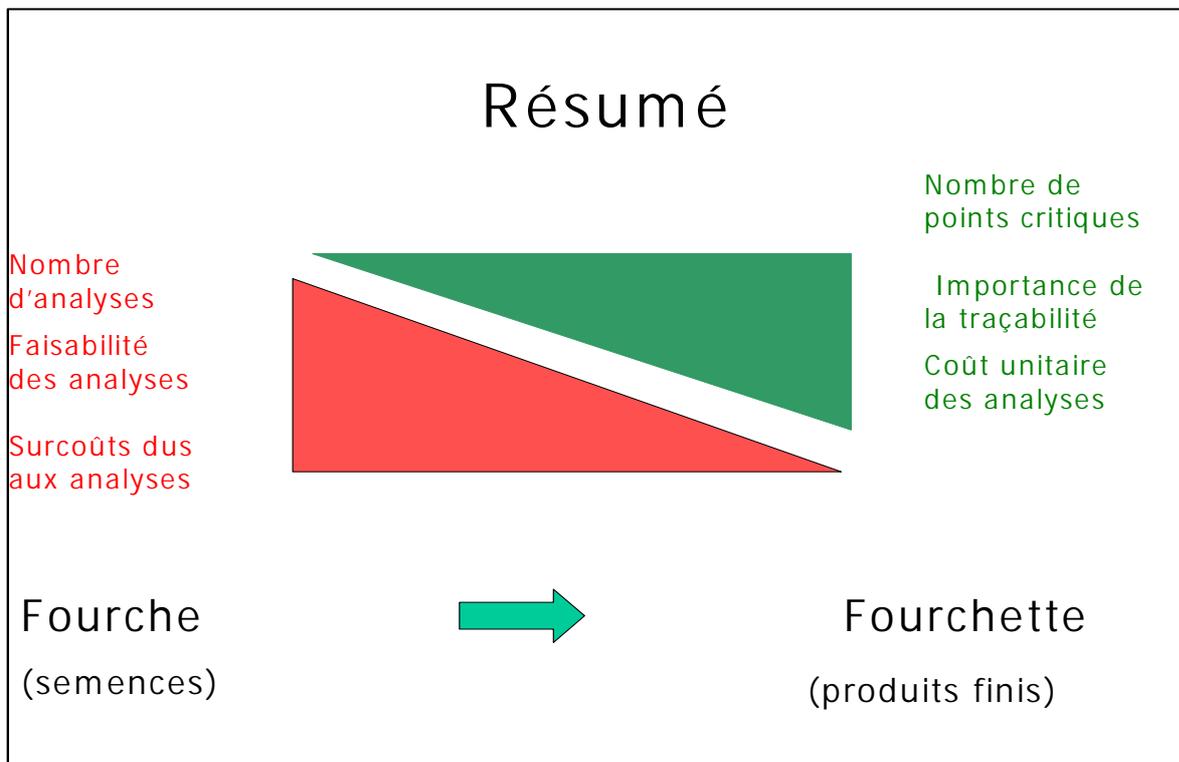
que les contrôles correspondants nécessitent des développements méthodologiques (fragments de bordure, puces à ADN...) dont les coûts ne seront pas imputés à une éventuelle filière « sans OGM »,

que les dispositifs d'assurance qualité des entreprises, pour celles qui en disposent, ont en grande partie absorbé, sans grande difficulté ni surcoûts notoires, la problématique OGM.

Dès lors les éventuels surcoûts résulteront à nouveau des risques de faux positifs et faux négatifs acceptés par les acheteurs et vendeurs tout au long de la filière, et donc des plans de contrôle choisis et du seuil retenu. Ces plans de contrôle dépendront de la pression en PGM dans laquelle se développerait cette filière, pression actuelle faible pour ne pas dire nulle au point de vue des produits européens.

Les déclassements de produits constitueraient certainement la source majeure de surcoûts. Actuellement, dans le cas des semences, qui reste le domaine le plus documenté, un seuil de pureté variétale de 99% entraîne un rejet d'environ 28% des semences, alors qu'un seuil de pureté de 99,9% entraîne doré et déjà un rejet de près de 63% des semences.

