

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université de Jijel



BC.09/07

Faculté des Sciences
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

01
/
01

Mémoire

de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures
(D.E.S)

Option : Biochimie

Thème



**Traçabilité moléculaire des produits agricoles et agroalimentaires
contenant des OGM par PCR**



Membre du jury :

- ❖ Encadreur: Dr RECHRECHE Hocine
- ❖ Examineur: Mr AICHOUR Ridha

Présenté par :

- ❖ MOURES Guemra
- ❖ GUETTICHE Khadidja

Promotion-Juin 2007

REMERCIEMENTS

Nous remercions DIEU seul, qui nous a accordé ce savoir et qui nous a facilité le chemin dans notre étude dès notre enfance c'est grâce à dieu que nous avons pu réalisé ce mémoire.

Nous remercions notre encadreur, Dr RECHRECHE Hocine et les membres de jury ainsi que l'ensemble de nos enseignants du Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire.

Nos remerciements s'adressent également aux membres de nos familles respectives pour leurs patience et encouragements indéfectibles au long de nos parcours estudiantins

Nous remercions toute personne qui nous a aidé de prés ou de loin.



Khadidja

Guemra

Tables des matières

CHAPITRE I : Introduction.....	1
CHAPITRE II : Généralités sur les produit agroalimentaires et leur traçabilié	
II.1- Introduction.....	6
II.2- Traçabilité des produits agroalimentaires	6
II .2.1- Préservation de l'identité	6
II.2. 2- Salubrité alimentaire	7
II.3- Types de traçabilité	8
II.4- Exemple de traçabilié : filière bovine	9
II.5- Les intérêts de la traçabilité	10
II.6- Les outils pour un système de traçabilité	10
II.6.1- Etiquettes et enregistrements manuels	10
II.6.2- Identification par marquage d'ADN	11
II.7- Définition des OGM.....	12
II.8- Applications de la transgénèse.....	13
II.8.1- Cas des plantes.....	13
II.8.2- Cas des animaux.....	14
II.8.3- Cas des microorganismes.....	15
II.9- Risques des OGM	16
II.9.1- Les risques sanitaires	16
II.9.2- Les risques de l'environnementales	18
CHAPITRE III : Technique de PCR	
III.1- Introduction.....	20
III.2-Concept et étapes de la PCR.....	20
III.2.1- Dénaturation.....	21
III.2.2- Hybridation.....	21
III.2.3- Elongation.....	22
III.3- Les facteurs clés pour la réussite d'une PCR.....	22
III.3.1- Amorces.....	22
III.3.2 - ADN matriciel	22
III.3.3- ADN polymérase	23
III.3.4- Température de la réaction	23
III.3.5- Tampon	24
III.4- Les différents types de la PCR.....	25

III.4.1- PCR quantitatif.	25
III.4.1.1- En temps réel	25
III.4.1.2 - PCR en point final	26
III.4.1.3- PCR Compétitive	26
III.5- Les applications de la PCR.....	26
CHAPITRE IV : Traçabilité moléculaire des OGM.	
IV.1- Introduction	28
IV.2- Réglementation sur l'étiquetage et la traçabilité des OGM	28
IV.2.1- La réglementation en matière de traçabilité	28
IV.2.2- La réglementation en matière d'étiquetage	29
IV.3- Détection des OGM.....	30
IV.3.1- Teste immunologique	30
IV.3.2- Teste phénotypique.....	31
IV.3.3- Teste basé sur ADN.....	31
IV.3.3.1- Tests qualitatifs.....	33
IV.3.3.2- Tests quantitatifs.....	34
IV.3.3.2.1- Quantification par PCR quantitative compétitive.....	35
IV.3.3.2.2- Quantification par PCR en temps réel	36
IV.3.3.2.3- Quantification par PCR multiplexe en temps réel.....	37
IV.4- Analyse graphique des données de la PCR temps réel.....	38
IV.5- Calcule de la teneur en OGM	39
CHAPITRE V : Discussion et conclusion	41

Abréviations

AB : Agriculture Biologique.

ADN : Acide Desoxyribonucleique.

ADN_c : Acide Desoxyribonucleique Complementaire.

AOSCA : Association of Official Seed Certifying

ARN : Acide Ribonucléique.

ARN_t : Acide Ribonucleique de transfert et cytoplasm

CGF : Corn Gluten Feed.

CSA : Cadre Stratégique Pour l'Agriculture.

ECO : Ecriture Codée Optique.

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

EPO : Ettiquette du Pays d'Origine.

ESB : Encéphalopathie Spongiforme Bovine.

FIS : Fédération Internationale de Semencier.

IPG : Identification Pérenne Généralisée.

ISO : International Organisation for Standardization.

ISTA: International Seed Testing Association.

KD_a : Kilo Dalton.

MCJ : Maladie de Creutzfeld Jacob.

OGM : Organisme Génétiquement Modifié.

ONIC : Office National Interprofessionnel des Céréales.

ONIOIL : Office National Interprofessionnel de l'oléagineux.

PCR : Polymérase Chaîne Réactions.

Pfu : Pyrococcus furiosus ultra TM.

PLM : Froducte Lifecycle Management.

PrP : Proteine prion.

RFID : Radio Frequency Identification.

RT-PCR : Reverse Transcriptio PCR.

SDS : Dodécyle Sulfate de Sodium.

TAIL-PCR : Thermal Asymmetric Inter Laced PCR.

Taq : *Thermus aquaticus*.

TP-PCR : Triplet repeat primed PCR.

VBF : Veiande Bovine Française.

Kb : kilobases.

Kd_a : kilo dalton.

Pb : Paires de bases.

C° : degrees celsius.

Min : minutes.

μl : Micolitre.

Mg : Miligramme.

ml : Mililitre.

mM : Milimolaire.

Chapitre I : **Introduction**

Au niveau des consommateurs, et quelle que soit la zone géographique, les aliments doivent être accessibles, à des prix abordables, ce qui se traduit par des améliorations des conditions de conservation pour assurer des approvisionnements stables et de qualité optimale dès la récolte. L'acceptabilité répond aussi à des notions d'aliments de santé, de plaisir et de satisfaction qualitative. Cela sous-entend la connaissance des pratiques alimentaires (à fortes spécificités locales dans les pays du Sud), de l'influence des traitements technologiques sur les qualités nutritionnelles et organoleptiques des aliments et de l'attente des consommateurs.

Les produits agroalimentaires ont pris une place considérable dans la nutrition humaine. En effet, grâce aux progrès des techniques de transport et de stockage, l'offre de produits agroalimentaires a considérablement augmenté. A tous les niveaux du secteur (production, transformation, commerce), la taille des entreprises s'accroît et les rapports qu'elles entretiennent les unes avec les autres se modifient. Ces évolutions ne sont que les premiers fruits de changements profonds qui sont appelés à s'intensifier au cours des prochaines années : changement des attentes des consommateurs, de la dimension du marché, des politiques à mises en œuvre et des techniques de production [1].

Les entreprises du secteur agroalimentaire sont confrontées à une évolution rapide des goûts et des habitudes de consommation. Les consommateurs valorisent une nourriture plus variée et plus sophistiquée et mesurent que leurs besoins alimentaires de base sont satisfaits. Le grand facteur de changement sera la mondialisation des marchés agroalimentaires. La consommation alimentaire devrait s'accélérer au cours des prochaines années dans un grand nombre de pays en développement (en Amérique latine, Afrique et en Asie) en raison d'une croissance démographique soutenue, de l'urbanisation et de la modification des régimes alimentaires accompagnant l'élévation du niveau de vie [2]. Au total, certains pays en développement sont devenus ou deviendront très prochainement sans doute de grands importateurs de produits agroalimentaires, notamment de viande rouge et de certains produits transformés [3]. L'augmentation des échanges et des investissements internationaux qui découlera de ces évolutions sera renforcée par les politiques suivies par la plupart des pays.

Le deuxième grand facteur de changement sera d'ordre technique. Le marché de l'alimentation des pays a déjà été révolutionné, depuis une vingtaine d'années, par l'apparition de nouvelles techniques de cuisson, d'emballage, de transport et de stockage. Des produits frais saisonniers sont désormais disponibles pendant la plus grande partie de l'année; les plats cuisinés achetés dans les grandes surfaces et la cuisson par micro-ondes sont entrés dans les habitudes

alimentaires. Les prochains changements importants surviendront dans deux domaines : les biotechnologies et les techniques de l'information [4].

La multiplication récente de problèmes de santé publique liée à l'environnement (dioxine, fièvre aphteuse, salmonellose, etc.) risque de marquer durablement les esprits. La crise de la maladie de la vache folle, appelée encéphalopathie spongiforme bovine ou ESB est l'un des exemples les plus parlants de crise de sécurité alimentaire [5]. Celle-ci a commencé en mars 1996 quand le ministre anglais de la santé a admis un lien possible entre le prion de l'ESB et la maladie de Creutzfeldt Jacob chez l'homme. Même s'il n'y avait pas de preuve directe, cette nouvelle a suffi pour faire chuter les ventes dans la filière bovine. Malgré les nombreux efforts pour rétablir la confiance du consommateur, un sondage effectué en février 1997 par la plus importante chaîne de supermarchés française a montré que 25% des consommateurs avaient changé leurs habitudes de consommation suite à la crise. Dans ce contexte, les problèmes d'hygiène, de santé et de confiance des consommateurs devraient également gagner en importance.

Dans la mesure où les échanges de produits alimentaires devraient se renforcer et leur production engager des procédés de plus en plus sophistiqués, il pourrait devenir plus difficile que par le passé de vérifier et de garantir que les aliments ne présentent pas de risque pour la santé humaine. Pour cela les consommateurs pourraient demander davantage d'information sur l'origine des produits ou sur certaines caractéristiques précises reflétant les préoccupations du moment. Ainsi, les producteurs étaient dans l'obligation de fournir des informations exactes sur leurs produits pour regagner confiance des consommateurs et ont répondu en créant un système de traçabilité. Le cadre stratégique pour l'agriculture (CSA) définissait expressément la traçabilité comme étant la capacité de rappeler l'historique, l'application ou la localisation d'une entité au moyen d'identifications enregistrées [6]. La traçabilité ne commence pas nécessairement à la ferme puisqu'elle fait souvent participer les fournisseurs d'intrants (engrais, fertilisants et les pesticides) du système d'exploitation agricole. Cependant, la conception du programme de traçabilité peut en restreindre la portée. En effet, le programme pourrait ne retracer que l'étape précédente dans la chaîne à valeur ajoutée. Un programme de traçabilité pourrait avoir pour seul objectif de faire le lien entre un produit de consommation et la ferme d'où il provient. Il pourrait aussi faire partie d'un plan plus vaste qui vise plusieurs objectifs.

L'obtention de labels ou d'une traçabilité efficace est une réponse possible au besoin de confiance des consommateurs. Ceux-ci cherchent à se protéger en achetant des produits auxquels

ils font confiance, à travers des marques et/ou des labels. Leur attitude est plus ou moins exacerbée suivant le type de produits. Parmi les plus concernés, on peut par exemple citer les viandes et les produits susceptibles de contenir des organismes génétiquement modifiés (OGM) [7]. Les OGM sont le produit de manipulations génétiques dont les origines remontent aux années 1970. Contrairement aux techniques de la sélection classique de la Génétique, cette technologie apporte une nouveauté radicale : elle permet de repérer et de prélever dans un organisme donné un gène conférant une qualité avantageuse et de l'introduire dans n'importe quel autre organisme. Rupture radicale avec les lois de la nature, le gène concerné peut provenir d'une toute autre espèce, même très éloignée de celle dans laquelle est y introduite. On peut par exemple introduire un gène d'une bactérie dans une plante, ou un gène d'une plante dans un animal : c'est ce qu'on appelle la transgénèse.

Les premiers OGM ont été mis sur le marché en 1995, aux Etats Unis, avant de gagner l'Europe et les autres continents. L'un des plus médiatique fut certainement la variété qui fut d'ailleurs un échec commercial, tant elle était insipide. Depuis, le nombre de plantes et maintenant d'animaux qui font l'objet de manipulation génétique n'a pas cessé d'augmenter. Les réticences que les OGM suscitent auprès des consommateurs de certains pays vis à vis des plantes transgénique, ainsi que les inquiétudes manifestées par de nombreux scientifiques, n'ont pas empêché l'élargissement rapide des surfaces cultivées. Ces dernières ont augmentées de 19% entre 2000/01, pour atteindre un total de 52,6 millions d'hectares.

Malgré des efforts de communication considérables, les multinationales n'ont pas réussi à apaiser les inquiétudes des consommateurs européens. Ce mouvement d'opinion a conduit sept pays à adopter en juin 1999 un moratoire sur les nouvelles autorisations de cultures d'OGM (Allemagne, Autriche, Belgique, France, Grèce, Italie et Luxembourg). Cependant, des directives européennes sur la traçabilité des OGM et l'étiquetage des produits contenant des OGM ont conduit à la levée de ce moratoire en 2003 pour certains produits.

La traçabilité a commencé avec des technique classique (étiquetage, bouclage,...) puis elle s'est développé en parallèle avec la biologie moléculaire. Dans la seconde moitié du XX^{eme} siècle la Biologie a connu deux révolutions, la biochimie des protéines suivie de la biologie moléculaire des gènes ; aux répercussions majeures, aussi bien sur la recherche fondamentale qu'appliquée. La Biologie Moléculaire est une expression qui en elle-même n'est pas grande signification, mais qui maintenant consacrée par l'usage, et que l'ont utilise dans le sens de " Biologie Moléculaire des gènes ", elle consiste en effet a étudier la structure des gènes, leurs

expression et son contrôle. Elle entraîne donc à travailler essentiellement avec la molécule d'ADN, et de l'ARN [8] et grâce à la découverte des enzymes de restriction et autres outils de Biologie Moléculaire signe le début de l'ère du " Génie Génétique " ou en 1972, l'équipe de Berg utilise l'enzyme de restriction EcoRI pour obtenir *in vitro* une molécule d'ADN hybride qui contient à la fois l'ADN du virus SV40 et une variante du bactériophage λ , c'est la première recombinaison génétique réalisée *in vitro* [9].

Donc la découverte de nombreuses enzymes de restriction, et la possibilité de recombiner l'ADN *in vitro* ont conduit à l'utilisation de petites molécules circulaires d'ADN, les plasmides. Les plasmides sont présentes naturellement dans le cytoplasme des bactéries et sont répliqués en parallèle du chromosome bactérien. La bactérie les tolère car ils portent en générale un gène qui procure un avantage sélectif. On a depuis élaboré un grand nombre de plasmides artificiels, qui contiennent beaucoup de sites de restriction, et en générale un ou deux gènes permettant de les sélectionner. Après insertion d'une séquence d'ADN particulier dans un plasmide (appelé aussi vecteur), celui-ci peut être introduit dans une bactérie (transformation), soit pour modifier son patrimoine génétique, soit pour obtenir un grand nombre d'exemplaires de cette séquence. Les plasmides et les autres vecteurs (cosmides, phage, virus modifié, phagmides, etc) sont des moyens de transport d'un gène cible (étranger) dans une cellule hôte (clonage moléculaire) pour d'obtenir de nombreuses copies identiques d'un gène ou d'un fragment de gène (clones).

Depuis cette époque, la technologie de l'ADN recombinant, notamment le clonage moléculaire a largement tenu ses promesses, en fournissant des outils largement utilisés par les biologistes et qui permettent une moisson de résultats dans tous les domaines de la biologie, du contrôle de l'expression des gènes à l'étude de l'évolution. Cependant, l'une des difficultés majeures qui limitait les applications d'une telle technologie à un nombre relativement restreint de gènes, était l'insuffisance des quantités disponibles d'ADN à étudier. En effet, dans de nombreux cas, la quantité et/ou la qualité de l'ADN disponible sont respectivement faible et médiocre et donc ne permettait pas de réaliser le clonage moléculaire du gène désiré. Cet obstacle majeur a pu être levé au début de l'année 1987, grâce à la découverte d'une nouvelle technique ingénieuse qui a révolutionné la manipulation des gènes et accéléré l'essor de la Biologie Moléculaire de façon fulgurante. Cette technique appelée PCR pour polymérase chaîne réaction ou la réaction de polymérisation en chaîne [10], a bouleversé la Biologie Moléculaire et s'est implantée rapidement dans les laboratoires, en permettant de produire de gigantesques quantités de séquences d'ADN spécifiques sans passer par une étape de clonage.

Au final la méthode actuellement la plus adaptée au contrôle des produits agroalimentaires semble être la PCR parce qu'elle a pu combler les lacunes des méthodes classiques. Ce rapport se limite volontairement à la traçabilité dans le secteur agroalimentaire, même si la traçabilité est un sujet sensible dans d'autres secteurs de production, comme par exemple l'industrie pharmaceutique ou même le secteur hospitalier, le secteur agroalimentaire présente ses propres spécificités. Il est organisé en cinq chapitres intitulés respectivement : introduction, généralités sur les produits agroalimentaires et leur traçabilité, polymérase chain reaction, traçabilité moléculaire des OGM, et une discussion/conclusion.

Chapitre II :
Généralités sur les produits
agroalimentaires et leur
traçabilité

II.1- Introduction

Depuis une bonne dizaine d'années, on constate, une augmentation de la peur des consommateurs vis-à-vis des denrées alimentaires. Des crises comme celles de la vache folle (1996), de la dioxine (1999), de la fièvre aphteuse (2001), de la grippe de poulet (2004) ou des OGM ont largement contribué à cette inquiétude parfois un peu irrationnelle face à cette nouvelle demande des consommateurs. Face à cette nouvelle problématique, l'industrie agro-alimentaire, cherche à se doter d'outils performants pour la traçabilité. En effet, une crise mal gérée peut avoir des conséquences catastrophiques pour une entreprise. En réponse à ces constatations, les systèmes de gestion de la traçabilité ne sont plus adaptés, et les entreprises de l'agro-alimentaire se retrouvent, ainsi souvent désemparées [11].

II.2- Traçabilité des produits agroalimentaires

La traçabilité est l'aptitude à rechercher un lot de produits et son historique au long de la totalité ou d'une partie de la chaîne de production de l'extraction au transport, au stockage, à la transformation, à la distribution et à la vente (c'est la traçabilité de chaîne) ou en interne dans une des étapes de la chaîne, par exemple l'étape de production (c'est la traçabilité interne) [12]. Pour être en mesure d'étudier la portée de la traçabilité à la forme, on doit d'abord comprendre le but de cette traçabilité. Les programmes de traçabilité permettent principalement d'atteindre un objectif de préservation de l'identité ou de la salubrité alimentaire. L'objectif de salubrité alimentaire comprend la santé des animaux et des plantes et la prévention des maladies.

II.2.1- Préservation de l'identité

La préservation de l'identité est un moyen de distinguer les produits dans le marché en fonction de caractéristiques uniques, dans le but d'établir un créneau commercial. La préservation de l'identité est définie avec précision dans le CSA comme étant un canal en boucle qui facilite la production et l'offre d'une qualité garantie en permettant la traçabilité d'un produit de base, depuis le matériel génétique ou l'élevage souche, jusqu'au produit fini sur l'étagère du détaillant. Il est nécessaire lorsqu'un consommateur ne peut lui-même vérifier aisément une caractéristique unique d'un produit. Ces caractéristiques sont couramment appelées attributs de confiance ou attributs d'expérience. Un attribut d'expérience permet au consommateur d'identifier la caractéristique qu'un produit prétend avoir simplement en utilisant ce produit. Par exemple, si une étiquette indique qu'une boîte de conserve renferme des cerises dénoyautées, le consommateur pourra facilement vérifier si les cerises ont été dénoyautées lorsqu'il ouvre la boîte. Il est donc évident qu'un consommateur peut discerner la véracité des affirmations faites

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université de Jijel



BC.09/07

Faculté des Sciences
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

01
/
01

Mémoire

de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures
(D.E.S)

Option : Biochimie

Thème



Traçabilité moléculaire des produits agricoles et agroalimentaires
contenant des OGM par PCR



Membre du jury :

- ❖ **Encadreur: Dr RECHRECHE Hocine**
- ❖ **Examineur: Mr AICHOOR Ridha**

Présenté par :

- ❖ **MOURES Guemra**
- ❖ **GUETTICHE Khadidja**

Promotion-Juin 2007

sur une étiquette grâce à sa seule expérience, sans avoir recours à un système de préservation de l'identité.

En revanche, les attributs de confiance ne peuvent être vérifiés par l'expérience, le consommateur doit plutôt compter sur la préservation de l'identité des systèmes de traçabilité pour vérifier la présence dans un produit d'un attribut donné. Pour préserver l'identité des attributs de confiance, il faut créer un système qui met d'un côté les produits présentant ces attributs et de l'autre, ceux qui ne les possèdent pas de plus, l'étiquette du produit indique généralement la présence de l'attribut confiance sans étiquette, le consommateur ne peut découvrir cette information. Les attributs de confiance sont souvent associés à l'origine du produit, à la méthode de production employée, à la présence ou l'absence d'une caractéristique spécifique et aux caractéristiques de la postproduction associées à sa commercialisation. Quatre types d'attributs de confiance emploient la préservation de l'identité des systèmes de traçabilité pour annoncer au consommateur leur présence dans un produit. Il s'agit de l'origine du produit (l'OPE permet aux consommateurs de prendre des décisions selon, par exemple qu'il croient que les aliments étrangers peuvent être moins sûrs que les produits locaux), de la méthode de production (permet de préciser comment un produit a été fabriqué et qui l'a fabriqué), des attributs de post-production (sont des caractéristiques touchant la façon dont un produit parvient au consommateur sa production et sa fabrication.) et des caractéristiques du produit (sont les particularités que les consommateurs recherchent d'un aliment). Bien que ces catégories soient présentées de façon isolée, les objectifs des programmes de traçabilité faisant appel à la préservation de l'identité se chevauchent souvent [13].

II.2.2- Salubrité alimentaire

La promotion de la salubrité alimentaire est le deuxième objectif des initiatives de traçabilité entreprises dans le secteur alimentaire. Il n'est pas surprenant que l'intérêt pour la traçabilité ait atteint un sommet depuis que la maladie de la vache folle a été découverte, l'apparence d'une crise liée à la salubrité alimentaire peut avoir des effets dévastateurs sur l'industrie touchée. Pour éviter les répercussions d'un autre incident semblable, l'industrie alimentaire canadienne s'efforçait d'améliorer ses pratiques de salubrité alimentaire et de faire connaître ces améliorations aux consommateurs. Les programmes de traçabilité sont une composante clé de nombreuses stratégies industrielles de salubrité alimentaire. La traçabilité permet de prévenir les problèmes de salubrité alimentaire en intégrant à la chaîne à valeur ajoutée un élément. Si un problème d'insalubrité, comme une contamination, peut être retracé jusqu'au point de contamination, l'exploitant de l'établissement pourrait être tenu responsable de

tout préjudice causé par la contamination. Pour éviter cette responsabilité, les exploitants sont invités à prendre les mesures nécessaires pour écarter tout risque de contamination.

La traçabilité contribue aussi au confinement lorsque la salubrité des aliments est compromise. Lorsqu'un aliment présentant un risque d'insalubrité a été produit dans le cadre d'un système de traçabilité, il est possible de refaire son parcours dans la valeur ajoutée et d'identifier l'origine du problème. Si la source du problème peut être facilement établie, on peut efficacement rappeler tous les produits qui sont entrés en contact direct avec le produit contaminé pendant et après la période problématique. La traçabilité permet un rappel précis qui évitera à l'exploitant de rappeler les produits qui ne posent aucun risque.

II.3- Les types de la traçabilité

On a deux manières pour classer la traçabilité la première basée sur l'objectif ou on trouve une traçabilité garantie de l'origine qu'il s'agit ici de garantir au moyen de l'enregistrement de l'identification et de certaines informations, l'origine du produit. Cette utilisation est particulièrement développée dans le secteur de la viande bovine : les producteurs utilisent la traçabilité pour garantir l'origine de leurs produit. L'origine étant ici un ensemble de caractéristiques des matières premières : lieu d'élevage, race de l'animal,... Les producteurs peuvent ainsi obtenir des labels comme par exemple le label VBF (Viande Bovine Française) [14-15]. La deuxième c'est une traçabilité étalonnage qui a la propriété d'un résultat de mesure consistant à pouvoir le relier à des étalons appropriés, généralement internationaux, par l'intermédiaire d'une chaîne ininterrompue de comparaisons [16].

