
**Analyse moléculaire de
biomarqueurs — Méthode pour
l'évaluation statistique des résultats
d'analyse obtenus lors des essais
de sous-échantillons multiples de
semences et de graines génétiquement
modifiées — Exigences générales**

*Molecular biomarker analysis — Method for the statistical evaluation
of analytical results obtained in testing sub-sampled groups of
genetically modified seeds and grains — General requirements*

[ISO 22753:2021](https://standards.iteh.ai/standards/sist/2a997399-1230-4f80-b841-e52bad7398e1/iso-22753-2021)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a997399-1230-4f80-b841-e52bad7398e1/iso-22753-2021>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 22753:2021](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a997399-1230-4f80-b841-e52bad7398e1/iso-22753-2021)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a997399-1230-4f80-b841-e52bad7398e1/iso-22753-2021>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2021

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	4
4.1 Généralités	4
4.2 Préparation des groupes de semences/graines	5
4.3 Méthodes de détection pour l'analyse qualitative de semences/graines GM dans des groupes de semences/graines	5
4.4 Évaluation statistique	6
5 Réactifs	6
6 Appareillage et matériel	6
7 Conception du plan d'essai	6
7.1 Généralités	6
7.2 Plan d'essai à une étape	7
7.3 Plan d'essai à deux étapes	7
8 Sélection des méthodes qualitatives	8
8.1 Généralités	8
8.2 Critères de performance	9
9 Interprétation	9
10 Expression des résultats	11
10.1 Classification d'un lot de semences/graines dans la catégorie «accepté» ou «rejeté»	11
10.2 Estimation de la teneur en biomarqueur moléculaire dans le lot de semences/graines	11
11 Rapport d'essai	11
Annexe A (informative) Tableau de comparaison des termes et définitions	12
Annexe B (informative) Exemple d'application de la méthode pour évaluer la teneur en OGM dans les semences/graines	14
Annexe C (informative) Estimation de la limite de détection pour un plan d'essai conçu pour détecter les semences/graines GM dans des lots de semences	22
Annexe D (informative) Détermination expérimentale de la taille de groupe maximale	26
Bibliographie	28

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 16, *Méthodes horizontales pour l'analyse moléculaire de biomarqueurs*.

La présente version française de l'ISO 22753:2021 correspond à la version anglaise publiée le 2021-08 et corrigée le 2022-11.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

Les essais sur les semences et les graines sont utilisés dans le monde entier pour définir commercialement la pureté des lots de semences et graines.

Les exigences commerciales relatives à l'étiquetage des produits agricoles ayant une teneur en organismes génétiquement modifiés (OGM) à un seuil spécifié, à la fois sous forme de contaminant pour les semences/graines et sous forme d'ingrédient alimentaire, se sont généralisées afin de respecter les réglementations et satisfaire les demandes des consommateurs. Le respect de ces exigences est évalué à différents stades de la chaîne d'approvisionnement, qui commence souvent par la récolte des graines.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps réel peut être utilisée pour déterminer la teneur en OGM par l'analyse du rapport entre le nombre de copies d'ADN de l'OGM et le nombre de copies d'ADN spécifique de l'espèce végétale puis la conversion en fraction massique génétiquement modifiée (GM).

De multiples événements empilés pendant une récolte, notamment ceux générés par le croisement d'au moins deux événements individuels, sont couramment utilisés dans le domaine de la production agricole. Les semences ou graines à empilement d'événements contenant de l'ADN d'OGM correspondant à au moins deux événements GM conjugués ne peuvent pas être différenciées, par une PCR quantitative seule, des semences multiples au sein du lot contenant chacun un événement GM individuel. Par conséquent, si l'OGM réel mesuré provient uniquement de semences à empilement d'événements GM, la teneur en OGM mesurée par PCR quantitative en temps réel d'un seul échantillon entraînera une surestimation du nombre réel de semences ou graines GM présentes.

La stratégie d'analyse de groupe, décrite dans le présent document, constitue une solution fiable pour estimer la teneur en OGM en se basant sur le fait que des semences/graines entières constituent l'échantillon.

