

Détection d'OGM dans les aliments pour animaux: aspects théoriques et pratiques

A. ROETSCHI et J.-Y. DERU, Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP), Tioleyre 4, CH-1725 Posieux

 E-mail: alexandra.roetschi@alp.admin.ch
Tél. (+41) 26 40 77 111.

Résumé

C'est à Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP), la station fédérale de recherches en production animale et laitière, que sont effectuées les analyses de détection d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans les aliments pour animaux de rente. Depuis l'introduction en 1999 des limites soumises à déclaration concernant les OGM (3% pour les matières premières et 2% pour les aliments composés), pas moins de 1600 échantillons ont été prélevés dans le cadre du Contrôle officiel des aliments pour animaux. Le bilan des analyses est réjouissant car très peu d'aliments composés ou de matières premières ont été l'objet de contestations par rapport à leur teneur en OGM. Les techniques de détection ont aussi évolué ces dernières années, pour gagner non seulement en rapidité mais aussi en précision, puisque actuellement une quantification des éléments transgéniques est effectuée en opération de routine.

Introduction

Depuis 1995, année de la première commercialisation outre-Atlantique de plantes génétiquement modifiées, la superficie de culture de ces organismes a constamment augmenté pour atteindre en 2003 approximativement 67,7 millions d'hectares (JAMES, 2003). Les Etats-Unis, l'Argentine, le Canada, le Brésil et la Chine sont actuellement les principaux pays cultivateurs d'organismes génétiquement modifiés (OGM) et représentent à eux cinq 98% de la production mondiale de cultures transgéniques. Plus près de chez nous, l'Espagne, l'Allemagne, la Roumanie et la Bulgarie cultivent des OGM, toutefois en quantités beaucoup plus modestes (JAMES, 2003). Contrairement aux Etats-Unis, la Communauté européenne et la Suisse sont plus restrictives vis-à-vis du commerce et de l'utilisation d'OGM dans les denrées alimentaires ainsi que dans les aliments pour animaux de rente. L'importation et l'utilisation de ces produits sont par conséquent soumises à des législations strictes. En Suisse, selon l'article 23 de

l'Ordonnance sur les aliments pour animaux, entrée en vigueur le 1^{er} juillet 1999, les matières premières et les aliments simples pour animaux de rente sont soumis à déclaration s'ils contiennent plus de 3% d'OGM alors que pour les aliments composés, le seuil est de 2%. En ce qui concerne les semences, une proportion de 0,5% d'OGM est tolérée par l'Ordonnance. Par conséquent, une attention toute particulière est portée au contrôle des produits importés utilisés dans l'alimentation animale et dans l'agriculture.

C'est sur le site de Posieux d'ALP que le laboratoire de biologie moléculaire a été établi en 1997. Depuis lors, il analyse des échantillons pour le compte du Contrôle officiel des aliments pour animaux ainsi que pour des clients externes. Ces analyses s'effectuent par une technique de biologie moléculaire, la *polymerase chain reaction* (PCR ou réaction de polymérisation en chaîne), qui est un puissant outil permettant de détecter de manière spécifique les éléments modifiés génétiquement, même si ces derniers sont présents en quantités infimes.

De la théorie...

Un système de détection par PCR se base sur l'amplification de fragments d'ADN (acide désoxyribonucléique) cible. Dans le cas présent, il s'agit de séquences insérées artificiellement dans le génome de certains végétaux afin de leur conférer de nouvelles caractéristiques. En règle générale, une séquence génétiquement modifiée comprend trois domaines: un promoteur, un gène étranger (le transgène) et une terminaison. Le promoteur constitutif le plus fréquemment utilisé dans ces constructions est le 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et sa présence permet de déclencher l'expression du transgène qui le suit. Chez les OGM actuellement commercialisés, le transgène confère une résistance à un herbicide total ou à un ravageur, telle la pyrale du maïs. La terminaison qui clôt la séquence modifiée est souvent une partie du gène de la nopaline synthétase, le NOS. Ce fragment d'ADN provient d'*Agrobacterium tumefaciens*, bactérie régulièrement utilisée pour insérer de l'ADN étranger dans le génome des

Tableau 1. Liste des matières premières génétiquement modifiées et des aliments simples génétiquement modifiés pour animaux homologués en Suisse.