Les plans de contrôle et le seuil choisis pour une filière « sans OGM » auraient un impact considérable sur le nombre d'analyses pratiquées par l'amont et donc vraisemblablement sur les schémas et lieux de production. Dans le cas des semences nous avons pu ainsi constater qu'entre 1 % et 0,1% un type de plan de contrôle par groupe utilisé par certains semenciers multiplie par 7 le nombre d'analyses nécessaires pour un



intervalle de confiance, classique, de 95%. Il ne paraît pas économiquement et techniquement pertinent de viser un intervalle de confiance plus élevé.

La pression en OGM est évidemment un facteur aggravant du nombre d'analyses nécessaires. C'est ainsi que le nombre d'analyses sur semences est 20 fois plus important pour celles produites aux USA que pour celles produites en Europe. Il est plus que probable que ce genre de situation se retrouvera dans l'UE dès que de nouvelles PGM seraient autorisées. Ceci devrait avoir des répercussions importantes sur l'organisation de la production de semences et aussi l'accès à certaines ressources génétiques (« germplasm »...).

Pour autant, les surcoûts importants supportés par l'amont de la filière, et plus particulièrement les semenciers, ont un impact variable sur les prix de revient des produits dérivés, selon le type de ces produits ; les analyses ne constituant bien entendu qu'une partie du coût des semences.

Dans le cas de la situation actuelle de faible pression en PGM, cet impact du prix des semences de maïs et soja peut être

- fort, dans le cas de produits à consommation directe même si les soja et maïs ne sont actuellement pas concernés,

- assez fort, de l'ordre de 10%, pour des produits peu transformés comme les semoules pouvant être directement consommées,

- ou enfin descendre à moins de 5% pour des produits de première transformation comme les amidons de maïs et autres produits dérivés comme les sorbitols et sirops de glucose. Selon le type de produit consommé, le surcoût en analyse sur les prix de revient des produits consommés sera faible voire nul dans la situation actuelle de faible pression en OGM.

Une filière « sans OGM » non restreinte au soja et au maïs aurait des proportions variables de ces 3 éléments (exemple des fruits et légumes consommés en consommation directe), ce qui changerait l'impact des surcoûts...

Bien sûr des surcoûts dus à des analyses de contrôles sont à attendre tout au long de la filière, par exemple de 3,3 à 3,5 F supplémentaire la tonne pour l'amidon, mais elles seront, au fur et à mesure qu'on approchera du consommateur, certainement sans commune mesure avec les coûts d'analyse supportés par les premiers acteurs de l'amont.

Il existe donc globalement pour le soja et le maïs un effet de dilution, de valeur variable selon le type de produit consommé, entre l'amont et l'aval de la filière. Cette dilution devrait induire, en ce qui concerne les analyses et plus particulièrement pour les produits transformés, un surcoût faible à nul pour les consommateurs finaux, toujours dans la situation actuelle d'une faible pression en OGM et d'un seuil de qualification adéquat.

Cette dilution sera également fonction de la répartition des utilisations des produits et de leurs dérivés et du périmètre retenu (alimentation humaine, alimentation animale...).

Le schéma ci-dessus brosse à très grands traits quelques caractéristiques du système de certification possible :

Si l'amont se caractérise par des analyses plus faciles en raison des matrices (semences, graines...), leur nombre et donc les surcoûts y seront les plus importants.

Au fur et à mesure de la transformation des produits et donc qu'on se rapproche du consommateur final, la faisabilité – et donc la fiabilité - des contrôles diminue par l'apparition de produits critiques, pour lesquels les analytes (cibles des analyses) diminuent en quantité et qualité (par exemple dégradation ou adsorption sur des produits résultants de cuisson extrusion...). Le coût unitaire des analyses augmente, en raison des difficultés croissantes d'analyse, rendant, avec l'augmentation du nombre de produits critiques la traçabilité indispensable. Cette traçabilité reste à formaliser / normaliser.

Il est donc à prévoir que, si la filière « sans utilisation d'OGM » vise à fournir des produits à des coûts similaires aux produits actuels, des négociations entre opérateurs devront tenter de répartir les charges financières au long de la filière.

En conclusion, il convient d'analyser les résultats de ce programme dans le cadre de la situation actuelle d'une faible pression en OGM (nombres et surfaces).

