



لجمهورية الجزائر الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة مننوري قسنطينة
كلية علوم والطبيعة والحياة

Département : Biologie et Écologie végétale علم البيئة النباتية و بيولوجيا و قسم

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie et génomique végétale.

Intitulé :

Techniques de Détection des OGM dans les Aliments

Présenté et soutenu par : **MOUBRI HASSIBA**

Le : 18/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : Dr. BOUSBA Ratiba (M.C - UFM Constantine).

Rapporteur : Pr. YKHLEF Nadia (Professeur - UFM Constantine).

Examineur : Mr. TEMAGOULT Mahmoud (M.A - UFM Constantine)

Année universitaire
2015 - 2016

Mes remerciements

J'adresse mes vifs remerciements au Professeur YKHLEF Nadia pour avoir bien voulu encadrer ce travail ainsi que pour son amabilité, son orientation et ses conseils fort précieux.

Je remercie tous mes professeurs pour ce qu'ils m'ont apporté durant le cursus. Je remercie également toute ma famille, en particulier mes parents pour leur aide et leur soutien.

Dédicaces

A mes parents et beaux parents

A mon fiancé

A mon frère et à mes belles sœurs

A, ma grand-mère que je chéris

A tous mes oncles et tantes

A, toute ma famille et mes amis

*A*insi qu'à la mémoire de mon oncle Koudeir

Je dédie ce travail

Résumé

Les organismes génétiquement modifiés (OGM) représentent une composante importante du marché mondial de l'alimentation humaine et animale, le taux de croissance des cultures génétiquement modifiées cultivées a augmenté de plus de 10% par an et a atteint 181,5 millions d'hectares dans le monde. Parallèlement à ce développement rapide des cultures GM, le public est toujours préoccupé par les risques potentiels des plantes GM et leurs dérivées. De ce fait une législation d'application a été mise en place pour vérifier la conformité avec les réglementations locales afin de donner le libre choix aux consommateurs, cette réglementation n'est néanmoins pas toujours appliquée, ce qui crée chez les consommateurs un profond doute et une non crédibilité quant aux produits importés tel que le maïs, le soja et le riz. L'utilisation d'organismes génétiquement modifiés et leur dérivés dans la chaîne alimentaire doit être soumise à une réglementation stricte et l'étiquetage des aliments doit être obligatoire.

Par conséquent, la mise au point de méthodes fiables pour la détection des OGM, leur identification, quantification et leur traçabilité est devenu de plus en plus importante. Afin d'exécuter ces règlements sur l'étiquetage des OGM, il est essentiel de développer et de standardiser de façon efficace et crédible les méthodes d'analyse pour le contrôle du contenu GM dans les produits alimentaires ainsi que dans les aliments pour animaux.

Dans ce contexte, le présent mémoire a pour objectif de faire une synthèse sur les principales avancées réalisées dans ce domaine, de présenter nos propres résultats sur l'essai qui a été fait afin de détecter la présence d'éventuels OGM présents sur le marché local en utilisant une technique d'analyse par amplification et de faire une synthèse des méthodes de détection dans le contexte du projet d'harmonisation des techniques de détection des OGM dans les pays (MENA) d'Afrique du nord et du moyen orient

Mots clés : *Organisme génétiquement modifié, traçabilité, étiquetage, techniques de détection.*

Summary

Genetically modified organisms (GMO) represent an important component in the global market of human and animal feeding. Growth rate of cultivated genetically modified organisms has increased by 10% per year reaching 181.5 million hectares in the world.

Simultaneously to this fast development of GMO crops, people are still concerned about the potential risks that GM plants and their derivatives may represent.

Therefore, a legislation has been settled to verify the compliance with local regulations to give the consumer more variety of choices, however, this regulation is still not applied yet, which created a fundamental questioning between consumers concerning imported products such as corn, soya or rice. The use of genetically modified organism and its derivatives in the food chain should be submitted to strict regulation and obligatory labelling.

Consequently, the setting up of reliable methods for GMO detection, identification, quantification and traceability has become more and more important. It is mainly important, in order to execute these regulations on GMO labelling, to develop and standardize in an efficient and credible way the analytical methods about controlling the GM constituent contained within food products and animal foodstuffs.

Within this framework, this memory aims to synthesize the foremost achieved developments in this field, and to expose our own results on the tests which were made to detect the eventual existence of GMO in the local market using an analyzing technique by amplification, also to summarize the detection techniques in the context of harmonization of GMO detection techniques in North Africa and Middle East.

Key words: Genetically modified organism, traceability, labeling, detection techniques.

ملخص

تمثل الكائنات المعدلة وراثيا عنصرا هاما من السوق العالمية للتغذية البشرية وكذا تغذية الحيوانات، تزايدت نسبة نمو زراعة الكائنات المعدلة وراثيا بأكثر من 10% سنويا لتصل مساحة المستغلات إلى 181.5 هكتار في العالم. وبصورة موازية لهذا التطور السريع لزراعة الكائنات المعدلة وراثيا، لا تزال الجماهير منشغلة بالأخطار التوقعية التي قد تنجم عن هذه النباتات المعدلة وراثيا ومشتقاتها.

لهذا الغرض، تم وضع تشريعا تنفيذيا من أجل مراقبة مدى المطابقة مع التنظيمات المحلية من أجل إعطاء أكثر حرية خيار للمستهلكين، في حين لم توضع هذه التنظيمات في حيز التنفيذ بعد، وهذا ما أثار عند المستهلكين شكوكا كبيرة ولا مصداقية في خصوص المنتوجات المستوردة، مثل الذرة وفول الصويا والأرز، إذ يجب إخضاع استعمال الكائنات المعدلة وراثيا ومشتقاتها في السلسلة الغذائية إلى تنظيما صارما، مع إجبارية وضع البطاقات التعريفية.

بالتالي، أصبح إعداد كفاءات موثوقة من أجل الكشف عن الكائنات المعدلة وراثيا، وتشخيصها وتحديد كميتها ومصدرها، أمرا في منتهى الأهمية.

ومن أجل تنفيذ هذه التنظيمات على توسيم الكائنات المعدلة وراثيا، لزم تطوير وتوحيد معايير بصفة ناجعة وموثوقة، أساليب وكفاءات تحليل يتسنى من خلالها مراقبة والكشف عن الكائنات المعدلة وراثيا الموجودة بالمنتوجات الغذائية وكذا تلك الخاصة بالتغذية الحيوانية.

في السياق نفسه، جاءت هذه المذكرة بهدف القيام بمقارنة تركيبية حول التقدمات المنجزة في هذا المجال، وكذا طرح نتائجنا الخاصة بالتجربة التي تم القيام بها من أجل الكشف عن وجود توقعي ووشيك للكائنات المعدلة وراثيا حاليا بالسوق المحلية، وذلك بالاعتماد على تقنية تحليل عن طريق التوسيع وكذا القيام بتركيب مقارن عن كفاءات الكشف في إطار مشروع اتساق تقنيات الكشف عن الكائنات المعدلة وراثيا ببلدان شمال إفريقيا والشرق الأوسط.

الكلمات الرئيسية: الكائنات المعدلة وراثيا، التتبع، البطاقات التعريفية، تقنيات الكشف

Sommaire du manuscrit

Introduction Générale	1
Chapitre 1 : Notion d'Organisme Génétiquement Modifié	3
1. Qu'est ce qu'un OGM ?	3
2. Historique de la transformation génétique	3
Chapitre 2 : Transformation Génétique Pour Quels Interêts : Quelques Exemples	6
1. Transformation génétique chez les Poacées	6
1.1 Transformation génétique sur le riz	6
1.1.1 Amélioration de la tolérance aux stress abiotique.....	6
1.1.2 Amélioration de la tolérance aux maladies fongiques	7
1.2 Transformation génétique sur le maïs.....	7
1.2.1 Amélioration de la tolérance aux maladies fongiques	7
1.2.2 Amélioration de la tolérance aux stress abiotique.....	9
2. Transformation génétique chez les légumineuses	10
2.1 Transformation génétique sur le soja.....	10
2.1.1 Amélioration de la tolérance aux stress abiotique.....	10
Chapitre 3 : Analyse Critique des OGM	13
1. Description de la construction des OGM	13
1.1 Les techniques de transformation génétique pour l'obtention d'un OGM.....	14
1.2 La classification des OGM.....	16
1.2.1 Les OGM de première génération	16
1.2.2 Les OGM de seconde génération	16
1.2.3 Les OGM de troisième génération	17
1.2.4 Les OGM de quatrième génération	17
2. Avantage ou inconvénient ?	17
2.1 Avantages des OGM	18
2.2 Risque des OGM.....	20

3. Tendance réglementaire	21
3.1 Le choix des africains devant la culture des OGM	21
3.2 Le cas de l'Algérie	23
Chapitre 4 : Méthodes de détection des OGM	24
1. Introduction	24
2. Méthodes de détection.....	24
2.1 Détection d'OGM basée sur la détection de l'ADN	24
2.1.1 Le séquençage	24
2.1.2 PCR quantitative et semi-quantitative.....	25
2.1.3 PCR qualitative	25
2.1.3.1 Le criblage	26
2.1.3.2 Les PCR spécifiques au gène.....	26
2.1.3.3 L'amplification spécifique à la construction	26
2.1.3.4 Le PCR spécifique à l'évènement	27
2.2 Détection d'OGM basée sur la détection de protéines.....	29
2.2.1 Western Blot.....	29
2.2.2 Test d'essai d'immunoabsorption en enzymatique (ELISA)	29
2.2.3 Bandelettes tests	30
2.2.4 Spectroscopie de masse	30
2.2.5 Microarrays (Puces à ADN).....	31
Chapitre 5 : Etude expérimentale	33
1. Introduction	33
2. Matériel végétal utilisé	34
3. Méthode d'analyse utilisée.....	35
3.1. Extraction d'ADN	35
3.2. Contrôles de la qualité et de la quantité des ADN extraits	37
3.2.1. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	37

3.2.2. Quantification des ADN extraits	37
3.2.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :	37
3.2.3.1. Programmes utilisés.....	38
3.2.3.2. Analyse des résultats de la PCR	38
4. Résultats et interprétation.....	39
4.1. Qualité de l'extraction d'ADN.....	39
4.1.1. Analyse au Nanodrop	39
4.1.2. L'amplification d'ADN.....	40
Conclusion Générale	44
Bibliographie	45
Annexe A	48

Liste des Figures

Figure 1.1 Application de Frederick Griffith	4
Figure 2.1 carte du vecteur d'expression et la régénération des plants de maïs transgéniques ..	9
Figure 3.1 Réalisation d'une construction génétique	13
Figure 4.1 Résumé des méthodologies et exemple de données [Alasaad et al. 2016]	28
Figure 5.1 Extraction d'ADN controles	36
Figure 5.2 Résultat PCR de l'état de fragmentation.....	40
Figure 5.3 Résultat PCR du gène SPS.....	41
Figure 5.4 Résultat PCR du promoteur P35S.....	42
Figure 5.5 Résultat PCR du terminateur T-nos	43