Matière première	Entreprise	Autorisé depuis	Promoteur 35S	Terminaison NOS	Résistance à	
					Herbicide total	Ravageur
Soja GTS-Soja	Monsanto	1996	X	X	X	
Maïs Bt176	Syngenta	1997	X		X	X
Bt11	Syngenta	1998	X	X	X	X
Mon810	Monsanto	2000	X			X

Toutes les variétés de gluten de maïs, d'aliments de gluten de maïs, de farine de rafles de maïs ainsi que de tourteaux d'extraction et de pression de soja homologués dans l'Union européenne, aux Etats-Unis et au Canada sont autorisés.

plantes. Un ou plusieurs transgènes peuvent être présents dans les végétaux, créant par conséquent des plantes possédant différentes résistances. Le tableau 1 illustre les OGM homologués et soumis à déclaration en Suisse. Ainsi, la première étape dans la détection des organismes génétiquement modifiés consiste à procéder à un criblage pour détecter la présence du promoteur 35S ainsi que la terminaison NOS. L'étape suivante, si elle s'avère nécessaire, est l'identification spécifique des différentes sortes de transgènes compris entre les deux domaines cités ci-dessus.

A Posieux, deux techniques de PCR sont utilisées en routine: la PCR «conventionnelle» et «en temps réel». Pour ces deux techniques, il est tout d'abord nécessaire d'extraire de l'ADN génomique à partir de l'échantillon à analyser. Cette extraction est relativement simple et s'effectue à l'aide de kits contenant des solutions prêtes à l'emploi. Grâce aux propriétés liantes de la silice et à différents tampons, il est possible d'obtenir de l'ADN génomique de bonne qualité. Lorsque cette étape a été réalisée, les différents composants du mélange réactionnel maître, le *mastermix*, sans lequel une réaction de PCR ne pourrait avoir lieu, sont mélangés:

- l'enzyme thermostable, la Taq polymérase
- le tampon compatible avec l'enzyme
- les nucléotides (A, T, C et G), qui permettent à la Taq polymérase de pouvoir synthétiser un brin d'ADN complémentaire à celui de l'ADN cible
- le $MgCl_2$
- les amorces, qui sont des fragments d'ADN de synthèse ayant la capacité de se fixer spécifiquement aux séquences cibles et qui permettent de ce fait la synthèse d'un nouveau brin d'ADN.

L'ADN génomique est ensuite ajouté au *mastermix* et les tubes transférés

dans des appareils, les thermocycleurs, qui exécutent les trois étapes décrites ci-dessous:

1. Dénaturation: l'ADN génomique obtenu lors de l'extraction se trouve en solution sous forme de doubles brins. Cette situation empêche les amorces de se fixer à leur séquence cible. Une dénaturation à haute température (95 °C) est nécessaire afin de séparer l'ADN en simples brins.

2. *Annealing*: cette étape permet la fixation des amorces sur leur ADN cible. Chaque système possède sa température optimale (50 à 65 °C).
3. *Elongation*: la Taq polymérase entre en action, elle repère les amorces fixées sur l'ADN cible et débute la synthèse du nouveau brin d'ADN en utilisant les nucléotides se trouvant dans la solution.