D'autre part, la traçabilité s'intéresse au recueil de données qui se rapporte ici à la collecte des données dans la relation entre les calculs et les données générées tout au long de la boucle qualité. Lors de son cycle de vie, un produit est sujet à un ensemble d'activités. Enfin en vue de déterminer le plan de rappel il en a une traçabilité qui identifie les produits à rappeler en cas de détection d'un problème qualité : pièce défectueuse dans un véhicule, matière première contaminée dans l'agroalimentaire [14-15]. Cette dernière divisée en deux types, la traçabilité ascendante, c'est la capacité, en tout point de la chaîne d'approvisionnement, à retrouver l'origine et les caractéristiques d'un produit à partir d'un ou plusieurs critères donnés. Elle sert notamment à trouver la cause d'un problème qualité et la traçabilité descendante, c'est la capacité, en tout point de la chaîne d'approvisionnement, à retrouver la localisation de produits à partir d'un ou plusieurs critères donnés. Elle sert notamment en cas de rappel et de retrait de produit [17].

On peut également distinguer les traçabilité amont et aval. Par rapport à une entité de référence (entreprise, atelier, exploitation,...) les traçabilité amont et aval. La traçabilité aval est la capacité à tracer la localisation des produits sortants. La traçabilité amont est la capacité de tracer l'origine des produits entrants. La traçabilité de tous les produits transitant à l'intérieure de l'entité référence est qualifiée d'interne.

II.4- Exemple de traçabilité : filière bovine

Depuis le début des années 80 on constate, une réduction significative de la consommation de viande bovine en Europe dont les causes sont multiples [18-19]. Les consommateurs exigent maintenant une meilleure information sur la qualité nutritionnelle et sanitaire des produits qui leur sont proposés. Cette exigence implique que l'origine de la viande soit garantie, c'est-à-dire qu'il y ait traçabilité continue depuis l'animal jusqu'aux pièces de viande commercialisées. C'est ainsi qu'ont été mis en place des accords interprofessionnels et des réglementations administratives pour l'ensemble de la filière, d'abord à l'échelle nationale puis de la communauté européenne, de même que des cahiers des charges spécifiques à certaines filières d'approvisionnement du type Label Rouge ou enseignes de grande distribution, pour que l'information portée sur les étiquettes soit claire et compréhensible par les consommateurs et permette toute vérification de l'exactitude de cette information.

Depuis de nombreuses années un système d'identification des bovins et des cheptels fonctionne en France dans un but de suivi zootechnique et sanitaire des animaux et des élevages. Suite au règlement CE n° 820/97, cette exigence fut étendue à tous les pays de la communauté et a conduit à la mise en place d'une nouvelle identification pérenne généralisée (IPG) de tous les bovins nés ou élevés en France avec constitution d'une base de données centralisées. Ces outils (double bouclage, registre bovin, passeport, etc.) permettent d'identifier et de suivre tout animal, ainsi que son statut sanitaire, présent en France de sa naissance à son abattage quels que soient le ou les détenteurs successifs. La traçabilité ne peut être garantie que s'il existe un système de vérification et de contrôle tout au long de la chaîne. Différentes techniques existent permettant de vérifier a posteriori les informations portées sur les étiquettes. L'origine géographique, ainsi que le type d'alimentation, devraient pouvoir être déterminés à partir de méthodes analytiques. C'est ainsi que la détermination des teneurs en isotopes stables, méthode actuellement appliquée aux végétaux, devrait permettre d'authentifier le lieu de production d'animaux réputés nourris avec des ressources locales, eau de boisson et végétaux [20].

En élevage	Chaque animal est identifié par des boucles portant le numéro national unique d'identification .Au moment où ces boucles sont apposées, un passeport est établi et suivra l'animal tout au long de l'élevage puis de la transformation .
Entrée usine	Les informations contenues sur le passeport sont saisies : numéro d'identification national, sexe, races du père et de la mère, numéro de cheptel de naissance, numéro de cheptel de l'éleveur, date de naissance.
Pesée fiscale	Une étiquette est éditée. Elle comporte le numéro de tuerie (identification interne), le numéro d'identification nationale de l'animal, le code fournisseur, la date et l'heure de la pesée fiscale, le poids, le numéro de cheptel de naissance, numéro de cheptel de l'éleveur. Cette étiquette est apposée sur chaque quartier de la carcasse.
Salle de découpe	Les quartiers (déjà identifiés par le numéro de tuerie) sont allotés en fonction des différents cahiers des charges. Chaque lot porte alors un numéro unique directement lié aux numéros de tuerie.
Préparation de hachage	Les muscles destinés à la fabrication de la viande hachée sont conditionnés dans des bacs. Chaque bac est identifié par une étiquette date et heure de remplissage du bac, numéro de lot, numéro de bac.
Hachage	Un numéro de mêlée est affecté aux bacs contenant les viandes issues d'un même broyage. Il est relié aux numéros de bacs .chaque bac comporte une étiquette indiquant le numéro de mêlée, le numéro de bac, le poids et le taux de matière grasse.
Formage et conditionnement	La viande est formée, mise en barquettes et étiquetée. On affecte un numéro de traçabilité, directement relié au numéro de mêlée. L'étiquette indique également la date limite de consommation, la date de conditionnement ainsi que le prix.

Tableau 1. Etapes de production et d'identifications dans la filière bovine.



Toutes ces méthodes de vérification a posteriori de l'origine ou de la race de l'animal dont est issue la pièce de viande expertisée sont basées sur la comparaison d'un profil pour une série de caractéristiques plus ou moins discriminantes avec des profils de référence déterminés au préalable. De ce fait les réponses sont du type probabiliste et, si elles permettent de vérifier la vraisemblance de l'information générique portée sur les étiquettes, elles ne permettent pas de vérifier l'intégrité de l'identification tout au long de la filière. Il convenait donc de mettre en place une méthode qui pallie ces inconvénients. Le tableau 1 résume les étapes de l'identification des produits dans la filière bovine.

II.5- Les intérêts de la traçabilité dans l'industrie agroalimentaire

La mise en place d'une traçabilité performante dans l'industrie agroalimentaire présente de nombreux intérêts par exemple l'intérêt marketing qui rassure le consommateur par l'intermédiaire de labels obtenus grâce à une traçabilité performante, Intérêt commercial qui augmente les commandes de la grande distribution en renforçant la crédibilité de l'entreprise (rapidité de réaction, identification précise des produits) pour les produits vendus sous une marque de la grande distribution, et la Possibilité d'augmenter le contrôle de la production. La traçabilité assure aussi, l'indication de cause à effet dans le cas de produits non conformes, facilitée d'obtention d'informations lors d'un audit qualité et l'implantation de systèmes d'information (gestion de production, de stocks, de la qualité, ...). Cependant, la mise en place d'une traçabilité efficace prend tout son intérêt en cas de crise :

Baisse du coût (en temps et en personnel) de recherche de l'historique et de la localisation des produits en cas de problème, Baisse du coût de rappel des produits on identifie moins de produits sains à rappeler, on diminue le risque de rappeler des produits déjà transformés et éventuellement on diminue le nombre de clients concernés et la diminution du nombre de sites de production ou de marques concernés par un rappel pour une entreprise multi site ou multimarques. Enfin la traçabilité permet de limiter la perte de confiance des consommateurs lors d'un grave problème de sécurité alimentaire : l'entreprise montre qu'elle maîtrise le problème [12].

II.6- Outil pour un système de traçabilité

II.6.1- Etiquettes et enregistrements manuels

L'utilisation d'étiquettes et d'enregistrement manuels est le moyen le plus simple pour obtenir un système de traçabilité. Il passe par l'utilisation d'étiquettes d'identification liée aux lots de Produits à tracer et enregistrements à chaque transformation, mélange et séparation de ces lots. L'information est écrite manuellement par les opérateurs sur les étiquettes et les enregistrements qualité. C'est un système très souple : on peut par exemple modifier rapidement

les informations à enregistrer ou ajouter de nouveaux produits. De plus, il est peu onéreux, puisqu'il ne nécessite que du papier et des stylos. L'enregistrement manuel est particulièrement adapté pour des processus de fabrication simple (avec peu de mélange et de sous-produit).

L'enregistrement et l'impression des informations peuvent être automatisés. L'utilisation de codes à barres, d'écriture codée optique (ECO) ou des étiquettes radiofréquence est largement répandue dans l'industrie. En générale, les étiquettes présentent les mêmes informations qu'une étiquette « manuelle » ainsi qu'un code permettant d'identifier le lot de façon univoque. Les identifications automatiques permettent de diminuer les erreurs de copies / recopies. En générale, les données utilisées dans l'atelier restent visibles sur l'étiquette. D'autres données peuvent être enregistrées informatiquement et accessibles dans le système de gestion à partir du numéro de lot. Avec un système de traçabilité informatisé, les recherches en cas de rappel sont beaucoup plus rapides. La RFID (radio frequency identification) est une technologie d'identification par radiofréquences [21]. Le principe de la RFID consiste à stocker un numéro de série unique, identifiant le lot à tracer, au sein d'une puce reliée à une antenne miniaturisée, l'ensemble formant un transpondeur.

II.6.2- Identification par marquages d'ADN

L'identification ADN est utilisée comme contrôle de la traçabilité, en particulier dans la filière de la viande bovine [22]. Il s'agit alors de garder une banque de données avec le marquage ADN des animaux abattus. Tant que le matériel moléculaire (ADN) n'est pas dégradé, la séquence génétique d'un individu, unique et inaltérable, peut être utilisée comme l'identifiant individuel qui assure une traçabilité parfaite, indépendante des aléas de saisie ou de transfert d'information. Il est bien évidemment illusoire de vouloir connaître la séquence génétique complète de chaque animal, mais il est possible d'envisager l'identification des animaux à partir d'un nombre restreint de régions du génome dont le typage soit facile et automatisable. Ces régions (loci) doivent être polymorphes et en nombre suffisant pour assurer que chaque individu soit caractérisé d'une manière unique parmi l'ensemble de la population de l'espèce [23]. Lors d'un contrôle de traçabilité sur un produit fini, on vérifie que l'ADN analysé corresponde à celui gardé dans la banque de données. La banque de données peut d'ailleurs être remplacée par le stockage d'une partie de l'animal, par exemple les oreilles, qui seront analysées parallèlement aux échantillons de produits finis. Pour identifier sans faille les contrefaçons mais aussi pour lutter contre la fraude à la garantie ou pour protéger des produits brevetés, certaines sociétés proposent la traçabilité par ADN. Elle synthétisent de l'ADN qui sert à marquer toutes sortes de produits.

L'ADN de synthèse copié sur l'ADN humain, est contenu dans des microsphères insérées dans chaque objet. En marquage, les molécules sont présentées soit en poudre soit en liquide. En lecture, il est procédé à des analyses par chemiluminescence ou par microscopie spécial. Après une polymérase Chain réaction (PCR), l'ADN est amplifié pour être lu. Il est alors très simple de savoir si le produit étudié est l'original (marqué) ou une copie (non marquée).

Les techniques de traçabilité par ADN sont également adaptées à la recherche de produits contenant OGM [24]. Le tableau suivant donne une comparaison entre l'enregistrement manuel et l'identification par marquage d'ADN (Tableau 2).

II.7- Définition des OGM

Une des conséquences de l'évolution des connaissances en biologie moléculaire, science jeune, a été de donner accès au patrimoine génétique des individus. Elle a conduit à développer un outil puissant, la transgénèse ou génie génétique, qui, associé aux techniques classiques d'amélioration des plantes et des animaux, permet de produire des «organismes génétiquement modifiés». Un Organisme Génétiquement Modifié (OGM) est un organisme (une plante, un animal, une bactérie, un virus) dans lequel on a introduit artificiellement un ou plusieurs gènes, soit inconnus de l'espèce à laquelle appartient cet organisme, soit appartenant à l'espèce mais ayant subi plusieurs manipulations génétiques. L'introduction de ces gènes conduit à la production de protéines qui confèrent de nouveaux caractères à l'organisme génétiquement modifié. La transgénèse consiste à transférer des gènes, éléments de base du patrimoine génétique contenus dans les chromosomes, vers un autre organisme, ou bien à les déplacer à l'intérieur d'un même organisme, et à les faire exprimer dans leur nouvel environnement. Les nombreuses applications potentielles de ce genre de techniques sont liées par exemple à l'introduction de caractères nouveaux dans un organisme qui n'aurait pu les acquérir autrement [25]. L'histoire des OGM a commencé il y a moins de trente ans avec la première bactérie transformée en 1973. Le premier végétal génétiquement modifié, ou transgénique, est apparu en 1983. Le tableau 3 résume les événements successifs de la transgénèse. La figure 1 explique les étapes de productions d'une plante transgénique.

II.8- Applications de la transgénèse

En 1973 la transgénèse a été appliquée, pour la première fois, à un microorganisme modèle, *Escherichia coli*. Elle a ensuite été réalisée chez le tabac et la souris. La première plante transgénique mise sur le marché a été en 1994 la tomate Flavr Savr, à conservation améliorée, de la firme Calgene (Etats-Unis). Lui ont succédé diverses plantes transgéniques de grande culture (maïs, soja, coton... déjà cultivés à grande échelle en Amérique du nord) qui ont été modifiées

Type de l'identification	Etiquetage et enregistrement manuel	Identification moléculaire par marquage d'ADN
Avantages	Système souple Facilité d'implantation Peu coûteux	Fiable Rapide Peut gérer la traçabilité de grosses Productions
Inconvénients	Peu adapté aux grosses production Recherches de traçabilité longue et non totalement fiables	Coût du système Lourdeur de la mise en place

Tableau 2. Comparaison entre l'enregistrement manuel et l'identification moléculaire par marquage d'ADN

Année	Evénements de la transgénèse
1985	Première plante transgénique résistante à un insecte.
1987	Première plante transgénique tolérante à un herbicide total
1988	Première céréale transgénique (maïs résistant à la kanamycine
1990	Première commercialisation d'une plante transgénique (en chine : tabac résistant à un Virus).
1994	Première légume transgénique commercialiser (tomate à maturation retardée).
1997	Premier tabac producteur d'hémoglobine
1998	Etiquetage des produits contenant des OGM.
1999	40 millions d'hectares des plantes transgéniques dans le monde.
2000	Séquençage du génome d'arabidopsis thaliana.
2001	Séquençage complet du riz
2002	58.7 millions d'hectares des plantes transgéniques cultivées dans le
2003	67.7 millions d'hectares des plantes transgéniques cultivées dans le monde.

Tableau 3. Evénements successifs de la transgénèse.

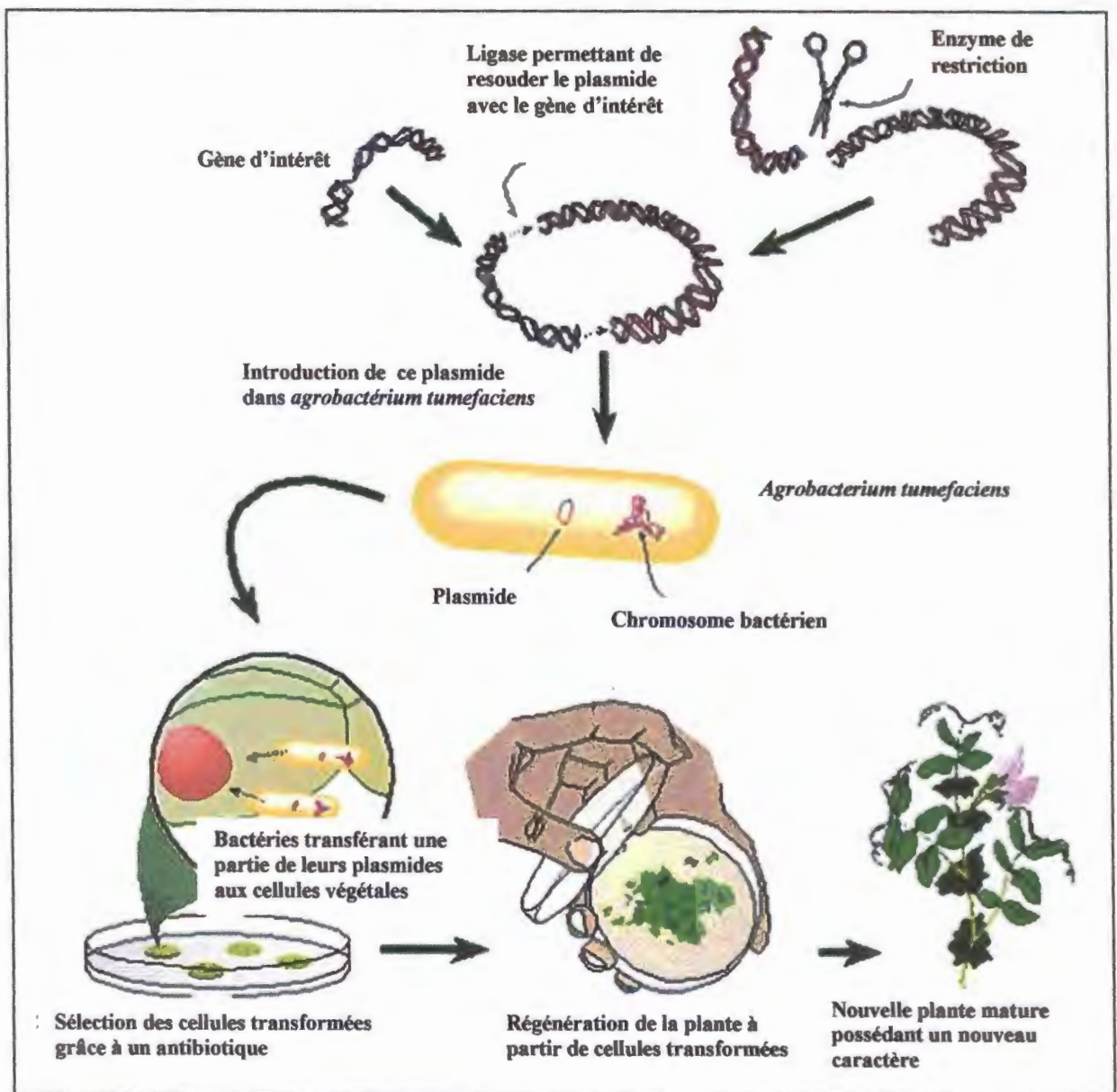


Figure 1. Etapes de production d'une plante transgénique

pour acquérir des avantages agronomiques (tolérance à certains herbicides, résistance aux insectes). Ces innovations sont le fait de grandes firmes internationales de l'agrofourriture, qui ont pu y consacrer les investissements nécessaires et dont l'expérience, acquise en protection des cultures ou dans le domaine des semences, a facilité la pénétration de ces marchés.

La transgénèse à but commercial est aujourd'hui surtout utilisée dans des situations «simples», mettant en jeu un seul gène ou un petit nombre de gènes : plantes protégées contre un herbicide; synthèse dans une plante d'une toxine dirigée contre un ravageur...

II.8.1- Le cas des plantes

L'amélioration de la production et de la qualité des produits sont les objectifs assignés à la transgénèse appliquée aux végétaux à l'échelle mondiale par ceux qui la développent. Pour la production, on recherche des tolérances à des herbicides totaux, à des ravageurs (insectes, nématodes) et à des pathogènes (virus, bactéries, champignons), ce qui conduit à des traitements plus sélectifs, moins coûteux et potentiellement moins agressifs pour l'environnement. On recherche aussi l'adaptation à des conditions difficiles ou limitantes (sécheresse, froid). L'utilisation dans ce cas de la transgénèse aurait deux avantages principaux : d'une part de pouvoir aller chercher des caractères intéressants «loin» de la plante à améliorer, par exemple chez des plantes dont le croisement avec la plante à améliorer, même aidé par les techniques de laboratoire, est totalement impossible. D'autre part de pouvoir introduire dans une variété très performante qui aurait une faiblesse (sensibilité à une maladie, à un insecte...), un gène d'une autre origine améliorant uniquement ce point sans passer par le croisement qui rebat toutes les cartes et modifie les autres caractéristiques [26].

Parmi les grandes cultures françaises, c'est pour le colza, le maïs et la betterave que la transformation génétique est la plus avancée. Les travaux portent sur différents caractères (stérilité mâle, qualité de l'huile, résistance aux maladies ou aux ravageurs...). La figure 2 montre la création d'un maïs transgénique. La transgénèse a permis d'introduire dans le maïs un gène qui le rend résistant à la pyrale, un ravageur important. Cette résistance est due à la synthèse d'une protéine toxique pour les larves de pyrale, mais sans risque pour l'homme et les animaux [27]. Pour la qualité des produits, les travaux les plus nombreux portent sur l'amélioration des protéines de réserve à des fins d'alimentation animale ou humaine, l'amélioration de la composition en acides gras des huiles végétales pour l'alimentation, des fruits et des légumes au goût amélioré.

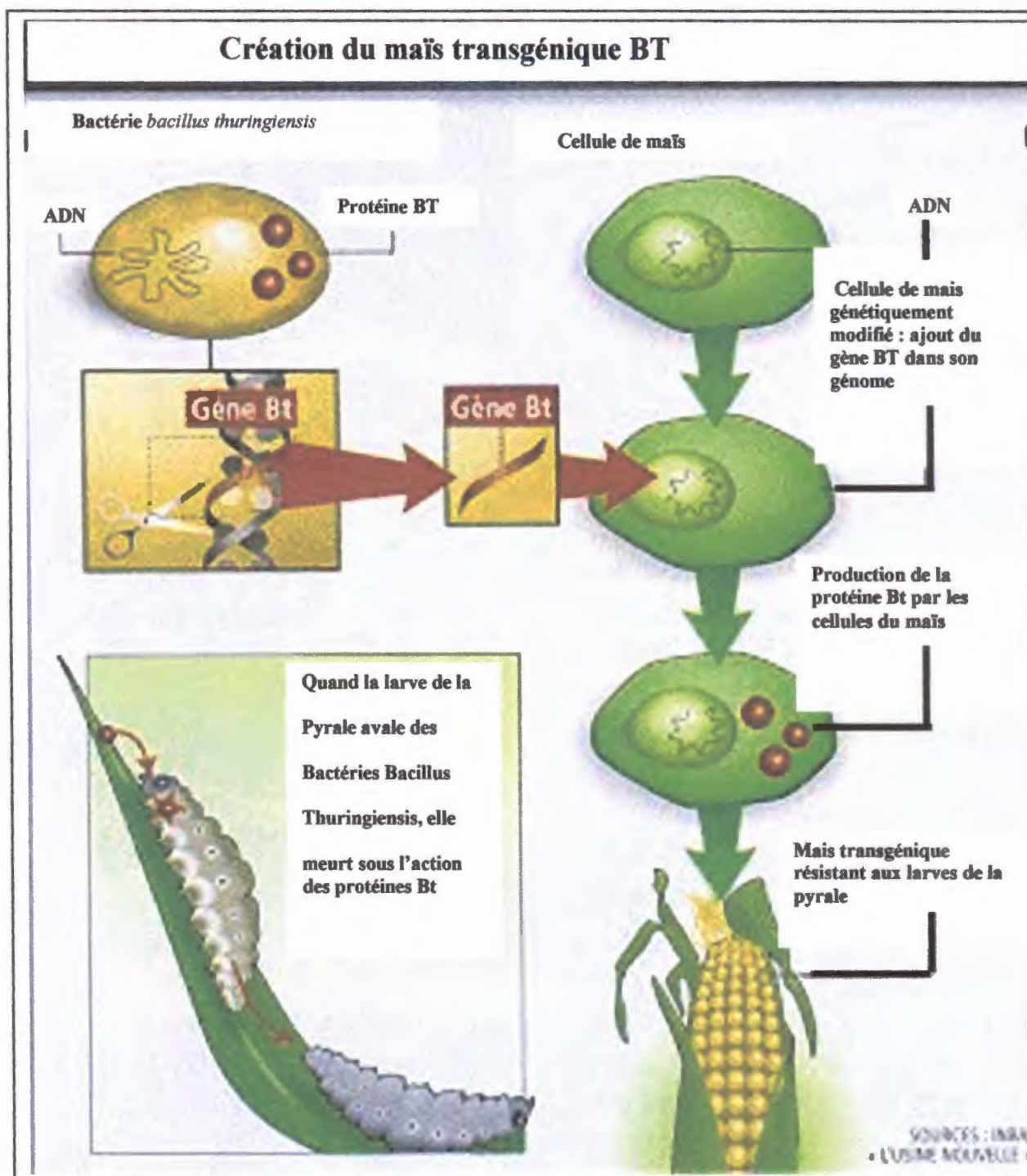


Figure 2. Création du maïs transgénique

II.8.2- Le cas des animaux

Dans le cas des animaux, la situation est moins favorable à la transgénèse que dans celui des plantes. Les raisons sont d'abord qu'on ne dispose pas encore couramment de cellules totipotentes, qui facilitent grandement la transgénèse, ensuite que les animaux possèdent des systèmes de défense et de régulation plus élaborés et moins plastiques que ceux des végétaux, enfin que l'acceptation par la société de la transgénèse animale est encore plus loin d'être acquise que chez les plantes. De ce fait, les recherches menées dans ce domaine conservent un caractère relativement fondamental, ou s'orientent plutôt vers la production de molécules à forte valeur ajoutée à des fins pharmaceutiques. Toutefois des applications zootechniques sont également explorées, comme la surexpression de l'hormone de croissance, la résistance génétique à des agents infectieux ou l'amélioration de la qualité des produits, notamment dans le cas du lait destiné aux nourrissons. À l'heure actuelle, la seule homologation d'un produit animal obtenu par transgénèse concerne la somatotrophine bovine, hormone utilisée aux Etats-Unis pour accroître la production de lait.