Liste des Tables

Table 1.1 Historique de la transformation génétique	5
Table 3.1 Techniques de tranfert direct.....	14
Table 3.2 avantages potentiels du géni-génétique dans différents domaines.....	18
Table 3.3 Motifs invoqués pour le rejet des OGM : les risques, les craintes et les raisons du refus	20
Table 3.4 principales différences entre les approches de réglementation européenne et américaine	22
Table 4.1 Avantage et inconvénient des méthodes de détection d’OGM basé sur la detecion des protéines	31
Table 5.1 Echantillons collectés dans le commerce	34
Table 5.2 Echantillons témoins	34
Table 5.3 résultats de l’analyse au Nanodrop	39

Liste des abréviations

ADN = Acide Désoxyribonucléique

DNTP = deoxy-NucleotideTri-Phosphate

EDTA = Éthylène Diamine Tétra-Acétique

UV = Ultra Violet

OGM = Organisme Génétiquement Modifié

PGM = Plante Génétiquement Modifié

GM = Génétiquement Modifié

MENA = Midle East & North Africa

ISAAA = International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications

UE = Union Européene

PCR = Polymérase Chaine Réaction

P35S = Promoteur 35S

Tnos = Termineur nopalinesynthase

JRC = Joint Research Service

OMC = Organisation Mondiale du Commerce

CaMV = Cauliflower mosaic virus

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay

CTAB = Cetyltrimethylammonium bromide

RNase = Ribonucléase

ROS = Espècesréactives de l'oxygène

TE = Tris Ethylenediaminetetraaceticacid

ARN = Acide ribonucléique

TBE = Tris Borate Éthylène Diamine Tétra-Acétique

SPS = Suchrose Phosphate Synthase

Taq = Thermusaquaticus

ABA= Acide abscissique

PEG = Polyéthylène glycol

Pb = Paire de bases

Introduction Générale

Introduction Générale

La détection d'Organismes Génétiquement Modifiés (OGM) dans les échantillons alimentaires et aliments pour animaux est devenue une question très complexe qui nécessite l'intégration d'informations techniques, juridiques et commerciales. Dans le contexte du présent document, seules les plantes génétiquement modifiées (PGM) sera pris en considération; la modification génétique de micro-organisme ou d'OGM à des fins thérapeutiques est au-delà du champ d'application de ce travail.

Le développement et le déploiement des cultures génétiquement modifiées sont en constante augmentation, la culture de ces derniers a augmenté à la fois en termes de superficie des terres cultivées et en termes de diversification des trait agronomique. Selon le dernier rapport de l'ISAAA en 2014, 25 pays avaient planté des cultures GM, alors que 30 autres pays avaient accordé les autorisations réglementaires pour leur importation pour l'alimentation humaine, au total 181,5 millions d'hectares de plantation d'OGM.

L'approbation et l'introduction sur le marché des cultures génétiquement modifiées et de leur aliment dérivés sont réglementées dans différents pays par des cadres juridiques respectifs. Ces cadres juridique s'appui sur un étiquetage volontaire et une traçabilité crédible.

Pour l'Union Européenne (UE), les exigences en matière d'étiquetage et de traçabilité sont très strictes, tandis que d'autres pays ont aucune réglementation en place, ni pour le marketing, ni pour l'étiquetage c'est le cas des pays d'Afrique de nord. Par conséquent les cultures génétiquement modifiées autorisées dans certains pays n'ont pas nécessairement le même statut d'approbation dans les autre pays, un tel manque de synchronisation peut avoir un impact considérable en particulier sur le commerce national du pays en question.

Les éléments clés techniques qui sont nécessaires à la mise en œuvre des exigences législatives, incluent la surveillance des OGM et leur éventuel étiquetage. Par contre, la disponibilité des protocoles d'échantillonnage appropriés est recommandée.

Parmi les différentes approches analytiques qui peuvent être utilisées pour la détection d'OGM l'approche la plus directe et celle qui est largement appliquée vise la modification génétique elle-même, à savoir la modification de l'ADN, en utilisant la réaction en chaîne par polymérase (PCR).

En effet, la PCR a été prouvé être la méthode la plus exact, applicable à partir de graines à des produits finaux sans être affecté par le niveau de traitement de l'alimentation

humaine ou animale. Jusqu'à présent, aucune autre technique d'analyse n'a atteint le même degré de précision que celui fourni par la PCR.

La stratégie du test couramment appliquée consiste en plusieurs étapes: la présence de matériel GM dans un échantillon est d'abord vérifiée par des méthodes de ciblage les plus courantes comme des éléments génétiques présents dans la construction GM, dans le cas d'une réponse positive, la deuxième étape est l'identification de la partie GM, éventuellement suivie par sa quantification. Cette stratégie est cependant pas plus appropriée pour le nombre et la complexité croissante de l'ensemble global des OGM au niveau mondial.

Les éléments les plus communs dans les constructions d'OGM, sont le promoteur 35 S du virus de la mosaïque du chou-fleur (p35S) et le terminateur du gène de nopaline-synthétase d'*Agrobacterium tumefaciens* (tNOS), ce sont les cibles typiques d'un simple dépistage.

En revanche, les différentes variantes des éléments utilisés pourraient donner lieu à de faux négatifs. Cette complexité se traduit par une augmentation de la difficulté d'avoir une vue d'ensemble de tous les éléments potentiellement présents dans les OGM. Jusqu'à présent, des centaines de méthodes de détection d'OGM ont été développés et publiés dans plusieurs revues scientifique dans le domaine de la science ainsi que dans les bases de données appropriés, plusieurs avis ont déjà été établis en décrivant, en évaluant et en comparant le large éventail des différentes approches analytiques applicables aux essais d'OGM.

Cependant, la variété des cultures GM commerciales à ce jour invoque une approche plus large. Un nombre élevé de différents OGM contiennent les éléments p35S et tNOS, ce qui signifie que la disponibilité de méthodes de détection individuels, validés en tant que telle ne suffisent pas pour faire face à la complexité mentionné ci-dessus. Pour une stratégie de détection efficace et complète, les tests de routine ainsi que les méthodes doivent être soigneusement sélectionnés et combinés, et le résultat doit être interprété de manière correcte.

Dans ce contexte, le présent rapport a pour objectif de faire une synthèse sur les principales avancées réalisées dans ce domaine, notre étude participera dans le projet collaborative pour la surveillance des OGM dans la région MENA. En outre, le projet vise à construire un réseau MENA de laboratoires spécialisés dans les essais d'OGM, conformément aux normes internationales, ce qui permettra en premier lieu aux laboratoires de maîtriser les techniques validés par le JRC. La détection des OGM nécessite des compétences techniques appropriées ainsi que des laboratoires accrédités pour la détection et la mise en œuvre de la réglementation des OGM en Algérie.

Chapitre 1 :
Notion d'Organisme
Génétiquement Modifié

Chapitre 1 : Notion d'Organisme Génétiquement Modifié

1. Qu'est ce qu'un OGM ?

Un (OGM) ou proprement dit Organisme Génétiquement modifié comme définition générale plus au moins académique, est tout organisme vivant qu'il soit animal, végétal, ou alors qu'il appartient au monde microbien, ayant été modifié de façon non naturelle par génétique, c'est-à-dire par intervention de la main de l'homme au sein de laboratoires, dont les caractéristiques génétiques initiales ont été modifiées soit par addition d'un ou plusieurs gène(s) provenant d'une autre espèce à condition de lui avoir ajouté divers éléments nécessaires à son expression dans l'organisme receveur, soit par suppression, remplacement, addition, ou toute autre modification sur au moins l'un de ses gènes ou d'un morceau de son matériel génétique 'ADN' ce qui veut dire en d'autres termes pour lui attribuer des caractéristiques qu'il ne possède pas du tout ou qu'il possède déjà, mais à un degré jugé insatisfaisant à son état naturel ou alors pour lui enlever ou atténuer certaines caractéristiques jugées indésirables cette définition vaut pour tous les OGM, quels qu'ils soient, et quel que soit leur secteur d'utilisation ou d'application.

De nos jours bien des débats existent sur ce qui est réellement un organisme génétiquement modifié, les défenseurs des OGM d'un côté et les opposants de ces derniers de l'autre.

Plusieurs sortes d'OGM existent que ce soit dans le milieu de l'agriculture, de l'industrie pharmaceutique (depuis bien longtemps déjà) dans l'industrie cosmétique ou alors ceux qui sont indispensables à toute recherche scientifique dans le domaine des sciences du vivant.

2. Historique de la transformation génétique

La transformation génétique est l'insertion d'un fragment d'ADN étranger dans une cellule propre à l'organisme lui-même grâce à des techniques de transgénèse qui ne cessent d'évoluer avec les années et les connaissances acquises par les chercheurs au fil des expériences.

Autrefois la définition de la transformation génétique laissait les chercheurs un peu dubitative car pour certains cela a toujours existé, depuis le commencement de la vie mais sous un autre nom plus approprié à l'époque et qui est l'évolution génétique (due à des mutations aléatoires du matériel génétique, aux phénomènes de conjugaison ou alors d'une

sélection naturelle due au hasard) qui n'est qu'une extension de la théorie de Charles Darwin mais bien évidemment en ce temps là tous les mécanismes de l'hérédité ou encore de la génétique était encore mal connu, désormais l'évolution n'est plus envisagée comme la transformation d'individus isolés mais comme celle de groupement d'individus de même espèce.

Les premiers organismes vivants à être transformés génétiquement sont les micro-organismes et les cellules animales, et grâce aux progrès de la biologie moléculaire et cellulaire végétale les transformations génétiques ont pu être adaptées aux cellules végétales.

En 1928 le médecin et bactériologue Anglais est le premier à mettre en évidence le principe d'échange de gène entre bactéries [Griffith1928].

1928



Frederick Griffith discovers transformation in bacteria and establishes the foundation of molecular genetics. He shows that injecting mice with a mixture of live, avirulent, rough *Streptococcus pneumoniae* Type I and heat-killed, virulent smooth *S. pneumoniae* Type II, leads to the death of the mice. Live, virulent, smooth *S. pneumoniae* Type II are isolated from the dead mice. Not until the 1930's, did Avery, Macleod and McCarty take up Griffith's work and try to explain the results.

Griffith, F. 1928. The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* **27**, 113-159.

Figure 1.1 Application de Frederick Griffith

En 1972, Paul Berg de l'université de Stanford aux États-Unis et son équipe créent une molécule d'ADN hybride à partir de l'ADN du singe et de celui d'une bactérie. Il s'agit de la première manipulation génétique.

En 1973, Stanley Cohen et Herbert Boyer, deux collaborateurs perfectionnent la technique et créent une chimère génétique utilisant les techniques de recombinaison de l'ADN en insérant le gène SV40 inducteur de tumeurs chez le singe dans un vecteur capable de se reproduire dans une population bactérienne, ils ont été confrontés dès lors à une multitude de questions avec une peur profonde de créer de redoutables bactéries cancérogènes, un bon nombre d'essais a été fait et le génie génétique prit alors son essor.