Ces étapes sont répétées 30 à 45 fois selon les systèmes, ce qui conduit à une amplification exponentielle des séquences cibles et à la détection d'un signal. Dans le cas de la PCR conventionnelle, les produits d'amplification doivent encore être chargés sur gel d'agarose alors que pour la PCR en temps réel, le résultat est obtenu directement au cours de la réaction. En effet, cette technique repose sur un principe similaire à celui de la PCR conventionnelle, si ce n'est qu'une sonde interne modifiée avec un fluorophore est ajoutée au *mastermix*. Parmi différents types de sondes existant (POITRAS et HOUDE, 2002), les sondes *Taqman* sont actuellement utilisées

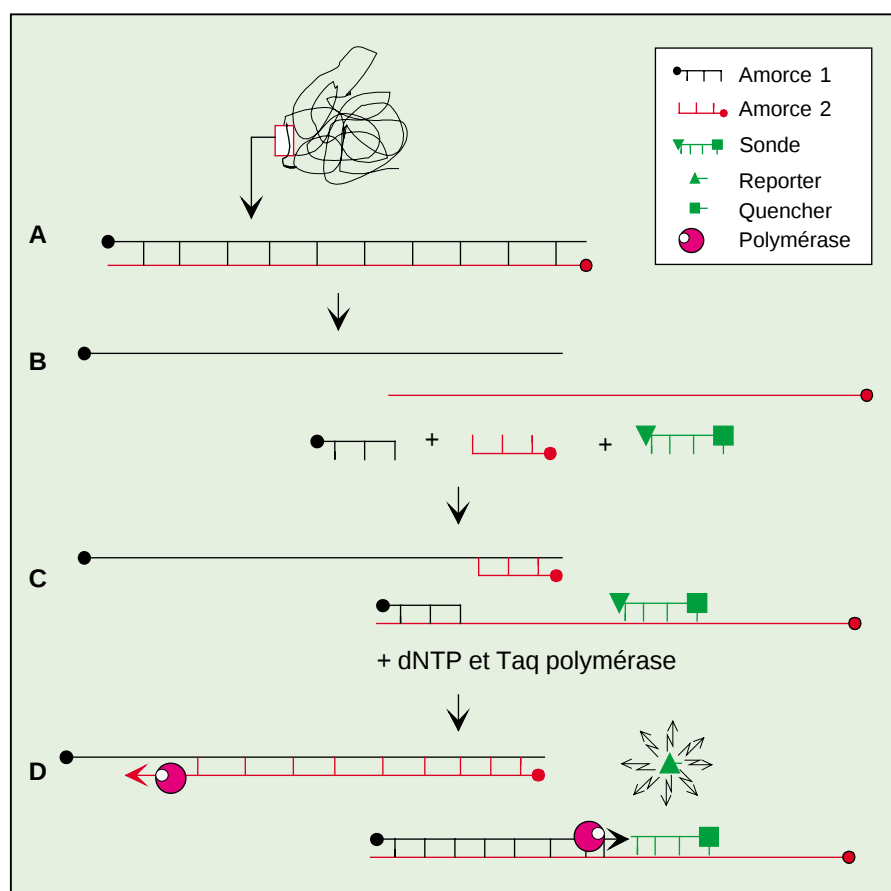


Fig. 1. Schéma des étapes d'une réaction de PCR en temps réel (système *Taqman*). A: L'ADN génomique se trouve en solution sous forme de doubles brins, la séquence cible est donc inaccessible pour les amorces et la Taq polymérase. B: Dénaturation; les brins d'ADN génomique se séparent sous l'effet de la haute température (95 °C). C: *Annealing*; les amorces et la sonde marquée par un fluorochrome peuvent se fixer spécifiquement sur leur séquence complémentaire. D: *Elongation*; à partir des amorces, la Taq polymérase amplifie les séquences cibles et écarte au passage le *reporter* de la sonde, ce qui entraîne une émission de fluorescence.

pour les analyses de routine. Elles portent un *reporter* à une extrémité et à l'autre un *quencher*, ce dernier fonctionnant comme un extincteur de fluorescence. Il y aura émission de fluorescence uniquement au moment où la Taq polymérase aura éloigné le *reporter* et que ce dernier ne se trouvera plus dans le voisinage du *quencher* (fig. 1). Cette fluorescence est ensuite mesurée par une unité optique.

