

Produits alimentaires. Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés

Yves Bertheau

▶ **To cite this version:**

Yves Bertheau. Produits alimentaires. Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés. 2000, 38 p. hal-02842612

HAL Id: hal-02842612
https://hal.inrae.fr/hal-02842612

Submitted on 7 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

FA107276

ISSN 0335-3931

normalisation française

XP V 03-020-1

Décembre 2000

Indice de classement : **V 03-020-1**

ICS : 07.080

HOMMAGE DE L'ÉDITEUR

Produits alimentaires

Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés

Partie 1 : Lignes directrices et exigences

E : Foodstuffs — Detection and quantification of genetically modified vegetal organisms and derived products — Part 1: Guidelines and requirements

D : Nahrungs- und Lebensmittel — Nachweis und Quantifikation von genetisch modifizierten pflanzlichen Organismen und Nebenerzeugnissen — Teil 1: Leitfaden und Anforderungen

Mr Yves BERTHEAU
INRA
PMDV/MDO
RD 10 - Route de St-Cyr
F-78026 VERSAILLES CEDEX
Tél. : +33 (0)1 30 83 32 04 - Fax : +33 (0)1 30 83 31 95
E-mail : bertheau@versailles.inra.fr

© AFNOR 2000 — Tous droits réservés

Norme expérimentale

INRA
Phytopathologie et Méthodologies de la Détection

publiée par AFNOR en décembre 2000.

Les observations relatives à la présente norme expérimentale doivent être adressées à AFNOR avant le 31 décembre 2002.

Correspondance

À la date de publication du présent document, il existe des travaux en cours au niveau européen traitant du même sujet.

Analyse

Le présent document est le premier volet d'une série de cinq normes concernant la détection et la quantification des organismes génétiquement modifiés et produits dérivés dans les produits alimentaires.

Ce document a pour objectif d'homogénéiser les résultats obtenus dans les laboratoires par la définition d'un cadre général auquel doit satisfaire toute méthode de détection basée sur les acides nucléiques et plus particulièrement sur la technique PCR (réaction de polymérisation par chaîne).

Descripteurs

Thésaurus International Technique : alimentation humaine, produit alimentaire, méthode d'analyse, détection, organisme génétiquement modifié, plante transgénique, calcul, ADN, essai de laboratoire, exigence, définition, réactif chimique, matériel d'essai, mode opératoire, assurance de qualité.

Modifications

Corrections

Éditée et diffusée par l'Association Française de Normalisation (AFNOR), Tour Europe 92049 Paris La Défense Cedex
Tél. : 01 42 91 55 55 — Tél. international : + 33 1 42 91 55 55

© AFNOR 2000

Détection des OGM et des produits dérivés AFNOR V03E

Membres de la commission de normalisation

Président : M BERTHEAU

Secrétariat : MME GUISSE — AFNOR

M	ALARY	INRA — CENTRE DE RECHERCHE MONTPELLIER
MME	BALOIS	ROQUETTE FRERES
MME	BEN TAHAR	GROUPE LIMAGRAIN HOLDING
M	BERTHEAU	INRA CTRE RECHERCHES VERSAILLES
MME	BERTIN	KALIGENE
M	BLANCHARD	RUSTICA PROGRAIN GENETIQUE
M	BOURY	BBV-BRETAGNE BIOTECHNO VEGETALE
M	BOUTREKA	SSHA ISHA
M	CLAUZEL	LCA — LABORATOIRE CENTRE ATLANTIQUE
MME	DUBOS	AQUANAL SA
M	FABRE	GNIS SOC
M	FACH	AFSSA PARIS LCHA
M	GABARD	DU PONT DE NEMOURS FRANCE SA
M	GACHET	EUROFINS SCIENTIFIC
M	GAVARD	LABORATOIRE LARA SA
M	GERVAISE	SGS LABORATOIRE CREPIN
MME	GIOVANNINI	CERESTAR FRANCE SA
MME	GOFFINET	CAR — CTRE ANALYSES & RECHERCHE
MME	GREVESSE	GENETECH SA
M	GUERREIRO	ITCF
M	GUYON	LABORATOIRE DEPT FRANK DUNCOMBE
M	HAUSER	GENESCAN
M	HERVIEU	DION GENERALE ALIMENTATION
M	LACAZE	AGROGENE
MME	LACOTTE	LABORATOIRE WOLFF ENVIRONNEMENT
MME	LASSERRE	MONSANTO SAS
M	LEBEAU	ATLANGENE APPLICATIONS
M	LEGAVRE	CIRAD AMIS
MME	LEGENTIL	UFCS
M	LENAERS	SILLIKER SA
MLLE	MARTIN	GENOLIFE
M	MARTIN	PE FRANCE SA
MME	MELIKECHI	SYND MIXTE POLE ANALYTIQ EAUX
M	MENRAS	ROCHE DIAGNOSTICS SA
MME	PEYRUCHAUD	PROMEGA FRANCE
M	PFISTER	IFRA
M	PHILIPP	DGCCRF LABO INTERREGIONAL
MME	PIGNARD	NOVARTIS SEEDS SA
M	QUINSAC	CETIOM
MME	RAOUX	ITERG — INSTITUT DES CORPS GRAS
M	SKORSKI	PHYLOGENE
M	TAKVORIAN	QIAGEN SA
M	VAITILINGON	BRASSERIES KRONENBOURG / TEPRAL
MME	VENES	DGCCRF
MME	VERGER	SRPV
MME	WAGNER	STARAL SA
MME	WEILL	LABO SANTE ENVIRONNEMENT HYGIENE
M	ZHANG	GEVES

Sommaire

Page

Avant-propos 4

Introduction 4

1 **Domaine d'application** 5

2 **Références normatives** 5

3 **Termes et définitions** 6
3.1 Termes généraux 6
3.2 Termes relatifs à l'extraction et à la purification de l'ADN 8
3.3 Termes relatifs à l'amplification de l'ADN et à la PCR 9
3.4 Termes relatifs aux témoins 11
3.5 Termes relatifs aux sondes 13
3.6 Termes relatifs aux matériaux de référence 13
3.7 Termes relatifs à la quantification 14

4 **Principe** 15

5 **Réactifs** 15

6 **Appareillages et équipements** 15

7 **Mode opératoire** 16
7.1 Généralités 16
7.2 Échantillonnage 16
7.3 Préparation de l'échantillon pour laboratoire et pour essai 16
7.4 Prises d'essai 18
7.5 Extraction et purification des acides nucléiques 18
7.6 Amplification de l'ADN par PCR 23

8 **Mesures générales d'assurance qualité** 30
8.1 Généralités 30
8.2 Locaux, appareillages et équipements 30
8.3 Équipement du personnel 32
8.4 Traitement et élimination des déchets 32
8.5 Réactifs 32

9 **Interprétation et expression des résultats** 34
9.1 Généralités 34
9.2 Calcul de la teneur en ADN de végétaux génétiquement modifiés 34
9.3 Interprétation des résultats 35

10 **Rapport d'essai** 36

Bibliographie 37

Avant-propos

Plusieurs appellations commerciales sont utilisées au sein du présent document. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs et ne signifient nullement qu'AFNOR approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

Le présent document cite des techniques brevetées. Elles doivent être utilisées en accord avec les sociétés détentrices des droits.

Introduction

L'objectif de l'analyse, s'attachant à la détection des organismes végétaux génétiquement modifiés (OGM) et de leurs produits dérivés, est :

— d'une part, de détecter, de cribler ou d'identifier dans une matrice donnée la modification génétique des OGM et produits dérivés ;

— d'autre part de quantifier :

- soit par criblage pour les produits purs, un OGM et ses produits dérivés dans la matrice ;
- soit par identification pour les produits en mélange, les OGM et leurs produits dérivés présents dans la matrice

dans la mesure où la teneur en chaque espèce a été déterminée.

Le présent document a seulement pour but de définir :

— des exigences générales que chaque méthode de détection des OGM, fondée sur les acides nucléiques, doit pouvoir respecter pour être retenue. D'autres documents plus spécifiques (XP V 03-020-2 à XP V 03-020-4 et XP V 03-021) décriront en détail les diverses étapes nécessaires à une détection fiable et sensible des OGM ;

— des lignes directrices concernant les précautions à prendre pendant les analyses. Une connaissance approfondie des techniques utilisées se révèle essentielle à leur bonne utilisation.

Il convient donc que les analyses soient conduites avec la plus grande rigueur possible, que les résultats soient aussi précis que possible et qu'il soit tenu compte de leur variabilité.

Les nombreuses manipulations en laboratoire peuvent par exemple entraîner involontairement des contaminations croisées et il convient de toujours vérifier la précision des résultats donnés par la technique et d'utiliser les témoins appropriés.

Il est aussi particulièrement important d'éviter les sources de contamination des échantillons, en veillant aussi bien à l'organisation du laboratoire qu'aux techniques de travail ou à la qualité des réactifs utilisés (voir article 8).

Le présent document a été divisé en plusieurs parties de façon à pouvoir être réactualisé au mieux en fonction des résultats des futurs essais interlaboratoires.

XP V 03-020-1, *Produits alimentaires — Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés — Partie 1 : Lignes directrices et exigences.*

XP V 03-020-2 [1)], *Produits alimentaires — Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés — Partie 2 : Méthodes d'extraction des acides nucléiques.*

XP V 03-020-3 [1)], *Produits alimentaires — Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés — Partie 3 : Méthodes qualitatives basées sur les acides nucléiques.*

XP V 03-020-4 [1)], *Produits alimentaires — Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés — Partie 4 : Méthodes quantitatives basées sur les acides nucléiques.*

XP V 03-021 [1)], *Produits alimentaires — Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés — Méthodes basées sur les protéines.*

Ces protocoles doivent répondre au mieux aux exigences du présent document.

---

1) En préparation.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie un cadre général auquel doit satisfaire toutes méthodes de détection des organismes végétaux génétiquement modifiés (OGM) basées sur les acides nucléiques et plus particulièrement sur la technique PCR (réaction de polymérisation en chaîne) ou technique d'amplification enzymatique *in vitro* de l'ADN [1], [4], [22].

Le but du présent document est :

— d'assurer la compatibilité des méthodes d'analyse ;

— de garantir que les principes généraux utilisés pour effectuer ces analyses sont les mêmes dans tous les laboratoires ;

— de participer à l'homogénéisation des résultats obtenus dans les laboratoires.

Des outils moléculaires devant fonder certaines méthodes manquent encore, comme par exemple les tests PCR fondés sur les fragments de bordure. Jusqu'à ce que tous les outils de détection nécessaires soient disponibles, il doit être tenu compte de cette situation intermédiaire, en indiquant, autant que possible, dans le rapport d'essai, notamment pour chaque méthode de détection, son domaine d'application (tests PCR qualitatifs et quantitatifs). Cette transparence, et la mise à jour de chaque technique dès qu'une nouvelle version ou une nouvelle méthode apparaît, doivent permettre de diminuer les écarts entre les données et les conflits qui peuvent en résulter.

La présente norme a été établie pour les produits alimentaires de consommation humaine mais peut également s'appliquer par exemple aux aliments pour animaux, aux semences et aux études environnementales (contrôles d'expérimentation).

2 Références normatives

Le présent document comporte par référence datée ou non datée des dispositions d'autres publications. Ces références normatives sont citées aux endroits appropriés dans le texte et les publications sont énumérées ci-après. Pour les références datées, les amendements ou révisions ultérieurs de l'une quelconque de ces publications ne s'appliquent à ce document que s'ils y ont été incorporés par amendement ou révision. Pour les références non datées, la dernière édition de la publication à laquelle il est fait référence s'applique.

NF EN 12682, *Biotechnologie — Organismes modifiés disséminés dans l'environnement — Guide pour la caractérisation de l'organisme génétiquement modifié par l'analyse de l'expression fonctionnelle de la modification génomique (indice de classement : X 42-303).*

NF EN 12683, *Biotechnologie — Organismes modifiés disséminés dans l'environnement — Guide pour la caractérisation de l'organisme génétiquement modifié par l'analyse de la stabilité moléculaire de la modification génomique (indice de classement : X 42-304).*

NF EN 12687, *Biotechnologie — Organismes modifiés disséminés dans l'environnement — Guide pour la caractérisation de l'organisme génétiquement modifié par l'analyse de la modification génomique (indice de classement : X 42-301).*

NF EN ISO 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai (indice de classement : T 01-070).*

NF ISO 3534-1, *Statistique — Vocabulaire et symboles — Partie 1 : Probabilité et termes statistiques généraux (indice de classement : X 06-002-1).*

FD V 01-000, *Analyse des produits agricoles et alimentaires — Terminologie.*

FD V 03-115, *Analyse des produits agricoles et alimentaires — Guide pour l'utilisation des matériaux de référence.*

XP V03-020-2 [2], *Produits alimentaires — Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés — Partie 2 : Méthodes d'extraction des acides nucléiques.*

XP V03-020-3 [2], *Produits alimentaires — Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés — Partie 3 : Méthodes qualitatives basées sur les acides nucléiques.*

XP V03-020-4 [2], *Produits alimentaires — Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés — Partie 4 : Méthodes quantitatives basées sur les acides nucléiques.*

XP V 03-021 [2], *Produits alimentaires — Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés — Méthodes basées sur les protéines.*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent (certaines définitions, tirées de normes déjà publiées, sont notées entre crochets) :

3.1 Termes généraux

3.1.1
organisme génétiquement modifié (OGM)
organisme dont le patrimoine génétique a été modifié par procédé autre que la multiplication et/ou la recombinaison naturelle ([6], [7], EN 12682, EN 12683, EN 12687)

NOTE Conformément aux termes de la présente définition, une modification génétique intervient dès qu'il y a utilisation des techniques indiquées dans la Directive 90/220/CEE ou les annexes pertinentes de celle-ci [glossaire CEN/TC 233].

3.1.2
acide nucléique
macromolécule présente dans toutes les cellules vivantes, soit libre, soit combinée à des protéines, et pouvant être soit le support de l'information génétique, soit l'agent permettant l'expression de cette information

3.1.3
ADN
acide désoxyribonucléique, polymère de nucléotides, se présentant généralement sous la forme de deux chaînes (ou brins) enroulé(e)s en double hélice

3.1.4
ADN hétérologue
ADN composé de deux séquences d'origine distincte (généralement d'espèces différentes)

3.1.5
teneur en OGM
rapport de la masse d'OGM à la masse de l'espèce considérée dans un produit pur tel que des semences

En pratique : pourcentage issu du rapport de la quantité totale initiale d'ADN des OGM à la quantité totale initiale d'ADN de l'espèce considérée.

3.1.6
matrice
produit simple ou complexe issu de l'industrie agro-alimentaire et soumis à analyse

3.1.7
ingrédient
substance (additifs et arômes compris) utilisée dans la fabrication ou la préparation d'une denrée alimentaire et qui est encore présente dans le produit fini, éventuellement sous une forme modifiée

Lorsqu'un ingrédient d'une denrée alimentaire a été élaboré à partir de plusieurs ingrédients, ces derniers sont aussi considérés comme des ingrédients de cette denrée.

---

2) En préparation.

3.1.8
échantillon pour laboratoire
échantillon dans l'état de préparation où il est envoyé au laboratoire et destiné à être utilisé pour un contrôle ou pour des essais [FD V 01-000]

3.1.9
échantillon pour essai
échantillon préparé à partir de l'échantillon pour laboratoire et à partir duquel les prises d'essai seront prélevées.

L'échantillon pour essai doit être représentatif de l'échantillon pour laboratoire, et doit être rendu homogène [FD V 01-000].

3.1.10
limite de détection
plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée, mais non quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode [FD V 01-000]

Dans le présent document, la limite de détection est définie sur le produit pur, tel la semence, ou sur un ADN bicaténaire pur de référence dans la mesure où l'équivalence entre l'ADN bicaténaire et la masse de la semence a été établie au préalable. L'effet de matrice est supprimé puisque le domaine d'application des méthodes d'extraction est fourni avec la description de celles-ci.

AVERTISSEMENT : La limite de détection d'une méthode, définie sur semences ou ADN pur, peut varier selon la matrice analysée (voir 10, 7.6.2.1).