L'addition d'un gène à un organisme entier consiste à lui ajouter une information génétique nouvelle et donc essentiellement à lui conférer un caractère phénotypique nouveau. À l'inverse, il est également possible d'inactiver un gène et ainsi de supprimer une information génétique spécifique. Plus subtilement, il est souhaitable dans certains cas de remplacer un gène fonctionnel par une autre version de ce gène plus ou moins mutée ou par un autre complètement différent. Les techniques pour atteindre ces buts sont disponibles depuis dix ans chez la souris et en partie seulement chez les animaux domestiques. Le transfert de gènes chez la souris est un outil essentiel pour la compréhension des phénomènes en cause dans les affections du type de la «maladie de la vache folle». Il a notamment permis de démontrer le rôle-clé joué par une protéine normale de l'hôte, la «protéine de prion» ou PrP, dans la genèse de la maladie, dans la propagation de l'agent infectieux responsable (ou «prion»), et dans la barrière d'espèce. Il a ainsi rendu possible l'obtention de souris transgéniques parfaitement insensibles à l'agent, ou à l'inverse, de souris présentant une sensibilité accrue à des prions touchant l'homme et diverses espèces animales, ce qui facilite leur détection et leur identification [28]. Les prions, agents responsables des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST), ont des propriétés biologiques et physico-chimiques très singulières qui en font une catégorie vraiment à part dans le règne des micro-organismes pathogènes. Ils induisent des maladies strictement neurologiques, d'allure dégénérative et inéluctablement mortelles, qui se déclarent après une longue période d'incubation cliniquement silencieuse. Ils provoquent chez l'homme quatre maladies, dont la maladie de Creutzfeldt Jacob (MCJ) et le Kuru, et chez les animaux, la

Tremblante du mouton et l'Encéphalite spongiforme bovine (ESB), ou maladie de la vache folle [29]. L'introduction par transgénèse de gènes présentant un intérêt économique ou environnemental chez certaines espèces de poissons a donné lieu à de nombreux travaux chez les poissons d'élevage. Parallèlement, cette technique est couramment mise en oeuvre pour le développement de modèles biologiques dans le but d'étudier la régulation de l'expression de gènes ou de fonctions biologiques [30].

IV.8.3- Le cas des microorganismes

En ce qui concerne les microorganismes, la transgénèse aide, d'une part à mieux comprendre leur fonctionnement, d'autre part à essayer de les améliorer pour qu'ils soient plus utiles à l'homme. Elle permet par exemple d'inactiver certains gènes et donc d'obtenir des informations sur le rôle de la protéine pour laquelle ils codent. Elle permet d'introduire plusieurs copies d'un même gène dans un microorganisme et donc d'accroître une fonction qu'il possédait déjà. Il est aussi possible de transférer les gènes d'un microorganisme dans un autre et donc de modifier les capacités de ce dernier, par exemple d'augmenter sa capacité de résistance à des virus bactériophages, ou à différents stress, ou encore de développer ses propriétés aromatisantes.

Des levures alimentaires transgéniques sont aussi utilisées pour produire des protéines hétérologues comme la chymosineA, enzyme de la présure utilisée pour la coagulation du lait en fromagerie. En effet, à la suite d'une pénurie croissante de présure de veau, on recherche depuis une vingtaine d'années des succédanés de présure utilisables industriellement. Le gène de la chymosineA a été cloné dans la levure laitière *Kluyveromyces lactis*, qui l'exprime, puis cette chymosine a été utilisée dans plusieurs pays (États-Unis, Grande-Bretagne, Japon...), mais pas en France, pour fabriquer différents fromages. Les résultats obtenus avec de la chymosine produite par la levure transgénique sont identiques à ceux observés avec la présure de veau. Les techniques de purification de l'enzyme sont telles que les préparations commerciales de celle-ci ne renferment pas de levures transgéniques, qui ne seront donc pas retrouvées dans le fromage. [31].

Les bactéries lactiques sont utilisées en agro-alimentaire pour de nombreuses productions : fromages, yaourts, charcuteries, salaisons...Le choix des souches s'effectue en fonction du type de production suivant différents critères plus ou moins bien définis. Pour les souches utilisées en fermentation laitière, on trouve les propriétés d'acidification, de protéolyse, de résistance aux bactériophages (virus bactériens) et la reproductibilité de la croissance. Une

souche ne possède pas, à elle seule, toutes les propriétés requises et un mélange de souches, ou ferment mixte, est généralement nécessaire. Cependant, un ferment, même soigneusement sélectionné, peut perdre ses qualités. Le matériel génétique d'une souche peut, naturellement, être remanié ou en partie perdu. De plus, la composition d'un ferment mixte peut changer si les conditions de conservation sont plus favorables à la survie de certaines souches. L'approche génétique peut offrir une alternative aux méthodes traditionnelles pour mieux comprendre le rôle des bactéries dans la fermentation et répondre à certains des problèmes rencontrés en production. Depuis une quinzaine d'années, le laboratoire de génétique microbienne s'est plus particulièrement intéressé à la bactérie lactique *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) et à son génome [32].

Les contacts avec des industriels de l'agro-alimentaire montrent leur intérêt pour l'utilisation de souches génétiquement modifiées mais aussi leur crainte à propos des réactions des consommateurs. Par nos achats, nous marquons notre satisfaction ou notre désapprobation concernant les produits du marché. Il est du devoir des scientifiques d'informer objectivement le consommateur pour qu'il puisse choisir, en connaissance de cause, les produits qu'il désire dans son assiette [33].

II.9 - Risques des OGM

II.9.1- Les risques sanitaires

L'opinion publique voit mal l'intérêt de l'utilisation d'OGM dans l'alimentation et se montre fataliste, d'où une réduction du crédit accordé aux experts. La Conférence de Citoyens d'août 1998, sans préjuger de ses conclusions a largement aidé à retrouver un débat sain, à lever les quiproquos, à concevoir un système de biovigilance adapté, à mettre en œuvre une information fiable et transparente, et à mener une réflexion de fond sur l'évaluation des plantes transgéniques [34].

Le risque d'allergies est plus difficile à évaluer car il n'y a pas actuellement de méthode à notre disposition permettant de prévoir de façon sûre ce risque pour l'homme pour quelque aliment que ce soit. Ainsi, nous avons vu récemment croître en Europe la fréquence d'allergies au litchi, en même temps que croît sa consommation. Quelques critères indirects permettent cependant dans une certaine mesure d'évaluer ce risque d'allergénicité des protéines nouvelles produites (voir le texte «Les aliments transgéniques n'entraînent-ils pas des problèmes d'allergie ?»). On examine notamment leur résistance à la digestion en milieux gastrique et intestinal reconstitués. En milieu gastrique, au bout de quelques secondes (quinze pour la protéine

introduite dans le soja transgénique Round up Ready), de nombreuses protéines sont dégradées et ne sont plus identifiables. En milieu intestinal elles sont également souvent rapidement dégradées en peptides, et cet aspect est contrôlé. Il convient cependant de souligner que les méthodes d'étude *in vitro* le plus souvent utilisées s'écartent sensiblement des conditions physiologiques. On estime qu'une dégradation rapide au niveau gastrique et intestinal est un gage de non risque d'allergénicité.

Les protéines présentant un caractère allergène ont en général quelques caractéristiques communes : elles ont une masse moléculaire comprise entre 10 et 70 KDa, sont présentes en grande quantité dans les aliments, sont stables à la chaleur, au pH, aux protéases et donc stables en milieux gastrique et intestinal. Elles sont aussi souvent glycosylées, toutes caractéristiques que les méthodes actuelles d'investigation permettent de mettre facilement en évidence. Il faut cependant rester vigilants car il existe des exceptions à ces règles. Il est aussi possible de rechercher des analogies de séquences entre la protéine à évaluer et des protéines connues pour leur allergénicité, et répertoriées dans des banques de données. Dans le troisième cas évoqué, lorsque l'équivalence en substance avec un aliment traditionnel ne peut être établie, la salubrité doit être évaluée au cas par cas. Par exemple, dans le cas d'une huile de colza enrichie par transgénèse en un acide gras précis, il suffirait de prendre comme référence une autre matière grasse alimentaire connue, si elle existe, dont la composition en acide gras serait proche de celle de l'huile de colza examinée [35].

Les bactéries présentes dans l'appareil digestif ont la faculté d'intégrer facilement à leur génome les gènes contenus dans les aliments que nous ingérons. Or, de nombreux OGM contiennent des gènes de résistance aux antibiotiques. Sans intérêt pour la plante, ils permettent seulement aux chercheurs de vérifier que la transgénèse s'est bien déroulée. Si ces gènes venaient à se transmettre aux bactéries pathogènes parfois présentes dans le tube digestif, ne serions face à un véritable problème de santé public, car les antibiotiques seraient sans effet sur ces bactéries et nous serions démunis face à de nombreuses maladies. Bien que cette probabilité soit faible, un groupe d'experts de la FAO et de l'OMS a récemment recommandé de renoncer aux techniques de transgénèse qui font appel aux gènes de résistance aux antibiotiques [36]. Un autre point important lié à l'alimentation a été examiné. Dans le cas du maïs transgénique résistant à la pyrale qui vient d'être autorisé à la production en France, certains des nombreux experts, notamment de l'INRA, saisis dans la phase d'examen de cette plante ont dû s'exprimer sur un problème très spécifique. La modification du génome des plantes pourrait également avoir des effets indirects sur la qualité nutritionnelle et sanitaire des aliments. Dans quelle

mesure le gène introduit interfère-t-il avec les autres gènes de la plante, provoquant des effets secondaires imprévus, notamment une modification de la composition et de la valeur nutritionnelle des aliments ? Peu de recherches existent à ce sujet. Cette question se pose également les variétés normales, dites non OGM, en raison des risques de contamination par des plantes OGM [37].

II.9.2- Les Risques environnementales

Le risque écologique principale est sans doute la «pollution génétique », résultat de croisements accidentels entre plantes OGM et plantes sauvages ou cultivées (non OGM) apparentées. La plupart des espèces ont la faculté de se croiser avec des variétés ou des espèces parentes (sauvage ou cultivées). Ce croisement se produit via le pollen, qui emporte avec lui la moitié des gènes de la qui l'a produit. Transporté par le vent ou les insectes, un grain de pollen peut se trouver sur le pistil de n'importe quelle autre plante .si celle -ci est de la même espèce ou d'une espèce parente, la fécondation est possible. La graine issue de cette fécondation donnera naissance à une plante porteuse du gène manipulé. La figure 3 représente la superficie des OGM dans le monde.

C'est ainsi qu'un gène peut s'échapper des parcelles d'essai et polluer les plantes sauvages ou cultivées des environs. Cette contamination se répand progressivement, hors de tout contrôle, au hasard des croisements entre plantes. C'est le pollen transporté par le vent qui voyage le plus loin, pouvant provoquer des contaminations à grande distance- à des dizaines voire des centaines de kilomètre. La pollution transgénique n'a rien à voir avec celle qu'on a connues jusqu'à présent : c'est en effet une pollution dont le contrôle nous échappe totalement, puisque les plantes contaminées ont la faculté de se reproduire et de se multiplier à l'infini. Or, personne n'a le recul nécessaire pour on évaluer les conséquences, et il sera impossible de faire machine arrière si l'on s'aperçoit d'un effet indésirable et imprévu sur l'environnement ou la santé. De même, la contamination rapide d'une plante sauvage, la ravenelle, par du colza transgénique, a démontré la réalité de la pollution génétique en direction des plantes sauvage contaminées par des gènes étrangers qui leur confèrent des propriétés nouvelles ? Il est beaucoup trop tôt pour le savoir, mais de nombreux scientifiques ont exprimé leurs craintes à ce sujet [38].

Ces risques de litiges ne sont pas à négliger : la diffusion du pollen dans l'espace, ou les chutes de graines lors de transports peuvent apporter des plantes transgéniques dans des champs d'agriculteurs n'en ayant jamais cultivé. Si ces «pollutions» créent des pertes financières, qui sera responsable ? On peut souhaiter, pour faciliter les arbitrages et les expertises, que

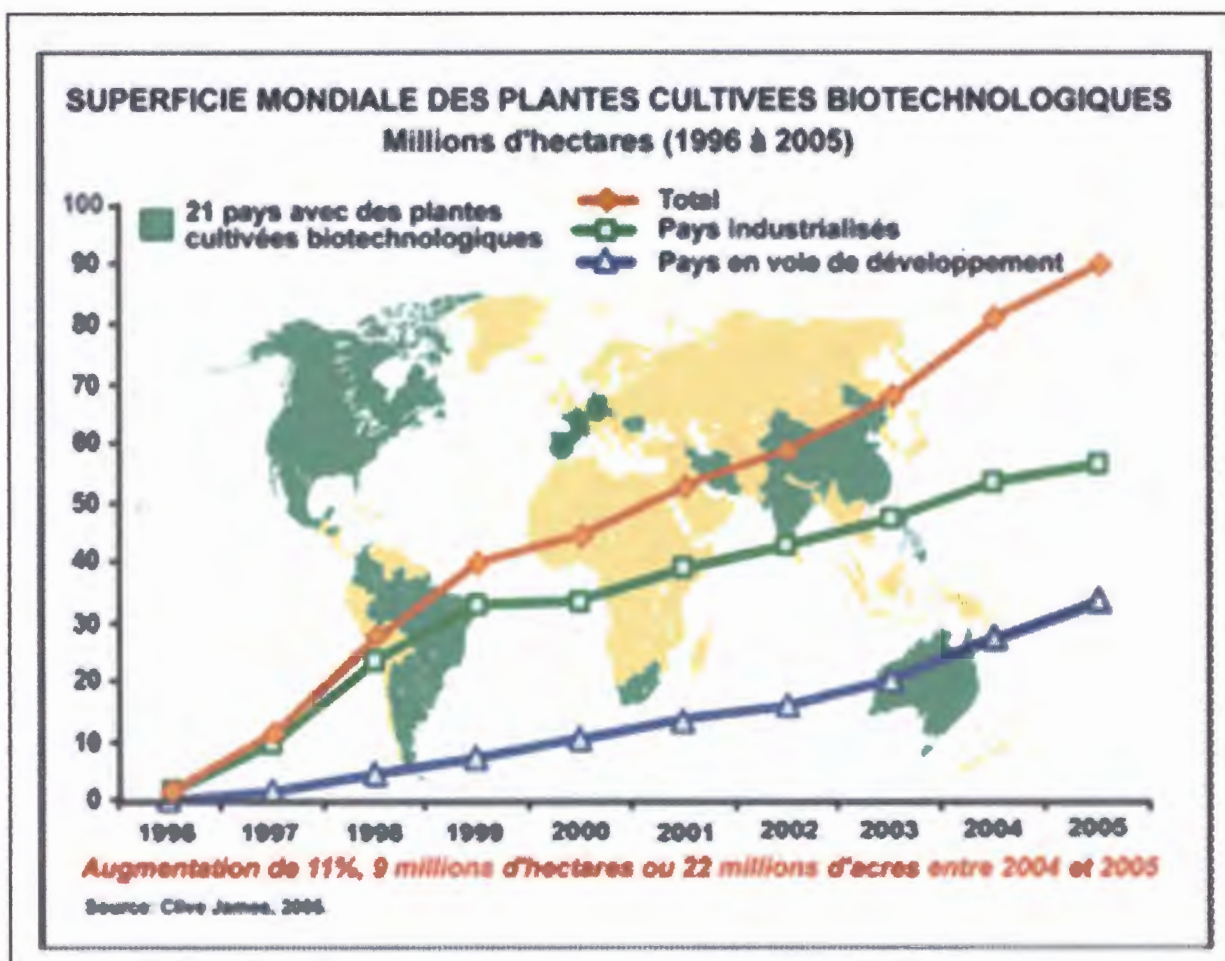


Figure 3. Représentation graphique des superficies des cultures des plantes OGM dans le monde.

l'enregistrement soit rendu obligatoire pour les pratiques agricoles associées à l'utilisation et à la maîtrise de la dissémination des plantes transgéniques. Une obligation d'enregistrement des pratiques dans un dossier administratif pourrait aider à la prise de conscience, par les agriculteurs, des risques associés à l'emploi de variétés transgéniques, mais aussi faciliter la mise en place, par les pouvoirs publics et les chercheurs, d'observatoires de suivi de la diffusion des transgène dans l'environnement [39]. La peur de consommateur de ces nouveaux problèmes impose un système de traçabilité plus fiable basée sur l'analyse de l'ADN (PCR). Considéré comme une solution miracle. Pour mieux comprendre cette technique on la détaillé dans le chapitre suivant.

Chapitre III :
Polymerase chain reaction
(PCR)

III.1- Introduction

La Biologie Moléculaire s'est édifiée sur près de cinq décennies de découvertes ininterrompues. Début 1953, Wilkins biophysicien et Franklin montrèrent que les images de cristaux d'ADN obtenues par diffraction aux rayons, ont la forme d'hélice; en avril 1953 Watson et Crick révélèrent, à l'aide des rayons x, la structure tridimensionnelle de l'ADN du noyau cellulaire qui fut publiée dans la revue nature en 1958, Meselson et Stahl confirmèrent le modèle de la (double hélice). Le Nobel 1962 fut attribué aux pasteuriens Lwoff, Monod et Jacob pour leurs travaux sur la génétique microbienne et la régulation cellulaire [40]. De 1968 à 1974 la cristallisation délicate de l'ARN_t (de transfert et cytoplasmique) puis la détermination de sa structure tridimensionnelle aux rayons x furent résolues [41].

Les découvertes successives en Biologie Moléculaire depuis près de cinquante ans, ont été liées étroitement aux mises au point de nouvelles techniques analytiques. Puis vint la méthode d'analyse dénommée PCR (polymerase Chain reaction) « *in vitro* » dont la conception revient à Mullis (avril 1983). Cette technique permet progressivement d'amplifier rapidement *in vitro* jusqu'à 10⁸ à 10¹⁰ fois, le fragment d'ADN isolé d'un prélèvement. La société Cetus (USA) en déposa les brevets en mars 1985 et Juillet 1987, les droits furent repris par Hoffmann- Laroche en 1991 qui délivra des licences d'exploitation [42]. Cette méthode de Biologie Moléculaire obtient le prix Nobel de chimie en 1993, Aujourd'hui, ce procédé révolutionnaire couplé à l'utilisation d'ADN polymérase thermorésistante permet d'obtenir, sans clonage, une amplification considérable d'un fragment donné d'ADN.

III.2- Concept et étapes de la PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) a profondément marqué la Biologie Moléculaire. Cette réaction est simple à réaliser et permet d'amplifier séquence d'ADN spécifique un nombre considérable de fois [43]. Est une méthode pour copier des séquences spécifiques de nucléotides d'un ADN (ou d'ADN par une version modifiée du processus). Comme le montre la figure 4.

La réplication répétée d'une séquence donnée (l'amplicon : habituellement < 2 kb) fabrique des millions de copies en quelques heures. La méthode repose sur la capacité qu'une ADN polymérase d'allonger une amorce sur un brin matrice qui comprend l'amplicon [44]. Cette réaction consiste à la simplification exponentielle d'un fragment d'ADN (figure 5), dont les séquences délimitant ses extrémités sont connues, en utilisant 2 types d'amorces (oligonucléotide) longue de 17 à 30

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

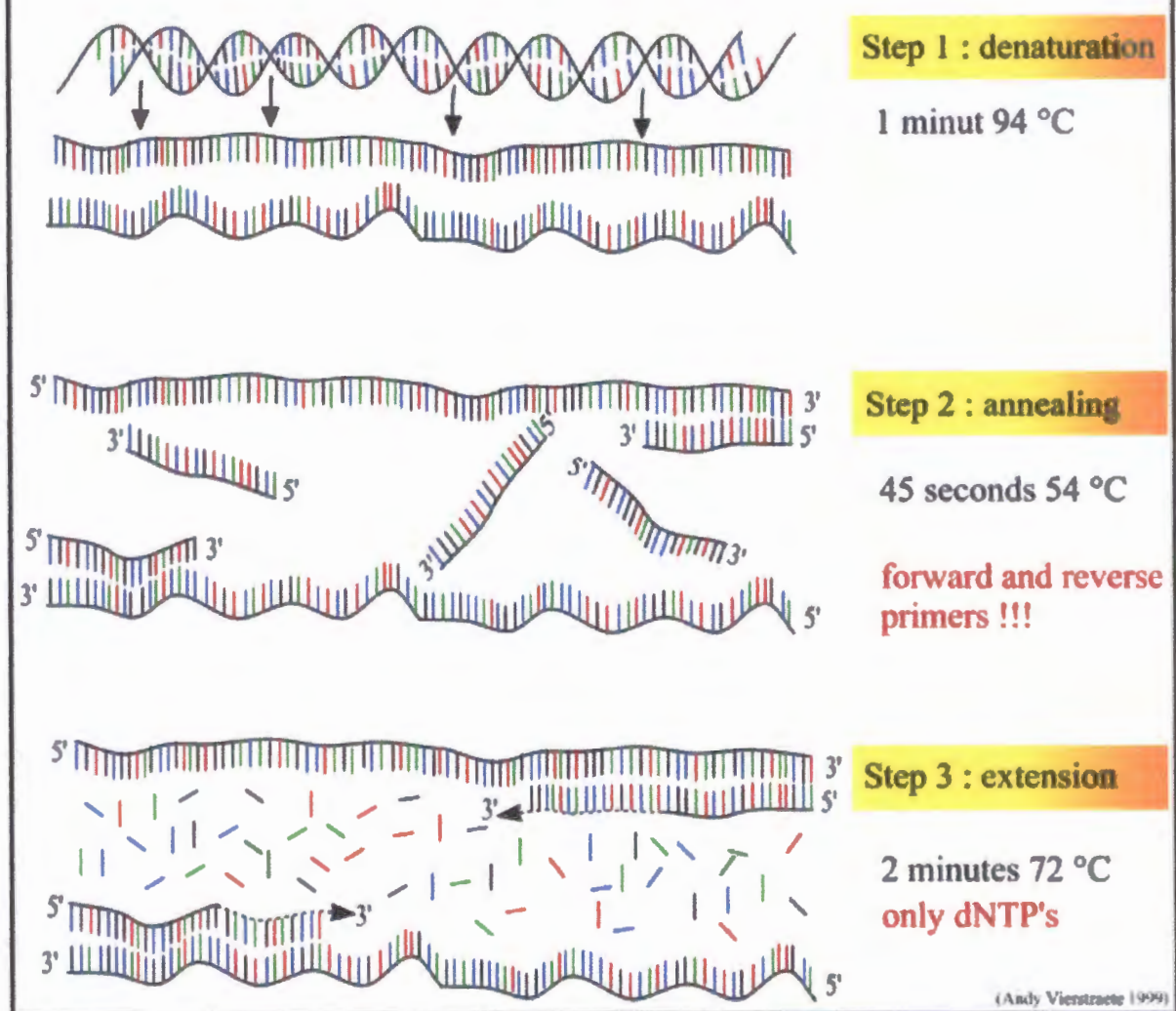


Figure 4. Schéma explicatif du mécanisme de PCR

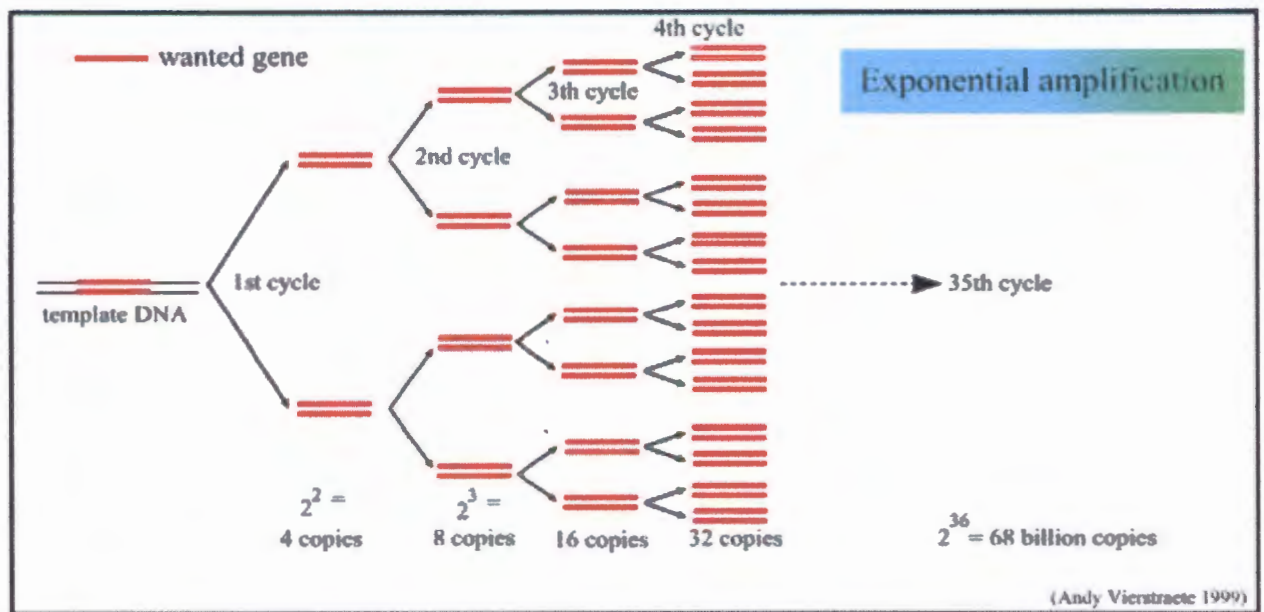


Figure 5. Amplification de l'ADN cible par PCR (augmentation exponentielle des Amplicons)