Table 1.1 **Historique de la transformation génétique**

Années	
1973	Identification du plasmide Ti dans la bactérie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Ce plasmide permet d'accueillir le gène porteur du caractère recherché et agit comme un transporteur. Il est ensuite en mesure de l'introduire dans le génome d'une plante.
1983	Première plante transgénique obtenue (tabac au stade expérimental).
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 (Chine : tabac résistant à un virus).
1994	Premier légume transgénique commercialisé (tomate FlavrSavr à maturation retardée).
1997	Premier tabac producteur d'hémoglobine. En France : première autorisation de culture transgénique pour le maïs résistant à la pyrale.

Chapitre 2 :
Transformation Génétique
Pour Quels Intérêts :
Quelques Exemples

Chapitre 2 : Transformation Génétique Pour Quels Intérêts : Quelques Exemples

1. Transformation génétique chez les Poacées

1.1 Transformation génétique sur le riz

1.1.1 Amélioration de la tolérance aux stress abiotique

Le riz (*Oryza sativa* L.) est une céréale importante qui est très cultivé dans le monde dans les deux zones climatiques tropicales et tempérées c'est une culture qui est constamment soumise à des contraintes biotiques et abiotiques , y compris à une salinité élevée à des températures extrêmes, à des métaux lourds, aux inondations, aux sécheresse, à l'épuisement des éléments nutritifs, et aux infections affectant la germination à cause des agents pathogène, Ces changements environnemental provoquent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) -le stress oxydatif induit par la suite directement et indirectement une perturbation de l'homéostasie redox ,ce stress oxydatif conduit à des dommages cellulaires tels que l'instabilité de la membrane par oxydation des lipides, l'inactivation d'une enzyme par la carbonylation des protéines, et l'oxydation de l'ADN, qui diminue la capacité photosynthétique et de la capacité métabolique,entraînant la mort cellulaire [Huang et al. 2013],[Mittler2012; Apel& Hirt2004]. Pour surmonter et résister à ces conditions oxydative, les plantes ont développé une large gamme de cellules, une sorte de systèmes de secours, y compris des molécules antioxydantes des enzymes, des molécules chaperons et des solutés métaboliques tels que la proline et de tréhalose [Singh et al. 2011].Plus précisément, les plantes détoxifier ROS par le cycle AsA-GSH par l'intermédiaire d'une combinaison d'antioxydants, tels que l'ascorbate (AsA) et le glutathion (GSH), ainsi que des enzymes antioxydantes telles que la peroxydase d'ascorbate (APX), le monodehydroascorbate réductase (MDHAR), et le déshydroascorbate réductase (DHAR). Composants de la voie AsA-GSH qui est localisés dans différents organites, y compris les chloroplastes, cytosol, et les mitochondries.

Les chercheurs ont démontré que la surexpression du gène c-glutamylsynthétase de *B. juncea* L. (BrECS) sous le contrôle d'une protéine sensible ABA inductible par le stress et le promoteur (Rab21) ainsi qu'un terminateur nos, amélioré la tolérance au sel et au viologène de méthyle (MV) et donné une meilleure germination, le gène ECS de *B. juncea* a été cloné par

transcription inverse (une RT-PCR), en utilisant un jeu d'amorce et un vecteur plasmide, en réduisant les dommages cellulaires par la création d'un GSH amélioré état redox et un rendement accru de la biomasse et de grain du riz dans des conditions de terrain ou de parcelles inondées d'eau, améliorant ainsi le rendement du riz [Bae et al. 2013].

1.1.2 Amélioration de la tolérance aux maladies fongiques

Le virus RSV provoque de grave maladie du riz en Asie de l'Est et est capables de poser de sérieux problèmes pour la stabilité de la production. Son génome est constitué de quatre ARNs simple brin. Le premier ARN code pour la RNA-dépendante une ARN polymérase (RdRp), tandis que les trois autres segments ont une polarité anti-sens ; chacun des brins a deux cadres de lecture ouvertes qui ne se chevauchent sur les brins opposés, séparés par une région intergénique non codante, qui joue un rôle dans la terminaison de la transcription. Le NS3 qui code pour la synthèse du brin de virion de l'ARN3, est un suppresseur viral RNA silencing (VSR). Il peut contrecarrer l'établissement de l'ARN silencing, et peut également empêcher la propagation des signaux silencieux en séquestrant le petit ARN interférents (siRNA), le VSR est un suppresseur viral d'ARN permettant à des virus d'inhiber ou d'échapper au RNA silencing, un mécanisme antiviral naturel des plantes. Étant donné que l'expression de VSR dans les plantes contrecarre les effets de l'ARN de défense de l'hôte, il pousse souvent des plantes à devenir sensibles à d'autres virus. Les chercheurs ont prouvé que le riz exprimant NS3 a un phénotype normal et est initialement sensible au RSV. En outre, le riz transgénique a montré que le NS3 a une meilleure résistance à la pyriculariose du riz, provoquée par le champignon *Magnaporthe oryzae*. Et que le NS3 peut avoir une double fonction pour faciliter l'infection virale comme un VSR mais aussi d'inhiber le développement pathogène comme inducteur de défense de l'hôte.

Le gène RSV NS3 dirigé par le promoteur 35S de CaMV a été exprimé dans le riz (*Oryza sativa* L. spp. Japonica. cv. Nipponbare) par une transformation par *Agrobacterium*. [Wu et al. 2014].

1.2 Transformation génétique sur le maïs

1.2.1 Amélioration de la tolérance aux maladies fongiques

Le glyphosate est l'ingrédient herbicide actif dans le Roundup. Il a un mécanisme d'action visant une enzyme trouvée seulement chez les plantes et certaines bactéries. Pour cette raison, il a un excellent profil toxicologique et environnementale, Cependant, il détruit également les autres espèces cultivées, Le glyphosate seul est peu efficace, car il n'adhère pas

aux feuilles et les pénètre difficilement. On lui adjoint donc un tensioactif (ou surfactant). Ces produits sont connus pour provoquer des mortalités cellulaires (par contact direct avec une cellule ou un tégument et des irritations. La capacité à transformer des plantes en utilisant la biologie moléculaire a permis le transfert d'un gène de glyphosate insensible à des espèces cultivées, permettant ainsi l'utilisation du glyphosate dans la culture et une voie de signalisation d'une nouvelle ère dans la gestion des mauvaises herbes. Aujourd'hui, la résistance au glyphosate a été introduite dans plusieurs des principales cultures cultivées sur un nombre croissant d'hectares de soja, du maïs, du canola et du coton.

Les chercheurs ont utilisé une Peptide de liaison en utilisant LP4 / 2A pour la transformation des gènes multiples considérant comme étant une méthode efficace pour empiler ou de mettre sous forme de pyramide plusieurs traits dans les plantes. Le gène (Bt) cry Bacillus thuringiensis et le gène epsps (5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) sont deux gènes importants pour la culture de plantes résistantes aux ravageurs et tolérante au glyphosate. Les chercheurs en utilisant le peptide LP4 / 2A qui joue le rôle d'un liant ont permis de connecter le gène Bt cry1Ah avec le gène EPSPS et 2mG2-combiné du gène manA large utilisé comme marqueur sélectif et cela en construisant un vecteur d'expression coordonnée appelée p2EPUHLGN. Le vecteur d'expression a été transférée dans le maïs par la transformation indirecte *Agrobacterium tumefaciens*, et ainsi 60 plantes ont été obtenus, dont 40% étaient des transformants positifs. La détection moléculaire a montré que les deux gènes dans le vecteur de fusion ont été exprimés à la fois et correctement épissés dans le traitement de traduction.

Par conséquent, le liant peptide LP4 / 2 a fourni une stratégie simple et fiable pour la production d'empilage de gènes dans le maïs et le résultat a montré que le système de transformation du gène de fusion de LP4 / 2A était réalisable dans les plantes monocotylédones [Sunet al. 2015].

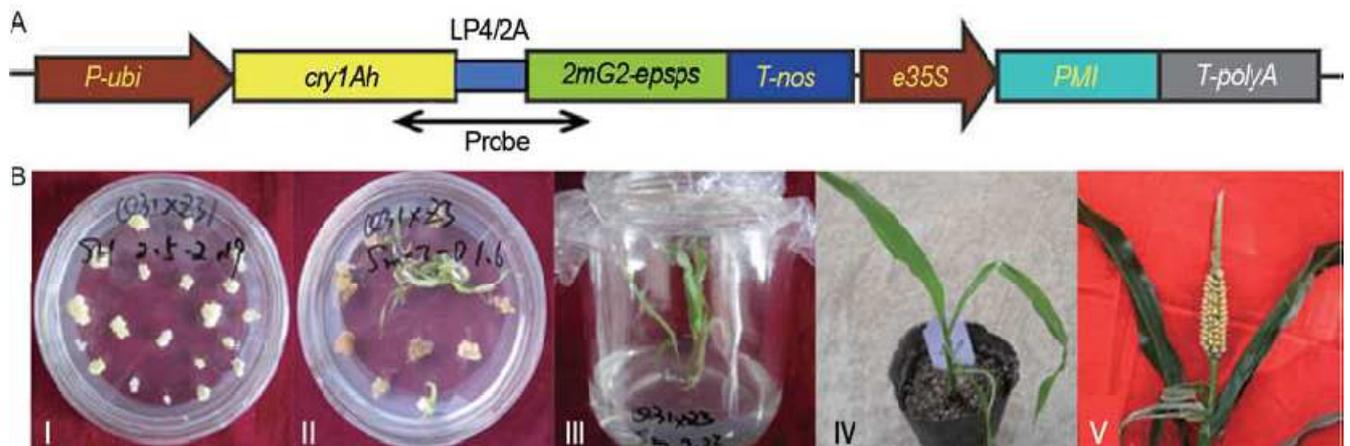


Figure 2.1 carte du vecteur d'expression et la régénération des plants de maïs transgéniques

A, une carte du vecteur d'expression. P-ubi, promoteur de l'ubiquitine; cry1Ah, le gène Bt cry1Ah; 2mG2-epsps, gène 2mG2-epsps; T-sai, nopaline terminateur du gène de la synthase; e35S, virus de la mosaïque du chou-fleur amélioré promoteur 35S; PMI gène phosphomannose isomérase; T-polyA, terminateur polyA; LP4 / 2A, peptide de liaison LP4 / 2A; sonde, un fragment de 900 pb du gène de fusion a été utilisé comme sonde pour un transfert de Southern. B, la sélection des cals résistants et la régénération des plants de maïs transgéniques. I, sélection des cals résistants; II, tournage résistant; III, plante résistante; IV, plante régénérée; V, T0 semences de maïs transgénique [Sunet al. 2015].

1.2.2 Amélioration de la tolérance aux stress abiotique

La sécheresse est l'un des stress abiotiques les plus importants qui affectent la productivité des cultures céréalières et notamment du maïs, représentant environ 24 millions de tonnes de maïs perdu par an, la sécheresse réduit la productivité en inhibant le développement et la photosynthèse.