3.1.11
limite de quantification
plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode [FD V01-000]

La limite de quantification doit prendre en compte la sensibilité des résultats aux dilutions extrêmes d'ADN. Il sera difficile d'obtenir des résultats reproductibles au-dessous de quelques dizaines de cibles par tube de PCR, la PCR n'étant pas corrélée à un pourcentage mais à un nombre absolu de molécules. Un système permettant de vérifier la présence d'éventuels inhibiteurs (par apport d'ADN exogène connu dans la solution d'ADN extrait de l'échantillon, connu sous le nom de «témoin interne de PCR») est fortement recommandé.

La limite pratique de détection de la PCR est d'au moins 1 à 20 copies de cible d'ADN par tube ; cette limite représente aussi généralement la limite de quantification.

AVERTISSEMENT : La limite de quantification d'une méthode, définie sur semences ou ADN pur, peut varier selon la matrice analysée (voir 10, 7.6.3.1).

3.1.12
incertitude de mesure
paramètre, associé au résultat d'un mesurage, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement être attribuées à l'analyte

3.1.13
conditions de répétabilité
conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps [ISO 3534-1]

3.1.14
conditions de reproductibilité
conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques dans différents laboratoires, par différents opérateurs utilisant des équipements différents [ISO 3534-1]

3.1.15
plage dynamique (plage de quantification)
intervalle de concentration à l'intérieur duquel la procédure analytique présente un niveau acceptable de justesse et d'exactitude

Pour une méthode d'analyse par PCR de la teneur en OGM par espèce végétale, plage qui s'étend de 0,1 %, limite de quantification, à 100 % de produits dérivés dans les produits bruts purs tels que les semences ou ADN bicaténaire pur de référence dans la mesure où l'équivalence entre l'ADN bicaténaire et la masse des semences a été établie au préalable.

Bien que la totalité de la plage dynamique d'une méthode PCR s'étende normalement de la limite de quantification (0,1 %) à 100 % de la teneur en OGM, dans la pratique, elle peut être fractionnée, comme par exemple une plage de 0,1 % à 2 % d'OGM pour laquelle sont disponibles des outils de quantification différents adaptés du type étalons (matériaux) de référence certifiés par exemple. La restriction d'une méthode à une plage dynamique limitée doit être définie.

3.1.16
mesure de la variabilité
grandeur exprimant le degré de variation d'une observation individuelle par rapport aux autres

NOTE La mesure la plus importante de la variabilité repose sur l'écart des diverses observations par rapport à la valeur centrale, à savoir l'écart-type σ. Dans la pratique, on utilise la variance s. Le coefficient de variation v est une mesure composite résumée qui, dans un échantillon, rapporte la variabilité à la moyenne.

3.1.17
domaine d'application
terme qui, s'agissant d'une méthode, qualifie la matrice, l'analyte ou l'espèce mesuré(e), la plage de concentration et le type d'étude de surveillance auquel la méthode est applicable compte tenu de ses caractéristiques d'exactitude [*Commission du Codex Alimentarius — In-house validated methods and their role in methods of analysis for codex purposes. 22e session — Budapest — Hongrie, 23-27 novembre 1998*]

3.1.18
détection
reconnaissance de la présence d'un organisme ou d'une structure moléculaire dans un échantillon [Glossaire du CEN/TC 233, WI 55, 58, 59, 61/65]

3.2 Termes relatifs à l'extraction et à la purification de l'ADN

3.2.1
extraction de l'ADN
séparation de l'ADN des autres composants d'un échantillon

3.2.2
purification de l'ADN
méthode d'extraction donnant un ADN purifié

NOTE Dans le présent document, la pureté se réfère à l'absence d'effet observable et mesurable des inhibiteurs de PCR, au moins sur le(s) témoin(s) interne(s) de la PCR.

3.2.3
ADN de qualité PCR
ADN purifié amplifiable par une méthode PCR

NOTE Dans le présent document, la pureté se réfère à l'absence d'effet observable et mesurable d'inhibiteurs de PCR, au moins sur le(s) témoin(s) interne(s) de la PCR.

3.3 Termes relatifs à l'amplification de l'ADN et à la PCR

3.3.1
amplification de l'ADN
méthode biologique *in vitro*, telle que la PCR, permettant d'augmenter le nombre de copies d'un fragment d'ADN

3.3.2
amplicon
séquence d'ADN produite par une méthode d'amplification de l'ADN, par exemple la PCR

3.3.3
PCR (réaction de polymérisation en chaîne, réaction enzymatique de polymérisation *in vitro* de l'ADN)
méthode enzymatique permettant d'amplifier des segments d'ADN *in vitro*

Après la dénaturation d'un ADN bicaténaire en un ADN monocaténaire, deux amorces de synthèse (oligonucléotides) d'orientation opposées (anti-parallèles) par rapport à la séquence cible s'associent à chaque extrémité de la séquence cible à amplifier. Les régions bicaténaires formées à la suite de l'association spécifique des bases entre les amorces et la séquence cible bordent le fragment d'ADN à amplifier et servent de positions de départ pour la synthèse spécifique *in vitro* de l'ADN par l'ADN polymérase thermostable. La répétition des processus de dénaturation par la chaleur, d'association des amorces et de synthèse de l'ADN (cycles) conduit, dans les premiers cycles, à une amplification exponentielle du fragment d'ADN délimité par les amorces [1], [22]. La production et la spécificité du fragment d'ADN amplifié (produit PCR ou amplicon) sont déterminées par des procédures appropriées, de préférence par l'hybridation d'au moins une sonde interne au fragment amplifié.

Tous les tests PCR doivent être optimisés et doivent donc pouvoir détecter au moins entre 1 et 20 copies des cibles d'ADN purifié.

3.3.4
PCR ELISA
méthode de détection et de quantification des produits de l'amplification d'une PCR en phase liquide après leur rétention dans une plaque de microtitration

La présence des amplicons est révélée par exemple par une activité enzymatique ou par fluorescence.

3.3.5
PCR «hot start»
PCR basée sur l'ajout ou, de préférence, l'activation d'une ADN polymérase thermostable après une phase initiale de chauffage pour limiter le risque d'associations spécifiques des amorces avec des séquences non ciblées

3.3.6
PCR gigogne (nested PCR)
ensemble de 2 PCR consécutives dont la seconde amplifie une séquence interne du produit de la première PCR

NOTE Sauf si elle est pratiquée dans un tube sans ouverture, cette méthode n'est pas recommandée en raison de son haut potentiel de contamination par entraînement (contamination «carry-over»). Elle n'est également pas recommandée pour la PCR quantitative.

3.3.7
PCR multiplex
PCR effectuées simultanément avec plusieurs couples d'amorces

3.3.8
PCR compétitive
méthode PCR quantitative reposant sur le principe de la compétition entre deux séquences reconnues par la même paire d'amorces mais aux produits distincts (par leur taille par exemple) dans leur séquence interne

Il est recommandé que les quantités d'ADN ajoutées à l'ADN échantillon inhibent le plus faiblement possible l'amplification de la cible (1 à 50 copies d'ADN cible par exemple).

NOTE Il est recommandé que l'ADN utilisé pour la PCR compétitive quantitative soit inséré dans un plasmide circulaire en raison de la meilleure stabilité de ce type d'ADN. Ce plasmide peut être utilisé sous forme circulaire ou après restriction.

3.3.9
effet plateau
dernière phase de la PCR pendant laquelle le rendement d'amplification décroît

Dans le cas considéré, l'amplification n'est plus proportionnelle ou est moins proportionnelle à la quantité initiale d'ADN cible [32].

3.3.10
amorce
oligonucléotide de longueur et de séquence définies

L'amorce est complémentaire d'un segment de l'acide nucléique pertinent pour l'analyse. Une paire d'amorces délimite le segment de la séquence cible d'ADN à amplifier (amplicon).

3.3.11
détection par criblage
méthode utilisée pour détecter des parties communes à plusieurs organismes différents, tels les OGM

Dans le présent document, méthode permettant de détecter, par exemple par amplification par PCR, des fragments d'ADN communs à plusieurs OGM tels que les signaux de régulation comme les promoteurs et terminateurs, les gènes ou les fragments de jonction entre ces éléments.

NOTE Sauf spécification et vérification expérimentales préalables, tous les tests PCR reposant sur la séquence interne d'un fragment d'ADN inséré doivent être considérés comme des tests de criblage (tests PCR spécifiques d'une construction). En effet, ces inserts sont issus de vecteurs et peuvent donner lieu à plusieurs événements de transformation, pour une même ou plusieurs espèces différentes.

3.3.12
détection par identification
détermination de l'identité par comparaison à un étalon [Glossaire CEN/TC 233 WI 55, 58, 59, 61, 65, 64]

Dans le présent document, méthode permettant de détecter sans ambiguïté l'identité d'un OGM, par exemple par amplification PCR.

3.3.13
séquence cible (ADN cible)
séquence d'ADN qui est utilisée en tout ou partie pour la détection et/ou l'identification par PCR

3.3.14
fragment de bordure (fragment flanquant, région flanquante, séquence flanquante)
fragment de jonction (3.3.22) spécifique du site d'insertion du transgène. Séquence d'ADN recouvrant la jonction entre une séquence exogène insérée et le génome (nucléaire, mitochondrial ou chloroplastique) de l'organisme receveur

NOTE Dans l'état actuel de la technique, la mutagenèse dirigée n'est pas disponible en routine pour les génomes nucléaires et mitochondriaux des plantes. Dans ces cas, l'insertion au hasard de séquences résulte en une signature univoque d'un OGM constituée des fragments de bordure. La recombinaison homologue est toutefois courante pour la transformation des chloroplastes. Il faut donc vérifier avec un soin particulier par voie expérimentale la spécificité des fragments de bordure dans le cas de transformation des génomes chloroplastiques.

3.3.15
hybridation (des amorces ou des sondes)
association plus ou moins spécifique de deux séquences monocaténaires d'acide nucléique

Dans le présent document, l'hybridation est une association spécifique, dans les conditions rapportées, d'une amorce complémentaire et/ou d'une sonde interne à la séquence cible.

3.3.16
mélange maître («mastermix»)
mélange réactionnel d'une PCR donnée suffisant pour l'ensemble des réactions PCR à réaliser et qui sera réparti dans les différents tubes. Le mélange maître contient tous les composants nécessaires à une PCR, excepté la cible (ADN ou contrôle)

Les volumes correspondants doivent tenir compte des pertes de transfert.

3.3.17
ADN polymérase thermostable (ADN polymérase thermorésistante)
préparation enzymatique thermostable permettant au minimum la polymérisation d'ADN dans les conditions de réaction choisies

3.3.18
uracyle N glycosylase (uracyle D glycosylase)
enzyme dont la propriété est d'hydrolyser toute séquence d'acide nucléique porteuse de déoxyuridine (dUTP) au niveau de ce nucléotide avant de chauffer le milieu de la PCR pour couper les amplicons contaminants (contamination d'entraînement)

NOTE En raison des coûts et en l'absence de contamination par entraînement, l'utilisation systématique de cette enzyme n'est pas obligatoire pourvu que les PCR soient toujours effectuées avec du dUTP.

3.3.19
thermocycleur
appareil automatique reproduisant les conditions de chauffage et de refroidissement des cycles de duplication de l'ADN de l'amplification PCR

3.3.20
analyse en point final
méthode qualitative ou quantitative, telle la PCR-ELISA, permettant de détecter ou de quantifier les amplicons après la réaction de PCR

3.3.21
analyse en temps réel
méthode PCR quantitative permettant de quantifier les amplicons durant la réaction de PCR, par exemple par hybridation avec des sondes internes fluorescentes

3.3.22
fragment de jonction
séquence d'ADN recouvrant le raccordement de deux séquences de fonctions (par exemple : promoteur, séquence codante) ou d'origines différentes

3.3.23
étalonnage
ensemble des opérations établissant, dans des conditions spécifiées, la relation entre les valeurs de la grandeur indiquées par un appareil de mesure ou un système de mesure, ou les valeurs représentées par une mesure matérialisée ou par un matériau de référence, et les valeurs correspondantes de la grandeur réalisées par des étalons [FD V 01-000]

3.4 Termes relatifs aux témoins

3.4.1
témoin positif OGM
ADN cible de référence ou ADN extrait d'un échantillon représentatif du matériel initial génétiquement modifié étudié (séquence insérée et son fragment de bordure), par extension ses produits d'amplification

3.4.2
témoin négatif OGM
ADN cible de référence ou ADN extrait d'un échantillon représentatif d'une plante ou d'un matériel dérivé d'une plante ne contenant pas le matériel génétiquement modifié étudié, par extension les résultats d'amplification négatifs obtenus

3.4.3
témoin interne de PCR (témoin d'inhibition de PCR, ADN dopé, «spiked DNA», IPC «Internal PCR Control»)
séquence d'ADN ajoutée extemporanément dans la solution d'ADN extraite de l'échantillon pour vérifier la présence d'inhibiteurs par PCR, par rapport à un témoin

NOTE 1 Ce témoin permet de déterminer la présence d'inhibiteurs de PCR, ce qui est particulièrement nécessaire dans le cas d'une amplification négative et de PCR quantitative avec des étalons externes de référence.

NOTE 2 Les séquences d'ADN conservées, ubiquitaires ou spécifiques d'une espèce, d'un extrait d'ADN ne peuvent pas être considérées comme des témoins internes de PCR mais comme des séquences universelles ou de référence.

3.4.4
témoin positif de PCR
échantillon dont on sait qu'il possède la séquence recherchée, par extension les résultats négatifs d'amplification obtenus

3.4.5
témoin dopé de PCR (témoin interne de PCR, témoin d'inhibition de PCR)
voir 3.4.3

3.4.6
témoin négatif de PCR
échantillon dont on sait qu'il ne possède pas la séquence recherchée, par extension les résultats négatifs d'amplification obtenus

3.4.7
témoin de réactif PCR (blanc de PCR, témoin négatif de réactif)
test PCR effectué avec de l'eau ou un tampon exempts d'ADN ou, hormis spécifications contraires, d'inhibiteur de PCR en lieu et place de l'ADN d'un échantillon, par extension les résultats négatifs d'amplification obtenus

NOTE 1 Les protocoles d'évaluation du caractère «exempt d'ADN» d'un réactif PCR sont décrits dans le document XP V 03-020-3.

NOTE 2 Ce témoin est généralement placé dans le dernier tube de PCR ou dans des tubes intercalés dans le cas d'amplifications nombreuses (par exemple tous les 10 tubes).

3.4.8
témoin négatif de locaux
témoin permettant de s'assurer qu'il n'y a pas d'ADN cible contaminant présent en suspension dans l'air des différents locaux où sont analysés les échantillons

Il s'agit d'un tube contenant de l'eau pure exempte d'ADN cible et laissé ouvert pendant toutes les étapes de l'analyse d'un échantillon (témoin de réactif de PCR à tube ouvert), c'est-à-dire jusqu'à l'amplification dans le thermocycleur.

NOTE Les sources de contamination étant nombreuses (poussières de broyage, contamination par entraînement,...), un témoin négatif de ce genre est utilisé pour apprécier le besoin de nettoyage des locaux à l'eau de Javel par exemple (voir article 8). Lorsque ce type de témoin est positif, de nouveaux contrôles des locaux peuvent permettre d'évaluer la contamination local par local afin de limiter les travaux de décontamination à entreprendre.

3.4.9
témoin négatif d'extraction
témoin constitué d'un test PCR effectué sur un extrait d'ADN résultant de l'extraction d'acides nucléiques à partir d'eau

3.5 Termes relatifs aux sondes

3.5.1
sonde interne
oligonucléotide composé d'environ 15 à 30 bases dont la séquence est spécifique de la cible amplifiée par PCR

Les sondes internes sont choisies entre les amorces utilisées pour l'amplification.

NOTE Les sondes internes sont utilisées pour la détection spécifique et généralement quantitative, tant en point final qu'en temps réel, par hybridation de la séquence amplifiée de l'ADN cible.