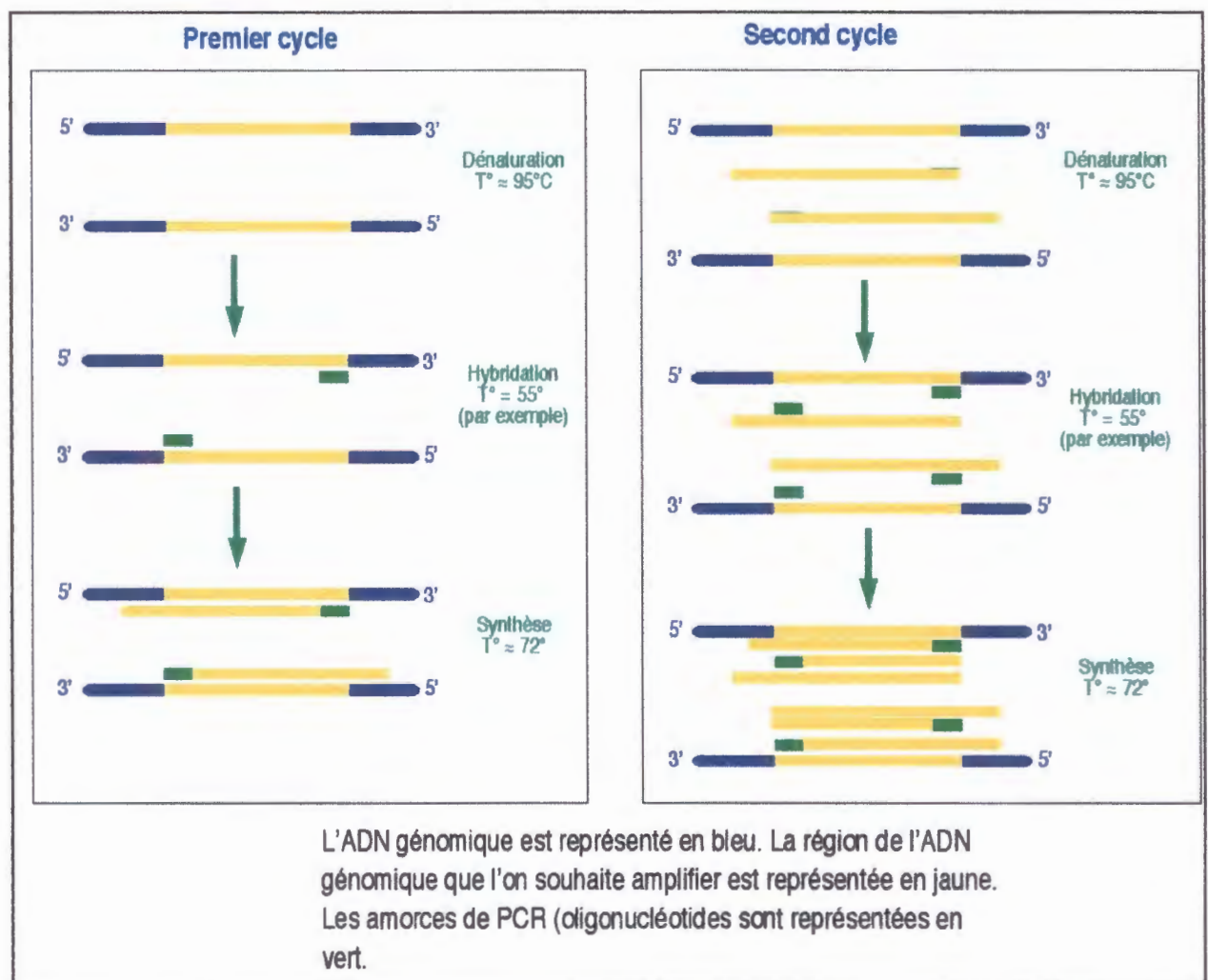


Figure 6. L'amplification d'une séquence d'ADN génomique au cours de deux premiers cycles de PCR

nucléotide qui encadrent la séquence à amplifier après qu'il ait été dénaturé, et elles sont orientées de telle sorte que l'ADN polymérase synthétise la région d'ADN qu'elles encadrent la réaction d'élongation crée 2 régions cibles double brin qui peuvent chacune être dénaturée, puis servir d'un deuxième cycle d'hybridation et d'élongation le 3^{ème} cycle produit 2 molécules double brin qui contiennent exactement la région cible. La répétition des cycles de dénaturation thermique, hybridation d'amorces et élongation conduit rapidement à l'accumulation exponentielle du fragment d'ADN ciblé. Prés 22 cycles, on s'attend théoriquement à une amplification de 106 fois environ et des implications de cet ordre sont effectivement obtenues en pratique. A un cycle donné (figure 6), la quantité d'ADN dépend donc du nombre initial de matrices. En revanche, quelque soit sa concentration initiale, il est théoriquement possible d'obtenir n'importe quelle quantité en ajustant le nombre de cycles. La PCR est donc régie théoriquement par la loi :

$$[\text{ADN}]_{\text{cycle}} = [\text{ADN}]_{\text{initiale}} \times E^n$$

Mais la PCR est une réaction enzymatique complexe. Le produit est identique au substrat et peut venir inhiber l'enzyme, mais surtout, les réactifs secondaires (amorces, dNTP) peuvent commencer à manquer. La PCR ne peut donc avoir une loi d'amplification exponentielle tant que l'ADN matrice est le seul facteur limitant. La réaction devient ensuite imprédictible et il est alors impossible de pouvoir comparer plusieurs échantillons entre eux sans biais quantitatif plus ou moins significatif, il est important de bien comprendre les différentes phases d'une cinétique de PCR [45]. Comme indique la figure 7 et 8.

III.2.1- Dénaturation

Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de chauffage (généralement 10 à 15 minutes à 95°C) est réalisée. Cette étape (1 sur la figure 9) permet de : déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérases de type (Hot Start), de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution (transcriptase inverse, uracil N-glycosylase) [46]. Dans le protocole original de la méthode c'est l'ADN polymérase d'E. coli (Klenow) qui était utilisée et du fait de l'étape de dénaturation thermique, il fallait renouveler l'enzyme à chaque cycle – un progrès important vint de l'utilisation de l'ADN polymérase Taq [47-48]. Provenant de la bactérie thermophile *thermus aquaticus*. L'ADN polymérase Taq résiste aux températures élevées et ne doit pas être renouvelée pendant la PCR [43 – 49], De plus la possibilité

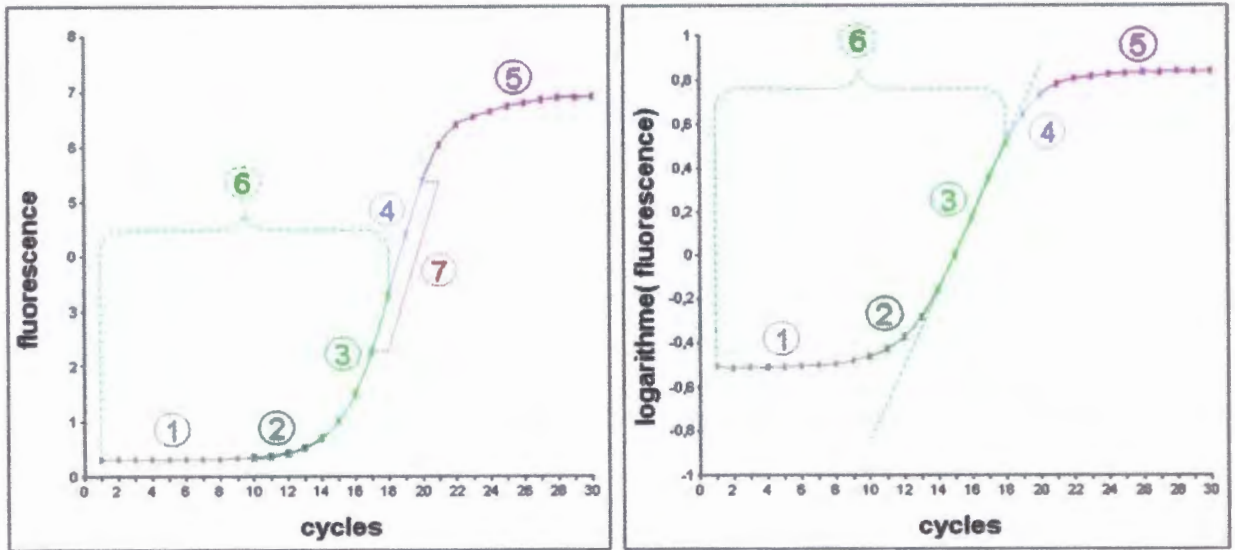


Figure 7. La cinétique mesurable d'une PCR

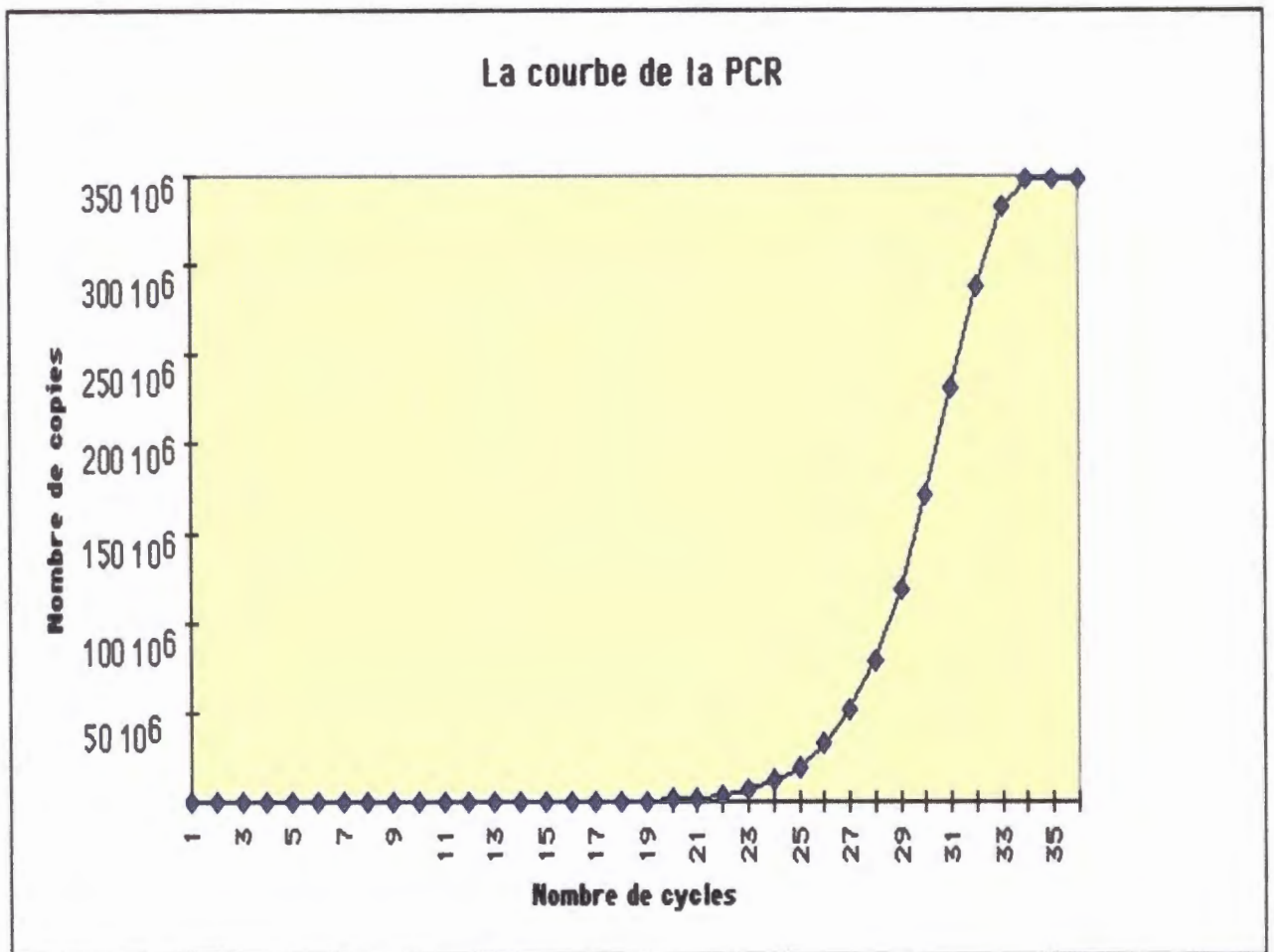


Figure 8. Courbe d'une PCR

d'effectuer l'élongation à haute température accroît la spécificité d'hybridation de l'amorce. Par conséquent grâce à l'utilisation d'une enzyme thermostable, la PCR a pu être automatisé très simplement en effectuant la réaction dans un bloc chauffant doté d'un système de programmation de cycles thermiques.

III.2.2- Hybridation

Cette étape (2 sur la figure 9) généralement 2 à 60 secondes à 56-64°C permet aux amorces sens et antisens de s'hybrider aux ADN matrice grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Peu de brins d'ADN matrice peuvent s'hybrider avec leur brin complémentaire, ce qui empêcherait la fixation des amorces, car ces dernières sont bien plus court et en concentration bien plus importante.

III.2.3- Elongation

Cette étape (3 sur la figure 9) généralement 4 à 120 secondes à 72°C permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTP libres présents dans le milieu réactionnel, la durée de cette étape dépend normalement de l'amplicon.

III.3- Les facteurs clé pour la réussite d'une PCR

III.3.1- Amorces

Les amorces de la PCR doivent être de 18-30 nt de long et avoir des contenus similaires G+C afin qu'elles puissent s'annealer sur des brins opposés de la séquence cible de sorte qu'elles puissent être allongées les unes vers les autres par l'addition de nucléotides à leur extrémité 3', les séquences cibles courtes s'amplifient. Plus facilement, souvent cette distance est inférieure à 500pb mais, avec l'optimisation, la PCR peut amplifier des fragments de plus de 10kb de long. Si la séquence d'ADN à amplifier est connue, la conception de l'amorce est alors relativement facile.

Les régions à amplifier doivent être inspectées pour 2 séquences appropriées d'environ 20 nt avec un contenu similaire en G+C, à chaque côté de la région à amplifier. Si le produit de la PCR doit être cloné, il est important d'inclure la séquence des sites d'enzymes de restriction uniques à l'intérieur de l'extrémité 5' des amorces. Si la séquence de l'ADN de la cible n'est pas connue, par exemple lorsqu'on essaie de cloner l'ADN pour une protéine pour laquelle il n'existe que certaines

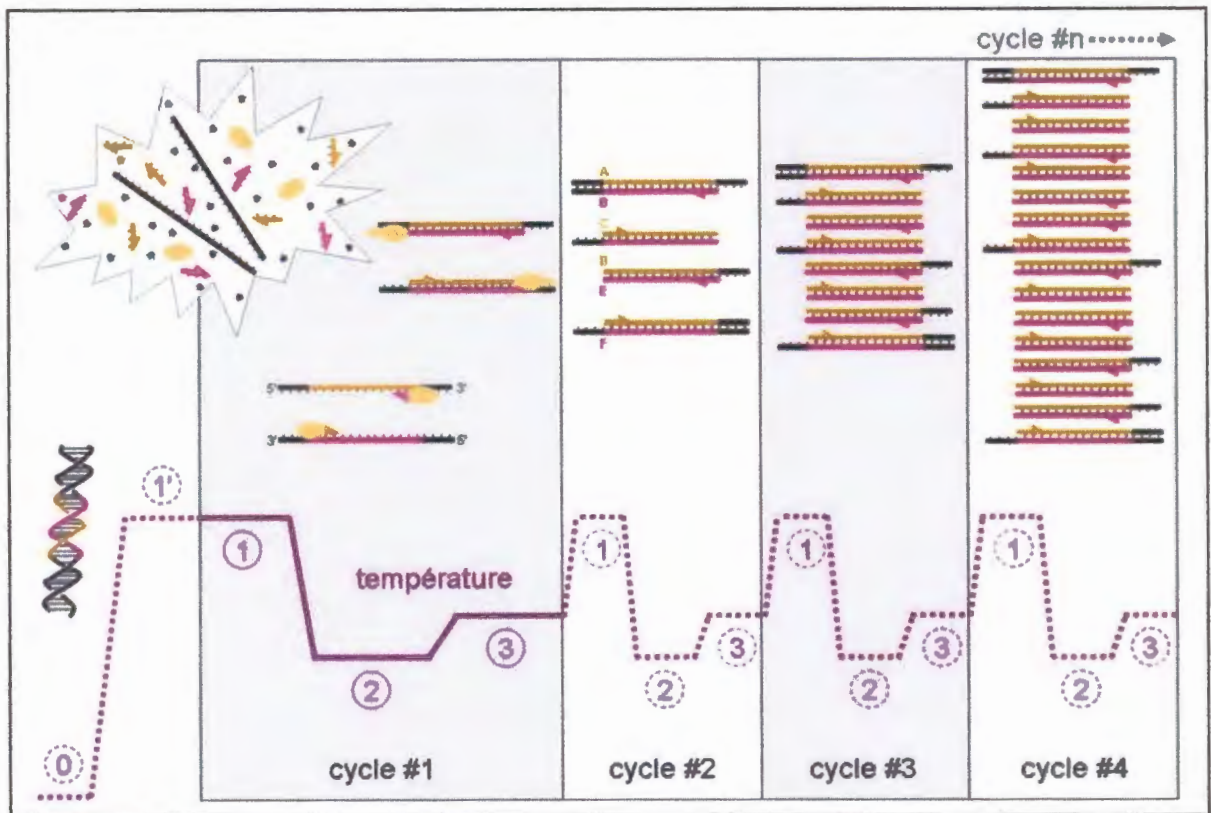


Figure 9. Evolution de la température et de la synthèse des différents brins d'ADN au cours des quatre premiers cycles de PCR. Chaque cycle est constitué de trois phase successives (1,2 et3)

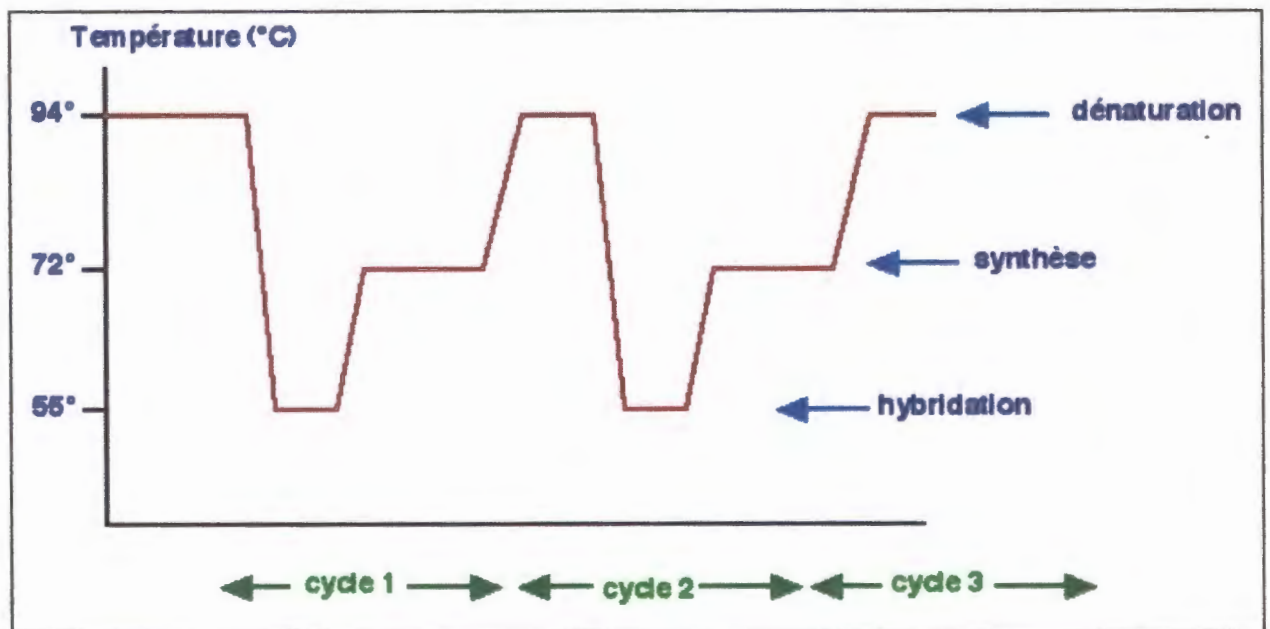


Figure 10. Evolution de la température au cours des cycles de 1

ADN polymérase	Source
Tma	Thermotogamartima
Deep Vent™	Pyrococcus sp
Tli	Termococcus litoralis
Pfu	Pyrococcus furiosus
Pwo	Pyrococcus Woesi

Tableau 4. Source d'ADN polymérase thermostable possédant une activité éditrice (exo nucléase de 3' vers 5')

Substances	Quantité et concentrations
ADN génomique	0.1-1µg
Amorce 1	20 picomole
Amorce 2	20 picomoles
Tris- Hcl pH 8.3 (à 20°C) 20mM	20mM
Mgcl ₂ 1.5 mM	1.5 mM
Kcl 25 mM	25 mM
DNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).	50mM chacun
Taq polymérase 2 unités	2 unités



Tableau 5. Mélange réactionnel d'une réaction de PCR d'ADN génomique humain.

séquence d'acide aminé, la conception de l'amorce est plus difficile. Pour cela les amorces dégénérées sont conçues en utilisant le code génétique pour travailler en dehors de ce que les séquences de l'ADN devraient encoder à la séquence connue de l'acide aminé [50].