... à la pratique

Dans les laboratoires de Posieux, une analyse par PCR se réalise en plusieurs étapes séparées spatialement afin de limiter au minimum les risques de contamination. Ainsi, après avoir été enregistrés, les échantillons sont transportés dans un premier laboratoire où s'effectuent les moutures. Le moulin utilisé se trouve sous une hotte aspirante, ce qui évite une dispersion des poussières dans l'environnement de travail. Chaque ustensile utilisé est jeté, s'il s'agit de matériel à usage unique, ou lavé à l'eau de Javel, s'il est réutilisable. Ce nettoyage est absolument nécessaire afin de détruire toute trace de matériel pouvant contaminer le prochain échantillon. Tous les échantillons ne peuvent cependant pas être moulus directement. Certains présentent un enrobage, qui doit être impérativement éliminé car il peut contenir des inhibiteurs susceptibles de compromettre la suite des opérations. Par ailleurs, une fraction de chaque échantillon est conservée sous sa forme originale, ce qui permet de recourir à ce matériel en tout temps si une nouvelle analyse s'avère nécessaire. Dans le deuxième laboratoire, le prélèvement de l'échantillon (de 100 à 200 mg selon la matrice à analyser) et l'extraction d'ADN génomique ont lieu. A l'issue de l'extraction, les concentrations et la pureté sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre et l'ADN génomique est dilué aux concentrations voulues. C'est dans le troisième laboratoire que tous les réactifs nécessaires au bon déroulement d'une réaction de PCR sont mélangés pour former le *mastermix*. Ce dernier est préparé en quantité suffisante pour l'ensemble des réactions PCR à réaliser puis réparti dans les différents tubes. A la suite de quoi, l'ADN génomique est ajouté et les tubes sont acheminés dans le quatrième et dernier laboratoire où se trouvent les différents thermocycleurs. Pour assurer une bonne reproductibilité, chaque échantillon est extrait à double et plusieurs contrôles accompagnent l'analyse: un contrôle d'extraction comme indicateur d'éventuelles contaminations lors de l'extraction de l'ADN

génomique, un contrôle PCR pour vérifier le déroulement correct de l'amplification de l'ADN dans les thermocycleurs ainsi que des contrôles positifs et négatifs certifiés. Si les résultats à l'issue des réactions entre les deux extractions ne sont pas cohérents, l'échantillon est retraité depuis l'extraction d'ADN génomique.

Résultats

Dès 1997 et jusqu'à ce jour, les méthodes de PCR utilisées à Posieux ont évolué en fonction de l'amélioration des techniques ainsi que des modifications de la législation suisse. En effet, de 1997 à 1999, les analyses de détection d'OGM ont été effectuées par PCR conventionnelle avec une évaluation qualitative du résultat pour le criblage et les systèmes spécifiques. Par conséquent, lorsqu'un signal était décelable sur gel d'agarose (fig. 2), l'échantillon était considéré comme positif et devait être soumis à déclaration. Dès le 1^{er} juillet 1999, avec l'entrée en vigueur de la nouvelle Ordonnance sur les aliments pour animaux, la méthode de PCR conventionnelle semi-quantitative a été mise en routine et a permis une première quantification des éléments transgéniques. Grâce à une droite de régression établie avec cinq points de mesure, le pourcentage d'ADN transgénique pouvait être estimé par rapport à un standard interne connu. Ce standard, le

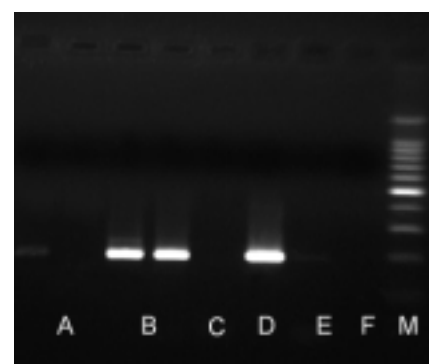


Fig. 2. Exemple de résultats obtenus à l'issue d'une PCR conventionnelle de détection du promoteur 35S. Les produits d'amplification ont été chargés sur un gel d'agarose (2%) qui contient du bromure d'éthidium permettant de visualiser les fragments d'ADN sous la lumière ultraviolette. A: échantillon négatif (en duplicat); B: échantillon positif (en duplicat); C: contrôle d'extraction; D: contrôle positif; E: contrôle négatif; F: contrôle PCR et M: marqueur de taille moléculaire.