3.5.2
sonde de révélation
sonde interne marquée utilisée pour détecter l'amplicon par hybridation

3.5.3
sonde de capture
sonde interne fixée sur un support solide qui permet la fixation de l'amplicon après son hybridation

NOTE 1 Divers types de fixation de la sonde de capture existent : adsorption passive, fixation active, par exemple par réaction entre une sonde de capture marquée par la biotine et un support solide revêtu de streptavidine.

NOTE 2 Le support solide peut être du papier, du plastique, du latex ou tout autre matériau approprié se présentant sous forme de bandelettes, de plaques de microtitration, de billes, etc.

3.5.4
sonde de révélation fluorescente
sonde marquée par fluorochrome(s) (balise moléculaire «molecular beacon», sonde d'hybridation à fluorescence «FRET^{TM} [3]», sonde d'hydrolyse, etc.) permettant la révélation par fluorescence des produits d'amplification

3.5.5
spécificité
aptitude à reconnaître spécifiquement le produit à détecter en le distinguant des substances analogues, des impuretés ou des produits de dégradation [CEN/TC 233 WI 67]

3.6 Termes relatifs aux matériaux de référence

3.6.1
matériau de référence
matériau ou substance dont une (ou plusieurs) valeur(s) de la (des) propriété(s) est (sont) suffisamment stable(s), homogène(s) et bien définie(s) pour permettre de l'utiliser pour l'étalonnage d'un appareil, l'évaluation d'une méthode de mesurage ou l'attribution de valeurs aux matériaux [FD V 01-000]

3.6.2
matériau de référence certifié
matériau de référence, accompagné d'un certificat délivré par un organisme reconnu indiquant une (ou plusieurs) valeur(s) de la (des) propriété(s) et son (leur) incertitude [FD V 03-115]

Les valeurs certifiées de ces matériaux ont été établies au cours d'une campagne de certification incluant des études interlaboratoires. Ces études doivent pouvoir être obtenues sur demande.

NOTE 1 Comme doivent l'indiquer les méthodes d'extraction dans leur domaine d'application, seules 2 formes d'étalons OGM et non OGM sont nécessaires, d'une part le produit brut initial comme les semences, et d'autre part la cible ADN pure présentée, par exemple, dans un plasmide circulaire stable. Dans ce dernier cas, l'équivalence entre la quantité d'ADN et la masse de produit pur brut doit avoir été déterminée au préalable.

NOTE 2 En absence d'étalon de référence, des étalons validés par le laboratoire peuvent être utilisés.

---

3) *FRET^{TM} est une appellation commerciale de produit. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement qu'AFNOR approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.*

3.6.3
matériau de référence externe
matériau de référence dont la (les) valeur(s) de consensus a (ont) été déterminée(s) à la suite d'études interlaboratoires

3.6.4
matériau de référence interne
matériau de référence dont la valeur de référence est attribuée par l'utilisateur :

— par comparaison aux valeurs certifiées (3.6.2) ou aux valeurs de consensus (3.6.3) des matériaux de référence ;

— par ajout d'une quantité connue de l'analyte à la matrice exempte de cet analyte

3.7 Termes relatifs à la quantification

3.7.1
quantification de l'amplicon
méthode chimique, physique ou biologique permettant de mesurer, durant ou après la PCR, la quantité d'ADN amplifié

3.7.2
quantification de l'ADN extrait (quantification de l'ADN purifié)
méthode chimique, physique ou biologique (par exemple enzymatique comme la PCR) permettant de quantifier la teneur en ADN extrait d'un échantillon (d'essai ou de référence) puis purifié

3.7.3
quantification de l'espèce végétale
méthode chimique, physique ou biologique (par exemple enzymatique comme la PCR) permettant de mesurer de façon spécifique la quantité d'une séquence d'ADN spécifique d'une plante, préalablement corrélée à la quantité (masse) de matière première pure telle que semences ou ADN cible équivalent

NOTE Seules des méthodes biologiques telles que la PCR fondée sur l'amplification d'un faible nombre de copies de gènes spécifiques des espèces, ou basées sur l'hybridation (puces à ADN, Southern, etc.) peuvent être utilisées pour les matrices résultant d'un mélange de plusieurs espèces.

3.7.4
quantification de l'OGM
méthode chimique, physique ou biologique (par exemple enzymatique comme la PCR) permettant de mesurer de façon spécifique la quantité d'une séquence spécifique d'un OGM, préalablement corrélée à la quantité (masse) de matière première pure telle que semences ou ADN cible équivalent

NOTE 1 Seules des méthodes biologiques telles que la PCR fondée sur un faible nombre de copies de gènes spécifiques des OGM peuvent être choisies pour les matrices résultant d'un mélange de plusieurs espèces.

NOTE 2 La quantité totale d'OGM est la somme par espèce végétale considérée des différentes quantités de chacun des OGM présents.

3.7.5
gène endogène (gène domestique, gène endogène de référence, gène de référence)
gène nucléaire, spécifique en tout ou partie d'une espèce végétale, présent en nombre de copies constant avec des séquences invariantes entre les cultivars (variétés cultivées) et les lignées, et dont une partie conservée est utilisée en PCR comme référence aux fins de quantification de l'espèce végétale

NOTE La séquence de référence utilisée peut être constituée de régions non géniques, pourvu que les critères d'invariance en nombre de copies et de conservation de séquence nucléique entre cultivars et lignées soient respectés.

4 Principe

La recherche qualitative et quantitative d'OGM par PCR s'effectue en quatre phases successives ou simultanées :

— le prélèvement, sauf indication contraire, d'un échantillon de laboratoire statistiquement représentatif de la matrice ;

— l'extraction d'ADN de la prise d'essai. L'ADN extrait est purifié une ou plusieurs fois, simultanément à l'extraction ou à la suite de celle-ci ;

— l'amplification d'ADN par PCR. Cette opération permet d'obtenir des amplicons des séquences cibles spécifiques des OGM et de l'organisme (espèce végétale) ayant fait l'objet de transgenèse ou de leurs produits dérivés ;

— la détermination de la présence / absence (PCR qualitative) ou de la quantité (PCR quantitative) d'espèce(s) végétale(s) et d'OGM soit lors des amplifications (PCR quantitative en temps réel), soit après celles-ci (PCR quantitative en point final).

5 Réactifs

L'eau utilisée doit être de qualité type I, exempte d'ADN végétal et de nucléases (EN ISO 3696).

Tous les produits chimiques doivent également, sauf spécification contraire, être exempts de manière observable ou mesurable d'ADN, de nucléases et d'inhibiteurs de PCR. Hormis spécification contraire, les produits utilisés ne doivent pas être source potentielle de contamination ou de dégradation d'ADN.

L'ensemble des réactifs doit être conservé et utilisé selon les recommandations des fournisseurs.

L'ensemble des réactifs généraux et particuliers nécessaires à l'extraction, à la purification, à l'amplification de l'ADN, à la quantification des amplicons et des ADN extractibles, est présenté dans les normes XP V 03-020-2, XP V 03-020-3 et XP V 03-020-4.

6 Appareillages et équipements

L'ensemble des appareillages et équipements nécessaires aux différentes phases de détection des OGM (préparation des échantillons de laboratoire et d'essai, extraction et quantification des acides nucléiques, amplification, quantification des amplicons, etc.) est présenté dans les parties XP V 03-020-2, XP V 03-020-3 et XP V 03-020-4 du présent document.

Autant que possible, l'ensemble des appareillages et des matériels doit être conservé exempt d'ADN végétal et de nucléases.

Il est recommandé que tous les appareils et en particulier les dispositifs ou parties d'équipements en contact avec les échantillons soient faciles à nettoyer et à décontaminer (voir article 8).

La maintenance des appareils, en particulier les thermocycleurs, doit être assurée selon les recommandations des fabricants. Autant que possible les systèmes de calibration adéquats doivent être disponibles et utilisés.

Les appareils doivent être d'une qualité telle qu'aucune différence statistiquement significative de résultats d'amplification ne puisse être mise en évidence entre les différentes positions des tubes de PCR.

La quantification en temps réel de la production d'amplicons lors des amplifications PCR est effectuée dans des thermocycleurs qui doivent répondre au minimum aux critères généraux des thermocycleurs utilisés pour la PCR et qui doivent être équipés de dispositifs permettant la mesure en continue de la production d'amplicons, généralement par mesurage de fluorescence.

7 Mode opératoire

7.1 Généralités

Le mode opératoire doit comprendre les contrôles pouvant détecter ou estimer :

— les faux positifs ;

— les faux négatifs ;

— la présence de substances pouvant interférer avec la méthode d'analyse ;

— la dégradation de l'analyte dans l'échantillon ;

— une réduction de la sensibilité de la méthode ;

— la récupération réduite de l'analyte durant la phase de préparation de l'échantillon.

Des précisions et des protocoles détaillés sont présentés dans les parties XP V 03-020-2, XP V 03-020-3 et XP V 03-020-4 du présent document.

7.2 Échantillonnage

L'échantillonnage (ensemble des opérations appliquées à un lot important de produits permettant de confectionner un échantillon réduit représentatif) ne fait pas partie de ce document. Il conviendra de se reporter aux normes d'échantillonnage existantes (voir article 2) et éventuellement à des procédures spécifiques aux OGM reconnues internationalement (ISTA [4)], etc.). En l'absence de telles normes, pour un produit donné ou pour les OGM, il conviendra que les parties concernées se mettent d'accord sur le plan d'échantillonnage à appliquer.

L'échantillonnage est une opération difficile à conduire, en particulier dans le cas des produits en grains, et exige le plus grand soin. Sans un échantillonnage correct, les résultats des analyses effectuées sur l'échantillon en laboratoire risquent d'être faussés et de conduire à d'importants litiges commerciaux et réglementaires.

7.3 Préparation de l'échantillon pour laboratoire et pour essai

7.3.1 Taille de l'échantillon pour laboratoire

La taille (en masse) des échantillons pour laboratoire dépend de la nature du produit, et en particulier de la dimension des particules et de leur homogénéité. Le tableau 1 indique les tailles minimales d'échantillons selon les matrices à analyser :

Tableau 1 — Taille minimale de l'échantillon pour laboratoire en fonction des matrices

Produits	Taille minimale de l'échantillon pour laboratoire
Produits bruts tels que grains, autres que les semences (maïs, soja, colza, riz, etc.)	10 000 grains ou leur équivalent massique
Produits de 1re transformation (semoule, farine, gritz, tourteaux, etc.)	1 kg
Produits liquides	500 ml
Produits pâteux et visqueux	500 g
Produits finis (conditionnés)	2 emballages individuels ou 100 g
Pour les semences : se reporter aux règles de l'ISTA, ou autres règles internationalement reconnues.	

NOTE Dans le cas de semences coûteuses, l'analyse peut porter sur de petits échantillons de laboratoire. Il est toutefois nécessaire dans ce cas de mentionner explicitement dans le rapport d'essai que ces échantillons ne permettent pas d'assurer le seuil de détection recommandé par le présent document.

4) *ISTA : International Seed Testing Association.*

Il est déconseillé de faire descendre la température au-dessous de – 20 °C, dans le cas de conservation par congélation, afin d'éviter les séparations de phase des échantillons liquides. Après décongélation, les échantillons et réactifs liquides doivent être homogénéisés par agitation manuelle ou à l'aide de tout appareil approprié (vortex, etc.).

Il est recommandé de conserver, pendant trois mois au moins, une partie aliquote de l'échantillon pour une éventuelle analyse ultérieure, dans les mêmes conditions que l'échantillon lui-même. La partie conservée doit être de taille suffisante pour procéder à une nouvelle analyse complète.

7.3.2 Préparation de l'échantillon pour essai

7.3.2.1 *Généralités*

Toutes les opérations de préparation des échantillons pour essai (broyage, homogénéisation, division) doivent être effectuées suivant les modes opératoires décrits dans la norme XP V 03-020-2 en veillant à éviter toute contamination de l'échantillon ou modification de sa composition (voir article 8).

Les semences et les produits finis solides ou pâteux, à forte teneur en lipides, ne se prêtent généralement pas facilement à un broyage en une seule étape à la taille de particule souhaitée. Plusieurs procédures peuvent donc être ajoutées telles que la délipidation à l'hexane après broyage intermédiaire, la congélation ou la lyophilisation avant broyage.

La réussite d'une PCR repose majoritairement sur la qualité de l'ADN purifié. Toutes les méthodes normalisées d'extraction (XP V 03-020-2) doivent être fournies avec leur domaine d'application, c'est-à-dire leur domaine expérimental et les matrices auxquelles l'extraction a été appliquée avec plus ou moins de succès.

7.3.2.2 ***Cas des produits solides*** *(grains, etc.)*

Broyer progressivement la totalité de l'échantillon pour laboratoire au moyen d'un appareil du type indiqué en 6.2, permettant d'obtenir un échantillon homogénéisé dont la taille moyenne des particules est inférieure, de préférence, à 2 mm.

Homogénéiser la mouture obtenue, effectuer ensuite des réductions successives jusqu'à obtention d'une masse réduite de 100 g de mouture.

Si nécessaire, procéder à un micro-broyage des 100 g de produit pour arriver à une finesse de mouture inférieure, de préférence, à 500 µm.

Prélever les deux prises d'essai (7.4).

NOTE Dans certains cas, il peut être préférable de réaliser un broyage humide.

7.3.2.3 ***Cas des produits en poudre***

Homogénéiser la totalité de l'échantillon pour laboratoire, effectuer ensuite, si nécessaire, des réductions successives jusqu'à obtention d'une masse réduite de 100 g de mouture.

Procéder si nécessaire à un micro-broyage du produit pour arriver à une finesse de mouture inférieure de préférence, à 500 µm.

Prélever les deux prises d'essai (7.4).

7.3.2.4 ***Cas des produits pâteux et visqueux***

Afin de faciliter le broyage, il est possible d'appliquer un des traitements suivants à certaines matrices :

— chauffage à une température maximale de 40 °C ;

— dissolution dans un liquide approprié comme l'eau par exemple ;

— congélation à une température inférieure ou égale à 20 °C.

Homogénéiser la totalité de l'échantillon. Prélever les deux prises d'essai (7.4) en tenant compte d'éventuelles dilutions ou concentrations.

7.3.2.5 *Cas des produits liquides*

Agiter le récipient contenant l'échantillon de manière à homogénéiser au mieux le produit. Dans le cas des produits non homogènes comme les huiles brutes, vérifier que les sédiments se sont complètement détachés des parois du récipient.

Prélever les deux prises d'essai (7.4).

7.3.2.6 *Cas des produits finis*

Selon le type de matrice à analyser, se reporter au 7.3.2.2, 7.3.2.3, 7.3.2.4 ou 7.3.2.5.

7.4 Prises d'essai

Effectuer deux prises d'essai à partir de l'échantillon pour essai (7.3.2).

La taille de prise d'essai utilisée pour l'extraction est donnée dans le tableau 2.

Tableau 2 — Taille de la prise d'essai en fonction de la matrice

Produits	Prise d'essai
Produits en grains [a] (maïs, soja,...)	250 mg ou 1 g
Autres produits	1 g
a) Par grains on entend les graines, semences et fèves de végétaux.	

Effectuer une analyse par prise d'essai (7.5 et 7.6).

7.5 Extraction et purification des acides nucléiques

7.5.1 Généralités

L'objectif des méthodes d'extraction des acides nucléiques est d'obtenir, à partir des matrices, des acides nucléiques amplifiables, en solution, pour pouvoir procéder au criblage ou à l'identification des OGM par PCR.

La solution d'ADN obtenue doit présenter une pureté convenable pour l'amplification et la quantification ultérieure des produits PCR, et doit donc, autant que possible, être exempte d'inhibiteurs de la PCR. Un contrôle de la qualité de l'extraction et de la purification de l'ADN doit impérativement être réalisé en cas d'amplifications PCR négatives sur un échantillon. Il est recommandé d'effectuer ce contrôle sous la forme de l'adjonction d'un témoin interne de PCR.

La quantité d'ADN extrait et purifié et le volume de reprise doivent être suffisants pour réaliser le nombre d'analyses PCR nécessaires (analyse de l'ADN bicaténaire,...) et le nombre requis de réactions PCR par échantillon d'essai (détections qualitatives ou quantification des teneurs initiales en OGM et espèces végétales).