Des études antérieures ont montré que l'expression d'une kinase activée par mitogène de la protéine kinase (MAPKKK), poussait le gène à activer une cascade de signaux d'oxydation et conduisait à la tolérance aux basses températures, aux hautes températures et à la salinité dans le tabac transgénique. Pour analyser le rôle de l'activation du stress oxydatif de signalisation dans l'amélioration de la tolérance à la sécheresse dans les grandes cultures, les chercheurs ont utilisé un MAPKKK du tabac (NPK1) et a été exprimée constitutivement dans le maïs. Les résultats montrent que l'expression NPK1 améliorée la tolérance à la sécheresse chez le maïs transgénique. Dans des conditions de sécheresse, les plants de maïs transgéniques ont maintenu des taux de photosynthèse significativement plus élevés que le contrôle non-transgénique, ce qui suggère que NPK1 induit un mécanisme qui protège les machines de la photosynthèse des dommages causés par la déshydratation. En outre, les plantes transgéniques tolérantes à la sécheresse produisent des graines avec des poids similaires à ceux dans des conditions où ils sont bien arrosés, alors que les poids des graines

de plantes témoins non transgéniques sous effet de sécheresse ont été considérablement réduits par rapport à leurs homologues non sollicités [Shouet al. 2004].

2. Transformation génétique chez les légumineuses

2.1 Transformation génétique sur le soja

Des méthodes efficaces ont été mises au point pour l'introduction de gènes étrangers dans la plupart des plantes cultivées. Cette technologie est utile à la fois pour l'amélioration des caractéristiques agronomiques, mais aussi pour la recherche fondamentale sur la fonction des gènes. La technologie de transformation est particulièrement bénéfique pour une culture comme le soja, le *Glycine max*, est un pool de matériel génétique très large à la suite de plus de 3000 ans d'élevage. Malheureusement, le soja a été l'une des plantes cultivées les plus difficiles à transformer. Les premières transformations réussies du soja utilisant l'*Agrobacterium tumefaciens* [Hinchey et al. 1988] et la biolistique, par contre l'efficacité a été très faible et les méthodes étaient difficiles à reproduire. Suite à cela, diverses méthodes de transfert de gènes et des tissus cibles ont été examinées, mais l'efficacité est restée faible pour la plupart des approches [Dinkins et al. 2002]. Ceux-ci comprennent des méthodes telles que l'électroporation de protoplastes [Lin et al. 1987; Gros et al. 1991] et tissu nodal intact.

Ces méthodes sont prometteuses, fournissant des plantes peuvent être régénérées à partir de protoplastes et ainsi le taux d'obtention de plantes transgénique est augmentée. Les deux méthodes les plus fiables pour le soja sont la transformation par *A. tumefaciens* et la biolistique d'ADN.

2.1.1 Amélioration de la tolérance aux stress abiotique

Le soja tolérant aux herbicides est le soja génétiquement modifié le plus cultivé au monde. Le soja étant en effet assez peu couvrant et peu compétitif par rapport aux mauvaises herbes, la principale difficulté de sa culture réside dans la maîtrise du désherbage, en particulier dans les premiers stades de son développement. Cette maîtrise des adventices passe par différentes stratégies. En agriculture biologique et dans certaines exploitations conventionnelles, le désherbage est mécanique uniquement, la culture du soja s'y prêtant assez bien. En agriculture conventionnelle, et en fonction de la flore attendue, on procède à un traitement en pré-levée, en pré-semis ou post-semis et/ou à un traitement en post levée seulement avec un herbicide sélectif.

Le soja 356043 a été élaboré par Pioneer Hi-Bred Production Ltd. au moyen de la technologie de l'ADN recombinant, qui a permis d'introduire les gènes *gat4601* et *gm-hra*. Le gène *gat4601* code l'enzyme glyphosate-N-acétyl-transférase (GAT) dérivé des enzymes du *Bacillus licheniformis*, qui métabolise l'herbicide glyphosate, conférant ainsi de la résistance à ce végétal. Le gène *gm-hra* code une enzyme ALS modifiée qui lui confère de la résistance aux herbicides inhibant l'ALS.

Pioneer Hi-Bred Production Ltd. a fourni des données sur l'identité du soja 356043, une description détaillée de la méthode de transformation, des données sur le site d'insertion des gènes, le nombre de leurs copies et leur niveau d'expression dans le végétal ainsi que le rôle des gènes insérés et de leurs séquences de régulation. Les nouvelles protéines ont été identifiées et caractérisées. Pioneer Hi-Bred Production Ltd. a également fourni des données permettant d'évaluer la toxicité potentielle des nouvelles protéines pour le bétail et pour les organismes non ciblés ainsi que son pouvoir allergène potentiel pour les humains et pour le bétail.

Le glyphosate bloque la production d'acide shikimique nécessaire à la biosynthèse des acides aminés aromatiques, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane, chez la plante, donnant ainsi lieu à l'arrêt de la croissance ou au décès de la plante. Le gène *gat4601* code une enzyme dérivée de trois enzymes N-acétyltransférases du *B. licheniformis* laquelle désactive le glyphosate par N-acétylation. La séquence de cette enzyme est homologue à 84 p. 100 aux séquences utilisées pour la créer. Le gène *gat4601* qui a été introduit dans le soja au cours du processus de transformation permettant d'élaborer le soja 356043 confère à cette variété une tolérance au glyphosate au champ.

L'acétolactate synthétase (ALS), également connue sous le nom d'acétohydroxyacidesynthase (AHAS), est une enzyme qui joue un rôle clé dans la synthèse des acides aminés essentiels à chaîne ramifiée : l'isoleucine, la leucine et la valine. Les herbicides inhibiteurs de l'ALS interrompent la synthèse de l'isoleucine, la leucine et la valine chez les végétaux, entraînant ainsi l'arrêt de la croissance et la mort des plantes. Le gène *gm-hra* code une enzyme ALS du soja qui présente deux différences précises au niveau des acides aminés par rapport à l'enzyme du type sauvage, ce qui le rend résistant à toutes les catégories d'herbicides inhibiteurs de l'ALS. Le gène *gm-hra*, qui a été introduit dans le soja au cours du processus de transformation permettant d'élaborer la lignée 356043 confère à cette variété une tolérance au champ aux herbicides à base d'inhibiteurs de l'acétolactate synthétase (ALS).

Chez le soja 356043, aussi bien l'expression de GAT4601 que l'expression de GM-HRA sont régulées par un promoteur constitutif. Des échantillons de tissus de soja ont été prélevés

chez des plants à divers stades de croissance. L'expression moyenne des protéines GAT4601 et GM-HRA à divers stades de croissance a été mesurée par dosage immunoenzymatique. Les chercheurs ont extrait les protéines GAT4601 et GM-HRA du grain de soja 356043 puis ils les ont caractérisées. L'identification des protéines purifiées a été confirmée par immunotransfert de type Western, analyse d'empreinte de masse peptidique et caractérisation de la séquence N terminale.

Les concentrations des protéines GAT4601 et GM-HRA dans les tissus du soja 356043 étaient trop basses pour permettre l'extraction de montants suffisants et procéder à l'évaluation de l'innocuité pour l'environnement et pour l'alimentation du bétail. Pour obtenir des quantités suffisantes aux fins de l'évaluation de l'innocuité, il a fallu exprimer les gènes *gat4601* et *gm-hra* au moyen d'un système de production de *E. coli*. L'équivalence des protéines GAT4601 et GM-HRA produites par la plante et par le *E. coli* a été déterminée par comparaison de leur poids moléculaire, de leur réactivité immunologique, de leur empreinte de masse peptidique et de leur degré de glycosylation. Les résultats ont démontré que les protéines GAT4601 et GM-HRA produites par le soja 356043 sont équivalentes à celles produites naturellement par *E. coli*.

La méthode qui a été utilisée est le bombardement microprojectile d'embryons somatiques secondaires avec des fragments d'ADN contenant uniquement les gènes *gat4601* et *gm-hra*. Le soja 356043 a été sélectionné sur la base de sa tolérance au chloresulfuron; la présence des gènes *gat4601* et *gm-hra* dans le transformant, a été confirmée.

Chapitre 3 :
Analyse Critique des
OGM

Chapitre 3 : Analyse Critique des OGM

1. Description de la construction des OGM

Les éléments présents dans la construction des OGM reviennent régulièrement comme :

- Le promoteur qui est l'initiateur de la transcription.
- Le gène d'intérêt ou gène marqueur qui sert à sélectionner la plante ayant reçu la bonne insertion.
- Le terminateur qui donne le signal de la terminaison de la transcription.

En plus de ces trois éléments essentiels et qui sont présent pratiquement chez tous les organismes génétiquement modifié il y'a également la présence d'amplification, de séquence amplificatrices ainsi que des facteur de transcription et d'autres éléments, tous ces éléments qui sont utilisé pour la création d'OGM sont également utilisé lors de leur identification [Gendron 2009].

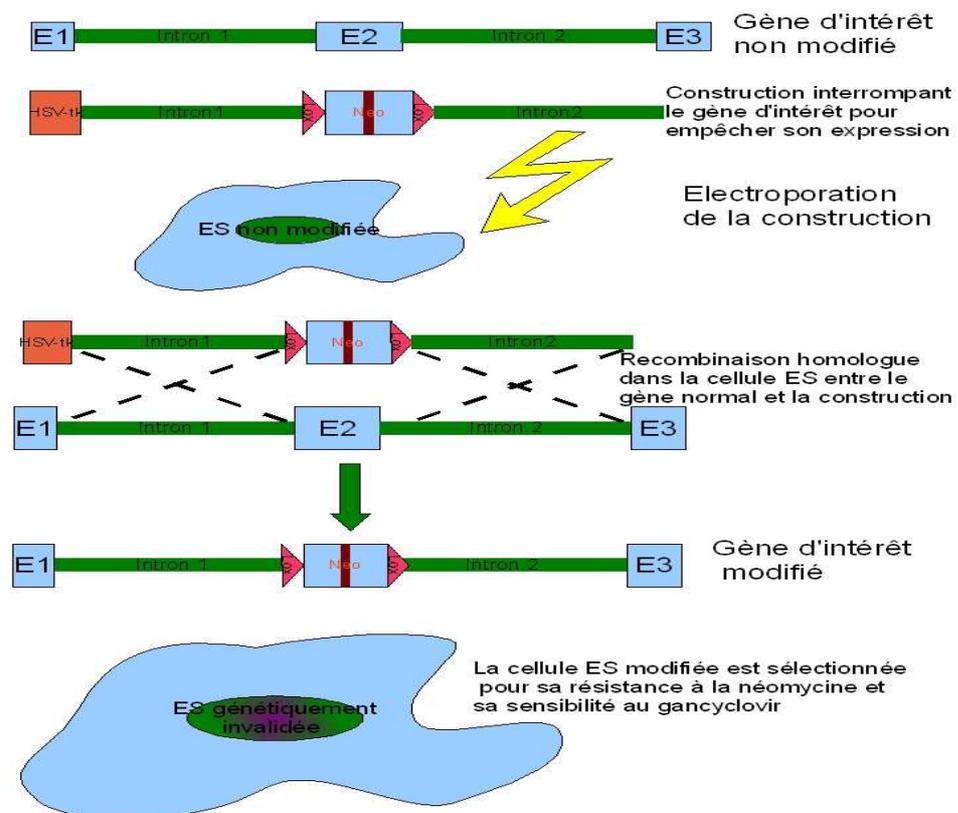


Figure 3.1 Réalisation d'une construction génétique

1.1 Les techniques de transformation génétique pour l'obtention d'un OGM

Il existe plusieurs méthodes pour fabriquer un organisme génétiquement modifié cela dépend de la nature de l'individu qu'il soit animale ou végétale, par la suite cela dépend également de la méthode utilisée que ce soit la méthode directe (méthodes physique), méthode chimique en faisant intervenir le polyéthylène glycol (PEG), une molécule capable d'induire la déstabilisation de la membrane plasmique et qui permet le transfert d'ADN, ou alors la méthode indirecte qui est également appelée méthode biologique en faisant intervenir des bactéries qui véhiculent le transgène jusqu'à la cellule souhaitée telle que l'*Agrobacterium tumefaciens*.