promoteur 35S artificiellement augmenté de quelques nucléotides, entrainait alors au cours de la réaction en compétition avec le promoteur 35S, si celui-ci était présent, dans l'échantillon (fig. 3). Par mesure densitométrique, le rapport entre ces deux éléments pouvait ensuite être calculé. Cette méthode a toutefois été remplacée en août 2001 par la méthode de PCR en temps réel qui utilise l'émission de fluorescence comme indicateur d'amplification. La mise sur

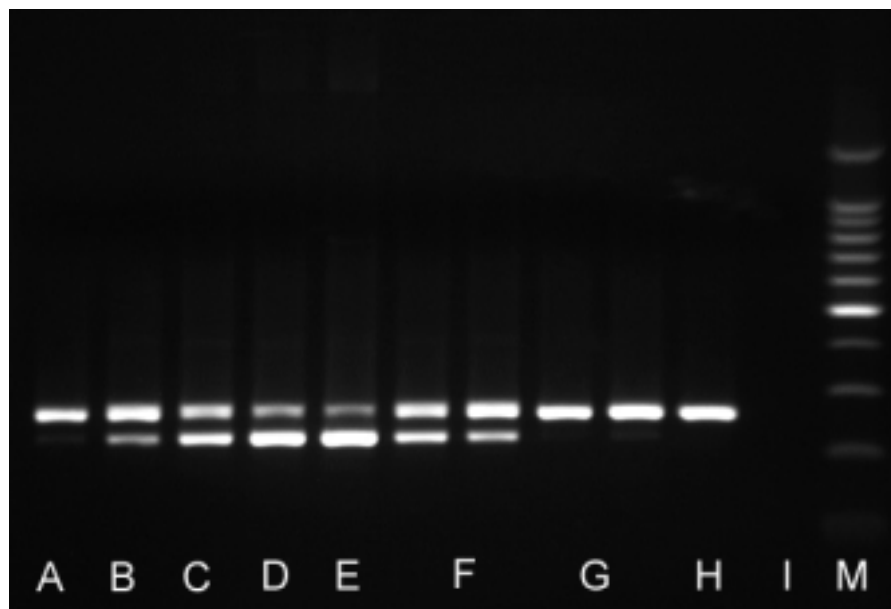
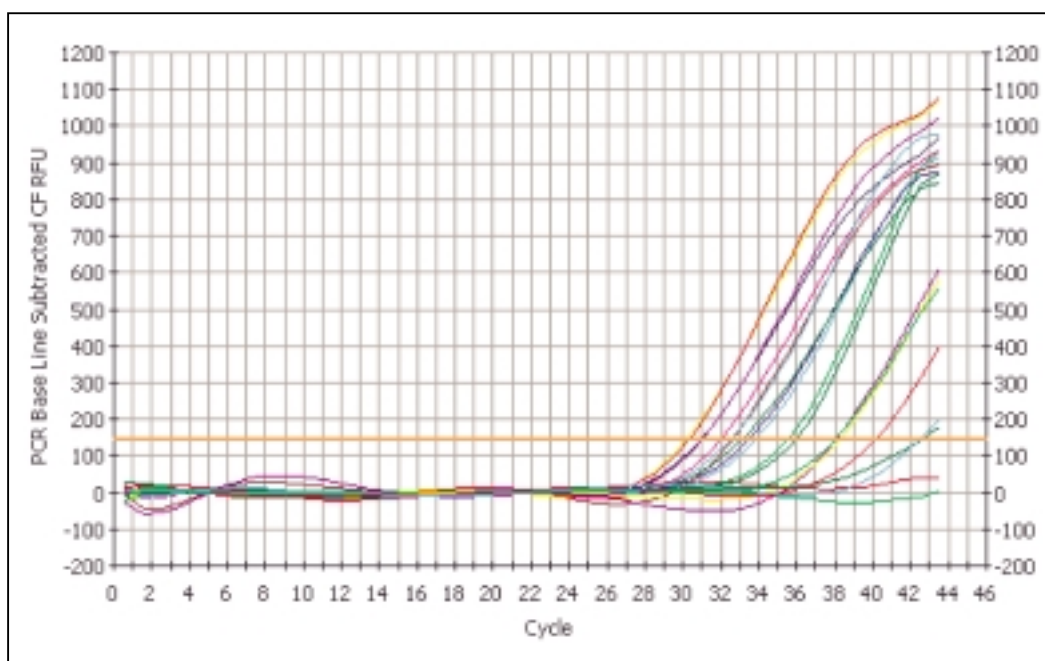