La qualité et le rendement des ADN extraits et purifiés par une méthode et sur une matrice données doivent donner des résultats à la fois répétables et reproductibles au niveau de l'amplification par la PCR. En particulier, la méthode utilisée doit permettre de récupérer des fragments d'ADN de tailles statistiquement supérieures à celles des amplicons.

L'ADN purifié doit être remis en suspension dans de l'eau de type I réactif ou de préférence dans un tampon avec un chélateur du magnésium, cofacteur de la majorité des nucléases, exempts d'ADN, de nucléases et d'inhibiteurs de PCR, hormis spécifications contraires [2].

Il est recommandé de prévoir un contrôle hebdomadaire de la contamination des locaux alors qu'un témoin négatif d'extraction doit être utilisé au minimum après analyse de toutes les prises d'essai et de préférence intercalé toutes les 10 à 20 prises d'essai selon l'expérience du manipulateur.

L'utilisation de techniques brevetées, comme par exemple une purification de l'ADN sur de la silice avec lyse simultanée, doit être clairement mentionnée dans le descriptif de la méthode. Il en est de même pour les techniques faisant appel à des kits commerciaux.

Dans certains cas, la méthode d'extraction peut faire défaut pour certaines matrices. Il est donc important d'essayer d'utiliser d'abord des méthodes d'extraction qui se sont avérées efficaces sur des matrices similaires (XP V 03-020-2).

NOTE Il est recommandé d'utiliser avec toutes les précautions nécessaires pour la santé du personnel et la protection de l'environnement, les méthodes utilisant des réactifs toxiques tels que le phénol, le chloroforme ou d'autres solvants [2].

7.5.2 Principe de l'extraction et de la purification de l'ADN

Il convient de réaliser une extraction par prise d'essai.

Le principe de base d'une extraction d'acides nucléiques consiste à libérer l'ADN présent, par exemple, pour les matières premières, en lysant les cellules végétales présentes, puis (ou en parallèle) à purifier l'ADN en éliminant tous les autres composants, en particulier les inhibiteurs de PCR.

La qualité et la pureté des acides nucléiques sont des facteurs importants de réussite des analyses PCR. Pour purifier l'ADN des contaminants inhibiteurs de la PCR, des méthodes d'extraction adaptées doivent être utilisées. Il est possible de recourir à des méthodes physiques et chimiques ou biologiques telle qu'une digestion enzymatique.

Il convient d'utiliser, notamment pour les échantillons secs, un volume de tampon d'extraction (XP V 03-020-2) suffisant pour obtenir une phase aqueuse, par exemple après centrifugation.

NOTE 1 D'une manière générale, il est conseillé d'éliminer tous les polysaccharides végétaux (pectines, cellulose, hémicelluloses, amidon, etc.) par des techniques du type précipitation fractionnée ou par l'action d'hydrolases exemptes d'ADN et de nucléoses (pectinases, cellulases, hémicellulases, α-amylase, β-amylase, etc.). Ces opérations peuvent être suivies ou non d'une purification, par exemple par adsorption sur matrice solide.

NOTE 2 Il est recommandé d'éliminer l'ARN et les protéines par un traitement approprié, tel que, par exemple, l'utilisation d'enzymes comme la RNase A et la Protéinase K pendant ou après l'extraction.

NOTE 3 Il est recommandé d'éliminer les fractions lipidiques par traitement préalable dans des solutions enzymatiques, des solvants ou tout autre réactif approprié.

Il convient généralement de purifier la solution d'ADN obtenue pour éliminer les inhibiteurs potentiels de l'amplification par PCR par exemple. La purification peut se faire, par exemple, par précipitation fractionnée, avec des solvants tels que l'éthanol, l'isopropanol ou le chloroforme, et/ou par adsorption sur matrices solides (échangeuses d'anions, gel de silice ou de verre, terre de diatomées, membranes, etc.). Il est possible d'utiliser plusieurs méthodes successives ou concomitantes de purification de l'ADN.

7.5.3 Contrôle de l'ADN extrait

7.5.3.1 *Contrôle de la quantité d'ADN extrait*

Bien que le dosage précis de la solution d'ADN obtenue soit primordial pour une quantification ultérieure reproductible des produits PCR, celui-ci n'est pas toujours possible en raison des très faibles teneurs en ADN de certains échantillons (cas, par exemple, de certains produits transformés).

Dans le cas où un co-précipitant, commercial ou non, de l'ADN est utilisé pour améliorer le rendement de précipitation, celui-ci ne doit pas contenir, hormis spécifications contraires, d'activité nucléasique, de séquence homologue aux séquences cibles des tests PCR ou d'inhibiteurs de la PCR.

La quantification de l'ADN peut être réalisée selon de nombreuses techniques (XP V 03-020-4). La fidélité du dosage dépend de la pureté de la solution d'ADN extrait et de la technique de dosage utilisée.

Pour certaines techniques, telles l'électrophorèse sur gel avec analyse d'images, l'électrophorèse capillaire ou la chromatographie liquide haute performance (CLHP), la quantification de l'ADN bicaténaire doit être faite avec des ADN de référence de taille moléculaire similaire.

L'ensemble des méthodes doivent être utilisées dans leur plage dynamique et la quantification réalisée par interpolation.

7.5.3.1.1 *Système d'électrophorèse et d'analyse d'images*

Cette méthode est généralement semi-quantitative et peut être également utilisée pour vérifier l'intégrité de l'ADN extrait.

Une partie aliquote de l'ADN extrait est soumise à l'électrophorèse dans un gel, généralement d'agarose de qualité et de concentration adéquates, en parallèle avec une gamme de référence constituée de concentrations connues d'ADN de poids moléculaire similaire (ADN de haut poids moléculaire dans le cas de produits peu ou pas transformés ou de bas poids moléculaire dans le cas de produits analysés très transformés).

Après coloration par un agent intercalant ou liant fluorescent (bromure d'éthidium, SYBR® Green I, Vista Green® [5], iodure de propidium par exemple...) ou à l'aide d'une méthode au nitrate d'argent, la quantité d'ADN extrait et purifié est estimée par comparaison (interpolation) avec la gamme d'ADN de référence.

NOTE 1 La quantification se fait de préférence à l'aide d'une caméra CCD de haute résolution et d'un logiciel d'analyse d'image approprié à la quantification de bandes discrètes. Un scanner de fluorescence et un logiciel d'analyse approprié à la quantification peuvent également être utilisés.

NOTE 2 Il est conseillé que les quantités d'ADN déposées et les conditions d'enregistrement ne saturent pas les capacités des systèmes de mesure (valeur généralement inférieure à 256 niveaux de gris dans le cas d'une caméra CCD).

7.5.3.1.2 *Système d'électrophorèse capillaire et d'analyse d'électrophorégrammes*

La méthode peut également être utilisée pour vérifier l'intégrité de l'ADN extrait [13].

Une partie aliquote de l'ADN extrait est soumise à l'électrophorèse dans un appareil d'électrophorèse capillaire adéquat. Une gamme de référence constituée de concentrations connues d'ADN de poids moléculaire similaire est soumise à électrophorèse dans les mêmes conditions (ADN de haut poids moléculaire dans le cas de produits peu ou pas transformés ou de bas poids moléculaire dans le cas de produits analysés très transformés (7.5.3.1.1)).

La détection UV à 260 nm ou à 254 nm, ou de préférence avec un détecteur à barrettes de diodes dans la gamme 200 nm à 300 nm, permet la quantification des nucléotides, en particulier de l'ADN bicaténaire extrait.

Le blanc doit être fait avec la solution dans laquelle l'ADN a été dilué pour effectuer l'électrophorèse capillaire.

NOTE Il est conseillé que les quantités d'ADN déposées et les conditions de mesure ne saturent pas les capacités des systèmes de mesure. Il est recommandé de pratiquer les mesures dans les conditions de vérification de la loi de Beer-Lambert. Il est possible à cet effet de diluer l'ADN.

7.5.3.1.3 *Fluorimétrie*

L'emploi d'un agent intercalant ou liant fluorescent approprié (PicoGreen®, SYBR® Green [5] par exemple) permet la quantification de l'ADN et de l'ARN selon le protocole décrit dans la notice d'emploi de l'appareil et/ou du réactif. Selon le type d'agent fluorescent employé, ce type de dosage peut être plus particulièrement spécifique de l'ADN bicaténaire.

La quantité d'ADN extrait doit être déterminée par interpolation à l'aide d'une gamme de référence d'ADN, de concentration connue et de poids moléculaire comparable à celle de l'ADN extrait (7.5.3.1.1, 7.5.3.1.2).

7.5.3.1.4 *Spectrophotométrie UV*

Cette méthode convient pour les concentrations en ADN supérieures à 5 µg/ml. Elle peut toutefois surestimer fortement la teneur en ADN selon la qualité de la purification.

Une mesure à 260 nm ou à 254 nm permet de déterminer la quantité de nucléotides présents dans la solution analysée. Elle ne constitue toutefois pas une indication de la qualité de l'ADN ou de l'absence d'ARN ou de nucléotides. La méthode n'est donc acceptable que si les critères de qualité décrits en 7.5.3.2 sont respectés. Il convient de choisir le coefficient d'extinction en fonction du type d'acide nucléique étudié et/ou de son intégrité (hyperchromicité de l'ADN dégradé) et de sa pureté. Pour l'ADN bicaténaire pur de haut poids moléculaire, il faut utiliser l'équivalence 1 $DO_{260\ nm}$ = 50 µg/ml.

---

5) SYBR®, Green I, Vista Green®, PicoGreen®, sont des appellations commerciales de produits. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement qu'AFNOR approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

Le blanc doit être effectué sur la solution (eau ou tampon) utilisée pour la mise en solution de l'ADN extrait.

NOTE 1 Il est recommandé que la propreté des cuves en quartz soit telle qu'aucun ADN ni nucléase, ni aucune substance pouvant interférer avec le dosage ne puisse rester adsorbée et interférer avec la détermination de la quantité d'ADN. Des lavages à l'eau de Javel à 1,7 % de chlore actif, à l'hydroxyde de sodium à 0,5 N, à l'acide chlorhydrique à 1 % ou à tout autre produit à activité similaire effectués régulièrement sont recommandés (voir article 8).

NOTE 2 Il est conseillé que les quantités d'ADN déposées et les conditions de mesure ne saturent pas les capacités des systèmes de mesure. Il est recommandé de pratiquer les mesures dans les conditions de vérification de la loi de Beer-Lambert. Il est possible à cet effet de diluer l'ADN.

7.5.3.1.5 *Chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP) avec analyse de chromatogrammes*

La méthode peut également être utilisée pour vérifier l'intégrité de l'ADN extrait.

Certaines colonnes de chromatographie en phase liquide (ToosHaas [6)] par exemple) permettent de séparer des hauts poids moléculaires compatibles avec les tailles des fragments d'ADN [29]. L'avantage de cette méthode est de permettre une automatisation partielle des analyses d'ADN.

Une partie aliquote de l'ADN extrait est soumise à la migration dans un appareil adéquat de chromatographie liquide à haute performance équipée d'une colonne appropriée. Une gamme de référence constituée de concentrations connues d'ADN de poids moléculaire similaire est soumise à chromatographie dans les mêmes conditions (ADN de haut poids moléculaire dans le cas de produits peu ou pas transformés ou de bas poids moléculaire dans le cas de produits analysés très transformés, voir 7.5.3.1.1).

La détection UV à 260 nm ou 254 nm, ou de préférence avec un détecteur à barrettes de diodes dans la gamme 200 nm à 300 nm, permet la quantification des nucléotides, en particulier de l'ADN bicaténaire extrait et purifié. Il convient de choisir le coefficient d'extinction en fonction du type d'acide nucléique étudié et/ou de son intégrité et de sa pureté (voir 7.5.3.1.4).

NOTE Il est conseillé que les quantités d'ADN déposées et les conditions de mesure ne saturent pas les capacités des systèmes de mesure. Il est recommandé de pratiquer les mesures dans les conditions de vérification de la loi de Beer-Lambert. Il est possible à cet effet de diluer l'ADN.

7.5.3.1.6 *PCR*

Cette méthode peut également être utilisée pour vérifier l'intégrité et la qualité de l'ADN extrait (voir 7.5.3.2).

Le principe de cette méthode de dosage de l'ADN extrait et purifié consiste à effectuer une PCR ayant pour cible une séquence universelle (oligo- ou multicopie) ou spécifique d'une espèce végétale et de rapporter, selon la nature de la séquence amplifiée, la quantité d'amplicons obtenue à la quantité initiale d'ADN total ou d'ADN de plante. Cette quantification doit avoir été initialement corrélée par l'une des techniques physiques précédentes, par exemple à l'aide de semences ou de plantes issues de semences, [4], [17], [18], [20], [21], [22], [23], [32], [33], [37].

NOTE Le type de gène de référence (universel ou propre à une espèce végétale) dépend de la composition des matrices analysées. Ainsi un gène de référence universel peut-il être utilisé avec des produits transformés résultant d'un mélange de composés issus de différents organismes alors qu'un gène de plante (gène endogène) peut suffire pour les matières premières pures.

La quantification de l'ADN extrait peut être effectuée par une méthode PCR en point final ou en temps réel. Les autres caractéristiques des tests PCR telles que la taille des amplicons et les limites de détection et de quantification des méthodes de quantification de l'ADN extrait basées sur la PCR doivent être identiques à celles des tests PCR utilisés en détection et identification des OGM (voir 7.6.2 et 7.6.3).

7.5.3.2 ***Contrôle de la qualité de l'ADN extrait***

7.5.3.2.1 *Généralités*

La détermination de la qualité de l'ADN extrait est un facteur déterminant pour la réussite de l'amplification par PCR ainsi que pour la précision de la quantification des produits PCR et donc des teneurs initiales en ADN [34].

---

6) ToosHaas est une appellation commerciale de produit. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement qu'AFNOR approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

La bonne qualité d'une solution d'ADN se caractérise par :

— son intégrité : elle doit présenter une taille de fragments statistiquement supérieure à la taille des fragments amplifiés ;

— son aptitude à être amplifiée : l'absence observable ou mesurable d'ARN, de nucléotides ou oligonucléotides, de protéines, et autres composés inhibiteurs de PCR est également signe de qualité.

NOTE 1 En cas de PCR négative (en particulier sur séquences universelles, de plantes et d'OGM) un témoin interne de PCR (témoin interne d'inhibition) permet d'apprécier l'effet inhibiteur de la solution d'ADN extrait.

NOTE 2 Si l'amplification d'un témoin interne de PCR est positive, l'impossibilité d'amplifier les fragments d'ADN de l'échantillon peut traduire : une teneur insuffisante en ADN de la prise d'essai (par exemple ADNr 16S employé pour quantifier l'ADN eucaryotique), une teneur en ADN de l'échantillon inférieure à la limite de détection, la dégradation de l'ADN ou le résultat d'une mauvaise extraction.

NOTE 3 Après contrôles et répétitions appropriés, il est préférable de s'abstenir de parler dans les résultats d'une absence d'ADN valable uniquement pour l'échantillonnage et les tailles d'échantillon et de prise d'essai considérés (voir article 9).

La qualité de l'ADN, extrait ou son intégrité uniquement, peut être appréciée selon plusieurs méthodes.

7.5.3.2.2 *Système d'électrophorèse et d'analyses d'images*

Un contrôle visuel sur gel ou, de préférence, avec une caméra sensible CCD, permet d'apprécier la propreté et la taille de l'ADN extrait ainsi que son éventuelle dégradation (nucléotides et oligonucléotides) et la présence d'ARN et notamment d'ARNr (ARN ribosomique).

La qualité de la lyse et de l'extraction s'apprécie également après migration électrophorétique par l'absence de fluorescence résiduelle dans les puits des gels d'électrophorèse. Cette méthode est donc davantage un indicateur de l'intégrité de l'ADN que de sa qualité intrinsèque au sens de l'absence observable ou mesurable d'inhibiteurs de PCR.

7.5.3.2.3 *Électrophorèse capillaire et chromatographie en phase liquide à haute performance couplées à un système d'analyse d'électrophorégrammes ou de chromatogrammes*

Il est recommandé pour l'analyse par chromatographie en phase liquide ou pour étudier les électrophorégrammes d'utiliser un détecteur UV de 200 nm à 300 nm ou un détecteur à barrettes de diodes.