Ces techniques fonctionnent toutes sur des cellules végétales. Cependant les cellules animales sont spécifiques, elles ont un rôle déterminé au sein de l'organisme, ainsi, pour créer un OGM animal, il faut agir sur la cellule à la base de toutes les autres: la cellule-œuf (qui donnera alors naissance à un nouvel organisme génétiquement modifié)[Wang et al. 2015]. On utilise donc plus particulièrement la technique de la micro-injection, qui est une méthode physique en ce qui concerne la transgénèse animale.

Table 3.1 Techniques de transfert direct

<i>Technique de transfert direct</i>	
<i>Electroporation</i>	Cette méthode consiste à soumettre des ADN et des protoplastes à des champs électriques, ce dernier provoque une déstabilisation de la membrane plasmique et une ouverture des pores facilitant par conséquent le passage de l'ADN dans le noyau, il ne faut en aucun cas que le choc électrique soit fort si non cela empêchera la cellule de reprendre ses activités initiales. Technique utilisée sur : le Riz, le Maïs, l'Orge ...etc.
<i>Micro injection</i>	Cette méthode consiste à introduire directement le gène étranger dans la cellule hôte en utilisant un micromanipulateur monté avec un microscope, le gène est alors introduit accompagné de son complexe promoteur-terminateur dans le noyau à l'aide d'une micropipette, la cellule est alors modifiée. Technique utilisée sur : le Tournesol, le Colza, la pomme de terre ...etc.

<i>Biolistique</i>	Cette technique consiste à propulser le transgène directement dans les cellules végétales en utilisant des micro-billes de métal enrobé d'ADN, généralement ce sont des micro-billes en tungstène, ces dernières sont projetées en très grande vitesse sur les cellules hôtes, l'inconvénient de cette méthode est l'intégration de façon aléatoire de la cellule transformée dans l'ADN. Technique utilisée sur : le Coton, la Tomate, le Blé ...etc
<i>Lipotransfection</i>	Cette technique consiste à emprisonner, bloquer le gène d'intérêt dans des liposomes qui ont la capacité de fusionner avec la membrane des protoplastes ils libèrent par conséquent le gène d'intérêt dans le cytoplasme de ce dernier, cette méthode est peu utilisée car peu de ces gènes peuvent parvenir jusqu'au noyau et s'intégrer avec le génome.

La méthode biologique consiste à faire intervenir une bactérie l'*Agrobacterium tumefaciens* ou l'*Agrobacterium rhizogène* possédant un système naturel de transfert de gènes aux cellules végétales en passant par ces étapes :

Etape 1 : l'introduction du gène d'intérêt dans un plasmide en utilisant différentes enzymes de restriction et une ligase donne un plasmide génétiquement modifié comprenant le gène d'intérêt.

Etape 2 : ce plasmide est alors transféré dans une bactérie qui est *Escherichia coli* (*E. coli*), par la suite les colonies de *E. coli* sont cultivées pour avoir un maximum de pourcentage de bactéries ayant reçu le plasmide transformées pour préparer le plasmide vecteur.

Etape 3 : la sélection des bactéries *E. coli* possédant les gènes d'intérêt c'est-à-dire les bactéries transformées et possédant également un gène de résistance à un antibiotique, se fait en plaçant les bactéries transformées dans un milieu riche en antibiotique et c'est ainsi que seules les bactéries transformées sont sélectionnées cette méthode s'appelle le criblage blanc/bleu.

Etape 4 : l'intégration du plasmide transformé à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens* possédant la capacité des fragments précis de son ADN dans le génome des plantes, le plasmide est alors transféré d'*E. coli* à *tumefaciens* par le phénomène dit de conjugaison.

Etape 5 : la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* est placée avec un fragment de tissu végétal dans un milieu de culture commun, c'est ainsi que le gène d'intérêt est transféré dans le noyau de la cellule.

Etape 6 : la régénération de plantes entières à partir de ces cellules transformées.

1.2 La classification des OGM

Il existe plusieurs axes pour classifier les organismes génétiquement modifiés, l'une des plus importantes est la classification fondée sur l'origine des éléments insérés.

1.2.1 Les OGM de première génération

La plupart des OGM commerciaux actuels ont été produits en utilisant la technologie cut-and-paste(couper-coller) à l'aide d'enzymes de restriction de digestions et de ligation, ces OGM se caractérisent en ayant le gène du caractère désiré combiné avec le promoteur 35S (P35S) et le terminateur T35S du virus de la mosaïque du chou-fleur(CaMV) et le promoteur synthase (P-nos) et le terminateur (T-nos) dérivés de *Agrobacterium tumefaciens* [Hemmer 1997], ce qui facilite la détection et la transformation des cellules végétales.

Ces constructions génétiques ont ensuite été insérées dans des vecteurs de clonage circulaire d'origine virale ou bactérienne pour une propagation rapide, les OGM de première génération consistent à intégrer deux types de transgènes à la majorité des cultures GM (maïs, soja, coton, colza...): un transgène de production d'un insecticide par la plante ou un transgène de tolérance à un herbicide, le plus souvent le Roundup de Monsanto (70 % des cultures américaines), l'insertion de la construction dans le génome de la plante varie de cellule en cellule.

La fonction de la construction génétique responsable d'un caractère désiré contient au moins un promoteur, un gène d'intérêt et un terminateur. Les constructions génétiques contiennent souvent aussi un enhanceur supplémentaire un intron ou un motif de signal, ce qui contribue à la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de signalisation dans la cellule. Les vecteurs de Clonage et leurs composants tels que les gènes marqueurs de sélection, les polylinkers et le plasmide Ti *Agrobacterium*, les bordures droite et gauche, sont présents dans de nombreux OGM mais pas tous !

La présence de ces éléments, leur distribution spécifique leur combinaison et leur organisation dans les différents OGM représentent des informations indispensables pour la détection des OGM.

1.2.2 Les OGM de seconde génération

Ce sont ce qu'on appelle les OGM empilés qui est une combinaison de différentes modifications dans une même plante, jusqu'à obtenir un organisme génétiquement modifié capable de produire plusieurs insecticides ou tolérer plusieurs herbicides différents.

Les OGM sont difficiles à distinguer de leurs parents de première génération. Beaucoup de coton et de maïs OGM commercialisés.

1.2.3 Les OGM de troisième génération

La troisième génération d'OGM est composée d'OGM où les éléments transgéniques insérés n'ont pas été utilisés dans d'autres OGM connues et où la majeure partie de l'insert est dérivée de l'hôte lui-même et où la partie recombinante de l'insert est très limitée (à des courts fragments dérivés du vecteur de clonage). Exemple d'OGM de troisième génération ou également appelé quasi-intragenique ou near-intragenic est la pomme de terre AV43-6 - G7. Ces OGM de troisième génération sont beaucoup plus difficiles à détecter que les première et deuxième générations.

1.2.4 Les OGM de quatrième génération

Lacisgenèse (où les gènes sont transférés seulement entre des organismes étroitement apparentés) fait partie des OGM de la quatrième génération, les éléments insérés vont invariablement être dérivés du pool génétique disponible pour la recombinaison naturelle.

Ainsi, seule la détection des éléments insérés ne peut pas être utilisée comme preuve de la modification génétique. Heureusement que pour ces OGM, l'ordre et l'insertion spécifique des éléments dans les loci est un potentiel pour la détection ainsi que l'identification des OGM basée sur l'ADN.

Les profils d'expression génique offrent également un certain potentiel mais qui est très limité. Pour la détection des intragènes et des cisgènes [Holst-Jensen et al. 2012].

2. Avantage ou inconvénient ?

Les organismes génétiquement modifiés ou OGM, ont été cultivés et commercialisés depuis plus de deux décennies, selon l'ISAAA (le **Service international pour l'acquisition d'applications agricoles biotechnologiques**) 181,5 millions d'hectare de surfaces cultivées en OGM en 2014 soit 10% des terres cultivées dans le monde, plus de 30 pays ont augmenté la culture d'OGM destinée à la commercialisation, et beaucoup d'autres ont effectué des essais sur le terrain. Les espèces OGM les plus commercialisées sont : le soja, le maïs, le coton et le colza, il y a une vingtaine d'autres OGM qui sont également commercialisés ou en cours de commercialisation. Le nombre d'OGM cultivés dans les essais sur le terrain ou pour la production commerciale a constamment augmenté au cours de cette période. De ce fait, le nombre d'espèces, le nombre de pays impliqués, la diversité des nouveaux éléments

génétiques (ajouté) au commerce mondial sont des facteurs qui contribuent à la complexité croissante de détection et l'identification correcte des OGM et de leurs matériaux dérivés [Holst-Jensen et al. 2012].

2.1 Avantages des OGM

Les avantages des OGM sont présentés dans la table 3.2 [Bonny 2003].

Table 3.2 avantages potentiels du géni-génétique dans différents domaines

<i>Domaines</i>	<i>Avantages</i>
<i>La société mondiale</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Nouvelle voie de développement technologique basée sur la matière vivante, la biologie et le renouvellement, au lieu d'être basé sur la chimie et des ressources fossiles. - Un moyen de développement plus durable au 21ème siècle. - Un moyen (entre autres) pour faire face aux changements climatiques : la reproduction plus rapide de nouvelles variétés adaptées, la chimie du végétal au lieu de chimie du pétrole. - En raison de moins de pertes de production, la même quantité de production peut être obtenue sur une zone plus petite ou une plus grande quantité sur la même surface. Donc, il est moins nécessaire d'augmenter la superficie cultivée par la déforestation ou la culture de nouvelles terres.
<i>Les consommateurs</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation potentielle des denrées alimentaires (intéressant pour les Pays les moins avancés), et les produits alimentaires un peu moins chers. - Moins de risques causés par certains pesticides chimiques dans l'environnement et dans les aliments. - Des produits adaptés à certaines exigences spécifiques (produits non allergènes, aliments enrichis ou au contraire limités dans certains Composants). - Un meilleur équilibre nutritionnel pour certaines denrées alimentaires. - Baisse des prix des différents vaccins et de traitements. - Amélioration du niveau de vie global si les gains de productivité sont partagés par tous.