Le processus décrit dans le présent document peut fournir une méthode permettant d'estimer avec précision les pourcentages de semences/graines GM dans un lot, indépendamment de la présence de semences/graines à empilement d'événements. La teneur en OGM est déterminée pour les sous-échantillons multiples représentatifs de semences/graines provenant d'un lot, puis analysée d'un point de vue statistique.

Analyse moléculaire de biomarqueurs — Méthode pour l'évaluation statistique des résultats d'analyse obtenus lors des essais de sous-échantillons multiples de semences et de graines génétiquement modifiées — Exigences générales

1 Domaine d'application

Le présent document décrit les exigences générales, les modes opératoires et les critères de performance applicables à l'évaluation de la teneur en semences/graines génétiquement modifiées (GM) dans un lot par une stratégie d'analyse de groupe qui comprend l'analyse qualitative de sous-échantillons multiples puis l'évaluation statistique des résultats.

Le présent document est applicable à la stratégie d'analyse de groupe permettant d'estimer la teneur en OGM sur un pourcentage de semences/graines afin d'en estimer la pureté, d'évaluer si un critère de rejet/d'acceptation défini est respecté et de déterminer les cas où des lots de semences/graines contiennent un empilement d'événements.

Le présent document n'est pas applicable aux produits transformés.

NOTE Une description de l'utilisation de la stratégie d'analyse de groupe est donnée dans les Références [1], [7], [8], [18], [19] et [20].

2 Références normatives

[ISO 22753:2021](https://standards.iso.org/standards/catalog/standards/sist/2a997399-1230-4f80-b841-e52bad7398e1/iso-22753-2021)

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 16577, *Analyse de biomarqueurs moléculaires — Vocabulaire pour les méthodes d'analyse de biomarqueurs moléculaires dans l'agriculture et la production agroalimentaire*

ISO 21572, *Produits alimentaires — Analyse des biomarqueurs moléculaires — Méthodes immunochimiques pour la détection et la quantification des protéines*

ISO 24276, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Exigences générales et définitions*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 16577 ainsi que les suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>

3.1
limite de détection PCR absolue
limite de détection absolue de la réaction de polymérisation en chaîne
LOD PCR absolue
plus petit nombre nominal (moyen) de copies cibles dans le volume de matrice distribué dans chaque PCR qui offrirait une probabilité acceptable de détection de la cible

3.2
NQA
 NQ_A
niveau de qualité acceptable
niveau d'impureté qui est acceptable pour le producteur et que les méthodes de production peuvent supporter

3.3
risque du consommateur
risque du consommateur (bêta)
probabilité d'acceptation d'un lot à la *limite de qualité inférieure* ([3.10](#))

3.4
graine/semence déviante
graine/semence considérée comme non conforme en raison de la présence ou de l'absence d'un trait ou d'une caractéristique particulière

Note 1 à l'article: Pour les besoins du présent document, est considérée comme déviante une semence qui possède une caractéristique GM inattendue ou imprévue par rapport aux caractéristiques GM connues ou attendues de la semence/graine.

3.5
taux de faux négatifs
TFN
probabilité qu'un *échantillon pour essai* ([3.20](#)) positif (groupe de semences/graines) connu ait été classé comme négatif par la méthode

Note 1 à l'article: Le taux de faux négatifs est le nombre de positifs connus mal classés divisé par le nombre total d'*échantillons pour essai* ([3.20](#)) positifs.

[SOURCE: ISO 16577:2016, 3.63, modifiée — l'abréviation a été ajoutée, «échantillon pour essai positif» a été remplacé par «échantillon pour essai (groupe de semences/graines) positif» et la formule a été supprimée.]

3.6
taux de faux positifs
TFP
probabilité qu'un *échantillon pour essai* ([3.20](#)) négatif (groupe de semences/graines) connu ait été classé comme positif par la méthode

Note 1 à l'article: Le taux de faux positifs est le nombre de négatifs connus mal classés divisé par le nombre total d'*échantillons pour essai* ([3.20](#)) négatifs.