La qualité de l'ADN extrait peut être appréciée par la taille des fragments d'ADN extrait, la présence ou l'absence de pics correspondant aux nucléotides et oligonucléotides d'une taille inférieure à la limite inférieure recommandée pour les amplifications PCR, les pics d'ARN et une valeur du rapport $DO_{260\ nm}$ / DO_{280nm} comprise entre 1,8 et 2.

Cette méthode est donc davantage un indicateur de l'intégrité de l'ADN que de sa qualité intrinsèque au sens de l'absence observable ou mesurable d'inhibiteurs de PCR.

7.5.3.2.4 *Spectrophotométrie UV*

Le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} permet d'apprécier la pureté de l'extrait d'ADN par rapport à des protéines contaminantes. Il est nécessaire que le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} soit compris entre 1,8 et 2.

Le spectre 200 nm à 300 nm permet d'apprécier la pureté de l'ADN extrait, tant par le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} que par l'aspect du spectre entre 200 nm et 240 nm qui permet d'évaluer, en particulier, les contaminations dues par exemple à des composés phénoliques, polysaccharidiques, etc.

Cette méthode est un mauvais indicateur de l'intégrité de l'ADN et de sa qualité intrinsèque au sens de l'absence observable ou mesurable d'inhibiteurs de PCR.

NOTE La dégradation de l'ADN et de l'ARN engendre une hyperchromicité qui génère une surestimation de l'ADN mesuré à 260 nm ou 254 nm. Dans ce cas, le rapport 260/280 nm est généralement supérieur à 2.

7.5.3.2.5 *PCR*

L'amplification par PCR de fragments de grande taille de séquences universelles (ADNr 18S, ADNr 28S, ADNr 16S, systèmes oligocopies conservés entre espèces, etc.) ou de fragments végétaux spécifiques dans le cas de produits purs, permet d'apprécier la qualité de l'ADN extrait (absence, observable ou mesurable, ou présence en quantité modérée d'inhibiteurs, taille minimale de fragments d'ADN extrait, etc.).

La détection de l'ADN amplifié peut être effectuée par tout système approprié, comme ceux décrits dans le présent document (7.6). Les limites de détection et de quantification des tests PCR utilisés doivent être identiques à celles des tests PCR utilisés en détection (criblage) et/ou identification des OGM alors qu'il est recommandé que la taille des amplicons soit égale ou supérieure à celle des essais de détection (voir 7.6).

En raison des limites de détection et de quantification exigées pour chaque méthode PCR, il est recommandé d'utiliser, par PCR, de préférence, et si la teneur en ADN de la prise d'essai le permet, 20 000 copies de la cible d'ADN ou de l'équivalent génomique [3].

7.5.3.3 *Stabilité de l'ADN extrait*

L'ADN extrait en solution doit être stable à 4 °C au moins durant le temps nécessaire à la réalisation de l'ensemble des PCR.

La stabilité à long terme d'un ADN extrait doit être préférentiellement contrôlée par l'amplification PCR d'une séquence universelle ou spécifique de plante, au minimum de façon qualitative et de préférence de façon quantitative. Les variations quantitatives entre amplifications successives de contrôle doivent rester dans les limites connues de la méthode de quantification.

Il est conseillé de pouvoir conserver l'ADN extrait d'un échantillon pendant 3 mois sous forme congelée ou lyophilisée.

Il est déconseillé de procéder à des congélations et décongélations répétées des solutions d'ADN.

7.6 Amplification de l'ADN par PCR

7.6.1 Généralités

La détection des OGM peut faire appel à plusieurs types de PCR :

— PCR sur séquences universelles avec :

- soit des cibles avec un grand nombre de copies : ces PCR ont majoritairement pour objet de contrôler l'absence d'ADN détectable dans un échantillon ;
- soit des cibles à faible nombre de copies : ces PCR sont utilisées majoritairement pour une quantification des OGM par rapport à l'ADN extrait total ; ces séquences universelles peuvent être présentes chez tous les eucaryotes et procaryotes ou uniquement chez l'un ou l'autre de ces types d'organismes ou encore seulement dans les plantes.

  Dans le but de quantifier la teneur en OGM par rapport à l'ADN total dans les produits purs ou pour corréler les OGM aux ingrédients d'un mélange, une corrélation doit être préalablement établie entre la quantité d'amplicons obtenue et la teneur initiale en ADN des semences, mesurée par des méthodes physiques (voir 7.5.3.1.1 à 7.5.3.1.5).

— PCR d'identification qualitative ou quantitative d'espèces végétales (ingrédients) : ces PCR sont conçues pour identifier et généralement quantifier l'espèce végétale ou les produits dérivés tels que les ingrédients ou additifs [8], [9], [10] et [11]. De préférence, deux gènes endogènes doivent être définis par espèce végétale (de sorte qu'une alternative soit possible si l'un des gènes était éliminé par les procédés de sélection ou par les procédés biotechnologiques traditionnels).

— PCR de criblage et d'identification qualitative et quantitative des OGM qui sont détaillées en 7.6.2 et 7.6.3.

La spécificité des amorces, et éventuellement des sondes, utilisées [5] doit être vérifiée :

— de manière théorique par recherche d'homologie, à l'aide de logiciels appropriés, dans les principales bases de données telles que GenBank et EMBL

et

— de manière expérimentale, sur des étalons OGM et non OGM, plusieurs espèces végétales, plusieurs cultivars de la même espèce ainsi que, autant que raisonnablement possible, sur tout organisme identifié par l'étude de spécificité théorique et plus généralement tout organisme dont est issue la séquence concernée.

Pour les méthodes normalisées, un récapitulatif de l'étude de spécificité théorique doit être fourni avec le descriptif du test PCR (avec le numéro de version de la base de données) ainsi qu'une liste évolutive des organismes naturels et génétiquement modifiés auxquels l'analyse PCR a été appliquée avec ou sans succès.

Plus globalement, et comme pour les méthodes d'extraction des acides nucléiques, il est demandé d'indiquer le domaine d'application de chaque test PCR (listes positives et négatives d'organismes naturels et génétiquement modifiés examinés pour lesquels des amplifications PCR ont été réalisées avec ou sans succès).

De façon à tenir compte des différents procédés agro-alimentaires, des différentes techniques d'amplification disponibles (dont la LCR ou Ligase Chain Reaction) et de la spécificité statistique des fragments d'ADN dans un génome, la taille des fragments d'ADN amplifiables doit être comprise entre 30 paires de bases et 250 paires de bases.

NOTE 1 Les traitements agro-alimentaires industriels réduisent généralement la taille de l'ADN extractible à environ 400 bp. La taille de la séquence ADN à amplifier doit donc être inférieure à cette taille.

NOTE 2 Bien que le présent document concerne principalement la technique PCR, d'autres techniques d'amplification intéressantes peuvent être utilisées telles que la technique LCR™ [7]. La limite basse de 30 bp tient compte de l'utilisation possible de ces techniques.

Dans l'idéal, la taille des fragments d'amplification devrait être identique pour les différents tests PCR. En cas d'impossibilité technique, il convient, autant que raisonnablement possible, que chaque type de test PCR (universel, de plante, de criblage et d'identification d'OGM) soit disponible sous plusieurs formes pour permettre d'amplifier des fragments encadrant chacun des autres types de test PCR afin de procéder à divers contrôles. L'encadrement devrait aller des tests PCR les plus généraux aux plus spécifiques, à savoir :

Séquences universelles ≥ séquences universelles de plantes ≥ séquences spécifiques de plantes ≥ séquences de criblage des OGM ≥ séquences d'identification des OGM.

Les PCR doivent toutes avoir été optimisées au moins pour les concentrations en ADN faibles à très faibles (voisines de la limite de détection, soit, par réaction, 1 à 50 équivalents génome de plantes ou cibles ADN ou une teneur en ADN de l'échantillon ≤ 100 pg si la taille du génome n'est pas connue avec précision) et également, de préférence, pour les concentrations élevées en ADN (soit, par réaction, une teneur en ADN ≥ 20 000 équivalents génome ou 100 ng si la taille du génome n'est pas connue avec précision [3], [15], [16] et [19].

NOTE 3 Il convient que l'optimisation de la PCR porte sur les concentrations en dNTP (et le rapport dTTP/dUTP, par exemple, pour les systèmes de décontamination correspondants), en magnésium, en UNG (UDG) et en amorces voire sondes, les températures, durées et nombre de cycles ainsi que sur les phases pré- et post-PCR. Il est recommandé de déterminer les conditions expérimentalement optimales.

NOTE 4 L'attention est attirée sur l'importance déterminante du choix des amorces (séquences, repliements, Tm, etc.) dans la spécificité, la qualité et la sensibilité des tests PCR [1], [4], [5], [22], [30].

Dans le cas d'échantillons contenant moins de 100 pg et, plus généralement, lorsque la qualité de l'ADN ne peut pas être évaluée, il est recommandé de prévoir 2 réactions PCR sur des volumes différents par exemple : la première avec un volume d'ADN échantillon par réaction PCR égal à $1/10^e$ du volume de la réaction PCR, la seconde avec un volume d'ADN échantillon par réaction PCR égal à la moitié du volume de la réaction PCR. Il peut être utile d'augmenter le volume d'une réaction PCR en présence d'un IPC.

On peut également ajouter à tous les échantillons à amplifier un témoin interne de PCR (ADN dopé) pour évaluer la teneur en inhibiteurs de PCR pour chaque échantillon. Cette technique est particulièrement recommandé lors de l'utilisation de standards externes de référence.

Les PCR optimisées doivent quantifier de façon fiable la teneur en ADN des espèces végétales et des OGM dans une plage dynamique prédéterminée (3.1.15) de l'ADN extractible. Cette démonstration doit avoir été réalisée avec des semences ou des cibles d'ADN purs dans la mesure où l'on a déterminé au préalable l'équivalence masse quantité d'ADN. La plage dynamique de la méthode PCR peut être divisée en plusieurs parties pour des raisons pratiques (par exemple disponibilité d'étalons de référence uniquement pour une teneur en OGM comprise entre la limite de quantification et 2 %) dans la mesure où les résultats donnés par les différentes méthodes sont compatibles dans les zones de recouvrement.

Les PCR doivent être capables de détecter toutes les variétés cultivées (cultivars) d'un OGM, soit par criblage, soit par identification à l'aide des fragments de bordure et d'une espèce végétale pour les gènes endogènes.

L'analyse PCR d'un échantillon, quelle qu'elle soit, doit comporter au minimum l'amplification de :

— séquence(s) de plante(s) correspondant aux OGM sur lesquels porte l'analyse ;

— séquence(s) commune(s) aux OGM à quantifier et/ou à détecter (criblage) et/ou spécifiques à certains d'entre eux.

---

7) *La LCR™ est une technique brevetée. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement qu'AFNOR approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ou techniques ainsi désignés.*

Une PCR qualitative doit présenter une limite de détection de 0,01 % sur semences ou ADN pur après corrélation avec l'équivalent massique en semences.

Une PCR quantitative doit présenter une limite de quantification de 0,1 % sur semences ou ADN pur après corrélation avec l'équivalent massique en semences.

7.6.2 Détection qualitative

7.6.2.1 *Généralités*

Dans le présent document, un test PCR qualitatif se définit comme un test d'identification d'un ADN cible.

NOTE 1 Lorsque la limite de détection de la méthode utilisée n'est pas connue, les résultats d'une telle détection qualitative ne peuvent être intégrés au rapport d'essai.

La spécificité des PCR qualitatives est à établir de préférence par une technique d'hybridation simple ou double de routine avec une ou plusieurs sondes internes. Elle peut aussi être déterminée par d'autres méthodes telles que, au minimum la taille du fragment amplifié, l'établissement de cartes de restriction des amplicons ou leur séquençage.

NOTE 2 Les méthodes PCR à haute spécificité (par exemple «hot-start») sont à privilégier. Les PCR qualitatives gigognes (nested PCR) sont à éviter en raison du risque de contamination (excepté les PCR gigognes en une seule phase sans ouverture de tube).

NOTE 3 La mise en œuvre de PCR multiplex est envisageable malgré une probable baisse de sensibilité. Celle-ci peut être compensée par l'optimisation des conditions de PCR et par un format de révélation par hybridation. En tout état de cause, les limites de détection et de quantification de tels tests sont, respectivement, de 0,01 % et 0,1 % d'OGM dans les semences ou quantités équivalentes d'ADN pur.

NOTE 4 Si possible, c'est-à-dire avec des échantillons à forte teneur en ADN, il convient que la quantité d'ADN par réaction PCR soit d'au moins 20 000 équivalents génome ou cibles ADN ou encore de 50 ng par tube lorsque la taille du génome de la plante (nucléaire ou plastidique) n'est pas précisément connue.

AVERTISSEMENT : La limite de détection des méthodes PCR est fonction du nombre de copies d'ADN cible accessible. Ce nombre est variable selon la matrice analysée. La limite de détection doit, si possible, avoir été estimée au préalable sur les matrices analysées ou sur des matrices comparables.

7.6.2.2 *PCR de criblage*

Par l'amplification de fragments communs à plusieurs OGM, une PCR de criblage permet de suspecter la présence d'OGM, qu'il est préférable ensuite d'identifier. L'intérêt d'une PCR de criblage est fortement dépendante du but recherché et elle ne peut pas être utilisée comme une méthode générale : son champ d'application doit être clairement défini.

La technique de détection repose sur l'amplification de séquences communes comme des séquences de régulateurs (tels que les promoteurs ou terminateurs) ou sur le criblage des certains gènes tels que ceux impliqués dans la tolérance aux antibiotiques ou aux herbicides et, en fin de compte, sur toutes les séquences communes à plusieurs OGM d'une même espèce ou d'espèces différentes telles que, par exemple, la séquence de jonction entre un promoteur et le gène intérêt.

D'une façon plus générale, toutes les méthodes PCR reposant sur les séquences internes d'insertion doivent être suspectées d'être présentes dans d'autres OGM et il y a donc lieu de les considérer comme des méthodes de criblage, sauf démonstration expérimentale et indication expresse du contraire dans le domaine d'application de la méthode.

Le domaine d'application des tests PCR de criblage doit être fourni sous forme de listes positives et négatives (organismes naturels ou OGM sur lesquels le test a été réalisé avec succès, organismes naturels ou OGM sur lesquels le test n'a pas donné lieu à amplification). Ces tests doivent spécifier en particulier les organismes que peuvent infecter ou dont sont originaires les séquences utilisées dans les événements de transformation (par exemple, différents isolats de virus de la mosaïque du chou-fleur pour le promoteur P35S ou les *Brassicae* sensibles à ce virus). Ces listes doivent être complétées au fur et à mesure de la parution de nouveaux résultats.

7.6.2.3 *PCR d'identification*

Une PCR d'identification d'espèce ou d'OGM doit reposer sur une signature univoque et non ambiguë. Dans l'état actuel des techniques, l'insertion de transgènes dans les génomes nucléaires et mitochondriaux s'effectue au hasard. La recombinaison homologue étant toutefois déjà disponible pour la transformation des chloroplastes, il est nécessaire d'évaluer avec le plus grand soin la spécificité de tous les tests PCR d'identification d'OGM reposant sur des séquences chloroplastiques.

En raison de leur présence possible dans plusieurs OGM de la même espèce végétale ou d'espèces végétales différentes, il est déconseillé d'utiliser pour une identification des séquences internes au fragment d'insertion (7.6.2.2).

Dans le cas où une transformation génétique dirigée n'a pas été utilisée pour obtenir un OGM, il est préférable d'utiliser l'un des fragments de bordure de l'insert. Présent en un seul exemplaire (jonction entre le génome de la plante et l'insertion) et spécifique de chaque OGM, dans l'état actuel des techniques pour des génomes nucléaires et mitochondriaux, le fragment permet d'identifier chaque événement de transformation de façon univoque et de mesurer sa teneur.

Dans le cas où le fragment de bordure ne constitue pas une signature univoque d'un OGM (empilage de gènes, mutagénèse dirigée, etc.) il conviendra d'utiliser les séquences et méthodes appropriées (LCR, etc.)