La qualification de la filière « sans utilisation d'OGM » est actuellement techniquement faisable au niveau des contrôles si elle est restreinte aux plantes et produits dérivés. Avec un seuil permettant de réduire les dérives analytiques (donc supérieur ou égal à 0,1%) et donc les contentieux, les surcoûts dus aux analyses et supportés par l'amont pourront se diluer jusqu'au consommateur final particulièrement pour les produits transformés.

Plus les produits sont transformés et plus la traçabilité prévaudra.

Pour ces mêmes produits transformés, l'apparition de points critiques et la nécessité de prendre éventuellement en compte des produits pour lesquels n'existent pas de méthodes de contrôles rendent indispensable une traçabilité normalisée.

Le fort impact de la réglementation actuelle des filières « conventionnelles » minore les surcoûts que devrait supporter une filière « sans OGM ». Une modification – assez improbable - de la réglementation aurait un impact considérable.

Dans la situation actuelle des autorisations de PGM, avec une traçabilité normalisée et une organisation sans faille de la filière, le test P35S, en préparation de validation inter-laboratoires internationale, peut satisfaire la majorité des besoins en détection pour les produits purs de l'amont.

Il est clair que la détection des OGM, dans ce cadre ou dans le cadre plus général de la réglementation au delà du seuil de 1%, constitue la première application à grande échelle d'un ensemble de méthodes moléculaires qui ont nécessité des travaux importants de développement mais aussi de normalisation. Ces travaux pourront être valorisés dans d'autres domaines comme l'authentification des origines, la détection des pathogènes.

En cela et dans ses aspects organisationnels, la filière « sans utilisation d'OGM » apparaît comme un excellent modèle quant à la qualification et à l'organisation de filières de qualité, ce qui devrait permettre aux entreprises européennes de maintenir encore quelque temps un avantage concurrentiel. Elle constitue également un excellent exercice préparatoire à la ségrégation des OGM lorsque des OGM à effet thérapeutique seront cultivés...

# Bibliographie

1. AFNOR 1991. Application de la statistique - Principes de contrôle statistique de lots. NF X 06-021.
2. AFNOR. 1991. Application de la statistique - Sélection de plans d'échantillonnage pour le contrôle par comptage de la proportion d'individus non conformes ou du nombre moyen de non conformité par unité. NF X 06-022.
3. AFNOR. 2000. Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés. Partie 1 : lignes directrices et exigences. XP V 03-020-1 : pp 38.
4. AFNOR 2001. Analyse des produits agricoles et alimentaires. Guide d'application des données métrologiques. FD V 03-116. Codex Alimentarius Commission. 1999. Report on the twenty-second session of the codex committee on methods of analysis and sampling. Budapest, Hungary. 23-27 November 1998.
5. Altman A. 1998. Agricultural biotechnology. The Hebrew Univ. Jerusalem. Rehovot, Israel.
6. Bertheau Y. 1998. Détection et identification des OGM. *POUR*. **159** : 69-77
7. Bertheau Y. et Diolez A. 1999. Les aliments passés au crible. *Biofutur*. **192** : 28-32.
8. Bertheau Y. et Diolez A. 2000. Détection des OGM : du libre choix des consommateurs aux études de biovigilance. *OCL*. **7(4)** : 314-319.
9. Bertheau Y. Diolez A., Kobilinsky A. and Magin K. 2001. GMO detection and performance criteria. J. AOAC Int. Submitted.
10. BgVV 2000. Development of qualitative as well quantitative detection methods to identify a genetic modification in soybean and maize products. Report of the EU tender No XXIV/98/A3/001.
11. Cochran W.G. 1997. Sampling techniques. John Wiley Eds. 3<sup>rd</sup> Ed.
12. Codex Alimentarius Commission. 2001. Measurement uncertainty. Progress report by relevant organizations (EURACHEM) and relationship between the analytical result, the measurement of uncertainty and the specification in Codex standards. Budapest, Hungary. 26 February-2 March 2001.
13. Codex Alimentarius Commission. 2001. Consideration of harmonized guidelines for the use of recovery information on analytical measurement. Budapest, Hungary. 26 February-2 March 2001.
14. Daudin J.J. et Tapiéro C.H. 1996. Les outils et le contrôle de la qualité. Coll. *Economica*. PIQ Poche.
15. DG Agriculture 2000. Economic impacts of genetically modified crops in the Agri-food sector.
16. Hemmer W. 1997. Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. BATS 2/97. pp 61. Disponible en ligne sur <http://www.bats.ch/>.