Fig. 3. Exemple de résultats obtenus à l'issue d'une PCR semi-quantitative. Les produits d'amplification ont été chargés sur un gel d'agarose (2%) qui contient du bromure d'éthidium permettant de visualiser les fragments d'ADN sous la lumière ultraviolette. Les bandes supérieures représentent le signal du standard interne et les bandes inférieures celui du promoteur 35S. A-E: droite de régression avec cinq points de mesure, A: 0,02%; B: 0,1%; C: 0,5%; D: 1% et E: 2% d'OGM; F: échantillon faiblement positif (< 0,5%); G: échantillon négatif; H: contrôle d'extraction; I: contrôle PCR et M: marqueur de taille moléculaire. Les échantillons sont chargés en duplicats.

Fig. 4. Exemple de résultat graphique obtenu à l'issue d'une PCR en temps réel. La quantité de fluorescence émise au cours des cycles d'amplification est enregistrée et comptabilisée au moment où la ligne de base (en rouge) est franchie. L'obtention de courbes sigmoïdales indique le bon fonctionnement de la réaction. Dans le cas présent, la première augmentation de fluorescence a lieu à partir du 28^e cycle. En ordonnée: cycles d'amplification (45 en routine) et en abscisse: mesure de l'émission de fluorescence.



gel d'agarose des produits d'amplification n'est donc plus nécessaire car toutes les données sont enregistrées sous forme informatisée (fig. 4). L'emploi simultané de deux sondes marquées avec différents fluorophores, l'une pour la matière première et l'autre pour le promoteur 35S, permet d'effectuer des co-amplifications et d'obtenir une quantification de l'élément transgénique, tout en prenant en considéra-

tion la qualité de la matière première à partir de laquelle l'ADN génomique a été extrait. Concrètement, deux droites de régression sont établies. La première pour la fraction transgénique avec cinq points de mesure allant de 0,02 à 2% (fig. 5) et la seconde pour le pourcentage de matière première avec cinq points de mesure allant de 1 à 100%. Pour des matières premières telles que le gluten de maïs ou les tourteaux de soja, le ré-

sultat sera exprimé sous forme de rapport entre le pourcentage de matière première et de promoteur 35S. Si la quantité de matière première est inférieure à 1%, le rapport n'est pas calculé et le résultat sera communiqué sous forme «matériel non amplifiable». Par contre, en ce qui concerne les aliments composés, seul le résultat du promoteur 35S sera rendu. Comme pour chaque méthode de quantification accréditée selon ISO 17025, les méthodes utilisées possèdent une incertitude de mesure et les résultats sont par conséquent rendus sous forme chiffrée, suivis d'un intervalle d'incertitude propre à chaque résultat.