Le domaine d'application des tests PCR d'identification doit être fourni, autant que raisonnablement possible, sous forme de listes positives et négatives (organismes naturels ou OGM sur lesquels le test a été réalisé avec succès, organismes naturels ou OGM sur lesquels le test n'a pas donné lieu à amplification). Les tests doivent spécifier en particulier les organismes dont sont originaires les séquences utilisées dans les événements de transformation (par exemple différents isolats de *Bacillus thuringiensis* pour les gènes *Cry*). Ces listes doivent être complétées au fur et à mesure de la parution de nouveaux résultats.

NOTE Les fragments de bordure nécessaires à l'identification et à la quantification des OGM n'étant pas, à la date de publication du présent document, connus de façon générale et le nombre d'OGM autorisés dans l'Union européenne étant encore limité, une situation intermédiaire doit être prise en compte. Dans l'état actuel des autorisations d'OGM par l'Union européenne, certaines séquences internes à l'insert (généralement appelées «spécifiques à la construction») peuvent être utilisées pour l'identification et la quantification des variétés autorisées dans l'Union européenne [25].

AVERTISSEMENT : Hormis cas d'analyse plante à plante, il n'est actuellement pas possible de différencier un OGM, et ses produits dérivés, résultant d'un empilement de gènes des lignes parentales.

7.6.3 Détection quantitative

7.6.3.1 *Généralités*

Diverses méthodes permettent la détection quantitative par PCR des cibles initiales d'ADN : ce sont par exemple la dilution limite, similaire dans son principe à la méthode utilisée couramment en microbiologie, ou les méthodes utilisant des étalons de référence telles que la PCR quantitative compétitive ou la PCR quantitative en temps réel [4], [12], [14], [17], [18], [20], [27], [28], [32],[33],[37], [38].

Différents couples d'amorces peuvent pour la même cible d'ADN présenter des différences de sensibilité allant jusqu'à un rapport de 1 à 1 000. Il convient donc d'insister tout particulièrement sur le contrôle de la spécificité et l'efficacité des couples d'amorces [4], [5], [22], [30], XP V 03-020-3, XP V 03-020-4.

Quantifier signifie déterminer la teneur en OGM soit par rapport à la quantité initiale d'ADN dans la prise d'essai dans le cas des produits purs tels que les semences, soit par rapport à l'espèce végétale qui peut être génétiquement modifiée dans le cas des composés mixtes.

Chaque échantillon doit au moins être analysé en double (une analyse par prise d'essai).

NOTE 1 Pour des teneurs en OGM par espèce proches de 1 %, il est recommandé que l'écart entre les résultats d'analyse de deux prises d'essai réalisées simultanément ne soit pas supérieur à 35 % de la moyenne des résultats.

Par gamme standard de référence, il convient d'utiliser au moins 3 points en double, et de préférence en triple, par plage dynamique (par exemple 0,1 %, 1 % et 2 % d'OGM).

Cette quantification nécessite la détermination de la quantité de chaque type d'amplicons obtenue par PCR et sa corrélation avec les quantités initiales, soit d'ADN total, soit d'ADN des espèces végétales considérées, mesurées par des méthodes physiques (voir 7.5.3.1.1 à 7.5.3.1.6) ou biologiques à l'aide d'étalons de référence certifiés, quand ils sont disponibles.

Dans la mesure où le nombre de chloroplastes et de mitochondries varie fortement selon le patrimoine génétique, l'état physiologique de la plante et les conditions environnementales, les gènes endogènes (gènes domestiques) nécessaires pour quantifier la teneur en espèce végétale doivent être choisis parmi les séquences nucléaires.

Deux types de détection/quantification des amplicons peuvent être utilisés pour une quantification des ADN extraits initiaux :

— en cours d'amplification (mesure en temps réel) : la mesure s'effectue sur la base du suivi de la PCR par fluorescence, de préférence avec hybridation d'au moins une sonde (marquée) interne au fragment amplifié [4], [30], [33], [37] ;

ou

— après la phase d'amplification (mesure en point final) : la mesure des différents produits amplifiés peut être réalisée de diverses manières, par exemple par électrophorèse et analyse d'image et/ou suite à l'hybridation d'une sonde interne [32].

Toutes les PCR quantitatives doivent être effectuées en présence d'un témoin interne de PCR de teneur connue (légèrement supérieure à la limite de quantification, soit 1 à 50 équivalents génome ou cible ADN équivalente) pour évaluer la teneur en inhibiteurs de PCR dès lors qu'aucune amplification n'aura pus être obtenue pour un échantillon donné et pour homogénéiser les données entre tubes de PCR en cas d'utilisation d'étalons de calibration externes (étalons de référence amplifiés en parallèle dans des tubes autres que ceux des échantillons).

NOTE 2 Idéalement, ce témoin interne est constitué de l'ADN (de préférence sous forme plasmidique) utilisé pour la PCR compétitive.

NOTE 3 L'avantage de la détection en cours d'amplification tient principalement à l'automatisation du système qui évite l'ouverture des tubes, et donc minimise les risques de contamination post-PCR («par entraînement»). Néanmoins, il est recommandé d'effectuer les PCR en temps réel avec un système de décontamination approprié (incorporation de dUTP par exemple).

La quantification, par corrélation aux teneurs initiales en ADN cible, est assurée par l'utilisation :

— soit d'étalons de référence extérieurs à l'échantillon (étalons de calibration externes) tels, par exemple des semences de teneur certifiée en masse, en plante et en OGM, amplifiés en parallèle aux échantillons mais dans des tubes distincts ;

— soit d'étalons de référence internes, de préférence sous forme des plasmides utilisés en PCR compétitive, dans la mesure où l'équivalence entre les masses de semences, les teneurs en OGM et les quantités d'ADN des références internes a été déterminée au préalable. Ces étalons de référence internes sont ajoutés à l'échantillon à amplifier et co-amplifiés avec l'ADN des échantillons.

NOTE 4 Dans le cas d'utilisation d'étalons de calibration externes (comme des matériaux de référence dans des tubes distincts de ceux des échantillons), l'utilisation de témoins internes de PCR doit permettre d'apprécier la présence d'inhibiteurs dans les extraits d'ADN par rapport aux étalons de calibration et d'apporter un éventuel facteur de correction.

NOTE 5 Lorsqu'on utilise des tissus végétaux autres que des semences broyées et notamment des tissus frais, il convient de tenir compte de la teneur en eau de ces tissus.

La quantification doit être obtenue par interpolation, en utilisant donc une plage dynamique appropriée de teneur en OGM et en espèce végétale.

Les limites de détection et de quantification de toutes les méthodes PCR (universelles, plantes et OGM), déterminées sur des semences, doivent être respectivement de 0,01 % et de 0,1 % (en masse).

NOTE 6 Si possible, c'est-à-dire avec des échantillons à forte teneur en ADN, il convient que la quantité d'ADN par réaction PCR soit d'au moins 20 000 équivalents génome ou cibles ADN ou encore de 50 ng par tube lorsque la taille du génome de la plante (nucléaire ou plastidique) n'est pas précisément connue [3].

Les amplicons de la PCR quantitative doivent être identifiés (confirmés) de préférence par hybridation de routine simple ou double. Dans le cas contraire, il est recommandé de s'assurer de la spécificité de la méthode utilisée sur une partie aliquote par une méthode appropriée quelconque, telle que la taille de l'amplicon, l'établissement de cartes de restriction des amplicons ou le séquençage de ceux-ci.

NOTE 7 La limite théorique de détection de la PCR est d'une copie de cible d'ADN par tube si la mise au point est correcte et le système de révélation sensible. Toutefois, s'il y a des inhibiteurs dans le milieu réactionnel, cette limite est difficilement atteinte. Un système permettant de vérifier la présence d'éventuels inhibiteurs (par apport d'ADN exogène connu dans la solution d'ADN extrait de l'échantillon, connu sous le nom de «témoin interne de PCR») est fortement recommandé.

NOTE 8 La limite pratique de détection de la PCR est de 1 à 50 copies de cible d'ADN par tube ; 20 copies d'ADN cible peut être considérée comme la limite de quantification pratique que doivent atteindre les méthodes PCR.

AVERTISSEMENT : La limite de quantification des méthodes PCR est fonction du nombre de copies d'ADN cible accessible. Ce nombre est donc variable selon la matrice analysée et la taille de prise d'essai. La limite de quantification doit si possible, avoir été estimée au préalable sur les matrices analysées ou sur des matrices comparables. L'attention de l'utilisateur est attirée sur le fait que la variabilité des mesures, généralement présentée sous forme d'écart-type, s'accroît avec la diminution du nombre de copies cibles. La quantification ne peut être effectuée pour des nombres d'ADN cible inférieur à 20 copies.

AVERTISSEMENT : Sauf conception de méthodes nouvelles d'identification et de quantification des OGM résultant de «l'empilement des gènes», et hormis analyse plante par plante, l'absence de méthodes spécifiques prenant en compte la présence de plusieurs événements de transformation dans l'ADN d'une même plante et les produits dérivés, induit une prise en compte surestimée des teneurs en OGM considérés.

7.6.3.2 *Quantification en point final*

7.6.3.2.1 *Généralités*

Au vu de la qualité de la majorité des thermocycleurs actuellement commercialisés, la quantification peut maintenant être réalisée par interpolation à l'aide d'une gamme d'étalons externes de référence à teneur certifiée en OGM et plantes (les matériaux de référence étant amplifiés dans des tubes distincts des échantillons). Il est néanmoins recommandé soit d'utiliser des témoins internes dans les tubes des systèmes de quantification du type PCR compétitive, avec co-amplification des étalons de référence interne avec l'ADN de la prise d'essai, soit d'utiliser des témoins internes de PCR pour pouvoir comparer l'efficacité des PCR des échantillons et des matériaux de référence.

Les fragments amplifiés résultants peuvent, si nécessaire, être dilués pour être adaptés à la plage linéaire de la méthode de quantification de l'ADN (amplicons).

La méthode doit normalement être applicable à des teneurs comprises entre 0,1 % et 100 % de semences de plantes et d'OGM ou équivalent d'ADN cible.

NOTE 1 Pour des raisons pratiques, la plage dynamique de la méthode PCR peut être divisée en plusieurs parties (par exemple en raison de la disponibilité d'étalons (matériaux) de référence certifiés uniquement pour une teneur en OGM de 0 à 2 %) dans la mesure où les résultats donnés par les différentes méthodes sont compatibles dans les zones de recouvrement et les limites de ces méthodes précisées dans leur description.

NOTE 2 Des résultats publiés indiquent que la quantification peut être obtenue à partir d'une PCR quantitative en point final [33]. Compte tenu de ce type de résultats, la PCR quantitative en point final peut donc être choisie pour déterminer la teneur en OGM par rapport à un seuil.

Les paragraphes suivants présentent le principe de certaines des méthodes applicables à la quantification des amplicons nécessaire pour la détermination des valeurs initiales en ADN des OGM et espèces végétales.

7.6.3.2.2 *Système d'électrophorèse couplé à l'analyse d'image*

Les amplicons sont séparés sur un gel d'agarose ou d'acrylamide à la concentration appropriée et visualisés par coloration avec un agent fluorescent intercalant ou liant de l'ADN ou tout autre procédé approprié comme une coloration au nitrate d'argent.

La quantification est effectuée par analyse de la réflexion (émission de fluorescence) ou de la transmission dans le cas de techniques à base de nitrate d'argent, à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images procédant par interpolation à partir d'une gamme de référence, certifiée quand elle est disponible, de préférence co-amplifiée avec l'ADN des échantillons ou avec un témoin interne de PCR pour déterminer la présence d'inhibiteurs de PCR de façon à déterminer un facteur de correction.

7.6.3.2.3 *Électrophorèse capillaire et chromatographie en phase liquide couplées à une détection UV*

En conditions non saturantes des pics d'élution, la quantification obtenue par cette méthode est meilleure que par électrophorèse (la quantification étant effectuée par transmission plutôt que par réflexion).

Le domaine de séparation des colonnes capillaires ou la porosité des colonnes chromatographiques (TosoHaas [8]) par exemple) doivent être adaptés aux tailles des amplicons étudiés.

---

8) TosoHaas est une marque déposée. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement qu'AFNOR approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

La quantification est effectuée par étude de la DO à 260 nm ou à 254 nm à l'aide d'un logiciel d'analyse des électrophorégrammes ou chromatogrammes, par interpolation à partir d'une gamme de référence certifiée, de préférence co-amplifiée avec l'ADN des échantillons à moins qu'un témoin interne de PCR ne permette d'apprécier l'effet des inhibiteurs de PCR.

7.6.3.2.4 *Hybridation en solution* (PCR-ELISA, puces à ADN, PNA)

Plusieurs formats de PCR-ELISA sont disponibles, sous forme commercialisés ou non, et sont couramment utilisés comme méthodes de routine [27]. Ils impliquent tous l'hybridation d'au moins une sonde interne soit pour retenir l'amplicon, soit pour évaluer si ce dernier a été fixé par un autre processus.

La présence des amplicons, par exemple dans un puits de plaque de microtitration, est révélée par une activité enzymatique ou par une fluorescence proportionnelle à la quantité d'amplicons dans la plage de quantification. Si nécessaire, l'ADN (les amplicons) peut être dilué pour la quantification.

Dans le cas de modèles de PCR-ELISA où les amplicons sont retenus à l'aide, par exemple, de systèmes substitués tels que des amorces marquées à la biotine ou par incorporation de nucléotides marqués, les limites de détection et de quantification des tests PCR doivent être en accord avec les spécifications du présent document.

NOTE 1 L'utilisation de sondes PNA (acides nucléiques peptidiques) en lieu et place des sondes ADN est possible pour tous les modèles d'hybridation qui le permettent [26], [31].

NOTE 2 Les méthodes à ADNb (ADN branché) sont également utilisables pour la détection des fragments amplifiés [28].

Les conditions de révélation, enzymatique ou par émission de fluorescence, de la rétention des amplicons doivent être réalisées dans la zone de linéarité de la méthode d'essai.

Le blanc de quantification sur plaque de PCR-ELISA (blanc de plaque) est réalisé sur un mélange réactionnel PCR dans lequel l'ADN extrait est remplacé par de l'eau de qualité I réactif analytique. Un résultat est considéré comme positif quand la densité optique d'un échantillon est supérieure ou égale à la moyenne plus trois fois l'écart-type déterminé dans le témoin négatif de PCR. La densité optique du bruit de fond déterminé à l'aide du témoin négatif de PCR ne saurait être supérieure à 0,1 ; elle est généralement inférieure à 0,07 et souvent comprise entre 0,01 et 0,04.

7.6.3.2.5 *Hybridation sur membrane* (système de bandelettes «dot» et «slot» «blot») *et billes*

Ces modèles de détection des amplicons reposent en général sur l'hybridation d'au moins une sonde interne.

Ce type d'hybridation fait intervenir des bandelettes ou tout autre moyen adéquat comme les billes, avec une sonde interne couplée à la phase solide et plongée dans une solution d'hybridation contenant une partie du milieu réactionnel de la PCR.

Les limites de détection et de quantification de ces tests PCR doivent répondre aux exigences générales du présent document.

Exemple d'application :

— la migration de la solution d'amplicons s'effectue par capillarité. L'hybridation est réalisée entre les amplicons marqués par exemple à la biotine et les sondes internes fixées ;

— la présence d'amplicons biotinylés est révélée par un système colorimétrique précipitant sur la membrane, résultant par exemple de l'action de la phosphatase alcaline couplée à la streptavidine.

Des segments amplifiés d'ADN peuvent également être fixés de façon plus ou moins spécifique sur un support et leur présence révélée ultérieurement par une hybridation avec une sonde interne marquée.

NOTE 1 L'utilisation de sondes PNA (acides nucléiques peptidiques) en lieu et place des sondes ADN est possible pour tous les modèles d'hybridation qui le permettent [26], [31].

NOTE 2 Les méthodes à ADNb (ADN branché) sont également utilisables pour la détection des fragments amplifiés [29].