17. Horwitz W., Kamps L.R. and Boyer K.W. 1980. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *J. AOAC*. **63**(6) : 1344-1354.
18. Hübner P., Waiblinger H-U, Pietsch K. and Brodmann P. 2001. Validation of PCR methods for the quantification of genetically modified food. *J. AOAC Int. In press*.
19. ISO 542. 1992. Oilseeds - Sampling
20. ISO 664. 1990. Oilseeds - Reduction of laboratory sample to test sample.
21. ISO 13690. 1999. Cereals, pulses milled products - Sampling of static batches.
22. ISO 6644. 1999. Cereals and milled cereal products. Automatic sampling by mechanical means.
23. James C. 2000. Global status of commercialized transgenic crops. ISAAA briefs **21**.
24. Kay S. and van den Eede G. 2001. The limits of GMO detection. *Nature Biotechnol.* **9**(5) : 405.
25. Kowles R.V. and Phillips R.L. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7010-7014.
26. Lemontey C., Mousset-Déclat C., Munier-Jolain N. and Boutin J-P. 2000. Maternal genotype influences pea seed size by controlling mitotic activity during early embryogenesis and final endoreduplication level/cotyledon cell size in mature seed. *J. Experiment. Bot.* **51**(343): 167-175.
27. Maury Y., Duby C., Bossenec J.M. et Boudazin G. 1985. Group analysis using ELISA : determination of the level of transmission of soybean mosaic. *Agronomie.* **5**(5) : 405-415.
28. Montgomery D.C. 1997. Introduction to statistical quality control. John Wiley, New York. 3<sup>rd</sup> Ed.
29. Philipp P., Seyler JF. et Bertheau Y. 2000. Détection des OGM dans les produits alimentaires et normalisation. *Ann. Fals. Exp. Chim.* **93**(950) : 25-40.
30. Pietsch K., Waiblinger H.U., Brodmann P. und WURZ A. 1997. Screeningverfahren zur identifizierung gentechnisch veränderter pflanzlicher lebensmittel. *Deutsche lebensmittel rundschau* . **2**, 35-38
31. Remund K., Dixon D., Wright D. and Holden L. 2001. Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. *Seed Sci. Res.* In Press.
32. Ricroch A., Priolon J. et Vincent J. 1998. Végétaux transgéniques : les enjeux pour la santé et l'environnement. Ed du GREP, Paris. pp 159.
33. Schilling EG. 1982. Acceptance sampling in quality control. In : *Statistics : textbooks and monographs*. Vol **42** . Dekker.
34. Schweizer L., Yerk-Davis G.L., Phillips R.L., Srien F. and Jones R.J. 1995. Dynamics of maize endosperm development and DNA endoreduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 7070-7074.
35. USDA 2001. Planting intentions survey 2001.
36. USDA/GIPSA. 1995. Inspection handbook. Book I. Grain sampling.
37. USDA/GIPSA. 1997. Inspection handbook. Book II. Grain grading procedures.
38. USDA/GIPSA. 2000. Sampling grain for the detection of Biotech grains.

39. Vernimont G.T. 1996. Use of statistics to develop ad evaluate analytical methods. Ed. W. Spendley. AOAC International : pp 183.

# Annexe

## Les plans de contrôles simple et par groupe. André Kobilinsky (INRA)

On supposera pour simplifier que la méthode utilisée est parfaitement sensible et détecte à coup sûr une graine OGM dans le groupe de graines broyées quelle que soit la taille de celui-ci.

L'acheteur décide de refuser les lots comportant une proportion  $p_{nt}=0.001$  de graines OGM, avec un risque  $\beta = 5 \%$ .

Cela signifie que si le lot contient une telle proportion non tolérable  $p_{nt}=0.1 \%$  de graines OGM, il ne veut pas accepter le lot dans plus de 5 % des cas.

Pour le contrôle, l'acheteur doit alors examiner au minimum  $2995 = \ln(\beta) / \ln(1-p_{nt})$  graines. En effet avec ce nombre de graines, la probabilité d'avoir 0 graines OGM dans un lot qui en contient 0,1 % est exactement  $5\% = (1-0.001)^{2995}$ .