Le laboratoire de Posieux traite annuellement environ 1500 échantillons dans le cadre des analyses de détection d'OGM. Aux échantillons prélevés par le Contrôle officiel des aliments pour animaux et par la douane s'ajoutent les échantillons envoyés par des clients externes. En ce qui concerne le Contrôle officiel, une nette diminution des cas soumis à déclaration a eu lieu après l'introduction des limites par la nouvelle Ordonnance en 1999 (tabl. 2). En effet, entre 1997 et la mi-1999, environ un tiers des 524 échantillons analysés a dû être soumis à déclaration alors qu'à partir de la seconde moitié de 1999 et jusqu'à fin 2003, sur 999 échantillons analysés, seuls 23 ont présenté une quantité d'OGM supérieure aux limites autorisées. Par ailleurs, en 2003, les 267 échantillons prélevés étaient tous conformes. Un regard sur la période 2000-2003 montre que, sur près de 6000 échantillons traités, les matrices le plus souvent analysées sont incon-

Tableau 2. Nombre d'échantillons (matières premières et aliments composés) analysés depuis 1997 dans le cadre du Contrôle officiel des aliments pour animaux.

	1997	1998	1999		2000	2001	2002	2003
Echantillons inférieurs à la limite de détection	65	208	63					
Echantillons soumis à déclaration	11	103	74	11	7	2	3	0
Echantillons inférieurs à la limite de déclaration				112	156	235	206	267
Sous-total			137	123				
Total	76	311	260	163	237	209	267	

1^{er} juillet 1999, entrée en vigueur des limites soumises à déclaration (3% pour les matières premières et aliments simples, 2% pour les aliments composés).

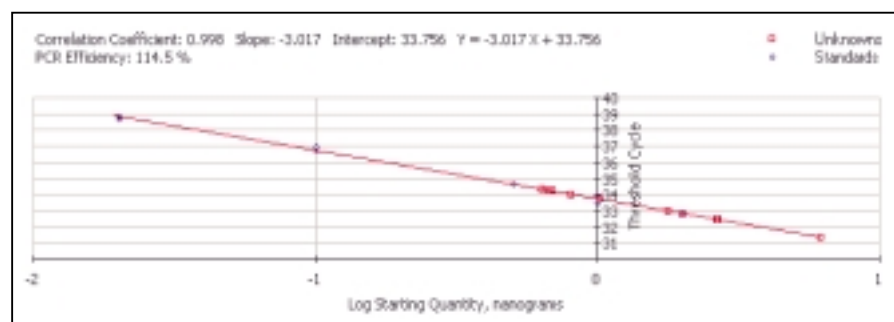


Fig. 5. Exemple d'une droite de régression pour la fraction transgénique (de 0,02 à 2% d'OGM). Les standards sont indiqués par des ronds bleus et les échantillons par des carrés rouges. Le coefficient de corrélation de 0,998 indique que la régression est valable.

Tableau 3. Illustration des différentes matrices analysées au cours de ces quatre dernières années.

	2000	2001	2002	2003
Aliments composés	312	515	528	509
Autres*	17	41	26	31
Betteraves (semences)	30	23	20	14
Blé	0	5	9	8
Colza (tourteau et semences)	40	161	55	33
Gluten de maïs	230	405	389	452
Maïs (semences)	236	137	118	106
Orge	0	3	1	3
Poudre de lait	3	2	2	0
Protéines de pommes de terre	11	12	1	0
Seigle	0	1	0	2
Soja (semences)	19	16	20	36
Tomates (semences)	0	0	4	2
Tourteaux de soja	228	337	356	416
TOTAL	1126	1658	1529	1612

*Par exemple: coton, endives, farine de soja, lin, semoule.

testablement le gluten de maïs et les tourteaux de soja (tabl. 3). C'est aussi pour le maïs et le soja que le laboratoire possède le plus de systèmes spécifiques, sur le plan qualitatif et quantitatif (tabl. 4). Par conséquent, si un échantillon est positif et qu'il contient du maïs ou du soja, l'OGM responsable du signal sera identifié. Cela n'est pas forcément le cas pour d'autres matrices car toutes les données nécessaires à la mise au point de systèmes spécifiques ne sont pas toujours disponibles. La consultation de banques de données sur les OGM régulièrement mises à jour, telle AGBIOS (www.agbios.com), peut alors s'avérer utile. Le laboratoire s'emploie cependant à développer régulière-

ment des méthodes afin d'élargir sa palette de prestations, et la participation à des analyses circulaires comme celles du Bipea (Bureau interprofessionnel d'études analytiques) ou de l'ISTA (International Seed Testing Association) permet un contrôle régulier des méthodes utilisées en routine.