<i>Les autorités Public</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Cela aide à maintenir la compétitivité de l'industrie des semences et la biotechnologie dans le pays. - Des moyens de développer une plus grande durabilité. - Utile en contribuant à résoudre certains problèmes (pollution, adaptation au changement climatique).
<i>Recherches publics</i>	<ul style="list-style-type: none"> - La biotechnologie = un outil indispensable pour la connaissance, la compréhension et la découverte, afin de permettre une meilleure compréhension de beaucoup de mécanismes biologiques inexplicés jusqu'à présent.
<i>Les agriculteurs et les agronomes</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Plus facile à cultiver (traitements simplifiés) , une plus grande flexibilité dans les interventions , des moyens possibles pour améliorer le revenu . - Diminution des pertes, et une meilleure adaptation des plantes à leur environnement. - Moins de pollution par les pesticides, les moisissures (champignons), ou par les impuretés. - Moins besoin d'augmenter les surfaces cultivées, possibilité d'une agriculture plus durable.
<i>Les entreprises de l'industrie alimentaire</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Matières premières diversifiées qui sont moins chers et mieux adaptés à une variété d'utilisations, avec moins de pertes.
<i>Les entreprises de semences</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessaires pour faire face à la concurrence et éviter la mort de l'industrie des semences. - Outil utile pour l'introduction de nouveaux traits dans les plantes (résistance, composition, etc.). - Permettre une sélection plus rapide et une meilleure résistance concurrentielle.

2.2 Risque des OGM

Table 3.3 Motifs invoqués pour le rejet des OGM : les risques, les craintes et les raisons du refus

<i>Types de risques</i>	<i>Les craintes et les risques perçus</i>
<i>Procédé de transfert de gènes</i>	transgénèse = transgression de la barrière entre les espèces. - Le risque engendré c'est de troubler l'ordre du génome qui ne peut qu'apparaître que plus tard. - Une connaissance insuffisante du génome n'autorise pas ce rafistolage en transférant des gènes étrangers
<i>La santé, par exemple maïs Bt, soja tolérant au glyphosate</i>	- Les allergies, la toxicité à long terme. - Des tests de sécurité insuffisante - Le gène codant pour la toxine Bt → consommant des toxines insecticides sécrétées en continu. - Le gène codant pour l'enzyme qui dégrade le glyphosate → OGM accumulent les produits de dégradation
<i>Environnement</i>	Le flux de gènes vers des espèces apparentées sauvages les, mauvaises herbes, les plantes envahissantes ce qui induit à une diminution accélérée de la biodiversité
<i>Agro-économique</i>	Le flux de gènes vers des cultures voisines de la même espèce ce qui induit à une récoltes impures et donc une contamination. - Problème de plantes spontanées dans les cultures. - Le risque d'une baisse de Bt ou de l'efficacité du glyphosate, de molécules intéressantes, pour une utilisation dans d'autres secteurs agricoles
<i>Economique</i>	Peu d'intérêt pour les consommateurs, «produit imposé » par les multinationales. - L'agriculture de plus en plus dépendante (les agriculteurs doivent acheter des semences chaque année). - Difficulté pour les pays en développement d'accéder à cette technologie (brevets)

	- L'appropriation des ressources génétiques par quelques grandes multinationales.
<i>Modèle de production agricole et alimentaire</i>	Renforcement du modèle industrialisé, dont les limites ont déjà été dépeintes de façon critique. - La perception des consommateurs : " Ils jouent avec notre santé pour faire plus d'argent "
<i>Motifs socio-politique (valeur, système, et croyance)</i>	- Une innovation ni demandé ni souhaité, mais mis en place uniquement pour les bénéfices de certaines entreprises multinationales. - Aucun respect pour le libre choix des consommateurs en raison de la présence d'OGM dans de nombreux additifs et "contamination" fortuite de grain à travers le flux de gènes. - Le désir de revenir à la vraie nature (intérêt croissant de produits organique). - OGM symbolisent le développement vers un type de société qui est perçue négativement. - De tels progrès, à quoi bon? " (Une certaine perte de confiance dans le progrès de la science).

3. Tendances réglementaire

3.1 Le choix des africains devant la culture des OGM

Il existe un consensus scientifique même en Europe qui dit que les aliments et cultures OGM mis sur le marché jusqu'à présent n'ont apporté aucun risque réel que ce soit pour la santé humaine ou pour l'environnement. L'Europe a décidé d'étouffer l'utilisation de cette nouvelle technologie, non pas à cause de la présence de risques, mais à cause de l'absence jusqu'à présent des avantages directs pour la plupart des Européens. Les agriculteurs en Europe sont peu nombreux, et ils sont très productifs même sans OGM. En Afrique, en revanche, 60% de tous les citoyens sont encore agriculteurs et ils ne sont pas encore très productifs.

Pour l'Afrique, le choix d'étouffer la nouvelle technologie avec le style de réglementation européenne porte un coût beaucoup plus élevé [Paarlberg 2010].

L'avenir des aliments et des cultures génétiquement modifiées en Afrique dépendra fortement du choix que fera le gouvernement africain en ce qui concerne la régulation de cette technologie. Il existe essentiellement deux différentes approches réglementaires disponibles: l'approche utilisée par l'Union européenne et l'approche utilisée par les Etats Unis, il y a quatre principales différences entre ces approches qui sont représenté comme suit [Paarlberg 2010]:

Table 3.4 principales différences entre les approches de réglementation européenne et américaine

<i>EUROPE</i>	<i>ETATS UNIS</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Exige de nouvelles lois distinctes et spécifiques aux aliments et aux cultures OGM 	<ul style="list-style-type: none"> - Les mêmes lois déjà existante qui sont déjà mise en place pour les aliments et cultures non OGM (en ce qui concerne la sécurité humaine et environnementale)
<ul style="list-style-type: none"> - Exige la création de nouvelles institutions (par exemple, les comités nationaux de biosécurité) et un dépistage et processus d'approbation spécifique pour les OGM 	<ul style="list-style-type: none"> - Ce sont les mêmes institutions de biosécurité pour les aliments non OGM Ex : Animal and plants health ou Environmental protection Agency
<ul style="list-style-type: none"> - Peut refuser d'approuver une nouvelle technologie seulement en se fondant sur «l'incertitude», un risque hypothétique suffit pour un refus. Connu sous le nom de « l'approche de précaution » 	<ul style="list-style-type: none"> - Si les tests standards de risques connus tels que la toxicité, l'allergénicité et la digestibilité ont été transmis avec succès, il n'y a pas d'obstacles réglementaires à la commercialisation
<ul style="list-style-type: none"> - Tous les produits sur le marché avec une certaine teneur en OGM doit porter des étiquettes d'identification 	<ul style="list-style-type: none"> - La FDA n'exige aucun étiquetage sur la nourriture OGM commercialisé

Les pays européens refusent d'importer de la nourriture ou même de la viande de veau des pays africains parce qu'ils disent qu'ils ont été nourri avec du maïs transgénique. Les dirigeants politiques en Afrique paient un prix pour tout simplement «faire ce que les Européens imposent. "Parce que les Européens ont peu besoin de cette nouvelle technologie leurs agriculteurs sont déjà très productifs et les consommateurs européens sont déjà bien nourris.

En Afrique, cependant où les agriculteurs ne sont pas encore productifs et où tant de consommateurs ne sont pas encore bien nourris, les gains potentiels des cultures OGM sont plus avantageux que l'importation des denrées alimentaires de l'étranger.

Par ailleurs, les Africains pourraient utilement chercher des moyens de rendre leur réglementation indépendante en ce qui concerne les cultures d'OGM.

D'autres pays en développement ont réussi à être relativement libres de toute influence externe - par exemple, la Chine a connu une forte valeur dans cette nouvelle technologie, et a investi des ressources budgétaires publiques importantes pour développer la technologie pour un usage uniquement chinois. L'Afrique a un choix à faire et des décisions indépendantes concernant les aliments et les cultures d'OGM.

3.2 Le cas de l'Algérie

L'Algérie ayant ratifié le protocole de Carthagène sur la prévention des risques biotechnologiques reste encore dubitative quant aux risques des organismes génétiquement modifiés le 24 Décembre 2000 l'Algérie adopte un arrêté ministériel interdisant : l'importation, la production, la distribution, la commercialisation et l'utilisation du matériel génétiquement modifié.

En 2004, Lors du débat sur le projet de loi relative aux semences et plants, le ministre de l'Agriculture, Saïd Barkat, a réaffirmé que les OGM seront interdits à la culture en Algérie jusqu'au "jour où l'on verra que les OGM n'auront aucun effet négatif sur la santé des Algériens".

La loi sur les OGM a été présentée par le Ministère de l'Environnement et intègre une partie sur les ressources biologiques. Cette loi prend également en charge la protection des obtentions variétales en conformité avec les accords de l'OMC.

L'Algérie affirme lors de sa coopération avec les états unis dans le domaine de l'agriculture à vouloir seulement améliorer la production en introduisant de nouvelles techniques et en améliorant la qualité de la semence et que tous les intrants, dont les

fertilisants, utilisés seront étiquetés , et que pour ce type de coopération, l'Algérie n'a ciblé que les entreprises n'utilisant pas ces types d'organisme.

Chapitre 4 :

***Méthodes de Détection
des OGM***

Chapitre 4 : Méthodes de détection des OGM

1. Introduction

Au cours des deux dernières décennies, les techniques d'ADN recombinant ont été énormément utilisées dans la science agricole moderne, et jusqu'à ce jour, un total de 336 plantes génétiquement modifiées a été approuvé pour la commercialisation.

Au cours de cette période, le taux de croissance des cultures génétiquement modifiées cultivées a été de plus de 10% par an et a atteint 181,5 millions d'hectares dans le monde environ 4/5 du total de plantation de soja et de 2/3 du coton dans le monde en 2014. Parallèlement à ce développement rapide des cultures GM, le public est toujours préoccupé par les risques potentiels des plantes GM et leurs dérivés [Holst-Jensen et al. 2012].

Plusieurs organisations internationales ont émis une série de réglementations pour renforcer et normaliser le développement des OGM. Plus de 50 pays et régions ont également publié des règlements sur l'étiquetage des OGM et des seuils de traçabilité dans tous les produits alimentaires contenant des teneurs GM, par exemple, l'étiquetage des seuils pour l'UE est de 0,9%, 0,5% au Japon, 3% en Corée et de 1% au Brésil.

2. Méthodes de détection

Afin d'exécuter ces règlements sur l'étiquetage des OGM, il est essentiel pour développer et standardiser de façon efficace et crédible les méthodes d'analyse pour le contrôle du contenu GM dans les produits alimentaires / aliments pour animaux. En utilisant deux principales méthodes pour la détection des OGM: l'une vise la détection des OGM au niveau de l'ADN/ l'ARN, et l'autre vise les exogènes exprimés au niveau des protéines. Ce sont ces deux méthodes qui sont principalement utilisées en raison de leur sensibilité élevée [Del Gaudio et al. 2010].