III.3.2- L'ADN Matriciel

Vu qu'on peut atteindre une extrême amplification, il a été démontré que la PCR peut quelque fois amplifier une molécule d'une matrice de départ. Donc toute source d'ADN qui fournit au moins une molécule cible peut en principe être utilisée comme matrice pour la PCR. Cela inclut l'ADN préparé à base de sang, de sperme ou de tout autre tissu, d'anciens spécimens médico-légaux de vieux échantillons biologiques ou de la laboratoire à partir de colonies bactériennes ou de plaques de phage. Ainsi que l'ADN purifié quelle que soit la source de l'ADN matriciel, la PCR peut uniquement être appliquée si certaines informations concernant la séquence sont connues de sorte que les amorces soient conçues [51].

III.3.3- ADN polymérase

Une polymérase constitue-t-elle un composant clé de la PCR. La Taq polymérase est une enzyme de ce type. Elle provient de *Thermus aquaticus* une bactérie des sources chaudes, dont l'optimum de croissance est d'environ 66-75°C, une forme modifiée, recombinante de cette enzyme, le fragment de Stoffel, est un peu plus thermostable que l'enzyme d'origine. Cependant aucune de ces enzymes n'a pas d'activité exonucléotique (3'-5'), c'est à dire qu'aucune ne peut cliver des nucléotides à partir de l'extrémité, toutes sont donc incapables de correction d'épreuve, ce qui a son importance pour certains usages : par exemple, lorsque il faut séquencer les produits de la PCR. Dans ces cas là, il est nécessaire de répliquer l'amplicon avec un maximum de fidélité.

Aujourd'hui, il existe une grande variété d'enzymes disponibles dans le commerce pour la PCR, certaines atteignent de très hauts niveaux de thermo stabilité et / ou de capacité de correction d'épreuve. Par exemple, la polymérase Pfu ultra TM (stratagène), tirée de l'archéobactérie, *Pyrococcus furiosus* est une enzyme très thermostable et de haute fidélité elle contient un facteur qui la préserve de l'empoisonnement par la DUTP, propre aux polymérases archaébactériennes (due à la désamination ou de la DCTP au cours de la PCR). Le tableau 4 donne quelques ADN polymérases et leurs sources.

III.3.4- Température de la réaction

Une PCR commence généralement par un démarrage à chaud « hot START » cela veut dire que l'ADN polymérase est ajoutée après l'étape de dénaturation thermique du premier cycle à une température correspondant à celle de l'hybridation voire supérieure à celle-ci, et juste avant l'étape d'hybridation. Le démarrage à chaud évite le problème qui pourrait résulter de l'addition de l'ADN polymérase quand le mélange réactionnel se trouve à une température plus basse. En effet, à des températures inférieures à la température d'hybridation de l'amorce (typiquement entre 45 et 60°C), des appariements incorrects peuvent se produire et amorcer l'élongation par la polymérase. De telles élongations stabilisent l'interaction de l'amorce avec des séquences non désirées, une fois incorporée dans l'ADN synthétisé pendant le premier cycle, l'amorce sera hybridée efficacement dans les cycles suivants, avec comme conséquence l'amplification d'un produit parasite. Une autre approche consiste à rendre la polymérase inactive à température ambiante, par exemple en utilisant des anticorps contre la polymérase qui s'élève [52], ou encore à utiliser l'ampli Taq GOLD™, une polymérase Taq modifiée qui n'est active qu'après chauffage à 95°C.

Une autre manière d'inactiver l'ADN polymérase Taq à température ambiante est la méthode selex « systematic evolution of ligands by exponential enrichment » dans les quelles la polymérase est inactivée réversiblement par son interaction avec des quantités nanomolaires d'oligonucléotide qui n'est qu'un piètre substrat pour la polymérisation et n'interfère pas avec les amorces d'amplification [53]. Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. L'étape de dénaturation est réalisée à environ 95°C, pour une dissociation complète des deux brins d'ADN. Selon la figure 10. L'étape d'Hybridation se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces (cette température varie de 50 à 60°C), cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces/ matrice est réalisé. L'étape de polymérisation est d'environ 72°C, température de « travail » de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée, au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées.

III.3.5- Tampons

Le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le PH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase (Tris HCl à PH basique 8.5 à 9). Il contient des cations bivalents Mg^{2+} , cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation avec la Taq polymérase. La présence dans le milieu réactionnel des cations bivalents Mg^{2+} et de cation monovalents (K^+ ou NH_4^+) vont neutraliser les charges négatives des groupement phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN/ ADN. En pratique, la concentration en sel doit cependant rester compatible avec l'activité de l'ADN polymérase. Le mélange réactionnel est préparé dans un tube, puis placé dans un bloc chauffant doté d'un système de programmation de cycle thermiques (chauffage/ refroidissement. En prend comme exemple le mélange réactionnel type pour l'amplification par PCR d'une séquence d'ADN génomique humain qui montré dans le tableau 5 (le volume réactionnel est de 100 μ l).

III.4- Les différents types de PCR

Il existe nombreuses variantes de la PCR à la base des technologies de l'ADN recombinant parmi elles on peut citer : la PCR emboîté qui utilise la stratégie des amorces emboîtées, les produits d'une première PCR utilisé comme substrats dans une seconde amplification par PCR dans les quelle les amorces (ou l'une d'entre elles) s'hybrident à des sites internes de la séquence amplifiée par la première PCR. Comme la probabilité est faible que des produits parasites contiennent des séquences. Susceptible de s'hybrider avec la d'euxième paire d'amorces, la PCR avec amorces emboîtées amplifie sélectivement l'ADN d'intérêt [54].

La PCR asymétrique dans ce procédé, une des deux amorces est ajoutée à concentration beaucoup plus faible que l'autre (rapport 1 :50 par exemple) et sera donc épuisée après quelques cycles l'abondance de l'autre amorce, cependant, permet qu'un des brins de l'échantillon d'ADN double brin soit copie un nombre significatif de fois cette méthode est utilisé pour fabriquer de l'ADN simple brin en vue de séquençage ou comme sonde [44]. LA TAIL- PCR (thermal asymmetric interlaced PCR) qu'il s'agit d'un protocole complexe alliant les principes de la PCR emboîtée de la PCR enzymatique par le T_m des amorces Le but est d'obtenir un amplicon finale spécifique d'une séquence d'ADN dont seule une extrémité est connue généralement dans l'optique de pour la marche sur chromosome ou la caractérisation des séquences variables des

immunoglobulines [55]. Et on distingue aussi la PCR Multiplexe qui est un protocole destiné à amplifier plus d'un amplicon à la fois, il est également possible d'amplifier différents types d'ADN reconnus par un même couple d'amorces, tels les mimics [56]. Enfin on cite d'autre type : PCR Touchdown, PCR sur colonie, LA- PCR, PCR in situ, TP- PCR et RT- PCR. Notre étude concerne l'identification et la détection des OGM dans les produits agroalimentaires qui basé sur la PCR quantitative.

III.4.1- PCR quantitative

III.4.1.1- En temps réel

Pour de nombreuses applications de la PCR, il est important de pouvoir estimer la quantité de matériel de départ. Théoriquement, il y a une relation directe entre la quantité de produit formé après un nombre donné de cycles de réaction. En pratique, on constate que les cycles successifs ont des rendements variables, ce qui rend l'estimation théorique peu fiable [57-58]. Higuchi et al (1992, 1993) furent les premiers à mesurer la quantité des produits de PCR au fur à mesure de leur accumulation en utilisant le bromure d'éthidium. L'amplification produite des quantités croissantes d'ADN double brin qui fixe le bromure d'éthidium, ce qui s'accompagne d'une augmentation de la fluorescence. En mesurant l'augmentation de la fluorescence produite par chaque cycle de réaction, il est possible d'analyser la cinétique de la PCR en temps réel, ce qui est beaucoup plus satisfaisant que de mesurer le produit accumulé Après un nombre déterminé de cycles. Le principal inconvénient de l'utilisation de bromure d'éthidium est que les produits non spécifiques génèrent aussi un signal. C'est pourquoi une méthode basée sur l'utilisation de sondes a été développée pour mesurer l'accumulation du produit [59].

III.4.1.2- PCR en point final

Ce terme est apparu en opposition à la PCR en temps réel il désigne toutes les tentatives de quantification à partir du produit final d'une réaction de PCR [60].

III.4.1.3- PCR compétitive

Cette méthode permet de doser la quantité d'une séquence d'intérêt ou séquence cible au sein d'un échantillon biologique contenant une quantité totale et connue d'ADN. Le principe consiste à amplifier par PCR, conjointement et concurremment, des quantités croissantes de séquence cible et une quantité fixe et connue d'une séquence étalon ou séquence standard. Cette

séquence standard correspond à la séquence cible, en générale clonée dans un plasmide, et détectée ou augmentée d'une vingtaine de paires de bases. Les amorces d'amplification sont donc les même et les quantités finales d'amplimeres ne dépendront que des quantités initiales respectives de séquence cible et standard, faciles à séparer sur un gel d'électrophorèse en polyacrylamide du fait de la variation de longueur de ces deux séquences. Il suffit alors de repérer le puit de migration ou les quantités d'amplimeres sont égales, pour estimer la quantité de séquence cible dans l'échantillon, par la connaissance de la quantité de séquence standard co-amplifiée. Une simple règle de trois permettra de déterminer la quantité totale de séquence d'intérêt contenues soit dans le volume total d'échantillon biologique étudié, soit rapportée par génome de l'espèce transgénique. Bien évidemment, cette technique exige une bonne standardisation afin définir des quantité d'ADN standard susceptibles d'encadrer avec précision la valeur de la dose de séquence cible.

III.5- Application de la PCR

Après le succès de jurassique Park, pratiquement tout le monde est conscient des applications potentielles de la PCR dans les domaines de la paléontologie ou de l'archéologie. D'autre méthode de réaction en chaîne qui pourraient produire des résultats équivalents a ceux de la PCR ont été décrites, mais jusqu'à présent aucune n'est utilisée de façon aussi universelle [61]. dans nombre d'application de la PCR à la manipulation de gènes, l'énorme facteur d'amplification n'est qu'un objectif secondaire par rapport à la modification de la séquence amplifiée. Cette modification consiste souvent à introduire des séquences supplémentaire aux extrémités de l'ADN amplifier. Les domaines d'applications des techniques PCR sont variables mais nous avons intéressé par l'application du PCR dans la traçabilité des produits agroalimentaire contenant des OGM.

Chapitre IV :
Traçabilité Moléculaire des
OGM

IV.1- Introduction

Plusieurs événements récents se sont succédés depuis la fin de l'année 1996 à propos de la détection et de l'étiquetage des OGM : le premier en date, novembre 1996, concerne l'arrivée sur le marché français de cargaisons de Corn Gluten Feed en provenance des USA; le deuxième concerne la recommandation parue au Journal Officiel du 2 février 1997 pour l'étiquetage de produits contenant des OGM; le troisième concerne le règlement européen "Novel Food" en vigueur depuis le 15 mai 1997. Ces événements sont à l'origine d'une demande du ministère de l'agriculture de mettre au point, dès que possible, une méthode de détection de la présence d'OGM dans les produits transformés de maïs, en l'occurrence le Corn Gluten Feed (CGF), arrivés dans des ports français [62].

IV.2 - Réglementation sur l'étiquetage et la traçabilité des OGM

IV.2.1- La réglementation en matière de traçabilité

La traçabilité peut être définie comme la capacité de retracer le cheminement des OGM et des produits dérivés, à tous les stades de leur mise sur le marché, tout au long des chaînes de production et de distribution, rendant ainsi le contrôle plus aisé et maintenant également la possibilité de retirer des produits du marché en cas de nécessité. L'obligation de traçabilité est destinée à faciliter l'étiquetage précis du produit final et à donner les moyens de vérifier et de contrôler les indications figurant sur les étiquettes. La traçabilité sur les OGM a été introduite en termes généraux dans la législation communautaire par la directive 2001/18/CE qui impose aux Etats membres de garantir la traçabilité à tous les stades de la commercialisation des OGM.

Cependant, la directive 2001/18/CE ne fournit ni la définition de cette notion, ni les objectifs qui s'y rattachent, ni les modalités complètes de sa mise en œuvre. Actuellement, une nouvelle règle sur la traçabilité des OGM a été adoptée par l'Union Européenne et les Etats membres, le 22 juillet 2003. Elle s'applique à tous les OGM, qu'ils soient destinés à l'alimentation humaine ou animale. Elle prévoit l'obligation de conserver et de transmettre, par les exploitants, les informations sur les produits qui contiennent des OGM ou qui sont fabriqués à partir d'OGM, à chaque étape de la mise sur le marché. Les informations relatives à la présence d'OGM doivent être transmises tout au long de la chaîne commerciale et conservée pendant 5 ans. Ainsi, la transmission et la conservation de ces informations limiteront les besoins d'échantillonnage et d'essai des produits. De plus, elle limite la perte d'informations spécifiques attachées aux produits lors des traitements successifs qu'ils subissent.

IV.2.2- La réglementation en matière d'étiquetage

L'adoption du nouveau règlement CE/1829/2003 et du règlement CE/1830/2003 ont permis l'abrogation d'un certain nombre de règlements dont vous trouverez un rappel ci-dessous. Le règlement fondateur européen 258/97/CE dit "nouveaux aliments" (Novel foods) rendait obligatoire l'étiquetage des aliments génétiquement modifiés, ainsi que les produits dérivés d'OGM ayant été produits à partir de ceux-ci, dès lors que le produit n'est pas équivalent en substance. L'obligation d'étiquetage a été étendue par le règlement 1139/98/CE, avec une obligation d'étiqueter les aliments et ingrédients fabriqués à partir du maïs Bt et de fèves de soja, dont la commercialisation avait été autorisée avant l'entrée en vigueur du règlement "Novel Foods". Deux mentions obligatoires sont prévues: produit à partir de soja/maïs génétiquement modifié et les produits contiennent des [ingrédients] fabriqués à partir de soja/maïs génétiquement modifié. La directive 2001/18/CE prévoit que les Etats membres prennent toutes les mesures nécessaires pour garantir, à tous les stades de la mise sur le marché, l'étiquetage des OGM mis sur le marché en tant que produits ou éléments de produits. Le règlement 49/2000/CE concernait la présence accidentelle de matériel génétiquement modifié dans les denrées alimentaires classiques. Il a été fixé un seuil minimal de 1 % de présence accidentelle d'ADN ou de protéines résultant d'une modification génétique dans les denrées alimentaires au-dessus duquel l'aliment doit être obligatoirement étiqueté.

Le règlement 50/2000/CE, adopté par la Commission européenne en janvier 2000, garantit que les additifs et les arômes soient aussi étiquetés obligatoirement lorsque de l'ADN ou des protéines résultant d'une modification génétique sont présentes dans le produit final. Le nouveau règlement est entré en vigueur en avril 2004. Il introduit, pour la première fois des exigences strictes en matière d'étiquetage des aliments génétiquement modifiés pour animaux suivant les mêmes principes que les aliments destinés à l'alimentation humaine (y compris les additifs, les arômes et les dérivés d'OGM). De plus, le nouveau règlement fonde l'obligation d'étiqueter non plus sur la possibilité de détection de protéines ou d'ADN résultant de modifications génétiques, mais sur la possibilité de remonter par la traçabilité à l'utilisation ou non de produits génétiquement modifiés. Ainsi, le nouveau règlement relatif aux aliments génétiquement modifiés destinés à l'alimentation humaine et animale introduit l'étiquetage de : toutes les denrées alimentaires contenant ou issus d'OGM, indépendamment de savoir si le produit final contient de l'ADN ou des protéines dérivées d'OGM et tous les aliments génétiquement modifiés pour animaux.

Afin d'éviter un sur étiquetage, les ministres européens ont décidé que ces obligations devraient s'appliquer uniquement si le produit final contient un taux de présence fortuite d'OGM accidentel ou techniquement inévitable supérieur à 0,9 %. Le règlement fixe un seuil de 0,5 % en dessous duquel une présence techniquement inévitable d'OGM, pas encore autorisé dans l'Union européenne, mais évaluée et tolérée de façon transitoire.

IV.3- Détection des OGM

La base de tout type de technologie de détection d'OGM consiste à exploiter la différence entre la variété non modifiée et la plante transgénique .Ceci peut se faire en détectant le nouvel ADN transgénique qui a été introduit ou la nouvelle protéine exprimée ou si la protéine joue le rôle d'enzyme, en procédant à une analyse chimique pour détecter le produit de la réaction enzymatique [63]. La figure 11 représente la détection des OGM par technique ELISA et PCR.

IV.3.1- Tests immunologique

La condition nécessaire est de disposer d'anticorps correspondant à la protéine rechercher. Ce n'est pas toujours possible dans les cas où la modification génétique ne conduit pas à la synthèse d'une protéine nouvelle mai au contraire veut diminuer ou supprimer une initialement présente (cas de la tomate à maturation retardée) ou dans le cas ou la construction génétique conduite à la synthèse d'une protéine produite dans un organe différent de l'organe soumis à la détection. Les tests immunologiques présentent d'être plu faciles à réaliser et moins coûteux. Ce pondant, la principale limite de cette méthode est qu'elle ne peut s'appliquer que sur les produit peu transformés .en effets, les traitements notamment thermiques et chimiques vont modifier la conformation des protéines voire les dégrader, et rendent ainsi impossible se genre d'analyse.

Les tests immunologiques sont très largement employer se forme de *dip stick* (languette de papier portent les anticorps et plongés dans la solution à tester pour la présence de l'antigène) ou de test ELISA. Le *dip stick* est utilisable en quelques dizaine de minutes au champs comme au laboratoires, soit plante par plante, dans le cas d'une production de semences OGM par exemple, soit par batch (assemblage de plusieurs plantes ou de graines) pour rechercher la présence accidentelle d'OGM dans le lots de graines. On peut détecter avec ces méthodes au moins jusqu'à 0.5% d'OGM [64].

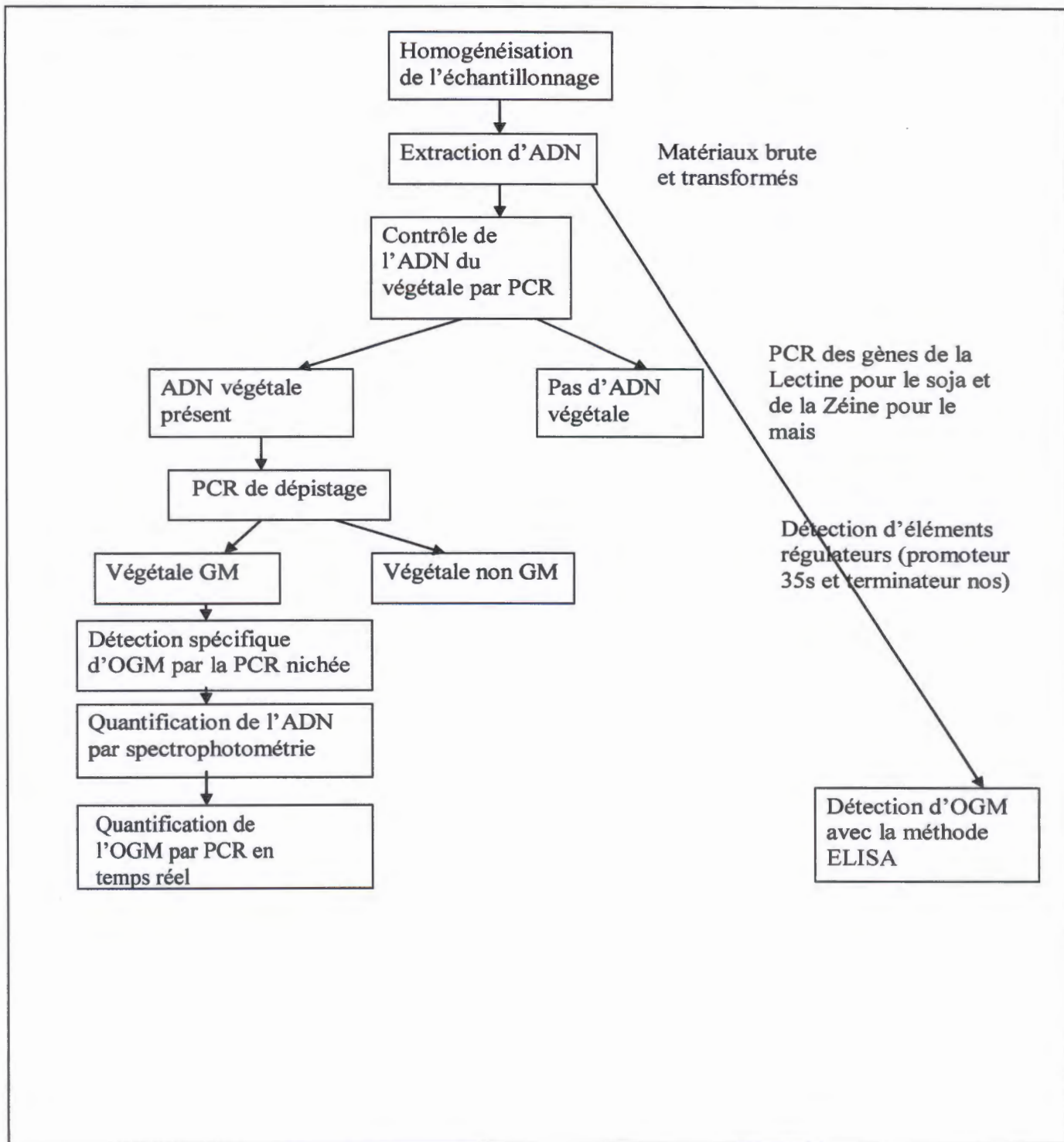


Figure 11. Les méthodes de détection des OGM

La méthode de teste basée sur les protéines utilise des anticorps spécifiques à la protéine d'intérêt. Le teste ELISA détecte ou mesure la quantité de protéine d'intérêt présente dans un échantillon, lequel peut en contenir diverses autres. Le teste ELISA utilise un anticorps unique pour établir la liaison avec la protéine spécifique. Un seconde anticorps pour amplifier la détection (facultatif) et un anticorps conjugué à un enzyme dont le produit génère une réaction colorée facile à visualiser et à quantifier en la comparant à une courbe standard de la protéine d'intérêt. Pour être correct, l'essai doit être exécuté par un personnel dument formé sur un équipement spécialisé [65]. La transformation industrielle dénature, par ailleurs facilement les protéines, ce qui peut poser problème lors de l'utilisation de la méthode ELISA pour analyser des fractions d'aliments transformés. Ces méthodes révèlent l'absence ou la présence d'OGM dans l'échantillon, mais peuvent aussi fournir une indication sur la quantité (pourcentage) présente dans un échantillon testé.

IV.3.2- Testes phénotypiques

Une partie de la certification AOSCA, particulièrement dans le cas du soja, est basée sur l'effet de l'apport d'herbicide sur plantules issues de lots de graines censées ne pas contenir d'OGM. Ces testes phénotypiques sont toutefois restreints aux phénotypes aisément contrôlables comme une tolérance à un herbicide. Il ne peuvent en outre être appliqués qu'à du matériel vivant, dépendent dans ce cas de la capacité germinative des graines. L'intérêt des tests phénotypiques et immunologiques ne doit pas être sous-estimé des lors qu'une traçabilité faible d'origine et de procédé sera opérationnelle. Ces tests peuvent en effet être utilisés pour la certification des produits purs à l'entrée d'une filière [66].