Remerciements

Nos vifs remerciements vont à Marie-Françoise Crausaz, Brigitte Ecoffey et Carmen Vonnez pour leur travail technique ainsi qu'au Dr Christoph Haldermann pour sa collaboration au développement de méthodes.

Tableau 4. Analyses effectuées par le laboratoire de Posieux.

	Méthodes de détection utilisées	
	Résultat qualitatif	Résultat quantitatif
<i>Criblage</i>		
Promoteur 35S	X	X
Terminaison NOS	X	
<i>Systèmes spécifiques</i>		
Soja		
GTS-40-3-2 (RR)	X	X
Maïs		
Bt176	X	X
Bt11	X	X
Mon810	X	X
T25	X	X
CBH351 (Starlink)	X	
GA21	X	
NK603	X	
TC1517 (Herculex)	X	
Colza		
GT73 (RT73)	X	
Détection du CaMV*	X	

*Virus de la mosaïque du chou-fleur.

Conclusions

- ❑ Les échantillons prélevés ces dernières années dans le cadre du Contrôle officiel des aliments pour animaux montrent que les exigences relatives à la déclaration des aliments contenant des OGM sont bien respectées par les fabricants d'aliments pour animaux.
- ❑ La méthode de PCR en temps réel est fiable et rapide, le résultat d'un échantillon arrivé au laboratoire le matin est déjà disponible en fin d'après-midi.
- ❑ Le laboratoire de Posieux améliore régulièrement ses connaissances scientifiques et techniques de manière à être en mesure d'optimiser la détection des OGM dans les matrices qui lui sont soumises.
- ❑ Les méthodes employées en routine sont adaptées aux changements qui devraient intervenir en Suisse pour s'harmoniser avec les décisions de l'Union européenne (limite de 0,9% pour la déclaration des OGM).

Bibliographie

- JAMES C., 2003. Preview: global status of commercialized transgenic crops. ISAAA Briefs n° 30. Ithaca, NY, 8 p.
- POITRAS E., HOUE A., 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev. Biol. Bio-tech.* 2 (2), 2-11.

Summary

GMO detection in animal feeds: theoretical and practical aspects

Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP), the Swiss Federal Research Station for Animal Production and Dairy Products, analyses animal feeds for their content of genetically modified organisms (GMO). Since the introduction in 1999 of the limits for GMO declaration (3% in raw materials and 2% in mixed feeds), more than 1600 samples were drawn by the official feed inspection. The results of the analyses show that few mixed feeds or raw materials have to be contested because of their GMO content. The detection techniques also evolved during the last years. They are more rapid and accurate today, and a quantification of the transgenic elements is now carried out routinely.

Key words: feeds, real-time PCR, GMO detection, official feed inspection.

Zusammenfassung

GVO Untersuchung in Futtermitteln: theoretische und praktische Aspekte

In Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP), der Eidgenössische Forschungsanstalt für Nutztiere und Milchwirtschaft, werden die Analysen für den Nachweis von gentechnisch veränderte Organismen (GVO) durchgeführt. Seit 1999, als die Deklarationslimiten für GVO (3% für Ausgangsprodukte und 2% für Mischfuttermittel) eingeführt wurden, sind letztlich ungefähr 1600 Proben von der amtlichen Futtermittelkontrolle gezogen worden. Die Ergebnisse der Analysen sind erfreulich, denn wenige Mischfuttermittel und Ausgangsprodukte wurden wegen des Gehaltes an GVO beanstandet. Die Untersuchungstechniken haben sich die letzten Jahre auch weiter entwickelt und haben nicht nur an Schnelligkeit sondern auch an Genauigkeit gewonnen, denn zur Zeit wird eine Quantifizierung der transgenen Elemente routinemässig ausgeführt.