7.6.3.3 *Quantification en temps réel*

Le principe de mesure en continu de la quantité d'amplicons produits repose [30], [33], [37] :

— sur la quantification de l'ADN double brin produit (par reconnaissance plus ou moins spécifique de l'ADN bicaténaire), généralement à l'aide d'un agent intercalant ou liant fluorescent de l'ADN,

ou

— sur la quantification par reconnaissance spécifique des amplicons produits à l'aide d'au moins une sonde interne à ceux-ci. Différentes variantes, généralement brevetées, sont commercialisées comme les sondes à hydrolyse de la chimie TaqMan® [9], les balises moléculaires (molecular beacons), la technologie Sunrise® [9], ou les sondes FRET™ [9]. Les technologies faisant appel à une hybridation de(s) sonde(s) interne(s) sont plus particulièrement recommandées.

La quantification peut être basée sur l'utilisation d'étalons de référence externes. Un témoin interne de PCR peut être utilisé pour la comparaison des rendements d'amplification entre les divers tubes d'un thermocycleur. Ce témoin interne peut être utilisé dans une PCR multiplex. Les limites de détection et de quantification des méthodes et des appareils dédiés à ce type de mesure en temps réel et des éventuelles PCR multiplex mises en jeu doivent être compatibles avec celles, générales, des méthodes de détection.

Quelle que soit la chimie en temps réel utilisée, il est recommandé d'utiliser un système de décontamination (par exemple de type dUTP + UNG) bien que le risque de contamination post-PCR (par «entraînement») soit minimisé par l'absence d'ouverture des tubes PCR.

Ces méthodes peuvent être appliquées dans des appareils dédiés permettant la détection en continu de la production d'amplicons, du moment que les limites de détection et de quantification des méthodes sont respectivement de 0,01 % et 0,1 % de plantes et d'OGM sur semences ou équivalent ADN.

Ces méthodes doivent normalement être applicables pour des teneurs comprises entre 0,1 % et 100 % pour les plantes et les semences d'OGM ou de plantes non transformées ou leur équivalent en ADN.

NOTE Pour des raisons pratiques, la plage dynamique de la méthode PCR peut être divisée en plusieurs parties (par exemple en raison de la disponibilité d'étalons de référence, certifiés quand ils sont disponibles, uniquement pour une teneur en OGM de 0 à 2 %) dans la mesure où les résultats obtenus par les différentes méthodes sont compatibles dans les zones de recouvrement. Les limites de ces méthodes doivent être, autant que raisonnablement possible, décrites.

8 Mesures générales d'assurance qualité

8.1 Généralités

L'organisation spatiale des laboratoires doit être fondée sur le principe de la «marche en avant» des échantillons permettant d'éviter tout croisement entre les échantillons à analyser et les produits de PCR.

Il est recommandé que cette «marche en avant» soit également respectée par le personnel, au moins sur une base quotidienne.

8.2 Locaux, appareillages et équipements

8.2.1 Organisation des locaux, appareillages et équipements

Le laboratoire d'analyse doit comporter au moins trois zones physiquement séparées, ou trois salles de travail :

— une salle ou zone physiquement séparée, pour le broyage, l'homogénéisation et l'aliquotage des échantillons ;

— une salle ou zone physiquement séparée, pour l'extraction ;

— une salle ou zone physiquement séparée, pour les opérations post-PCR.

Il est recommandé qu'une zone physiquement séparée, ou une salle de préparation des mélanges maîtres soit également disponible.

---

9) TaqMan®, Sunrise® et FRET™ sont des appellations commerciales de produits ou des marques déposées. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement qu'AFNOR approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

Dans le cas d'utilisation de hottes de PCR de protection, celles-ci doivent être lavables à l'eau de Javel à 1,7 % de chlore actif ou HCl à 1 N ou NaOH à 0,5 N ou tout autre produit d'efficacité similaire et résister à des traitements UV répétés pendant 15 min avant toute opération.

Il est recommandé d'équiper la zone ou la salle de broyage d'un système d'aspiration afin d'éviter les contaminations dues aux poussières. La sortie du système d'aspiration doit éviter toute contamination d'autres locaux ou du laboratoire d'analyse.

Il est recommandé que la zone ou la salle post-PCR soit sous pression négative et qu'elle soit équipée d'un sas.

Il est recommandé d'effectuer les extractions d'ADN sous hotte aspirante (sorbonne). Les thermocycleurs ainsi que les appareils permettant d'effectuer des PCR en temps réel peuvent se trouver dans la zone ou la salle de préparation des mélanges maîtres. En ce cas, aucun tube ne doit être ouvert après amplification dans cette salle ou zone.

Toutes les mesures appropriées doivent être prises pour empêcher l'entrée d'aérosols d'ADN qui peuvent résulter de PCR antérieures ou concomitantes.

8.2.2 Maintenance des locaux, appareils et équipements

La PCR est une méthode de détection extrêmement sensible très fortement affectée par les contaminants externes (poussières de broyage, contamination par entraînement, etc.). Il est recommandé de contrôler avec une fréquence adéquate les locaux à l'aide des témoins appropriés (3.4.8).

L'ensemble des appareils et matériels réutilisables doit pouvoir être :

— nettoyé avec un détergent approprié de façon à éliminer l'ensemble des particules et molécules adsorbées sur les surfaces en contact avec les échantillons et prises d'essai ;

— nettoyé, si possible, particulièrement en ce qui concerne les parties en contact avec les échantillons, à l'eau de Javel à 1,7 % de chlore actif ou HCl à 1 N ou NaOH à 0,5 N ou tout autre produit d'efficacité similaire, de façon à éliminer toute trace d'ADN et de nucléase ;

— rincé abondamment à l'eau et suivi si possible d'au moins 2 rinçages à l'eau de qualité type I, par exemple, spécialement pour les parties en contact avec les échantillons ;

— stérilisé si la stérilisation est applicable à tout ou partie de l'équipement ou l'appareillage, en particulier pour les parties en contact avec les échantillons.

Un programme régulier de maintenance, de nettoyage et de décontamination (à l'eau de Javel à 1,7 % de chlore actif ou HCl à 1 N ou NaOH à 0,5 N ou tout autre produit d'efficacité similaire) est recommandé avec une périodicité adéquate :

— quotidien et à chaque usage : surfaces de travail, intérieur des hottes de sécurité («hottes PCR»), parties des broyeurs et homogénéisateurs en contact avec les prises d'essai ou les produits en résultant, quelques équipements selon l'usage comme balances, pH-mètres, pipettes automatiques, diluteurs, etc. ;

— hebdomadaire : sols, éviers, broyeurs (parties sans contact avec les échantillons) ;

— mensuel : bains-marie, autoclaves, purificateurs d'eau, centrifugeuses, fours à hybridation rotatifs ;

— trimestriel : réfrigérateurs, congélateurs, incubateurs,

— semestriel : murs, fenêtres, appareils fixés (lampes, placards,...).

La maintenance des appareils et équipements doit être assurée en conformité avec les instructions des fournisseurs. Des systèmes d'étalonnage appropriés doivent être disponibles pour les appareils.

8.2.3 Mesures appropriées pour éviter les contaminations

Les parties des appareillages et équipements en contact avec les prises d'essai ou en contenant doivent être nettoyées de façon à éviter toute contamination croisée d'ADN et de nucléase entre échantillons.

Après usage et avant nettoyage, il est recommandé de stocker l'appareillage, la verrerie et les parties d'équipement à nettoyer dans des bacs remplis d'eau de Javel à 1,7 % de chlore actif ou HCl à 1 N ou NaOH à 0,5 N ou de tout autre produit d'efficacité similaire, suivi d'un rinçage à l'eau.

La verrerie propre doit être stérilisée avant utilisation. Elle doit être stockée avant usage dans des locaux ou des récipients non contaminant. Chaque pièce de verrerie doit être fermée individuellement (bouchon, papier aluminium, film plastique ou autre) pour éviter toute contamination durant le stockage et le transport.

Pour éviter les contaminations, il convient d'utiliser des pipettes ou des micropipettes appropriées (comme par exemple des micropipettes à aspiration avec cônes à filtre ou des micropipettes à déplacement positif).

8.3 Équipement du personnel

Le personnel doit revêtir une blouse différente pour chacun des types d'opérations ainsi que des gants à usage unique. L'usage de gants talqués est déconseillé dans les opérations pré-PCR du fait des risques d'inhibition et/ou des contaminations des mélanges réactionnels de PCR.

Il est recommandé de changer les gants et les blouses selon une fréquence appropriée.

8.4 Traitement et élimination des déchets

Les déchets toxiques (agents intercalants, etc.) doivent être stockés, utilisés et éliminés selon les règles en vigueur.

L'ensemble des déchets contaminés par des échantillons ou une solution d'ADN doit être traité à l'eau de Javel à 1,7 % de chlore actif ou à l'acide chlorhydrique à 1 %, ou à l'hydroxyde de soude ou avec un produit d'efficacité équivalente. Ils peuvent également être disposés dans des sacs étanches stérilisables ou des conteneurs à incinération, avant sortie des salles de manipulation.

Il est recommandé que les tubes de PCR soient détruits, de préférence, par incinération.

Les déchets de verre doivent faire l'objet d'une élimination séparée après séjour dans de l'eau de Javel à 1,7 % de chlore actif, acide chlorhydrique à 1%, ou hydroxyde de soude à 0,5 N ou un produit d'efficacité équivalente. L'ensemble du matériel jetable (embouts de pipettage, pipettes,...) ou recyclable avant lavage (dont les portoirs de tubes PCR), doit être temporairement stocké par immersion dans une solution d'eau de Javel à 1,7 % de chlore actif, acide chlorhydrique à 1 %, ou hydroxyde de soude à 0,5 N ou un produit d'efficacité équivalente avant sortie des appareils ou des salles de manipulation.

Tout échantillon contenant des OGM doit être éliminé de façon à éviter toute dissémination.

8.5 Réactifs

8.5.1 Généralités

Sauf spécification contraire, tous les réactifs doivent être exempts d'ADN, de nucléase(s) et d'inhibiteur(s) de PCR.

Le poids, l'état du produit et le conditionnement de l'échantillon doivent être vérifiés à réception. Ces informations doivent être consignées.

Les échantillons doivent être conservés dans des récipients parfaitement étanches avant et après analyse pour éviter tout risque de contamination croisée avec d'autres produits.

Les échantillons doivent être stockés dans des conditions garantissant la composition initiale du produit et évitant tout risque de perte.

Les produits périssables doivent être conservés à 4 °C ou à – 20 °C et quelquefois à – 80 °C jusqu'à analyse, si nécessaire en condition non oxydante, voire sous atmosphère neutre (azote ou argon). Les conditions de conservation et la durée de celle-ci doivent être consignées.

Afin d'éviter les séparations de phase, il est déconseillé de faire descendre la température des congélateurs en dessous de – 20 °C. Après décongélation, les échantillons doivent être homogénéisés par agitation manuelle ou à l'aide de tout appareil approprié (vortex, etc.).

8.5.2 PCR

Lors de la préparation d'une PCR, il est conseillé de conserver les réactifs sur la glace pendant l'introduction à la micropipette des réactifs. En règle générale, un mélange réactionnel de PCR contient les composants figurant dans le tableau 3, lesquels doivent être généralement introduits dans l'ordre spécifié si des solutions commerciales (contenant par exemple le tampon, les nucléotides, le magnésium, etc.) prêtes à l'emploi ne sont pas utilisées.

Tableau 3 — Composants utilisés dans une réaction PCR typique

Composant [1)]	Explication
Eau de type I de qualité analytique	Solvant
Solution tampon de PCR (généralement concentrée 10 fois)	La composition varie de manière importante selon les systèmes proposés par les fabricants ; la solution contient une concentration ionique déterminée et divers additifs (protéine[s], DMSO, Tween 20,...) appropriés en particulier à l'activité ou à la stabilité de l'ADN polymérase thermostable utilisée.
$MgCl_2$	Le magnésium sous forme libre est un cofacteur essentiel à l'activité de l'ADN polymérase thermostable. Il augmente le Tm de l'ADN bicaténaire et forme un complexe soluble avec les dNTP. Sa concentration finale est donc dépendante des concentrations en dNTP, amorces, sonde et ADN cible.
dNTP	Désoxyribonucléotides triphosphates : utilisés dans la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase.
Amorces	Oligonucléotides de taille et de séquences déterminées permettant de sélectionner la séquence à amplifier par PCR.
ADN polymérase thermostable	Enzyme utilisée pour la réaction de polymérsiation d'ADN *in vitro*.
1) Selon leur provenance, certains de ces composants peuvent être déjà mélangés dans le tampon de réaction concentré. Il est nécessaire d'utiliser un tampon de composition simple et connue pour l'optimisation des tests PCR. La proportion dTTP/dUTP et la quantité d'uracyle N glycosylase doivent être déterminées si ce système de décontamination est utilisé.	
NOTE Alors que les incorporations de dUTP sont systématiques, l'addition d'UNG et sa mise en action (généralement 2 min à 50 °C avant la première dénaturation précédant les cycles d'amplification) n'est requise qu'en cas de contamination avérée (témoin négatif des réactifs devenu positif).	

À titre indicatif, pour garantir une préparation correcte et mener à bien la réaction d'amplification, différents contrôles doivent être effectués selon une fréquence appropriée, soit pour chaque échantillon, soit par ensemble (série) de réactions PCR :

- **Témoin d'inhibition** : tout échantillon n'ayant pas présenté d'amplification PCR (séquences universelles, séquences de plantes ou séquences d'OGM) doit faire l'objet d'un contrôle de présence d'inhibiteurs par addition d'ADN exogène (ADN dopé, témoin interne de PCR) dont l'amplification doit être comparée à celle d'un témoin (ADN exogène pur apporté à un mélange réactionnel de PCR sans présence connue d'inhibiteur). Il est recommandé d'utiliser dans ce cas un ADN exogène de calibration (plasmide de PCR compétitive par exemple). Les quantités d'ADN exogène apportées doivent toujours être suffisamment faibles (1 à 50 équivalents génome de plante ou copies d'ADN cible) pour ne pas masquer la présence d'inhibiteurs de PCR dans la solution d'ADN extrait.
- **Témoin négatif de contamination de locaux :** Ce témoin doit être constitué d'un extrait effectué sur de l'eau de type I réactif ayant subi l'ensemble des procédures (extraction d'acides nucléiques, etc.). À la différence du témoin négatif d'extraction ou du témoin de réactif, le tube PCR doit rester soit constamment ouvert soit ouvert uniquement dans la pièce à tester jusqu'à la mise en place dans le thermocycleur.
- **Témoin négatif de réactifs PCR** : toute série d'analyses PCR doit être accompagnée d'au moins un tube de témoin négatif de contamination des réactifs et des appareils, systématiquement placé en dernier dans l'ordre de manipulation des tubes. L'ADN à amplifier doit être remplacé par de l'eau de type I réactif. Dans le cas de grand nombres d'analyses PCR simultanées (plus de 20 PCR simultanées), il est recommandé d'intercaler un tel témoin tous les 10 ou 20 échantillons, selon l'expérience du manipulateur.
- **Témoin négatif d'extraction (blanc d'extraction)** : ce témoin consiste en un échantillon constitué d'eau de type I réactif analytique soumis à l'ensemble des procédures analytiques (extraction d'acides nucléiques,...). À la différence du témoin de contamination des locaux, le tube correspondant n'est pas maintenu ouvert durant les opérations analytiques.

- **Témoin(s) positif(s) de PCR** : chaque type de PCR (séquences universelles, séquences de plantes, séquences d'OGM) doit être accompagné d'un contrôle positif pour lequel l'ADN extrait d'un échantillon est remplacé par un ADN purifié de qualité précédemment contrôlée (ADN génomique de plante et/ou d'OGM, ou de préférence — en raison de leur meilleure stabilité — plasmides utilisés par exemple en PCR compétitive). Ces témoins positifs sont généralement placés en fin de série d'analyse, avant le témoin négatif de réactifs PCR.

  NOTE L'utilisation d'étalons de PCR compétitive, apportés en quantités connues dans les tubes de PCR d'analyses de prises d'essais, permettent à la fois d'apprécier la teneur en inhibiteurs de PCR et de satisfaire au besoin de témoin positif de PCR tout en permettant la quantification recherchée.