[SOURCE: ISO 16577:2016, 3.65, modifiée — l'abréviation a été ajoutée, «échantillon pour essai négatif» a été remplacé par «échantillon pour essai (groupe de semences/graines) négatif» et la formule a été supprimée.]

3.7
taille du groupe
nombre de semences/graines contenues dans un groupe

3.8**essai de groupe**

évaluation statistique de la teneur en analyte à partir de résultats d'analyse qualitative (c'est-à-dire positifs ou négatifs) pour chaque groupe de semences/graines de l'échantillon pour essai (3.20)

3.9**échantillon pour laboratoire**

échantillon ou sous-échantillon(s) reçu(s) par le laboratoire

Note 1 à l'article: Il est attendu que l'échantillon de semence/graine reçu soit représentatif du *lot de semences/graines* (3.18).

[SOURCE: ISO 16577:2016, 3.89, modifiée — La Note 1 à l'article a été ajoutée.]

3.10**LQL**
 L_{QL}
limite de qualité inférieure

niveau d'impureté le plus élevé qui est acceptable pour le consommateur

Note 1 à l'article: Ce terme peut être équivalent au *seuil* (3.22).

3.11**fraction massique**

rapport entre les semences/graines GM et les semences/graines totales correspondant au rapport de masse

3.12**nombre de groupes de graines/semences déviantes**

nombre de *groupes de semences/graines* (3.17) comprenant une ou plusieurs *semences/graines déviantes* (3.4)

3.13**courbe caractéristique opérationnelle
courbe OC**

représentation graphique du pourcentage de semences/graines déviantes et de la probabilité d'acceptation situés respectivement sur les axes horizontal et vertical et utilisée dans le cadre de contrôles qualité afin de déterminer la probabilité d'acceptation de *lots de semences/graines* (3.18) d'un *plan d'essai* (3.21)

3.14**risque du producteur****risque du producteur (alpha)**

probabilité de rejet d'un lot au *NQA* (3.2)

3.15**échantillon représentatif**

unités d'échantillonnage (échantillons ou groupes) qui ont été extraites d'un lot au moyen d'un processus garantissant que toutes les unités d'échantillonnage ont les mêmes chances d'être sélectionnées et n'ont pas été modifiées au point de fausser le résultat d'analyse

Note 1 à l'article: Le processus d'extraction peut être un processus à multiples étapes.

3.16**critère de rejet/d'acceptation**

nombre de groupes de semences/graines déviantes (3.12) maximal qui peut être détecté dans l'échantillon pour essai (3.20) d'un *lot de semences/graines* (3.18) acceptables

3.17

groupe de semences/graines **groupe**

nombre déterminé de semences/graines préparées à partir d'un *échantillon pour essai* (3.20) de semences/graines par échantillonnage représentatif

3.18

lot de semences/graines **lot**

population destinée à être échantillonnée pour estimer le paramètre mesuré

3.19

empilement d'événements

accumulation d'au moins deux événements de transformation à la suite d'un croisement traditionnel et/ou d'étapes de transformation génétique successives

Note 1 à l'article: Dans le contexte du présent document, un empilement d'événements désigne un empilement dans lequel les deux événements ou plus n'ont pas de liens génétiques.

[SOURCE: ISO 16577:2016, 3.197, modifiée — La Note 1 à l'article a été ajoutée.]

3.20

échantillon pour essai

échantillon préparé pour essai ou analyse, la quantité totale ou une partie de celui-ci étant utilisée pour l'essai ou l'analyse en une seule fois

Note 1 à l'article: L'échantillon pour essai est préparé à partir d'un *échantillon pour laboratoire* (3.9).

Note 2 à l'article: Il est attendu que l'échantillon pour essai soit représentatif de l'*échantillon pour laboratoire* (3.9).

[SOURCE: ISO 16577:2016, 3.210 modifiée — La Note 1 à l'article et la Note 2 à l'article ont été ajoutées.]