IV.3.3- Teste baser sur ADN

Après un bref rappel de ce qui caractérise une plante transgénique, est expliqué l'intérêt d'utiliser l'ADN comme moyen de détection de ce caractère transgénique lorsqu'il s'agit de denrées alimentaires. Les techniques actuelles de détection et d'identification des transgènes dans les aliments sont exposées tout en soulignant leurs limites par rapport aux constructions inconnues. Avant de détailler les méthodes analytiques de détection d'identification et de quantification d'OGM ou de leurs dérivés dans les aliments, il est utile de rappeler brièvement qu'une plante transgénique ne diffère de ses congénères classiques que par l'intégration dans son génome d'un morceau d'ADN généralement étranger (l'ADN transgénique) qui lui confère une nouvelle propriété jugée intéressante. Pour mettre en œuvre cette technique. Il est nécessaire de disposer :

D'ADN en quantité suffisante et suffisamment purifié car la réaction PCR est sensible à la présence d'inhibiteurs coextraits avec les acides nucléiques. Il s'agit d'une technique certes puissante mais sujette à l'inhibition par certains composés, en particulier des polysaccharides et des polyphénols, ayant pu passer de l'aliment à l'extrait et elle est fort sensible à la contamination par des produits d'amplifications antérieures. Ce dernier problème peut être évité moyennant certaines précautions lors des analyses [67-68].

Quant à l'inhibition, elle est en partie dépendante du processus d'extraction auquel la matrice alimentaire a été soumise, de même qu'aux différents procédés de purification que l'extrait a subis. Pour l'extraction, la littérature récente renseigne plusieurs protocoles utilisant notamment des détergents de nature variée lors de l'étape de lyse : par ex. SDS (dodécylsulfate de sodium) [69], bromure de N-cétyl-N, N, N-triméthylammonium [70]. En outre, des étapes de purification plus ou moins poussées peuvent être prévues qui vont de l'extraction classique au phénol-chloroforme à l'emploi de résines commerciales: ex. Wizard de Promega [71]. Généralement, ils ont obtenu de très bons résultats au moyen d'extraits résultant d'une lyse thermique en présence de SDS 1 % suivie d'extractions au phénolchloroforme et d'une précipitation des acides nucléiques à l'éthanol. Pour des échantillons plus récalcitrants à la PCR, un passage de l'extrait sur la résine du kit "High Pure PCR template preparation" de Roche Diagnostics s'avère souvent efficace. Pour apprécier l'effet d'inhibition, on soumet l'extrait à une PCR au moyen d'amorces universelles pour plantes. En cas d'insuccès, il y a lieu d'améliorer la pureté de l'extrait. Signalons cependant que plusieurs dilutions de l'extrait (1, 1/10, 1/100) sont testées simultanément en PCR, car il est fréquent qu'une dilution suffise à lever l'inhibition. En fait, les protocoles d'extraction de l'ADN sont à mettre au point par catégorie de produits (ex. huile et lécithine) et il est d'ores et déjà évident que pour certains d'entre eux on ne parviendra plus à mettre en évidence de l'ADN, c'est notamment le cas de l'huile de soja fort raffinée [72].

De couples d'amorces (oligonucléotides spécifiques) qui permettent d'amplifier spécifiquement le fragment recherché ; Afin de détecter de faibles nombres de copies d'ADN les conditions d'amplification doivent être optimisés.

Le résultat de la PCR est conditionné par la nature des séquences des oligonucléotides mis en jeu comme amorces puisque ces dernières définissent le fragment qui sera amplifié. Ce choix des amorces déterminera si l'analyse effectuée relève de la détection ou de l'identification.

Lorsque les amorces se cantonnent au sein d'éléments fréquemment employés dans une construction transgénique, par ex. le promoteur 35S du virus de la mosaïque du choufleur, on procède à une détection de criblage car la cible visée n'est pas typique d'une construction [70]

Il faut toujours être prudent avec de telles cibles car elles ne révèlent pas forcément une origine transgénique. L'analyse s'affine davantage lorsque les amorces se situent dans des éléments distincts mais voisins au sein d'une construction, par ex. dans le promoteur et la région codante du gène d'intérêt, étant donné qu'il s'agit alors d'une cible caractérisant la construction. Quant à l'identification de la lignée végétale transgénique, elle est possible en ciblant un segment d'ADN propre à l'événement de transformation. Il faut pour cela une cible à cheval sur une des deux bordures de la construction.

Des standards témoins OGM pour interpréter les résultats. Les standards de calibration actuels sont à base de semence broyées, mais des standards sous forme d'ADN génomique ou plasmiques peuvent être utilisés. Cette méthode révèle l'absence ou la présence d'OGM dans l'échantillon, mais peut aussi fournir une indication sur la quantité (pourcentage) présente dans un échantillon testé. Le tableau 6 résume une comparaison entre le test ELISA et la PCR.

IV.3.3.1- Tests qualitatif

Ils sont fondés sur la capacité d'amplifier par PCR une séquence particulière d'une construction insérée dans un OGM. Selon les amorces utilisées, on peut indiquer simplement la présence d'OGM sans plus de précision. Ce test dit de «criblage» utilise les amorces des régions de régulation P35S ou Tnos identiques chez tous les OGM autorisés en Europe. Identifier le type de construction présent dans l'OGM par l'amplification d'une partie de son transgène (amorces spécifiques); celui-ci pouvant être le même dans des OGM différents identifier, précisément l'OGM par l'amplification des fragments de bordure encore plus spécifique que celles de transgène. Pour l'instant, seuls les laboratoires officiels chargés du contrôle des OGM disposent d'amorces de bordure pour quelques OGM. La modification de la directive 90/220 améliore ces amorces de bordure ainsi que les standards nécessaires à l'analyse. Par ailleurs un important programme européen a été mis en place pour développer des tests quantitatifs basés sur les fragments de bordure. Enfin, il est utile de remarquer que la vérification de la présence d'un OGM non autorisé suppose de connaître au préalable les caractéristiques de cet OGM et de disposer des amorces spécifiques ainsi que du standard témoin. Un registre international (en cours d'élaboration) des outils analytiques sera très utile pour effectuer ce type de recherche. La figure 12 donne un exemple de stratégie de test.

	PCR	ELISA
Elément testé	ADN	Protéine
Bute de teste	Détecter et quantifier les nouvelles séquences d'ADN insérées dans le génome	Détecter les modification génétique dans les culture
La sensibilité	Très sensible avec un risque de faux positif	Une moins grande sensibilité que le PCR et donc un moins grand risque de faux positifs
Durée	Requiert un temps de développement par réactif relativement limité	Temps de production important pour le développement des réactifs et la mise au point de la méthode
Facilité d'utilisation	Difficile ; nécessite un équipement et une formation spécialisés.	Moyenne ; nécessite une familiarité avec les pratiques de laboratoire ; les tests sont spécifiques et varient en fonction de la culture et de la variété.

Tableau 6. Synthèse comparative entre les méthodes de détection ELISA et PCR

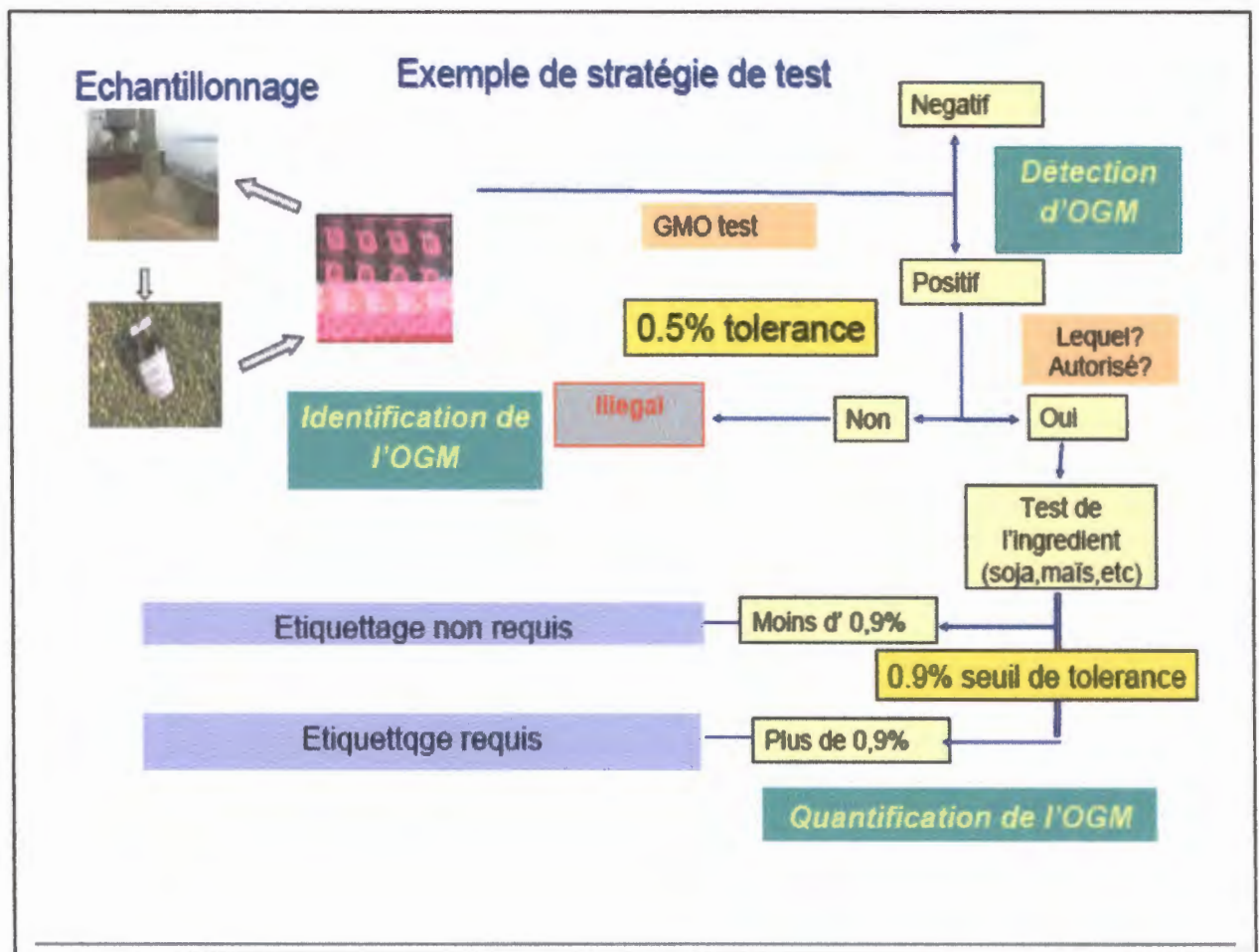


Figure 12. Les étapes de détection des OGM

IV.3.3.2- Test quantitatif

Ils visent à connaître le pourcentage d'OGM présente dans un échantillon en estimant par PCR [73], la quantité d'ADN cible présente dans un échantillon, parallèlement à une gamme étalon rappelons que la détermination de pourcentage d'OGM dans un produits fini est définie par rapport à chaque espèce végétale. Par conséquent, hormis les produits purs non transformés comme les graines et les semences, la détermination de la teneur en OGM d'une matrice nécessite deux quantification :

La première vise à connaître la teneur en espèce végétale en déterminante nombre de copies d'une cible d'ADN spécifique de l'espèce végétale. Cela suppose de disposer pour les développements d'un certain nombre de variétés représentatives de la diversité mondiale de l'espèce considérée, afin de vérifier la conservation des séquences cibles et de leur nombre de copies.

La seconde vise à déterminer pour le même échantillon le nombre des copies, d'une cible d'ADN spécifiques du ou des OGM de cette espèce présente. Les amorces utilisées pour le criblage (P35S) ne peuvent être utilisées pour la quantification que dans les produits purs (une seule espèce végétale et même un seul OGM car, par exemple, le nombre de copie P35S dans les différents OGM issus du maïs n'est pas le même). Les amorces spécifiques de l'insert peuvent être utilisées en PCR quantitative dans un mélange tant qu'une autre OGM avec les mêmes séquences internes n'est pas autorisé au sein de l'UE.

Seuls les tests basés sur les fragment de bordure permettent la quantification exacte dans les produits mixtes, pourvu que les OGM ne résultent pas d'un empilage de gène (*gène stacking*), c'est-à-dire d'un croisement entre deux OGM préalablement autorisés.

Le rapport du nombre de copies d'OGM d'une même espèce végétale sur le nombre de copies spécifiques de l'espèce donne la teneur en OGM par espèce. La variabilité finale de la détection sera donc fonction de celle de chaque un des tests PCR qui doivent avoir été optimisés. Pour déterminer le nombre de copies d'OGM d'une espèce végétale et le nombre de copies génome de cette même espèce, deux approches peuvent être envisagées :

les différents types de PCR quantitatives dites en «point final» mesurent les quantités d'amplicons après la PCR par analyse d'image après une électrophorèse en gel d'agarose en présence d'agents intercalant de l'ADN (par exemple BET) ou après électrophorèse sur capillaire. Pour les OGM la méthode de PCR compétitive a été utilisée, mais est progressivement remplacée par les PCR quantitatives en temps réel ; elle est encore utilisée pour savoir si la teneur en OGM est au-dessus d'un certain seuil.

les différents types de PCR quantitative dites en «temps réel» mesurent en continu les quantités d'amplicons pendant la PCR. La figure 13 résume les étapes successives de l'analyse d'aliments par PCR en temps réel. La mesure de l'accroissement du nombre d'amplicons est assurée par la mesure de la fluorescence libérée par leur synthèse grâce à l'utilisation d'une sonde interne à l'amplicon, ou par l'utilisation d'un agent liant à l'ADN de l'amplicon (méthode SybrGreen) [74].

La quantification d'ADN basée sur une PCR classique repose sur des mesures de valeurs limites pour obtenir une sensibilité optimale, lorsque l'amplification atteint le rendement maximum (appelé «phase stationnaire»). A ce stade, la réaction a dépassé la phase exponentielle, notamment en raison de la diminution des réactifs et de l'inactivation thermique progressive de la polymérase utilisée. La corrélation résultante entre la concentration de produit finale et le nombre de molécules cibles initiales est ainsi limitée. Afin de surmonter ce problème, des techniques telles que la PCR quantitative compétitive et la PCR en temps réel ont été mises au point pour résoudre les problèmes liés à l'établissement d'un rapport entre la concentration d'ADN cible et la quantité de produit PCR résultant de l'amplification.

IV.3.3.2.1- Quantification par PCR quantitative compétitive

L'une des premières méthodes PCR quantitative mises au point est celle de la PCR quantitative compétitive [75-76]. Cette méthode est basée sur la co-amplification de la matrice d'ADN cible et de quantité donnée d'un ADN standard interne (compétiteur) portant les mêmes sites de fixation d'amorces. Etant donné que la quantité initiale du compétiteur est connue et que les niveaux d'amplification de la cible et de l'ADN compétiteur sont les mêmes, la quantité des deux produits PCR, déterminée par exemple : par électrophorèse sur gel (Figure 14) est représentative du taux d'ADN cible et de compétiteur présents dans l'échantillon de réaction avant l'amplification. En règle générale, un compétiteur est un plasmide linéarisé porteur de la même séquence de nucléotides que l'ADN cible, à l'exception d'une suppression ou d'une insertion afin d'obtenir, après co-amplification, deux bandes de tailles distinctes après électrophorèse sur gel standard.

La PCR compétitive a été mise en œuvre avec succès pour quantifier à la fois l'ADN et l'ARN, mais sa plage dynamique est limitée à un taux cible/compétiteur situé approximativement entre 1:10 et 10:1. En fait, pour obtenir une précision optimale, il convient de trouver le point d'équivalence auquel le taux cible/compétiteur est de 1:1. A cet effet plusieurs dilutions doivent être testées pour obtenir un taux cible/compétiteur approprié.

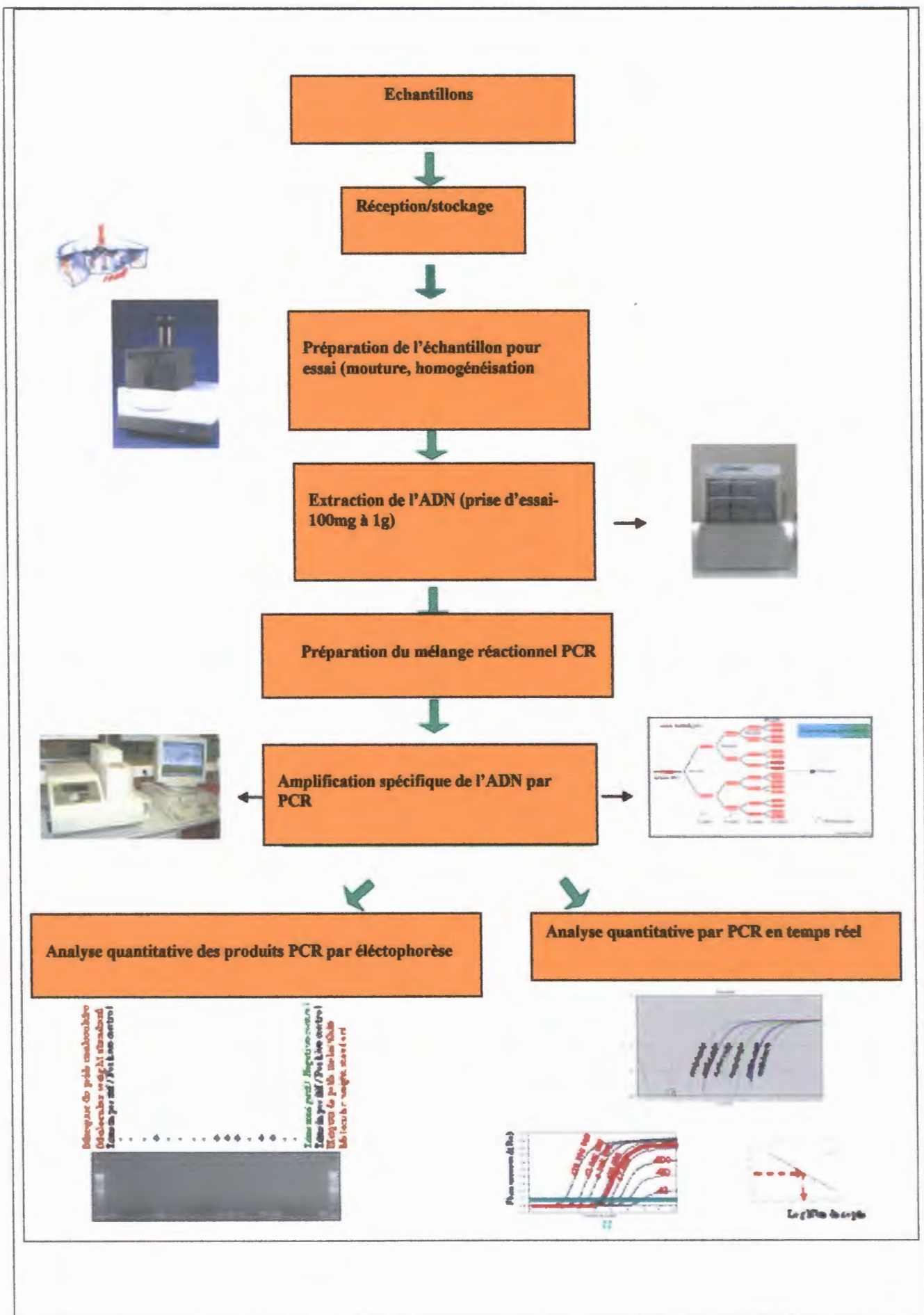


Figure 13. Etapes successives de l'analyse d'aliments par PCR ou par PCR en temps réel

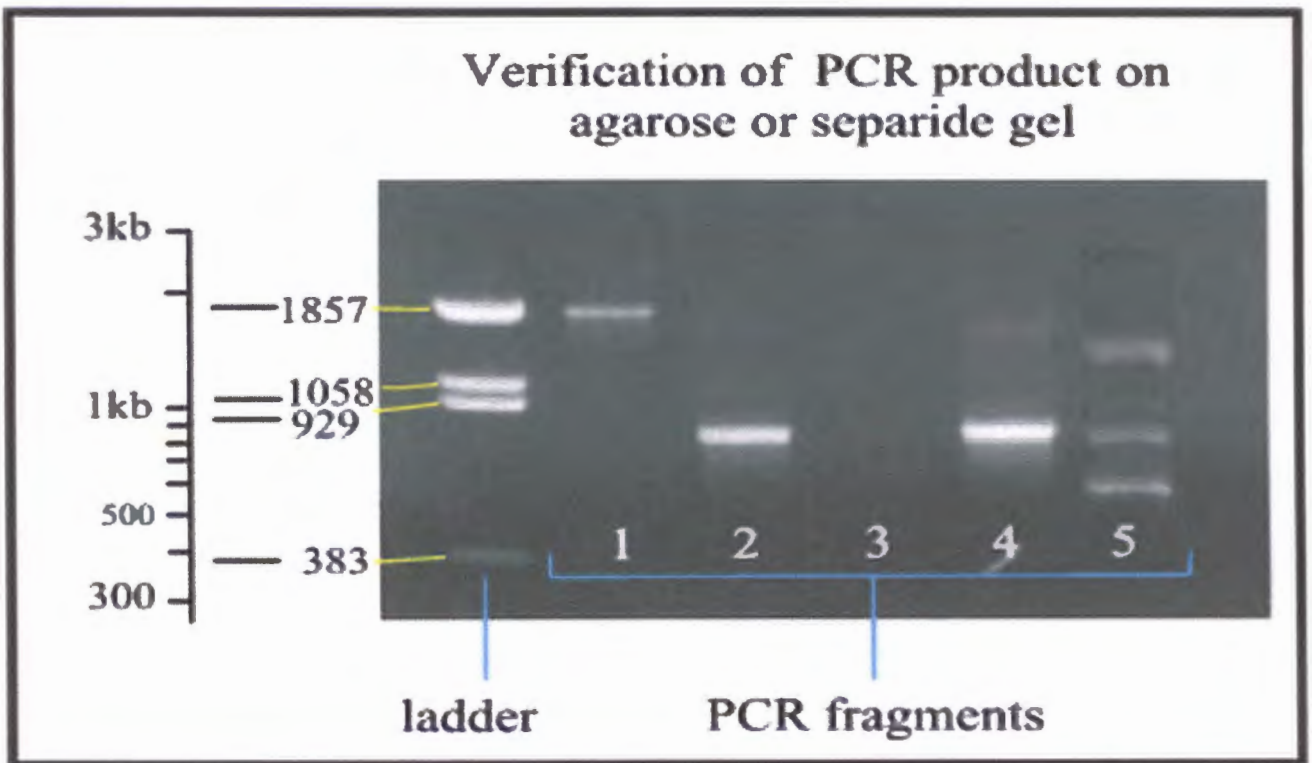


Figure 14. Vérification des résultats de la PCR sur gel d'agarose

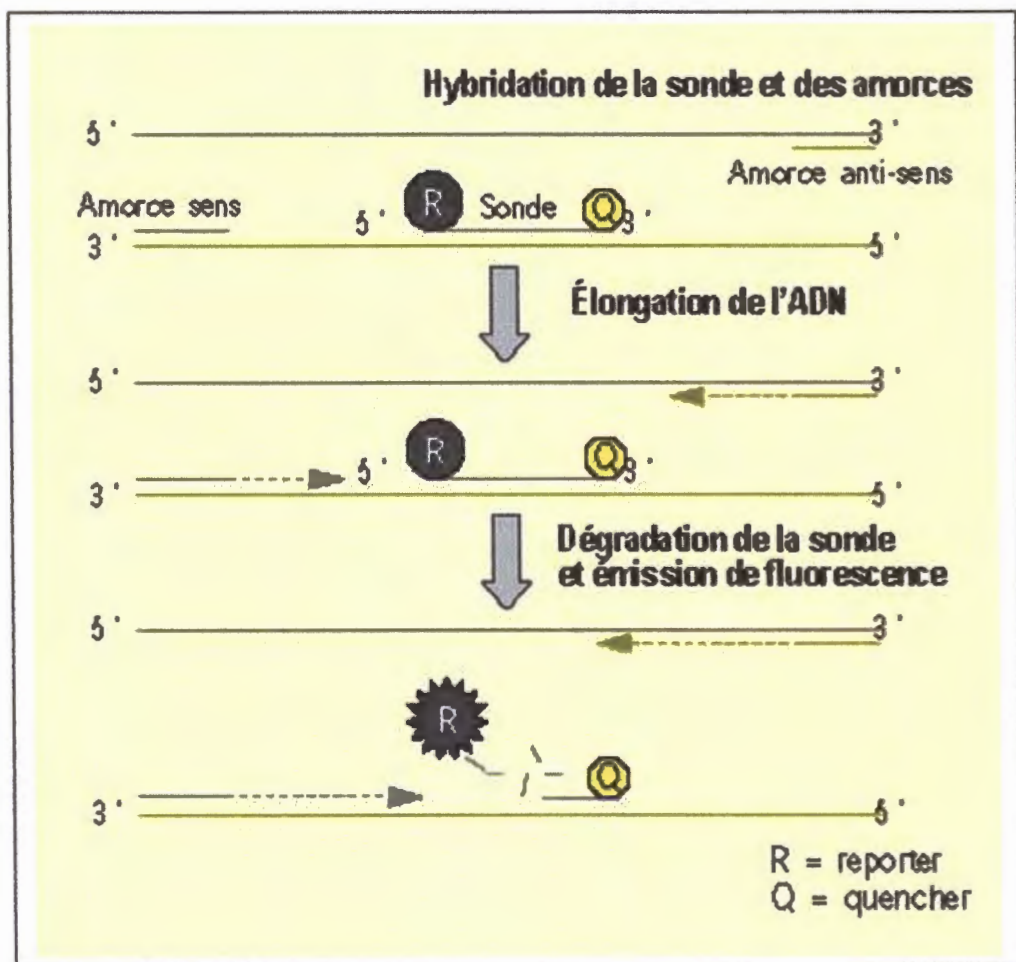


Figure 15. Principe de la PCR temps réel en chimie Taqman

L'inconvénient de cette approche réside dans la nécessité de construire et de caractériser un compétiteur différent pour chaque cible à quantifier. En fait, la moindre différence au niveau de l'efficacité de l'amplification compromettra sérieusement la précision d'une quantification par PCR quantitative compétitive.