2.1 Détection d'OGM basée sur la détection de l'ADN

2.1.1 Le séquençage

Le séquençage est la méthode la plus sûre et la plus directe pour l'identification des OGM. Par ailleurs, elle consiste en un processus long et complexe. Le séquençage est uniquement utile pour la confirmation de la présence et l'identité d'un OGM détecté par une autre technique de

détection. Il sera utile dans le cas d'échantillons telle une semence unique ou un seul amplicon [Gendron 2009].

2.1.2 PCR quantitative et semi-quantitative

La PCR semi-quantitative est basé sur l'évaluation d'un lot séparé en plusieurs sous-échantillons. La taille des sous-échantillons, leur nombre et les résultats positifs sont les éléments utilisés pour estimer le pourcentage d'OGM dans un lot. Par un sous-échantillonnage approprié, cette approche pourrait même permettre de détecter aussi peu que 0,2 % d'OGM. Cependant, la méthode par sous-échantillonnage augmente substantiellement le nombre de tests nécessaires pour obtenir une détection plus précise des OGM en faible concentration. L'approche par PCR en temps réel est probablement la méthode la plus précise pour quantifier les OGM approuvés ou non approuvés de séquences connues.

Cette approche se base sur la détection et la quantification d'un indicateur fluorescent dont la transmission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons engendrés pendant la PCR. Ils sont habituellement utilisés pour quantifier, par PCR spécifique à l'événement, un contenu aussi faible que 0,1 % d'OGM.

En effet, le coefficient de variation de la concentration déterminé par cette méthode varie habituellement autour de 5 à 20 % (causant une grande incertitude au niveau du résultat obtenu. D'une façon générale, les méthodes de détection PCR ont une limite de détection de 0,01 %.

Cependant, l'analyse quantitative n'est pas possible à d'aussi faible concentration. À ce niveau de détection, un résultat positif pourrait être confondu pour un résultat négatif ou du bruit de fond. La plupart des laboratoires utilisant ces techniques pour la détection d'OGM se donnent une limite plus raisonnable de 0,1 % [Gendron 2009].

2.1.3 PCR qualitative

Une des techniques fréquemment utilisées est celle basée sur l'amplification de l'ADN du transgène par PCR). En effet, on peut déterminer, par différentes techniques de PCR, la présence ou l'absence d'OGM. En général, ces méthodes d'amplification peuvent être regroupées en au moins quatre catégories [Holst-Jensen et al. 2012]:

- 1- les méthodes de criblage
- 2- les méthodes spécifiques au gène
- 3- les méthodes spécifiques à la construction
- 4- les méthodes spécifiques à un événement.

En plus de la stabilité thermique et chimique de l'ADN, la grande sensibilité de ce type de méthode, sa simplicité technique et la grande quantité d'expériences déjà accumulées en plus de son potentiel pour l'automatisation sont des avantages importants.

2.1.3.1 Le criblage

Le criblage étant une technique simple d'utilisation qui détecte la présence de séquences fréquemment utilisées dans la construction des OGM tels des promoteurs ou terminateurs. Souvent, cette approche utilise les séquences déjà connues des promoteurs CaMV (« Cauliflower mosaic virus ») 35S (P35S) ou NOS (nopalinesynthase) (PNOS) ainsi que des terminateurs NOS (TNOS) ou CaMV 35S (T35S) qui sont régulièrement utilisés. Ces types de PCR sont assez rapides et sensibles et permettent, en théorie, de détecter aussi peu que 0,01 % à 0,1 % d'OGM lorsqu'on cherche pour la présence d'un promoteur 35S par exemple [Angers-Loustau et al. 2014].

Cependant, celles-ci ne permettent pas de différencier deux OGM qui utiliseraient les mêmes séquences contrôlant l'expression d'un transgène différent.

2.1.3.2 Les PCR spécifiques au gène

Les PCR spécifiques aux gènes quant à elles, permettent d'obtenir un peu plus d'information puisqu'elles peuvent déterminer le gène qui est transcrit pour créer l'OGM. Si deux organismes génétiquement modifiés ont le même gène dans leur construction, il ne sera pas possible de les différencier, par exemple, lorsqu'il faut détecter la présence d'un OGM ayant un gène additionnel « stackedgene » [Bilgiç et al. 2013]. En effet, si un croisement est fait entre deux OGM et que la lignée résultante possède les cassettes d'insertion des deux parents, la différence entre un mélange de ces deux OGM et un OGM nouvellement créé par le croisement de ceux-ci ne pourra pas être faite avec une PCR spécifique au gène.

2.1.3.3 L'amplification spécifique à la construction

Cette technique consiste à amplifier une section de la construction (ex le promoteur) jusqu'à une autre section de cette même cassette d'insertion (ex le gène). Avec cette approche, l'information obtenue sur une partie de la construction peut permettre de déterminer de façon assez précise un OGM qui pourrait être présent. Cependant, pour deux événements avec la même construction insérée, il se pourrait qu'il n'y ait pas de différence.

2.1.3.4 Le PCR spécifique à l'évènement

Il permet d'amplifier la jonction entre l'ADN de la plante et celui de la cassette d'insertion (bordure). Cette méthode s'applique seulement dans le cas où l'évènement ciblé est connu. En présence d'un mélange d'OGM différents ou de nature inconnue, cette technique est difficilement applicable ou nécessiterait une pléiade de tests.

Pour les trois premiers types de PCR (criblage, spécifique au gène, spécifique à la construction), une connaissance détaillée de la séquence complète de l'OGM n'est pas nécessaire. Pour l'usage de ces PCR, il est possible de se baser sur des données générales de construction d'OGM telles les séquences partielles des inserts qui sont accessibles dans la littérature scientifique.¹ Dans le cas d'une PCR spécifique à l'évènement, la séquence de la jonction entre la plante et la construction doit être connue et, pour cela, il faut avoir accès à de l'information beaucoup plus détaillée sur la séquence de l'OGM recherché pour créer les amorces appropriées. Ces informations sur la jonction OGM-plante sont souvent inaccessibles et parfois réservées aux entreprises ayant ou payant les droits sur le brevet du transgène.

Pour obtenir une détection efficace et sensible avec ces méthodes, il est important d'évaluer le choix des zones d'amplification, les paramètres des PCR, le degré de dégradation de l'ADN et les matrices testées pouvant interférer avec l'amplification, puisque de plus en plus de laboratoires sont dotés d'équipements pour faire l'amplification PCR de base, les limitations viennent surtout du fait que son utilisation sur le terrain demeure limitée par rapport aux méthodes immunologiques. Les quatre types de PCR précédemment mentionnés peuvent servir de détection qualitative en donnant de l'information sur la présence ou l'absence de produits d'amplification recherchés avec des seuils de détection pouvant aller jusqu'à 0,01 %. Il est donc possible d'obtenir une meilleure sensibilité avec la PCR plutôt qu'avec les méthodes immunologiques, puisque ces dernières détectent aux environs de 0,1 % pour les tests les plus sensibles [Gendron 2009].

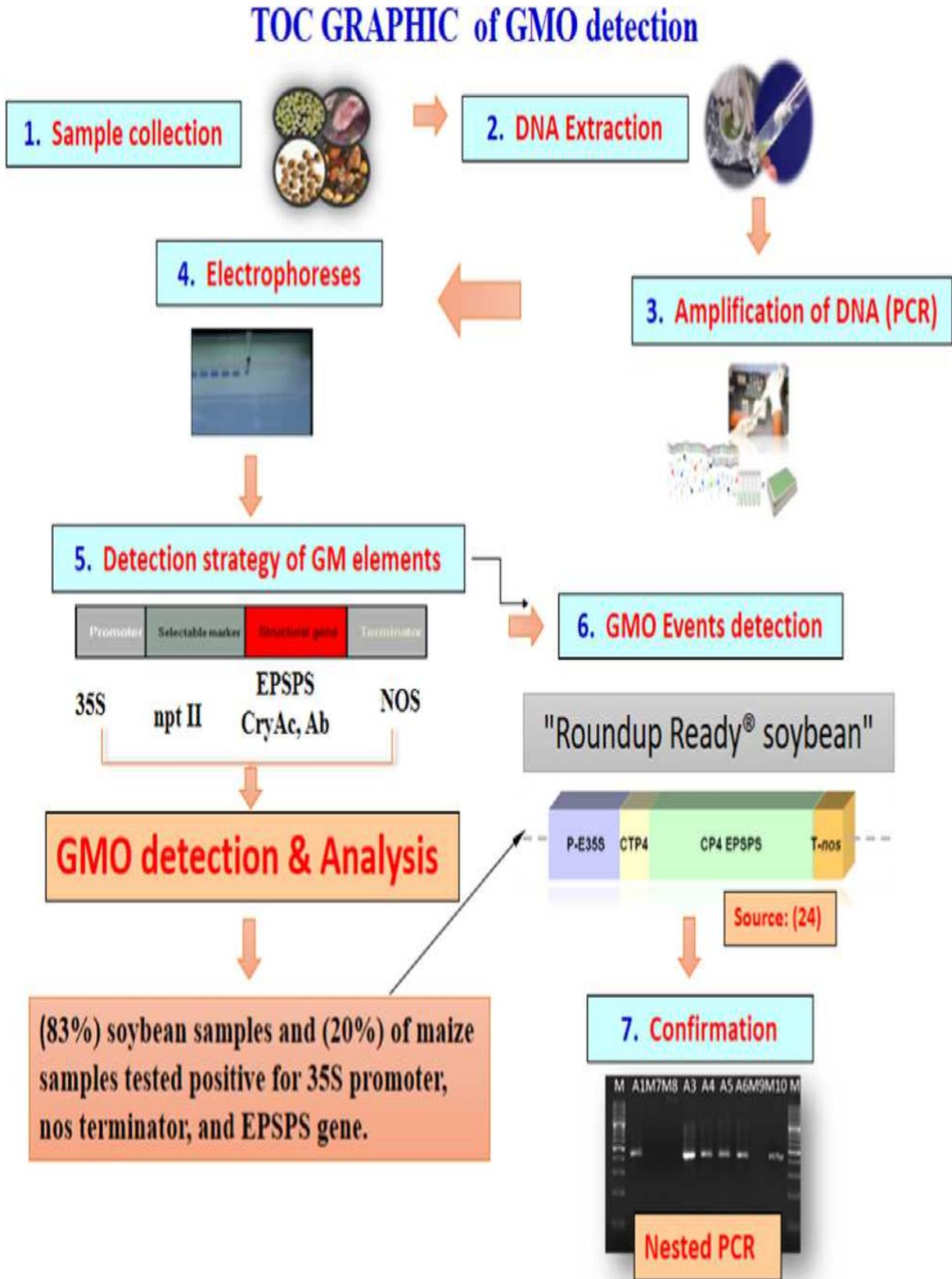


Figure 4.1Résumé des méthodologies et exemple de données [Alasaad et al. 2016]

2.2 Détection d'OGM basée sur la détection de protéines

La détection de la protéine produite par le transgène est l'une des méthodes qui est couramment utilisée pour la détection d'OGM. Ce type de méthode peut être utilisé pour la détection qualitative et quantitative. Le principe de cette approche est basé sur l'utilisation d'un anticorps se fixant spécifiquement à un antigène, soit la protéine recombinante recherchée. Pour pouvoir obtenir cet anticorps, il faut qu'il soit déjà disponible ou bien qu'on puisse le développer à partir d'informations ou de protéines déjà connues [Holst-Jensen et al. 2012]. Il est important que l'anticorps sélectionné soit bien spécifique pour empêcher les réactions non voulues avec d'autres protéines ayant des caractéristiques semblables qui pourraient entraîner l'apparition de faux positifs [Markoulatos et al. 2004]. Ces méthodes peuvent, selon le cas, être utilisées directement sur le terrain (bandelettes tests) ou en laboratoire (Western Blot, « enzymelinkedimmunosorbent assay »). Les techniques immunologiques tout comme la caractérisation phénotypique détectent des caractères particuliers pouvant être présents dans plusieurs types d'OGM.