3.21

plan d'essai

plan spécifiant les conditions de l'*essai de groupe* (3.8), y compris la *taille du groupe* (3.7), le nombre de *groupes de semences/graines* (3.17) et le nombre de *groupes de semences/graines déviantes* (3.12) au sein de l'*échantillon pour essai* (3.20) à la suite du rejet d'un *lot de semences/graines* (3.18)

3.22

seuil

teneur maximale acceptable d'un OGM dans un lot

Note 1 à l'article: Il peut s'agir d'une valeur prescrite.

Note 2 à l'article: Les seuils peuvent être exprimés en *fraction massique* (3.11), à condition qu'un facteur d'incertitude soit utilisé pour la conversion en seuil de pourcentage de semences/graines.

4 Principe

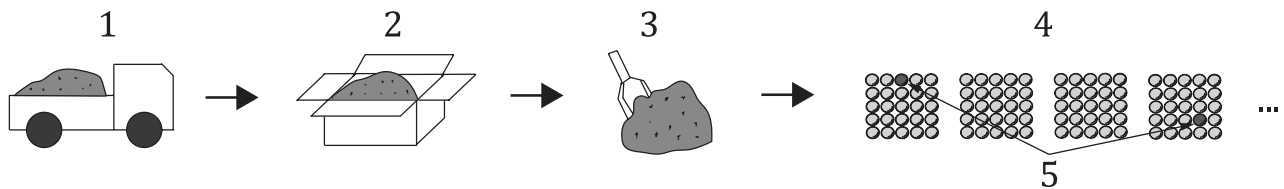
4.1 Généralités

Dans cette méthode, l'échantillon pour essai est divisé en un nombre de groupes prédéterminé. Chaque groupe comprend un nombre déterminé de semences/graines et est analysé qualitativement par rapport à la présence ou l'absence d'une cible GM. Une évaluation statistique est effectuée sur le nombre de groupes positifs aux OGM par rapport au nombre total de groupes de semences/graines afin de déterminer la teneur en OGM en fraction massique.

Un calcul statistique détermine les conditions d'essai optimales, à savoir le nombre de semences/graines par groupe (taille du groupe), le nombre de groupes de semences/graines et le nombre maximal de groupes de semences/graines positifs aux OGM pour l'acceptation du lot de semences/graines. Un

calcul statistique fournit également une estimation du pourcentage en nombre de semences/graines GM d'un lot, en fonction d'un plan d'essai défini.

4.2 Préparation des groupes de semences/graines



Légende

- 1 lot de semences/graines en vrac
- 2 échantillon pour laboratoire
- 3 échantillon pour essai
- 4 groupes de semences/graines
- 5 graine/semence déviante

NOTE Chaque groupe est représenté sous la forme d'une rangée à droite.

Figure 1 — Illustration schématique de l'obtention de groupes de semences/graines à partir d'un lot de semences/graines en vrac

Le processus de formation de groupes de semences/graines à partir d'une série d'étapes d'échantillonnage, en commençant par le lot de semences/graines en vrac, est illustré à la [Figure 1](#), (1).

Bien que les modes opératoires permettant d'obtenir un échantillon pour laboratoire à partir d'un lot de semences/graines ne soient pas abordés par le présent document, un échantillon pour laboratoire (1) provenant d'un lot de semences/graines doit être obtenu de manière appropriée. Les modes opératoires peuvent être conçus d'après les Références [3], [6], [10], [11], [12], [15], [19] et [23].

L'échantillon pour laboratoire doit être soigneusement mélangé et divisé/réduit pour créer l'échantillon pour essai (3). De la même manière, l'échantillon pour essai doit être soigneusement mélangé (c'est-à-dire, homogénéisé) et divisé en groupes de semences/graines [chaque groupe étant représenté sous la forme d'une rangée à la [Figure 1](#), (4)] en respectant les principes de l'échantillonnage aléatoire simple. Les groupes de semences/graines peuvent varier en taille (d'une seule semence/graine à un échantillon pour essai complet, soit un seul volume). Dans la plupart des cas, plusieurs groupes de semences/graines sont créés à partir de l'échantillon pour essai.