Si l'acheteur examine un nombre inférieur de graines, la probabilité de n'en avoir aucune génétiquement modifiée, donc d'accepter ce lot avec 0,001 % de graines OGM, est supérieure à 5 %. C'est à dire que le risque de l'acheteur dépasse alors 5 %.

Si au contraire, l'acheteur examine un nombre de graines supérieur à 2995, son risque de ne pas détecter un lot contenant la proportion non tolérable 0,1 % d'OGM devient inférieur à 5 %. Ce risque devient par exemple  $\beta=1 \%$  si  $4603 = \ln(\beta) / \ln(1-p_{nt})$  graines sont examinées.

Mais plus le nombre de graines est élevé, plus fort est le risque du producteur de se voir refuser un lot, quand bien même ce lot ne contiendrait qu'une proportion très réduite  $p_t$ , dite proportion tolérable d'OGM. Dans ce qui suit on prend comme proportion tolérable  $p_t=0,02 \%$ , soit 1/5 de la proportion non tolérée par l'acheteur.

Si toutes les graines sont simultanément broyées, et que l'on rejette le lot quand on détecte la présence d'OGM dans le broyat, la probabilité de rejet avec cette proportion tolérable  $p_t=0.02 \%$  est  $1-(1-p_t)^n$  où  $n$  est le nombre total de graines broyées.

Le tableau suivant donne les probabilités de rejet avec les deux valeurs de  $n$  données précédemment et les deux proportions  $p_{nt}$  et  $p_t$ .

10 Probabilités de rejet dun lot avec deux valeurs de  $n$  et des proportions

Probabilité d'avoir au moins une graine OGM parmi $n$		
	$n$	
	2995	4603
$p_{nt} = 0,001$	0,95	0,99
$p_t = 0,0002$	0,95	0,60

Dans le cas où la proportion de graines OGM atteint la proportion non tolérée 0,001, la probabilité de rejet est celle souhaitée soit 95 % si on broie 2995 graines, 99 % si on en broie 4603. Le problème est que la probabilité de rejet est encore extrêmement forte lorsque la proportion est la proportion tolérée de 0,02 %. Avec de tels nombres de graines, on rejette alors le lot dans pratiquement 1 cas sur 2.

Pour obtenir un risque raisonnable pour le producteur tout en gardant le risque désiré pour l'acheteur, il est donc indispensable d'avoir une stratégie de contrôle plus compliquée que celle qui consiste à broyer seulement un groupe de graines. Si l'on veut un plan de contrôle simple, i.e. qui s'effectue en une seule étape, on broiera non plus 1, mais  $N$  groupes de graines comportant chacun  $n$  graines. On accepte ou on refuse le lot en fonction du nombre  $X$  de groupes où l'on détecte de l'OGM.

On peut bien sûr décider de refuser l'échantillon si ce nombre  $X$  est non nul. Mais alors on se retrouve dans le cas de figure précédant. La probabilité de rejet est exactement la même que si on broyait toutes les graines simultanément puisqu'on suppose la méthode employée parfaitement sensible.

Cette méthode ne devient donc intéressante que si le lot n'est rejeté que pour  $X > A$  où le seuil d'acceptation  $A$  est strictement positif. Pour chaque valeur du nombre total  $N \times n$  de graines, du nombre  $N$  de groupes formé, on peut facilement trouver le plus grand seuil  $A$  garantissant que le lot est rejeté dans 95 % des cas s'il contient la proportion  $p_{nt}$  non tolérée de graines OGM. C'est ce seuil qu'il est naturel de retenir car si l'on en prend un plus petit, on augmente fortement le risque du producteur.

Le tableau suivant donne ces plus grand seuils pour des nombres  $N$  et  $Nn$  variables et il précise en regard le risque du producteur, ceci avec les mêmes deux valeurs non tolérée et tolérée  $p_{nt}=0.001$  et  $p_t=0.0002$ .