Il est recommandé d'incorporer un système de décontamination à la PCR (psoralène, dUTP pour action ultérieure de l'UNG par exemple) afin de réduire au maximum les risques de contamination due aux amplicons obtenus lors de PCR précédentes.

9 Interprétation et expression des résultats

9.1 Généralités

À aucun moment, il ne pourra être affirmé qu'il n'y a pas d'OGM dans l'échantillon analysé au travers de ses prises d'essai.

NOTE Dans le cas des semences, il convient de tenir compte des recommandations spécifiques aux OGM, quand elles existent.

9.2 Calcul de la teneur en ADN de végétaux génétiquement modifiés

La teneur t en OGM doit être exprimée par espèce végétale et calculée selon la formule suivante :

$$t = \sum_{i=1}^{n} \frac{Q_i}{Q}$$

où :

Q_i est le nombre initial de molécules d'ADN spécifique de l'OGM i,

Q est le nombre initial de molécules d'ADN cible spécifique de l'espèce,

n est le nombre total d'OGM identifiés dans l'échantillon de l'espèce concernée.

Exemple de calcul de la teneur en OGM dans un produit résultant d'un mélange d'espèces végétales :

— Identification et/puis quantification des espèces végétales présentes dans l'échantillon : espèces A, B et C avec Q_A, Q_B, et Q_c

— Identification et/puis quantification (quantités d'ADN initial spécifique) de l'OGM correspondant à chaque espèce identifiée :

1) Espèce A : OGM_{A1} et OGM_{A2} avec Q_1 et Q_2
2) Espèce B : non quantifiable
3) Espèce C : OGM_{C1}, OGM_{C2}, OGM_{C3} avec Q'_1, Q'_2 et Q'_3

— Calcul des teneurs en OGM de la matrice analysée :

1) Pour l'espèce A, $t_A = \frac{Q_1 + Q_2}{Q_A} \times 100 = 0{,}4 + 0{,}2 = 0{,}6\ \%$
2) Pour l'espèce B, t_B est non détectable ou non quantifiable
3) Pour l'espèce C, $t_C = \frac{Q'_1 + Q'_2 + Q'_3}{Q_C} \times 100 = 0{,}4 + 0{,}6 + 0{,}3 = 1{,}3\ \%$.

NOTE 1 La quantification d'ADN d'OGM par une méthode de criblage, comme par exemple P35S, c'est-à-dire sur une séquence interne présentant un nombre variable de copies par OGM, peut être soit exacte soit surévaluée, selon le type et la proportion d'OGM présents dans l'échantillon.

NOTE 2 Il est recommandé que les résultats soient fournis avec des indications les plus claires possibles quant à leur variabilité.

9.3 Interprétation des résultats

9.3.1 Généralités

L'échantillon est considéré comme contenant de l'ADN de végétaux génétiquement modifiés si :

— la spécificité des fragments amplifiés a été évaluée soit à partir de cartes de restriction, d'un séquençage ou d'une hybridation de type «Southern», soit, de préférence, par hybridation par une méthode effective avec au moins une sonde interne du type PCR-ELISA, des bandelettes «slot» ou «dot» blot, soit encore par hybridation lors d'une PCR en temps réel. Dans le cas où cette spécificité n'a pas été vérifiée par les méthodes décrites précédemment à utiliser préférentiellement, celle-ci doit être vérifiée au minimum par le profil de restriction voire la taille du fragment amplifié. Cette taille doit correspondre celle du témoin positif OGM tandis que l'étalon non OGM ne doit présenter aucun fragment amplifié de taille similaire à celle du témoin positif OGM.

— L'ensemble des témoins et étalons doit fournir des résultats conformes à leur définition et à leur rôle.

Les résultats des analyses des 2 prises d'essai doivent être concordants (note 1, 7.6.3.1). En cas de résultats contradictoires, il est nécessaire de recommencer les analyses sur 2 nouvelles prises d'essai. Le type de résultat (positif ou négatif) doit être confirmé par une majorité de résultats concordants.

9.3.2 Expression des résultats en détection qualitative

9.3.2.1 *Généralités*

À aucun moment, il ne pourra être affirmé qu'il n'y a pas d'ADN de végétaux génétiquement modifiés dans l'échantillon analysé au travers des prises d'essai.

En aucun cas, l'expression des résultats ne saurait être de la forme «±».

9.3.2.2 *Cas de PCR réalisées avec plus de 20 000 copies équivalent génome (gène de référence) d'une espèce x*

Exprimer le résultat selon le cas considéré :

— pour un résultat négatif : «résultat négatif à la limite de détection de 0,01 % de l'espèce *x*» ou «moins de 0,01 % d'OGM pour l'espèce *x*» ;

— pour un résultat positif : «résultat positif à la limite de détection de 0,01 % de l'espèce *x*» ou «plus de 0,01 % d'OGM pour l'espèce *x*».

9.3.2.3 *Cas de PCR réalisées avec moins de 20 000 copies équivalent génome (gène de référence) d'une espèce x*

Exprimer le résultat selon le cas considéré :

— En cas d'absence de signal : «la quantité d'ADN de l'espèce *x* présente dans l'échantillon analysé est insuffisante pour satisfaire aux exigences du présent document quant à la limite de détection. Dans ces conditions, la norme impose de ne pas rendre de résultat. Il est recommandé de procéder à une analyse quantitative pour déterminer la limite de détection de la méthode sur cet échantillon.»

— En cas de signal positif : «résultat positif, supérieur à la limite de détection de 0,01 % pour l'espèce *x*»

9.3.3 Expression des résultats en détection quantitative

NOTE Il est recommandé que les résultats soient fournis avec des indications les plus claires possible quant à leur variabilité.

9.3.3.1 *Cas de PCR réalisées avec plus de 20 000 copies équivalent génome (gène de référence) d'une espèce x*

Exprimer le résultat selon le cas considéré :

— si le nombre de copies d'ADN cible d'OGM est supérieur à 20 et que la valeur du résultat est comprise entre 0,01 % et 0,1 %, alors le résultat s'exprime sous la forme suivante «la teneur en OGM de l'espèce *x* est inférieure à la limite de quantification de 0,1 %» ou «moins de 0,1 % d'OGM pour l'espèce *x*» ;

— si le nombre de copies d'ADN cible d'OGM est supérieur à 20 et que la valeur *y* du résultat est supérieure à 0,1 %, alors le résultat s'exprime sous la forme «la teneur en OGM de l'espèce *x* est de *y* %» (indiquer la valeur en pourcentage) ;

— si le nombre de copies d'ADN cible d'OGM est inférieur à 20, alors le résultat s'exprime sous la forme «la teneur en OGM de l'espèce *x* est inférieure à la limite de quantification de 0,1 %».

9.3.3.2 *Cas de PCR réalisées avec un nombre de copie équivalent génome d'une espèce x (gène de référence) compris entre 20 et 20 000 copies*

Exprimer le résultat selon le cas considéré :

— si le nombre de copies d'ADN cible d'OGM est supérieur à 20 et que la valeur du résultat est supérieure à 0,1 %, alors le résultat s'exprime sous la forme «la teneur en OGM de l'espèce *x* est de *y* %» (indiquer la valeur en pourcentage) ;

— si le nombre de copies d'ADN cible d'OGM est inférieur à 20, alors le résultat s'exprime sous la forme «la teneur en OGM de l'espèce *x* est non quantifiable».

9.3.3.3 *Cas où le nombre de copies d'ADN cible de l'espèce x (gène de référence) est inférieur à 20*

Exprimer le résultat comme suit :

«la quantité en ADN de l'espèce *x* ne peut être quantifiée. En conséquence la teneur en OGM concernant cette espèce ne peut être déterminée».

10 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit au moins comporter les données suivantes :

— toutes les informations nécessaires à l'identification de l'échantillon ;

— la référence au présent document et à la méthode utilisée en précisant en particulier s'il s'agit d'une méthode qualitative ou quantitative ;

— une référence à la méthode quantitative employée (PCR quantitative en point final ou en temps réel) ;

— la taille de l'échantillon reçu et analysé et les restrictions éventuelles applicables (adéquation avec les limites de détection et limite de quantification) ;

— la date de réception de l'échantillon ;

— la date de la mise en analyse si celle-ci diffère de plus d'un jour de la date de réception ;

— la taille de la prise d'essai et les restrictions éventuelles applicables ;

— les résultats et les unités dans lesquelles ils ont été exprimés, selon l'article 9 ;

— tout point particulier observé pendant le déroulement de l'essai ;

— toute opération non spécifiée dans la méthode ou considérée comme facultative et susceptible d'avoir eu une influence sur les résultats, tels que l'état des échantillons à leur réception et leurs conditions de conservation.

Bibliographie

[1] Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.; 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239 : 487-491.

[2] Sambrook, Fritsch, Maniatis, Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[3] Arumuganathan K. et Earle E.D. 1991. Nuclear content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* **9**(3): 208-218.

[4] Ed. James W. Larrick. The PCR technique: quantitative PCR Biotechniques Books. Eaton Publishing. 1997.

[5] Dieffenbach C.W., Lowe T.M.J. et Dveksler G.S. 1993. General concepts for PCR primer design. PCR Methods Appl. **3:** S30-S37.

[6] Directive 90/219/CEE du Conseil, du 23 avril 1990, relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés.

[7] Directive 90/220/CEE du Conseil, du 23 avril 1990, relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement.

[8] Règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 1997 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires.

[9] Règlement (CE) n° 1139/98 du Conseil du 26 mai 1998 concernant la mention obligatoire, dans l'étiquetage de certaines denrées alimentaires produites à partir d'organismes génétiquement modifiés, d'informations autres que celles prévues par la directive 79/112/CEE.

[10] Règlement (CE) n° 49/2000 de la Commission, du 10 janvier 2000, modifiant le règlement (CE) nº 1139/98 du Conseil concernant la mention obligatoire, dans l'étiquetage de certaines denrées alimentaires produites à partir d'organismes génétiquement modifiés, d'informations autres que celles prévues par la directive 79/112/CEE.

[11] Règlement (CE) n° 50/2000 de la Commission, du 10 janvier 2000, concernant l'étiquetage des denrées et ingrédients alimentaires contenant des additifs et arômes génétiquement modifiés ou produits à partir d'organismes génétiquement modifiés.

[12] ACTOR J.K., LIMOR J.R. et HUNTER R.L. 1999. A flexible bioluminescent-quantitative polymerase chain reaction assay for analysis of competitive PCR amplicons. *J. Clin. Lab. Anal.* **13**(1) : 40-47.

[13] BECKMANN A., GEBHARDT F. et BRANDT B.H. 1998. Direct quantification of polymerase chain reaction fragments using field-amplified sample injection in capillary zone electrophoresis for gene dosage estimation. *J. Chromatogr. B. Biomed Sci. Appl.***710**(1-2) : 75-80.

[14] BOOM R., SOL C., WEEL J., GERRITS Y., de BOER M. et WERTHEIM-van DILLEN P. 1999. A highly sensitive assay for detection and quantitation of human cytomegalovirus DNA in serum and plasma by PCR and electroluminescence. *J. Clin. Microbiol.* **37**(5) : 1489-1497.

[15] BRIONES P. 1996. Experimental design : a useful tool for PCR optimization. *Biotechniques* **21** : 134-140.

[16] COBB B.D. et CLARKSON J.M. 1994. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids. Res.* **22**(18) : 3801-3805.

[17] CROTTY P.L., STAGGS R.A., PORTER P.T., KILLEEN A.A. et McGLENNEN R.C. 1994. Quantitative analysis in molecular diagnostics. *Hum. Pathol.* **25**(6) : 572-579.

[18] DIVIACCO S., NORIO P., ZENTILIN L., MENZO S., CLEMENTI M., BIAMONTI G., RIVA S., FALASCHI A. et GIACCA M. 1992. A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. *Gene* **122**(2) : 313-320.

[19] HARRIS S. et JONES D.B. 1997. Optimisation of the polymerase chain reaction. *Br. J. Biomed. Sci.* **54**(3) : 166-173.

[20] HILL W.E. 1996. The polymerase chain reaction : Applications for the detection of food-borne pathogens. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36**(1-2) : 123-173.

[21] HOLMSTROM K., ROSSEN L., RASMUSSEN O.F. 1993. A highly sensitive and fast non radioactive method for detection of polymerase chain reaction products. *Anal. Biochem.* **209**(2) : 278-283.

[22] .INNIS M.A, GELFAND D.H., SNINSKY J.J. et WHITE T.J. 1990. PCR protocols — A guide to methods and applications, Academic press.

[23] JENKINS F.J. 1994. Basic methods for the detection of PCR products. *PCR methods Appl.* **3**(5) : S77-82.

[24] KATZ H.D et HAFF L.A. 1990. Rapid separation, quantitation and purification of products of polymerase chain reaction by liquid chromatography. *Journal of chromatography* . **512** : 433-444.

[25] Mac CORMICK C.A., GRIFFIN H.G, UNDERWOOD H.M. et MASON M.J.. 1998. Common DNA sequences with potential for detection of genetically manipulated organisms in food. *Journal of applied microbiology* **84** : 969-980.

[26] NIELSEN P.E. 1999. Applications of peptide nucleic acids. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**(1) : 71-75.

[27] NIEMEYER C.M., ADLER M. et BLOHM D. 1997. Fluorometric polymerase chain reaction (PCR) enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of immuno-PCR products in microplates. *Anal. Biochem.* **246**(1) : 140-145.

[28] NOLTE F.S. 1998. Branched DNA signal amplification for direct quantitation of nucleic acid sequences in clinical specimens. *Adv. Clin. Chem.* **33** : 201-235.

[29] KATZ E.D., HAFF L.A., EKSTEEN R. 1990. Rapid separation, quantitation and purification of products of polymerase chain reaction by liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **512** : 433-444.

[30] ORLANDO C., PINZANI P. et PAZZAGLI M. 1998. Developments in quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.* **36** (5) : 255-269.

[31] ORTIZ E., ESTRADA G., LIZARDI PM. 1998. PNA molecular beacons for rapid detection of PCR amplicons. *Mol. Cell. Probes.* **12**(4) : 219-226.

[32] PANNETIER C., DELASSUS S., DARCHE S., Saucier C. and KOURILSKY P. 1993.Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. *Nucleic Acids Res.* **21**(3): 577-583.

[33] PECCOUD J. et JACOB C. 1999. Statistical estimations of PCR amplification rates. *In* Gene Quantification. Ed.F. Ferré. Birkhauser. New York.

[34] ROSSEN L., NORSKOV P., HOLMSTOM K. et RASMUSSEN O.F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. International journal of food microbiology (1992), **17**, 37-45.

[35] SABAT G., ROSE P. HICKEY W.J. et HARKIN J.M. 2000. Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(2) : 844-849.

[36] SACHADYN P. et KUR J. 1998. The construction and use of a PCR internal control. *Mol. Cell. Probes* **12**(5) : 259-262.

[37] YANG B, YOLKEN R. et VISCIDI R. 1993. Quantitative polymerase chain reaction by monitoring enzymatic activity of DNA polymerase. *Anal. Biochem.* **208**(1) : 110-116.

[38] NF EN ISO 542, *Graines oléagineuses — Échantillonnage* (indice de classement : V 03-900).

[39] NF EN ISO 5555, *Corps gras d'origine animale et végétale — Échantillonnage* (indice de classement : T 60-280).

[40] NF EN ISO 664, *Graines oléagineuses — Réduction de l'échantillon pour laboratoire en échantillon pour essai* (indice de classement : V 03-902).

[41] NF EN 12740, *Biotechnologie — Laboratoires de recherche, développement et analyse — Guide pour la manipulation, l'inactivation et le contrôle des déchets* (indice de classement : X 42-207).

[42] NF EN 12741, *Biotechnologie — Laboratoires de recherche, développement et analyse — Guide pour les opérations de laboratoires biotechnologiques* (indice de classement : X 42-053).

[43] ISO 13690, *Céréales, légumineuses et produits de mouture — Échantillonnage des lots statiques* (indice de classement : V 03-700).