Un nombre déterminé de semences/graines peut être obtenu par pesage ou par mesure de volume, auquel cas une approximation du nombre est effectuée sur la base d'un facteur de conversion déterminé (par exemple, poids de mille semences/graines). Dans le cas où ce poids est utilisé pour obtenir les groupes de semences/graines, l'opérateur doit avoir une estimation de la variabilité introduite par l'utilisation du poids plutôt que par le dénombrement des semences/graines.

Le mode opératoire de l'essai de groupe, décrit à l'[Article 7](#) est effectué sur les résultats collectifs qualitatifs (positifs ou négatifs) pour chaque groupe de semences/graines.

4.3 Méthodes de détection pour l'analyse qualitative de semences/graines GM dans des groupes de semences/graines

En général, les méthodes de détection d'OGM sont divisées dans deux catégories^[21]. La première catégorie d'analyse cible une séquence d'acide nucléique pour détecter la présence d'OGM. La seconde fait appel à des méthodes de détection d'une protéine spécifiée qui confère un trait transgénique spécifique. Il convient de sélectionner les méthodes de détection parmi l'une des catégories ou les deux catégories, en tenant compte de leur adéquation avec l'objectif. Des recommandations sur la sélection

des méthodes qualitatives sont fournies à [l'Article 8](#). Des informations supplémentaires sont données dans l'ISO 21569^[4] et dans l'ISO 21572.

4.4 Évaluation statistique

L'incertitude d'échantillonnage et de mesure doit être prise en compte. L'incertitude d'échantillonnage peut être adéquatement prise en compte en utilisant la distribution binomiale^{[18][2]}. Il convient de tenir compte du TFP et du TFN de l'analyse qualitative^[2]. Il convient de tenir compte de la LOD de la méthode de détection appliquée.

L'essai de groupe décrit ici peut être utilisé pour définir les critères de rejet/d'acceptation en fonction d'un seuil défini par la teneur en OGM, ainsi que pour estimer la teneur en OGM et les limites de confiance supérieure et inférieure associées.

5 Réactifs

Il convient que tous les réactifs utilisés lors de l'analyse soient ceux spécifiés dans la méthode.

En l'absence de spécification, il convient que tous les réactifs soient de qualité analytique reconnue.

Ces réactifs doivent être conservés et utilisés selon les recommandations du fournisseur ou conformément aux spécifications d'assurance qualité du laboratoire. Il peut également être approprié d'aliquoter les solutions réactionnelles requises pour la méthode d'analyse afin d'éviter de les soumettre à des cycles répétés de congélation-décongélation et/ou de réduire les risques de contamination croisée. Pour plus d'informations, voir l'ISO 24276 et l'ISO 21572.

6 Appareillage et matériel

Il convient que le laboratoire utilise un matériel correctement entretenu et adapté aux méthodes employées.

Pour plus d'informations, voir l'ISO 24276 et l'ISO 21572.

7 Conception du plan d'essai

7.1 Généralités

Le nombre de semences/graines soumises à essai, les critères de rejet/d'acceptation, les étapes de préparation des échantillons et la méthode d'analyse utilisée doivent être déterminés en fonction de l'objectif de l'analyse.

Lors de la classification des échantillons de semences/graines, il est possible de déterminer si le nombre de semences/graines déviantes ou groupes de semences/graines est supérieur ou non à un critère de rejet/d'acceptation défini. Il peut ensuite être décidé de rejeter ou d'accepter le lot de semences/graines d'après les résultats d'essai.

Un plan d'essai de base pour l'essai de groupe comprend trois paramètres fondamentaux:

- a) le nombre de groupes de semences/graines;
- b) la taille des groupes de semences/graines;
- c) le nombre maximal de groupes de graines/semences déviantes pour l'acceptation du lot de semences/graines (critère de rejet/d'acceptation).

Les risques associés au NQA et à la LQL sont respectivement les risques du producteur (alpha) et du consommateur (bêta) qui, avec le TFP et le TFN, permettent de concevoir un plan d'essai approprié.