Enfin, à la fin de la réaction, la PCR compétitive nécessite une quantification précise des amplicons de la cible et du compétiteur, ce qui implique généralement des étapes de traitement post-PCR laborieuses. La PCR compétitive est une méthode semi-quantitative qui implique une comparaison entre un standard (le compétiteur) et l'échantillon. Les résultats ne peuvent indiquer qu'une valeur inférieure, égale ou supérieure à une concentration standard donnée [77].

VI.3.3.2.2- Quantification par PCR en temps réel

La teneur en OGM d'un échantillon peut être exprimée comme étant la quantité de matière génétiquement modifiée dans la quantité de matière totale. Pour déterminer cette valeur dans un système PCR en temps réel, il faut évaluer le nombre de séquences d'ADN d'un gène de référence endogène (en vue d'une utilisation en tant que «normalisateur») ainsi que le nombre de séquences d'ADN cible spécifique de l'OGM. Le gène de référence doit être sélectionné de manière à ce qu'il soit spécifique de l'espèce, présent en copie unique par génome haploïde, stable au sein de différentes lignées de la même espèce et ayant les mêmes propriétés d'amplification que les OGM analysés (bien que cela soit plutôt dû à une bonne conception des sondes d'amorces). Un problème dans la quantification relative résulte de l'interprétation du pourcentage de teneur en OGM non stipulé par la législation; par conséquent, la teneur en OGM (en pourcentage) peut être considérée comme étant le poids de l'ingrédient modifié divisé par rapport au poids total de l'ingrédient pur (par ex. poids du maïs divisé par le poids total de l'ensemble du maïs contenu dans l'échantillon). Du point de vue analytique, il convient de calculer le pourcentage d'OGM en termes de nombre de copies d'ADN cible par rapport au nombre de copies spécifiques de taxon cible, mais cette définition ne tient pas compte de certaines caractéristiques importantes des lignées d'OGM alternativement, des étalons de référence différents des matériaux de référence certifiés (par ex. séquences d'ADN clonées ou mélanges d'ADN génomiques) peuvent être calibrés par rapport à ces matériaux de référence certifiés afin de corriger les divergences moléculaires dans la quantification. Dans tous les cas, cet aspect de la quantification doit être pris en compte lors de la mise au point d'une méthode, étant donné que la limite de détection et la limite de quantification sont influencées par le nombre effectif de copies à quantifier.

La conception d'une analyse PCR en temps réel doit inclure les éléments suivants : un système PCR capable de détecter une séquence d'ADN cible spécifique de l'OGM et le second système PCR capable de détecter une séquence de référence endogène préférentiellement spécifique de l'espèce, mais pouvant être utilisée en tant que « normalisateur » dans les cellules des concentrations relatives d'OGM.

Les courbes d'étalonnage pour la cible et la référence endogène. Pour chaque échantillon expérimental, la quantité de cible et de référence endogène est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage correspondante. La quantité de cible est normalisée avec la quantité de référence endogène pour obtenir la concentration relative de la cible. Pour qu'elles répondent aux exigences statistiques, les courbes d'étalonnages doivent comprendre au moins 4 points de concentration différents. Chaque point de la courbe d'étalonnage, ainsi que l'échantillon doivent être chargé au moins en trois exemplaires.

Enfin, la quantification du gène de référence et la quantification de la séquence spécifique de l'OGM doivent être effectuées au cours de la même opération PCR (co-amplification) et non en plusieurs opérations, afin d'éviter toute fluctuation statistique entre différentes expériences.

VI.3.3.2.3- Quantification PCR multiplexe en temps réel

En fonction des propriétés chimiques et de l'appareillage utilisé pour la quantification il est possible de concevoir des PCR en temps réel pour effectuer la quantification des séquences de référence et d'OGM séparément dans des tubes distincts ou dans les mêmes tubes en tant que réaction « multiplexée ». Les deux options présentent à la fois des avantages et des inconvénients : les réactions multiplexées permettent d'économiser du temps et des réactifs (il est possible d'analyser le double d'échantillons en une seule et même expérience), d'éviter les erreurs de configuration entre la mesure de la référence et du gène cible de l'OGM, étant donné qu'elles ont lieu dans le même tube, mais elles sont moins sensibles (en terme de limite de quantification) en raison de l'interférence entre les deux réactions et des différences de consommations de réactifs entre les deux réactions. D'un autre côté, des réactions séparées pour mesurer le gène de référence et le gène cible de l'OGM sont plus sensibles en termes de limite de quantification, mais nécessitent deux fois la quantité de réactifs et de tubes réactionnels sur l'appareillage de PCR en temps réel et sont plus exposées par ex. aux risques d'erreur de pipetage lors de la mesure d'un échantillon. La disponibilité de colorants rapporteurs multiples pour les sondes Taq Man (la figure 15 explique la réaction) permet de

détecter l'amplification de plusieurs cibles dans le même tube. Le colorant rapporteur (FAM) se distingue de l'autre (VIC) car ils ont des longueurs d'onde d'émission maximale différentes.

IV.4- Analyse graphique des données de la PCR en temps réel

Au cours d'une PCR en temps réel, les données de fluorescence (valeur R_n) recueillies permettent de tracer un graphique représentant la quantité de signal par rapport au nombre de cycles ou au temps (Figure 16). En général, le graphique est tracé sur une échelle semi-logarithmique. Dans la PCR en temps réel, on peut distinguer trois phases différentes : une première phase de « retard » avec de légères fluctuations des courbes correspondant au signal de fond; une seconde phase exponentielle avec des courbes parallèles croissantes, et une troisième phase où les courbes ont tendance à atteindre un palier.

La force de la PCR en temps réel réside dans le fait que la quantification survient non pas à la phase terminale de la PCR (palier), mais à l'étape où la croissance exponentielle de la quantité d'ADN amplifié (valeur R_n) atteint un point significativement plus élevé que le signal résiduel. Cette technique de mesure augmente considérablement la précision de la quantification, étant donné qu'il y a une corrélation directe entre la quantité de matrice initiale et la phase durant laquelle l'amplification commence à devenir exponentielle. Dans la PCR en temps réel, un cycle seuil (C_T) est défini à titre expérimental comme le cycle auquel le signal de fluorescence atteint la moyenne des signaux de fluorescence mesurés entre le troisième et le quinzième cycle plus dix écarts types. Plus la quantité initiale d'ADN génomique est élevée plus le produit accumulé est détecté rapidement dans le processus PCR, et plus la valeur C_T est basse.

En pratique le choix de la ligne de seuil dans la détermination de la valeur C_T incombe souvent à l'opérateur, représentant l'un des éléments subjectifs de la PCR en temps réel. La ligne de seuil doit être placée au-dessus de toute activité de base et dans la phase d'augmentation exponentielle, qui paraît linéaire dans la transformation logarithmique (toutes les courbes sont parallèles). Dans tout les cas, la ligne de seuil doit être placée au niveau auquel les courbes des répliquats commencent à coïncider le plus. En fait, il arrive parfois que les répliquats présentent, dans la toute première partie de la phase exponentielle, une légère divergence qui diminue ou disparaît totalement alors que la réaction se poursuit. La figure 17 représente le déroulement de la réaction.

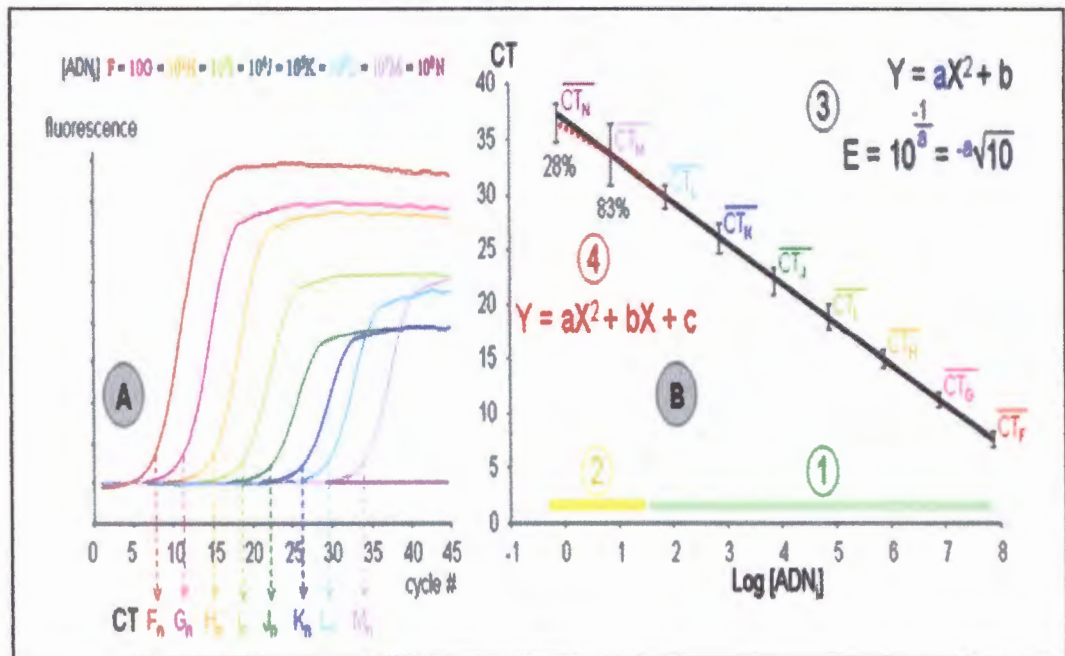


Figure 16. Représentation graphique de la quantité de signal par rapport au nombre de cycles

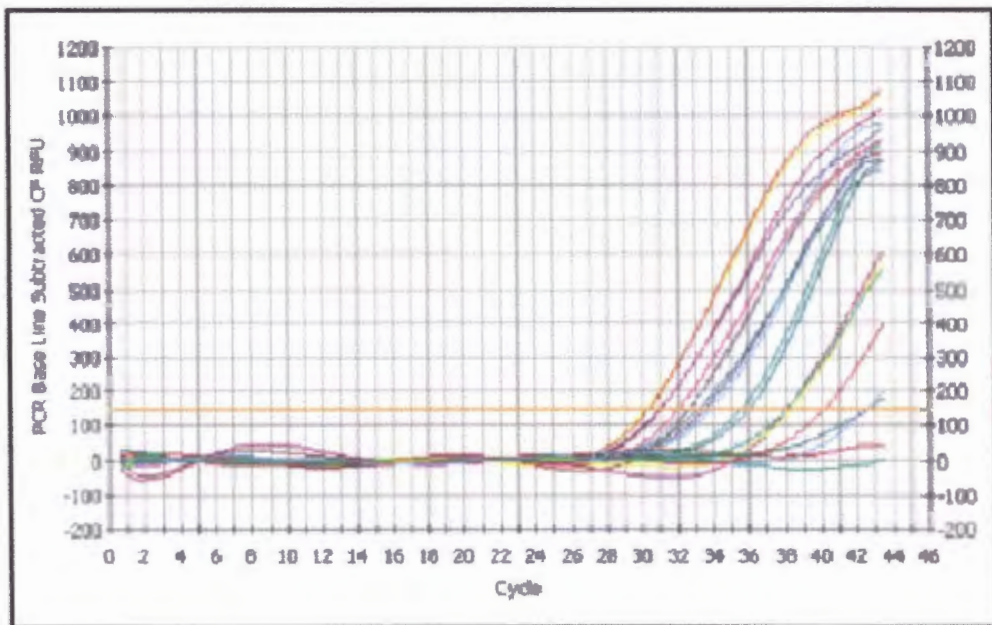


Figure 17. Exemple de résultat graphique obtenu a l'issus d'une PCR en temps réel

VI.5- Calcule de la teneur en OGM

Le rendement de la PCR en temps réel est une valeur ΔR_n , qui correspond à la différence entre R_n^+ (le signal de fluorescence comprenant l'ensemble des éléments) et R_n^- (le signal de fond de la réaction - référence ou lecture d'un échantillon NTC) les résultats graphiques sont bien détaillé dans la figure18. La teneur en OGM d'un échantillon peut être déterminée de deux manières différentes :

1. tracé de deux courbes standard sur la base de différentes quantités d'ADN:

La première courbe avec un système de quantification spécifique du gène de référence.

La seconde courbe avec un système de quantification spécifique de la cible GM.

Pour chaque échantillon, les quantités de cible spécifique et de gène de référence sont déterminées par interpolation avec la courbe standard. La teneur en ADN des OGM (sous forme de pourcentage) est ensuite calculée comme étant le rapport entre la quantité de séquence cible GM et la quantité de séquence du gène de référence.

Il convient de noter que les échantillons analysés doivent forcément se situer entre les limites supérieure et inférieure des deux courbes standard. Les valeurs aberrantes doivent être exclues, étant donné qu'elles sont sujettes à des erreurs de quantification.

2. la méthode C_T comparative ($\Delta\Delta C_T$) : cette méthode n'utilise pas une quantité connue de standards mais compare la quantité relative de la séquence cible d'OGM à la séquence du gène de référence. La courbe standard est obtenue en chargeant une série d'échantillons à différentes concentrations connues d'OGM (par ex. matériaux de référence certifiés de l'IRMM). Le résultat est une courbe standard de valeurs $\Delta\Delta C_T$ ($\Delta C_T = C_T \text{ gène de référence} - C_{TOGM}$). La valeur de la teneur en OGM est obtenue en calculant la valeur ΔC_T de l'échantillon et en la comparant aux valeurs obtenues avec les standards.

Pour que cette méthode soit fructueuse, les efficacités d'amplification des systèmes PCR cible et de référence doivent être semblables. A cet effet, une méthode sensible de contrôle consiste à examiner la manière dont ΔC_T (la différence entre les deux valeurs C_T de deux PCR pour la même quantité de matrice initiale) varie en fonction de la dilution de la matrice. Si les efficacités des deux amplicons sont approximativement équivalentes, la représentation graphique logarithmique de la quantité d'entrée par rapport à la ΔC_T serait une ligne presque horizontale (pente <0.10). Cela signifie que les deux PCR ont la même efficacité dans la plage de quantités de matrice initiales. Si le graphique montre une efficacité inégale, la méthode de la courbe standard doit être utilisée pour la quantification des OGM. La plage dynamique doit être déterminée à la fois pour (1) les concentrations minimale et maximale des cibles pour lesquelles les résultats sont exacts et (2) les rapports minimum et

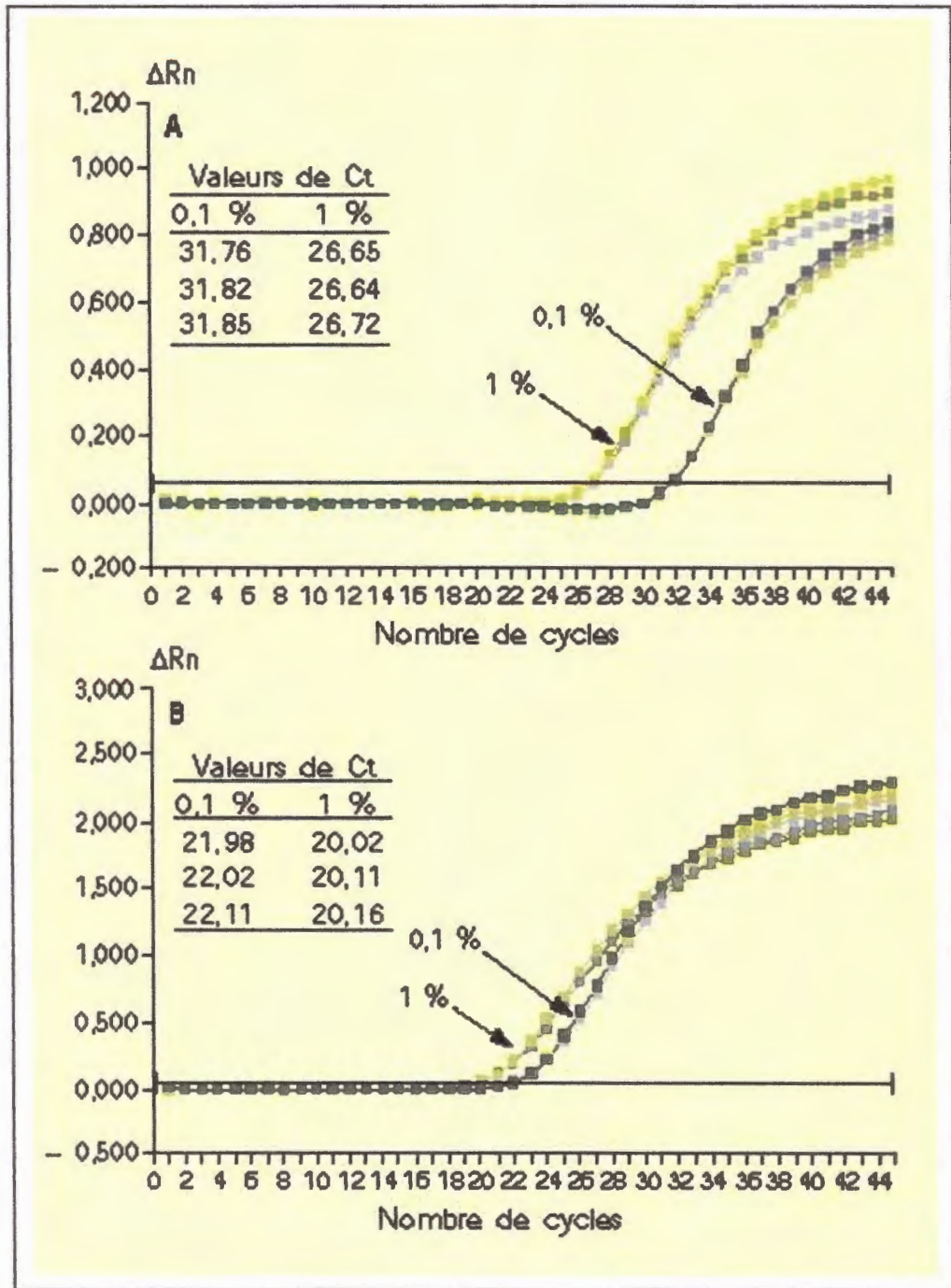


Figure 18. Résultat graphique de rendement d'une PCR temps réel

maximum de deux quantités de gènes pour lesquelles les résultats sont exacts. Dans la PCR en temps réel compétitive classique, la plage dynamique est limitée à un rapport cible/compétiteur d'environ 10:1 à 1:10 (la précision optimale est obtenue pour un rapport de 1:1). La PCR en temps réel est capable de générer une plage dynamique beaucoup plus importante.

Chapitre V :

Discussion et conclusion

Comme nous l'avons précisé précédemment, tout système de traçabilité repose sur deux entités fondamentales, la première est l'étiquetage et l'enregistrement manuels, comme l'utilisation des étiquettes code barre ou des puces électroniques. Cette identification permet de distinguer de façon univoque le lot dans l'atelier et le stock. Malgré que ce système est le plus simple pour obtenir une traçabilité il pose des problèmes de fiabilité (erreurs de lecture/écriture), de productivité (temps nécessaire à recopier les informations) et de temps de réponse en cas de rappel consultation des enregistrements qualité). De plus, toute comparaison avec un bilan matière devient très difficile sans gestion informatisée du stock.

Toutes les méthodes de traçabilité, que l'on pourrait qualifier d'administratives, évoquées ci-avant donnent ou donneront de bons résultats à condition d'éliminer les facteurs "fraudes" et "négligences". Par exemple, dans la filière animale rien ne garantit le lien entre l'étiquette et la pièce de viande sur laquelle elle a été apposée (la réhabilitation d'une viande est ainsi rendue possible). Il faut craindre ici qu'il soit aussi facile, si c'est pas plus, d'apposer de fausses étiquettes que de falsifier des boucles. Un problème latent d'identification subsiste donc, et c'est l'entière responsabilité de la filière qui supporte les conséquences de l'absence d'une relation infalsifiable et pérenne entre le système d'identification administratif et l'animal identifié par ces boucles ou la pièce de viande identifiée par l'étiquette [21-78].

On peut aussi remarquer que le marquage ADN ou la traçabilité de l'ADN sont des techniques efficaces pour contrôler un système de traçabilité. Par exemple, pour la viande bovine, on vérifie au cas par cas si les informations inscrites sur l'identifiant (étiquette) correspondent bien à l'analyse ADN, considérée comme infaillible. Mais, contrairement à ce que certains acteurs des filières concernées le laissent entendre, ces systèmes ne remplacent en aucun cas un système de suivi de la traçabilité, ce sont uniquement des moyens de contrôle quasiment infaillibles. Donc la traçabilité dans le secteur agroalimentaire connaît des problèmes concernant la quantité de produits à tracer et surtout leur diversité croissante.

Les techniques de traçabilité les plus fiables sont des approches biomoléculaires basées sur technologies de l'ADN recombinant, notamment la PCR, cependant, elles rencontrent des problèmes telles les résultats faussement positifs ou négatifs : des procédures de contrôle s'avèrent donc obligatoires. Les résultats faussement positifs peuvent être dus à diverses causes telle que la contamination de l'échantillon, de l'appareil et/ou des réactifs par la séquence cible provenant d'autres spécimens et/ou d'une amplification antérieure et, l'amplification de séquence (s) non spécifique (s) due à une spécificité insuffisante des amorces et/ou à un degré

restringente trop faible qui permet l'amorçage de séquences non spécifique. Les causes des résultats faussement négatifs sont aussi multiples comme l'absence de séquence cible, due à une extraction défectueuse de l'ADN de l'échantillon, une concentration de la cible dans l'échantillon inférieure à la limite de détection, l'état de la cible trop mauvais pour une amplification, la présence d'inhibiteurs de la PCR dans l'échantillon, une mutation dans le site de fixation de l'amorce dans la séquence cible et un mauvais fonctionnement du cycleur thermique.

La mise sur le marché des Organismes Génétiquement Modifiés (OGM) a suscité ces dernières années d'âpres débats entre les industriels encouragés par les bénéfices potentiels de leurs innovations génétiques et les agriculteurs dont l'avenir est en jeu et l'opinion publique échaudée par les atteintes récentes à la sécurité alimentaire. Il est évident que malgré les controverses sur les OGM, l'évaluation des risques liés à la santé et à l'environnement est souvent trop rapide. La régulation des risques potentiels portés par les OGM s'inscrit dans un contexte d'incertitude car, personne ne sait a priori si ces OGM auront un impact sur la santé humaine ou sur la biodiversité. L'utilisation des méthodes analytiques basées sur la technologie de la PCR pour détecter des séquences d'ADN associées aux OGM est de plus en plus courante. La PCR permet d'amplifier sélectivement des fragments spécifiques d'ADN qui se trouvent en faible quantité dans un mélange complexe d'autres séquences d'ADN. Ces gènes amplifiés sont enfin soumis à une électrophorèse sur gel standard de manière à pouvoir en détecter et quantifier les OGM dans des espèces cultivées pour l'alimentation humaine et animale. La détermination de l'identité génétique permet, en outre, la ségrégation et la traçabilité sur toute la chaîne d'approvisionnement des cultures génétiquement modifiées.