11 *Seuil d'acceptation, risque de l'acheteur et du producteur pour quelques couples  $(Nn, n)$  Seuils d'acceptation  $A(N, n)$  pour  $p_{nt}=0.001, \beta=0.05$*

	N:1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nn										
3000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6000	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
9000	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2
12000	0	1	1	2	2	3	3	3	3	4
15000	0	1	2	2	3	3	4	4	4	4
18000	0	1	2	3	3	4	4	5	5	5
21000	0	1	2	3	3	4	5	5	6	6
24000	0	1	2	3	4	4	5	5	6	6
27000	0	1	2	3	4	4	5	6	6	7
30000	0	1	2	3	4	5	5	6	7	7
33000	0	1	2	3	4	5	5	6	7	7
36000	0	1	2	3	4	5	6	6	7	8
39000	0	1	2	3	4	5	6	6	7	8
42000	0	1	2	3	4	5	6	7	7	8
45000	0	1	2	3	4	5	6	7	7	8

Risque  $\beta$  correspondant (exact) pour l'acheteur

	N:1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nn										
3000	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.9	5.0
6000	0.2	0.2	5.0	3.7	3.1	2.8	2.6	2.5	2.4	2.3
9000	0.0	2.2	0.7	0.4	3.5	2.5	2.0	1.7	1.5	1.4
12000	0.0	0.5	0.1	1.4	0.6	3.6	2.3	1.7	1.3	4.8
15000	0.0	0.1	2.0	0.3	2.2	0.9	3.9	2.3	1.5	1.1
18000	0.0	0.0	0.7	4.4	0.7	3.2	1.2	4.4	2.4	1.5
21000	0.0	0.0	0.3	2.1	0.2	1.3	4.4	1.6	4.9	2.6
24000	0.0	0.0	0.1	1.0	4.0	0.5	2.0	0.6	2.0	0.9
27000	0.0	0.0	0.0	0.5	2.2	0.2	0.9	2.8	0.8	2.5
30000	0.0	0.0	0.0	0.2	1.2	4.0	0.4	1.4	3.9	1.1
33000	0.0	0.0	0.0	0.1	0.7	2.4	0.2	0.7	2.1	0.5
36000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	1.5	4.0	0.3	1.1	2.9
39000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.9	2.6	0.2	0.6	1.6
42000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.5	1.7	4.1	0.3	0.9
45000	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.3	1.1	2.8	0.2	0.5

Risque du producteur  $\alpha$  correspondant for  $p_t = 0.0002$

	N:1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nn										
3000	45.1	45.1	45.1	45.1	45.1	45.1	45.2	45.1	45.2	45.1
6000	69.9	69.9	25.4	27.7	29.0	29.9	30.5	30.9	31.2	31.5
9000	83.5	35.2	42.7	45.9	16.6	18.4	19.7	20.6	21.4	21.9
12000	90.9	48.8	57.6	24.3	28.6	9.7	11.4	12.7	13.7	4.2
15000	95.0	60.4	25.3	35.5	13.2	17.0	5.5	6.8	8.0	8.9
18000	97.3	69.7	34.1	12.4	20.5	7.0	9.8	3.0	4.0	4.9
21000	98.5	77.0	42.8	17.9	28.4	11.3	3.6	5.5	1.6	2.3
24000	99.2	82.7	50.8	23.9	9.0	16.4	6.0	9.0	3.0	4.2
27000	99.5	87.0	58.2	30.1	12.6	22.3	9.1	3.1	5.1	1.6
30000	99.8	90.3	64.7	36.4	16.7	6.4	12.9	4.9	1.6	2.8
33000	99.9	92.8	70.3	42.6	21.1	8.8	17.3	7.2	2.6	4.4
36000	99.9	94.6	75.2	48.5	25.9	11.6	4.5	10.0	3.9	1.3
39000	100.0	96.0	79.3	54.1	30.8	14.8	6.2	13.2	5.6	2.1
42000	100.0	97.0	82.8	59.3	35.7	18.3	8.1	3.2	7.6	3.0
45000	100.0	97.8	85.8	64.1	40.5	22.0	10.4	4.3	10.1	4.3

Pour obtenir un risque du producteur acceptable, disons 5 %, il faut broyer au moins N=7 groupes de n=3000 graines chacun. Le lot est refusé si l'on trouve plus de 5 groupes OGM, accepté si  $X \leq 5$ . Cette procédure est assez coûteuse. Une procédure plus économique peut être obtenue en procédant en deux étapes. On effectue un premier contrôle qui a une forte chance de conduire à l'acceptation si la proportion d'OGM est négligeable. Mais à l'issue de ce premier contrôle, il peut y avoir décision d'en effectuer un second pour redonner sa chance au producteur si la proportion est dans les limites tolérées.