Pour déceler la présence d'un ADN génétiquement modifié on a recours à des amorces non spécifiques, mais présentes dans la plupart des constructions génétiques végétales (promoteur 35 S, terminateur NOS, séquence régulatrice, séquence de résistance à un antibiotique ...). Si la présence de ces fragments est détectée, la conclusion de l'analyse sera qu'il y a un ADN génétiquement modifié. Par contre, s'il n'y a pas de détection, il est impossible de conclure à l'absence de ce type d'ADN. Car l'OGM peut avoir été construit avec un autre promoteur et un autre terminateur. Le risque de " faux positif " doit aussi être pris en compte. Il peut y avoir dans la nature d'autres ADN que ceux d'un OGM qui répondent à ces sondes. Avec le maïs, par exemple, des " faux positifs " peuvent éventuellement être présents par la contamination de celui-ci par *Bacillus thuringiensis*. La deuxième stratégie permettant d'identifier un ADN d'origine OGM nécessite cette fois-ci des amorces spécifiques (utilisation

de banque de gènes et de logiciels spécifiques) à chacune des constitutions génétiques possibles et connues.

L'ADN est supposé résistant à certains traitements chimiques ou thermiques. Au mois de février 1997, l'INRA annonçait avoir mis au point une technique permettant, en moins de 48 heures, de détecter la présence d'OGM dans les produits alimentaires transformés, cependant, ce test reste encore hypothétique sur des produits transgéniques ayant subi un traitement de transformation drastique ou violent (exemple : purée de tomates). Car dans ce cas la probabilité de trouver de l'ADN transgénique est infime (destruction de l'ADN au cours du processus). Il ressort néanmoins que cette technique a été validée au niveau européen sur des produits bruts ou de première transformation (grains, farine, semoule...) et sera normalisée, si tout suit un cours normal, dans les mois à venir. La méthode n'a cependant pas été validée pour les produits finis. C'est une des raisons pour les quelles, pour le moment, les services officiels de contrôle ne peuvent que se montrer indulgent.

Un autre problème n'a pas été résolu, c'est la définition d'un seuil minimal de détection. Celui-ci n'a pas encore été fixé par Bruxelles alors que la méthode de PCR est très sensible et que l'on pourrait déceler d'infimes traces d'OGM (10^{-3} à 10^{-5} selon la maîtrise des opérateurs). L'existence de seuils est nécessaire et sert à éviter la mention de la présence d'ingrédients ou de substance à l'état de trace. Comme indiqué précédemment, la détection des OGM peut être réalisée par d'autres techniques : Technique sérologique ou immuno-enzymatique, Cette technique repose sur l'analyse de la protéine exprimée par le transgène. On utilise pour cela des techniques sérologiques (anticorps mono ou poly clonaux) ou immuno-enzymatique qui permettent par des tests classiques de type Elisa de révéler la présence d'une protéine donnée. Bien que cette méthode de test rapide reste séduisante, elle ne peut pas constituer une stratégie valable pour le contrôle sur toute la chaîne agroalimentaire. Les conditions de milieu, les traitements et les transformations que vont subir les matières premières dans le processus de fabrication de produits finis alimentaires auront des effets importants sur la structure de ces protéines. Les protéines spécifiquement recherchées peuvent être ainsi dénaturées ou détruites. Cette caractéristique a donc tendance à réduire considérablement le champ d'application dans la chaîne agroalimentaire de cette technique aux produits agricoles bruts (fruits, légumes) ou obtenus par des transformations " douces ".

Nous avons aussi remarqué que cette technique basée sur le contrôle des protéines ne peut pas rendre compte de la totalité de la plante impliquée.

l'exemple du maïs Bt, qui n'exprime normalement la toxine que dans les parties vertes de la plante (plus particulièrement les feuilles). Si l'on doit détecter cet OGM sur un produit alimentaire contenant des grains de maïs (partie non verte), il y a de forte chance que la protéine spécifique ne soit pas présente et donc pas détectée. Pour éviter ces lacunes et gagner le temps, les chercheurs essayent de développer de nouvelles techniques comme la technique des puces à ADN qui est le résultat du développement de la Biologie Moléculaire, la Chimie Combinatoire et la

Bioinformatique.

Dans l'Union Européenne, les réglementations mises en place par la Commission Européenne imposent un étiquetage clair des produits, avec mention obligatoire et explicite de la présence d'OGM dès lors qu'entre dans l'un des composants de ces derniers plus de 0,9 % d'OGM. L'obligation d'étiquetage concerne également les arômes et les additifs (quelle qu'en soit la quantité) dérivés d'OGM. Cette obligation vaut pour tous les pays de l'Union Européenne. Seuls sont dispensés de cette mention les produits dans lesquels toute trace de l'ADN modifié ou de la protéine transgénique a disparu (c'est notamment le cas des huiles). Depuis avril 2000, la culture des OGM est autorisée en Europe, mais assortie de conditions strictes et de contrôles renforcés. Les autorisations de cultures transgéniques sont soumises à un examen précis des risques qu'elles présentent pour l'environnement. L'autorisation est limitée à une durée de 10 ans et peut être suspendue en cas de nouvelles avancées scientifiques. Enfin, en mai 2004, l'Union européenne a mis fin à un moratoire de 5 ans en autorisant l'importation d'un maïs transgénique (baptisé Bt-11), sous la forme de boîtes de conserve et de pop-corn.

L'objectif principal du système de traçabilité sur la Biosécurité est de protéger la diversité biologique des risques potentiels portés par les OGM. Il définit les conditions d'échanges transfrontaliers des entités biologiques capables de transférer ou répliquer du matériel génétique et permettre à tous les pays, d'assurer le contrôle sur les échanges des OGM. L'Algérie, en signant le Protocole de Biosécurité et en participant à différents processus et projets, a déjà pris des orientations quant à la mise en place d'un cadre national de biosécurité. Par ailleurs, un arrêté du Ministère de l'Agriculture, relatif aux semences et plants, a pour objet d'interdire l'importation, la distribution, la commercialisation et l'utilisation du matériel végétal génétiquement modifié et applique ainsi le Principe de précaution.

A l'instar des autres pays, si l'Algérie ne peut pas développer une recherche de haut

niveau dans tous les domaines des biotechnologies, elle doit se doter au moins de l'expertise nécessaire, incluant réglementation et surveillance. Le 25 mai 2000, l'Algérie a signé le protocole de Cartagena et a décrété un moratoire sur les OGM le 24 décembre 2000. Enfin, une loi visant à protéger les ressources génétiques locales est en préparation. L'élaboration d'outils réglementaires permettra d'assurer non seulement un réel contrôle sur les échanges des OGM, mais aussi d'obtenir une meilleure maîtrise des enjeux pour les négociations internationales et une estimation des coûts liés à l'application des dispositions techniques du protocole.

Par ailleurs, un atelier intitulé "participation du public à la biosécurité : information et traçabilité" a réuni du 14 au 16 décembre 2003 dans les locaux de l'Institut National d'Agronomie, environ vingt-cinq personnes, venues du monde de la société civile, de la recherche ou de l'administration gouvernementale. Organisé par l'association de Réflexions d'Echanges et d'Actions pour l'Environnement et le Développement (AREA-ED), Lors de cet atelier, outre la présentation d'un certain nombre de point théorique lié aux OGM . deux travaux de recherche ont été réalisés, l'un sur la détection des OGM par PCR et l'autre consacré à la gestion de l'information par le biais d'internet, les participants ont émis un certain nombre de recommandations : organiser d'ici un an une journée nationale d'information et de débat sur les OGM, sensibiliser les agriculteurs et les apiculteurs à l'aide de supports pédagogiques adaptés prendre contact avec les associations de consommateurs, collaborer avec le réseau des laboratoires européens pour la mise en place d'un véritable système de traçabilité en Algérie. Ces recommandations seront mises en œuvre par les participants, chacun à son niveau, avec ses moyens. Cependant, les participants ont manifesté la volonté de rester en réseau, afin de faire circuler l'information et de pouvoir s'entraider.

Enfin, cela dit, l'absence actuelle, en Algérie, de cultures génétiquement modifiées fait que les problèmes liés à la biosécurité et à la bioéthique n'ont pas eu toute l'attention qu'il faudrait maintenant leur consacrer. Par ailleurs avec l'ouverture du marché et l'importance des importations de matières premières comme les céréales, les oléagineux pour la transformation des huiles ainsi que les produits utilisés dans l'industrie agro-alimentaire (arômes, ferments, lécithine de soja, vitamines), les produits issus d'OGM peuvent être introduits illégalement et commercialisés.

Bibliographie

1. Stevens B. La chine à l'aube du 21 siècle, les perspectives agricoles : tendances et enjeux à l'horizon 2000. (1996) L'observateur de l'OCDE, n° 201.
2. Kuba F. L'autosuffisance alimentaire pour la chine. (1997) L'observateur de l'OCDE, n°206.
3. Charlobois P et Schmidhuber J. Agriculture : tendances et enjeux d'ici à 2001. (1997) L'observateur de l'OCDE, n°205.
4. David B et Linda f. Marche électroniques dans l'agroalimentaire. (1997) L'observateur de l'OCDE, n°208.
5. Latouche K, Rainelli P and Ver Mesch D. Food safety issues and the BSE scare: some lessons from the French case. (1999) Food policy, vol. 23, n°5, pp. 347-356.
6. Hobbs J E, Bailey DV, Dickinson D L et al. Traceability in the Canadian red meat sector: do consumers care? 2005 Revue Canadienne d'agroéconomie, vol.53, n°1, pp.47-65.
7. Liddell S and Bailey DV. Market opportunities and threats to the U.S. pork industry posed by traceability systems. (2001) International food and agribusiness Management Review. vol. 4, pp.287-302—58.
8. Morgan R A and Anderson W E. Human gene therapy. (1993) Annu. Rev. Biochem.62, 191-217.
9. Berg P, Baltimore D, Boyer H W, Cohen S N, Davis R W, Highness D S, Nathans D, Roblin R, Watson J D, Weissman S and Zinde N D. Potential biohazards of recombinant DNA molecules. (1974) Science.185, 303.
10. Curtiss R, Inoue M, Pereira D, Hsu A L and Rock L. Construction in use of safer bacterial host strains for recombinant DNA research. In Scott WA and Werner RW, eds.
11. Dupuy C. Analyse et conception d'outils pour la traçabilité de produits agroalimentaires afin d'optimiser la dispersion des lots de fabrication. Thèse en productique. Institut national des sciences appliquées de Lyon (2004).
12. Moe T. Perspectives on traceability in food manufacture. Food Science and Technology, 1998, (1998) Vol.9, pp. 211-214.
13. Hobbs J E, Bailey DV, Dickinson D L et al. Traceability in the Canadian red meat sector do consumers care? Revue canadienne d'agroéconomie. (2005), vol53 n° 1 pp 47-65.
14. Verret C, Mathoulin-Pélissier S, Courbil R, Perez P, Destret F, Roubinet F, Vidal I and Salmi L R. Evaluation du système de traçabilité des produits sanguins labiles en région Midi-Pyrénées. (1998) Transfus Clin Biol., 1998, Vol.5, pp.275-282.
15. Viruega J L and Vernet M. Le nouvel usage de la traçabilité dans le secteur français de la viande bovine. (1999) Revue française de gestion industrielle, 1999, Vol .18, n°4, pp.81-97.
16. ISO. Norme ISO 8402 :1994. Management de la qualité et assurance de la qualité 1994, European standard. (1994).
17. GENCOD. La traçabilité dans les chaînes d'approvisionnement, de la théorie à la pratique, Issy-les-Moulineaux : GENCOD 2001, 98p. (1994).

18. Potherat C, Mainsant P. Le recul des viandes de ruminants dans la consommation de viande, volailles et poisson en France au cours des 25. Dernière années : une réorientation du choix des ménages. (1995) Renc, Rech. Ruminants 2, 1-8.
19. Compris P. La consommation des produits animaux en France : tendances et perspectives. (1997) INRA prod. Anim, 10, 267-274.
20. Renou J P. Les méthodes analytiques. La dilution isotopique caractérisée l'origine d'un produit. (1998) Viandes prod. Carnés 19, 77.
21. Jansen M B and Eradus W. Future developments on devices for animal radiofrequency identification. Computers and electronics in Agriculture, 1999. (1999)Vol. 24, pp. 109-117.
22. Arana A, soret B, Lasa I, and Alfonso L. Meat traceability using DNA markers : application to the beef industry."Meat Science, (2002), Vol. 61, pp. 367-373.
23. Balding D J, Nichols R A. A method for quantifying differentiation between populations at multi-allelic loci and its implications for investigating identity. (1995).
24. Auer C A. Traking genes from seed to supermarket: techniques and trends. (2003) Trends in plant science, 2003, vol. 8. n°12, pp.519-567.
25. White F, Garfinkel D, Huffman G, Goeden M and Nester. Sequences homologous to AgrobacteriumRhizogenes T-DNA in the genomes of uninfected plants. (1983) Nature, 301, 348-350.
26. Puech J C et Kuntz M. Contrôle de la maturation et de la qualité des fruits in : Les plantes transgéniques Enjeux et risques. (1997) La lettre des Sciences de la Vie du CNRS, n° 70 13-16.
27. Chaufaux J, Sanchis V, Lereclus D. Bacillus thuringiensis, un réservoir d'insecticides. Dans Les plantes transgéniques en agriculture. (1996) J. Libbey Eurotext ed. Montrouge, 143-159.
28. Chesebro B. BSE and prions: uncertainties about the agent. (1998) science 279, 42-43.
29. Dormont D. Les agents transmissibles non conventionnels ou prions. (1997) Virologie 1, 11-22.
30. Hallerman E M and Kapuscinski A R. Transgenic fish and public policy: Regulatory concerns. (1990) Fisheries 15 (1), 12-20.
31. Hemmed D, Desmazaud M, Martinet J et Houdebine L M. Levains lactiques et levains non lactiques. Utilisation et perspectives In : Biologie de la lactation. (1993). Les Editions INSERM, Paris. INRA-Editions, Versailles.
32. Maguin E, Prévost H, Gruss A. Construction of food grade mutants of lactic acid bacteria. (1996) Lait. 76 : 139-146.
33. Rallu F, Gruss A, Maguin E. Mutants de Lactococcus lactis résistants l'acidité. (1998) Lait. 77 : 131-137.
34. Grove R, White et al. Uncertain world : GMOs, food an public attitudes in Britain, Lancaster University (1997).

- 35. Pascal G, La stratégie d'évaluation de la sécurité alimentaire des plantes transgéniques.** (1997) In Oléagineux, Corps gras, Lipides vol. 4, 241-244.
- 36. Aubert C, Part F.** Dossier OGM, les quatre saisons du jardinage n°33 mars-avril 2002.
- 37. Robert A B et Franck S.** Les aliments transgéniques : une menace pour les moins nantis. Fondation Charles-Léopold mayer. (2002) Collection enjeux planètes.
- 38. Solenne P.** Thèse ENSA de rennes. (2001) L'institutionnalisation de l'agriculture biologique (1980-2000).
- 39. Colbach N, Meynard J M.** Modelling the influence of cropping system on gene flow for herbicide resistant rapeseed. Presentation of model structure. (1996) Xe Colloque International sur la Biologie des Mauvaises Herbes, Dijon, septembre 1996, pp. 223-230.
- 40. Jacob F R, Monod J.** Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. (1961) Journal of Molecular Biology. 3, 318-356.
- 41. Rich A et Kim S H.** La structure tridimensionnelle de l'ARN de transfert. (1978) Science S, 50-61.
- 42. Larzuld C.** La PCR, un procédé de répllication in vitro. (1993) 388 ptec & Doc Lavoisier, paris.
- 43. Ehrlich S D, Noirot P, Petit M A, Setlow J K et Hollaender A.** Structural instability of Bacillus subtilis plasmids. (1986) In Genetic engineering eds, vol 8, pp 71-83 plenum, New York.
- 44. Singleton P.** Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine. (2004) 6 th edition, 235.
- 45. Mullis K B et Floona F.** Specific synthesis of DNA in vitro via a Polymerase. (1987) Catalyzed chain reaction methods enzymol. 155, 355-350.
- 46. Birch D E.** Simplified hot start PCR. (1996) Nature 381 445--6.
- 47. Mullis K B.** The unusual origin of the polymerase chain reaction. (1990) Sci. USA 78, 2072--6.
- 48. Lawyer F C , Stoffel S , Saikir et al.** Isolation characterization and expression in E-coli of the DNA polymerase from thermus aquaticus.(1989) J. Biol- chem. 264, 6427 -37.
- 49. Saikir, Gelfond D H, Stoffel S et al.** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermo -stable DNA polymerase. (1988) Science 239, 487- -91.
- 50. Adams R L, Pknowler J T and leader D P.** the Biochemistry of the Nucleic Acids, 11 the Edn. (1992) Chanpman and Hall, Landon.
- 51. French A W.** Gene therapy-Sci. (1995) Amer. 273, 96-99. Proceedings of the National Academy of Science of the USA (2002) 99596-601.
- 52. Taylor G R et Loyan W P.** The polymerase chain Reaction : new variations on an old theme. (1995) Curr. Opin.Biotechnol. 6, 24-- 9.

53. Dang C et Jayasena S D. Oligonucleotid inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR . (1996) *J. Mol.Biol.*264:268--78.
54. Eckert K A et Kunkel T A High fidelity DNA Synthesis by the Thermusaquatique Cus DNA polymerase. (1990) *Nucl Acids Res.* 18, 3739-44. *Journal of clinical microbiology* (1999) 37 1274-1279.
55. Liuyg W. Thermal asymmetric interlaod PCR : automatable amplification and Sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. (1995) *Genomics.* Feb 10 : 25 (3) : 674-81.
56. Baltimore D. RNA- dependent DNA polymerase in Virious of RNA tumor Viruses. (1970) *Nature* 226, 1209-1211.
57. Higuchi R, Dollinger G, walsh P S, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequence. (1992) *Biotechnology* 10, 413-17.
58. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, et Watson R. DNA amplification reaction. (1993) *Biotechnology* 11, 1026-30.
59. Livak K J, Flood S J, Marmaro J, Giusti et Deetz K. Oligonucleotides with fluorexent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization PCR methods. (1995) *Appl* 4. 357-62.
60. Poitras E et Houde A. La PCR en temps réel : principes et applications –Reviewsin *Biology and Biotechnology (canada, vol2, NO2 december 2002. pp.2-11.) Applied and EN. Vironmental microbiology.* (1999) 65-265-2653.
61. Landegran U. The challengers to PCR a prolifération of chain réactions. (1996) *Curr. Opin. Biotechnol* 7, 95--7.
62. Axel k, Eurotext J L. Les plantes transgéniques en agriculture (1996).
63. Lipp M, Anklam E and Stave J W. Validation of an immunoassay for detection and quantification of a genetically modified soybean in food and food fractios using reference (2000).
64. Bertheau Y. Detection et identification des OGM (1998) *POUR*, 159 : 69-77.
65. Lipp M, Brodman P, Pietsch K, Pauwels J, and Anklam E. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maiz in dried powder. (1999) *Jornal of AOAC international* 82, 923-928.
66. Bertheau Y. et Diolez A. Les aliments passés au crible. (1999) *Biofutur*, 192 : 28-32.
67. Orrego C, Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J, White T J. Organizing a laboratory for PCR work PCR Protocols – a guide to methods and applications. (1990) San Diego: Academic Press, p. 446–454.
68. CEN. Foodstuffs - Detection of genetically modified organisms and derived products - Qualitative nucleic acid based methods. (2000) Proposal CEN/TC 275/WG 11 for adoption as first working document. Berlin: Comité européen de Normalisation, Deutsches Institut für Normung.

69. Meyer R. Nachweis gentechnologisch veränderter Pflanzen mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) am Beispiel der Flavr SavrTM-Tomate. (1995) Z. Lebensm. Unters. Forsch. 201 p. 583–586.
70. Pietsch K, Waiblinger H U, Brodmann P and Wurz A. Screeningsverfahren zur Identifizierung gentechnisch veränderter pflanzlicher Lebensmittel. (1997) Dtsch. Lebensm. Rundsch. 93, p. 35–38.
71. Köppel E, Stüder E, Lüthy J, Hübner P. Detection of genetically modified food. (1997) In Amado R, Battaglia R.
72. Pauli U, Liniger M and Zimmermann A. Detection of DNA in soybean oil. (1998) Z. Lebensm. Unters. Forsch. 207, p. 264–267.
73. Larrick J W. The PCR technique : quantitative PCR. (1997) Biotechnics books, Eaton publishing.
74. Gachet E, Martin G et al. Detection of genetically modified organisms (GMO) by PCR : a brief review of methodologies available . (1999) Trends in food science technology 9 : 380-388.
75. Giacca M, Zentilin L, Norio P, Diaviaccos S, Dimitrova D, Contreas G, Biamonti G, Perni G, Weighardt F, Riva S and Falschi A. Fine mapping of a replication origin of human DNA . (1994) proceeding of the national academy of science USA 91,7119-23.
76. Hardegger M, Brodmann P and Hermann A. Quantitative detection of the 35s promoter and the nos terminator using quantitative competitive PCR. (1999) European food research technology 2069, 83-87.
77. Studer E, Rhyner C, Luthy J and Hubner P. Quantitative competitive PCR for the detection genetically modified soybean and maize. (1998) Zeitschrift fur. Lebensmittel-untersuchung – forschung A. 207,207-213.
78. Morgenroth D, Hales T and Fobes K. Another link in the chain (2004). Card Technology Today, 2004, Vol.16, n°4, pp. 11-12.

Titre : Traçabilité Moléculaire des produits agricoles et agroalimentaire contenant des OGM par PCR

Résumé :

Le système de traçabilité est un procédé qui suit les différents étapes de la production pour assurer une bonne qualité et permet de reconnaître les conditions et les propriétés des productions, surtout, s'agissant des produits alimentaires les plus consommés et facilement périssables qui posent problèmes aux producteurs comme aux consommateurs. Parmi, ces problèmes, la présence des Organismes Génétiquement Modifiés (OGM).

La Biotechnologie des OGM est issue du développement fulgurant des techniques de la Biologie Moléculaire et du Génie Génétique, notamment la technique de PCR qui permet l'amplification de l'ADN à partir de quantités infimes présentes dans l'échantillon. Grâce à la PCR, la traçabilité biomoléculaire et infaillible des produit agroalimentaires basée sur la technologie de l'ADN recombinant est dvenue une réalité.

Summary:

The system of traceability is a set of operations which allow the following of the different steps of production to ensure a good quality of products and permit the knowledge of the conditions and the properties of the productions, especially perishable and more consumed foods. These last are responsible of many problems for both customers and productors, among them, the presence the Genetically Modified Organisms (GMO).

The Biotechnology of GMO is the result of the dazzling development of Techniques of the Molecular Biology and Genetic Engineering, especially the technique of PCR, which is based the DNA amplification from very low quantity in the samples. Know, using PCR, we are able to set up an infallible biomolecular traceability, based on the technology of recombinant DNA.

ملخص:

نظام الـ Traçabilité هو عملية تتبع مراحل الإنتاج لضمان نوعية جيدة، حيث يسمح بالتعرف على ظروف الإنتاج وخواص المنتج، خاصة المواد الغذائية لما لها من أهمية بالنسبة للمستهلك، الذي ازداد تخوفه من ظهور المشاكل الصحية المرتبطة بالتغذية. من بين هذه المشاكل تلك المتعلقة بظهور الكائنات المعدلة وراثيا (OGM).

هذه الأخيرة نجمت عن التطور الرائع في البيولوجيا الجزيئية و الهندسة الوراثية، والذي تزامن أيضا مع ظهور تقنية الـ PCR (تفاعل البوليميراز المتسلسل) التي تعتمد على تضخيم المادة الوراثية ADN للحصول على نتائج دقيقة، وتفادي الأخطاء والغش لتصبح أهم تقنيات Traçabilité وأضمنها.