2.2.1 Western Blot

Le Western Blot ou transfert de type Western est une technique qualitative utile pour l'analyse de protéines [Markoulatos et al. 2004]. Malgré qu'elle soit très spécifique, cette méthode est surtout utilisée en recherche plutôt qu'en test de routine [Ahmed 2002]. Elle permet une limite de détection entre 0,1 et 1 % Ce seuil de détection est dépendant du niveau d'expression de la protéine et de l'affinité de l'anticorps pour la protéine recherchée [Markoulatos et al. 2004].

2.2.2 Test d'essai d'immunoabsorption en enzymatique (ELISA)

Cette méthode utilise une plaque avec des puits à la surface desquels sont fixés des anticorps qui vont interagir avec un antigène spécifique (protéine recombinante). On peut obtenir par la lecture visuelle des plaques, des résultats qui sont semi-quantitatifs ou obtenir, grâce à un lecteur de plaque, des résultats quantitatifs en mesurant directement la densité optique par rapport à un standard de concentration connue. Avec l'ELISA, on peut obtenir un résultat quantitatif ou semi-quantitatif en environ 90 minutes [Ahmed 2002] avec des limites de détection de 0,1 % pour certains événements (Demeket coll. 2006). L'utilisation des « antibody coated tubes » pourrait réduire la durée du test à environ quinze à trente minutes [Ahmed 2002]. En général, la limite de détection dans le cas de semences OGM serait aux environs de 0,25 % [Ahmed 2002]. Cependant, certaines compagnies opéreraient avec une

limite plus élevée de 0,3 % (Lübec 2005). Selon l'article de Markoulatos [Markoulatos et al. 2004] la limite de détection serait plutôt entre 0,8 % et 1,2 %.

2.2.3 Bandelettes tests

Ce test se fait à partir de bandelettes contenant un anticorps dirigé contre la protéine recombinante recherchée. La protéine en suspension dans une solution, dans laquelle la bandelette est trempée, migre par capillarité et forme un complexe antigène-anticorps marqués qui va se fixer à d'autres anticorps présents sur la bandelette. Il y a apparition d'une première bande de couleur lorsqu'il y a fixation du complexe immunitaire à un second anticorps spécifique et d'une seconde bande lorsque les anticorps marqués migrent à travers la bandelette. Ainsi, le résultat obtenu est noté par l'apparition de bandes suite à un changement de couleur. La présence de l'OGM est notée par la présence de deux bandes tandis que la présence d'une seule bande indique que le test a fonctionné normalement mais que le produit n'est pas un OGM (Ahmed 2002). Avec cette approche, il est possible d'effectuer des tests qualitatifs ou semi-quantitatifs permettant de détecter la présence d'environ 0,15 % d'OGM (Lübec 2005). Il serait possible d'obtenir avec cette méthode des résultats en cinq à dix minutes [Ahmed 2002]. Cette technique est économique, transportable et utile, pour un criblage initial rapide [Markoulatos et al. 2004].

2.2.4 Spectroscopie de masse

Cette méthode pourrait être utilisée pour détecter de très faibles quantités de protéines (ppm). Les protéines digérées avec de la trypsine pourraient être comparées aux bases de données («proteindatabank» ou OenBank) pour identifier des protéines inconnues telles qu'un allergène présent dans des semences ou des aliments [Weber et al. 2006]. Cependant, l'application de la détection des OGM n'a pas encore été démontrée, un nombre limité d'échantillons peut être testés (dix à quinze par jour) et la méthodologie est dépendante du niveau d'expression de la protéine.

Table 4.1 **Avantage et inconvénient des méthodes de détection d'OGM basé sur la détection des protéines**

<i>Avantage</i>	<i>Inconvénient</i>
<ul style="list-style-type: none"> -La rapidité du résultat obtenu -Le faible coût du test -La possibilité de faire des tests sur place -Ne nécessitent qu'un minimum de personnel et d'équipement 	<ul style="list-style-type: none"> -Incapables de faire la différence entre deux constructions différentes d'OGM produisant une même protéine - S'assurer de tester au bon moment la section de la plante appropriée car l'expression protéique diffère dans certains tissus sélectionnés ou à certains stades de leur croissance - Difficulté dans la différenciation des protéines endogène de celles résultant de l'expression d'un transgène. - Instabilité de certaines protéines par rapport à l'ADN lors des procédés de Transformation - Une puissance de détection moindre que la PCR

2.2.5 Microarrays (Puces à ADN)

Il y a eu, au cours des dernières années, le développement des «microarrays » qui pourrait s'avérer être très prometteur pour la détection des OGM. L'utilisation de puces à ADN ou « miroarrays » est une approche permettant le criblage rapide d'un grand nombre de gènes simultanément sur un échantillon. Le « microarray » permet de cibler plusieurs sections spécifiques d'ADN en même temps. Cette technologie est basée sur le principe d'hybridation des brins d'ADN avec la principale différence que plusieurs sondes sont attachées à une surface solide. Celles-ci correspondent à différentes portions de l'ADN recherché. C'est une technique très sensible, qui n'est cependant pas encore assez développée et qui est limitée aux laboratoires experts et bien équipés [Lübeck 2002]. Un exemple de « microarrays » disponible sur le marché est celui du « GMO chip kit » qui permet la détection des OGM. Ce kit a été créé par Genescan Europe et il permettrait d'obtenir les résultats de quatorze analyses séparées en combinant le criblage et l'identification d'OGM en un seul test [Lübeck 2002].

Un autre exemple de cette technique montre qu'en un seul test, il serait possible de détecter la présence de cinq espèces de plantes, de trois éléments OGM de criblage ainsi que d'un témoin pour la présence de séquences provenant de la présence d'une contamination

naturelle avec le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) [Leimaniset al. 2006]. Cette approche aurait un seuil limite de détection entre 0,1 et 0,3 % [Leimaniset al. 2006].

Un des problèmes majeurs avec les « microarrays » est leur coût élevé (de 1 00 à plus de 1 000 dollars par échantillon). De plus, la quantité d'information générée par ceux-ci est difficile à traiter. Aussi, on note le problème de comparaison des résultats entre les plateformes existantes causé par le manque de références universelles [Lübeck 2002].

Ceci est relié à l'utilisation de différentes technologies pour créer les plateformes ainsi qu'à l'utilisation de méthodes d'analyses différentes pour un même type de plateforme. La normalisation des plateformes et l'amélioration de l'analyse pourraient rendre la méthode plus attrayante. Cependant, le coût élevé et le besoin en personnel bien qualifié limitent l'accès à cette nouvelle technologie [Lübeck 2002].

Un autre problème relié à l'usage des « microarrays » est la nécessité d'avoir de l'information sur la séquence des OGM recherchés. Sans cette information, il faudrait, pour détecter un OGM inconnu, fonctionner par une méthode soustractive. Aussi, l'utilisation de cette méthode sur le terrain demeure limitée par rapport aux approches de type immunologique.

L'avantage de cette méthode sur la technique PCR est qu'elle permet d'effectuer, en une seule étape, un criblage et des tests spécifiques aux événements. Pour l'instant, les « microarrays » sont encore considérés comme des méthodes de détection de première ligne tout comme le criblage puisque les résultats obtenus doivent être confirmés par PCR standard ou quantitatif [Gendron 2009].

Chapitre 5 :
Etude Expérimentale

Chapitre 5 : Etude expérimentale

1. Introduction

Les organismes génétiquement modifiés (OGM) sont des organismes ou le matériel génétique a été modifié par l'utilisation de la technologie de l'ADN recombinant afin d'acquérir des caractères nouveaux tels que la tolérance aux herbicides la résistance aux insectes ou une amélioration de la qualité nutritionnelle. Les principales cultures OGM sont le soja, le maïs, le coton, le canola et le riz. Les modifications génétiques sont effectuées par l'insertion d'une construction génétique consistant principalement en un promoteur, un ou des gènes codant pour la caractéristique recherchée et un terminateur. En dépit des avantages des OGM, des enquêtes dans certains pays du moyen orient et d'Afrique du nord ont montré que la plupart des consommateurs ne sont pas d'accord pour la consommation des aliments GM.

Par exemple, en Algérie dans le constantinois environ 63% de la population sont contre la consommation de riz transgénique et 71% sont contre de se nourrir de la viande d'un animal nourri avec de la viande OGM, en Egypte 60% des égyptiens rejettent les aliments GM, 51,6% sont contre la culture des OGM, 64% pensent que les OGM affectent la santé humaine et 40% croient que les aliments génétiquement modifiés sont nocifs pour l'environnement. En Arabie Saoudite, 73% des consommateurs refusent de consommer quotidiennement des aliments GM et 73% pensent que les aliments génétiquement modifiés ne sont pas étiquetés de façon adéquate sur le marché. Actuellement, il n'y a pas de réglementation sur l'étiquetage OGM pour contrôler les aliments génétiquement modifiés dans presque tous les pays de la région MENA. Il n'y a que l'Arabie Saoudite qui a placé une loi pour l'étiquetage obligatoire des aliments GM au seuil de 0,9% _1% , la Jordanie et la Tunisie ont promulgué des lois pour l'étiquetage obligatoire de certains aliments GM mais avec de nombreuses exception et pas de seuils d'étiquetage définies en plus des règlements sur l'étiquetage, la plupart des pays de la région MENA ont pris des mesures générales de sécurité pour un meilleur contrôle des OGM en ratifiant le Protocol de Carthagène de biodiversité , un accord international qui contrôle la manipulation et le mouvement des OGM, cependant, et malheureusement, le protocole n'a pas encore été mis en œuvre.

En ce qui concerne les pays MENA, ils importent leurs produits agricoles et alimentaires à partir des pays producteur d'OGM, créant ainsi une forte probabilité d'introduction de cultures GM dans leur région. En effet, des études précédentes sur les OGM

englobant d'autres pays supplémentaires et d'autres cultures afin d'obtenir une évaluation plus compréhensive sur les OGM présent dans la région.

Le riz est l'une des principales cultures utilisées comme un aliment de base dans la région et les statistiques montrent une augmentation significative de sa consommation, Tous les pays de la région importent du riz d'Amérique latine, créant ainsi une forte probabilité pour l'introduction du riz GM dans leur propre pays [Querci et al. 2010].

En outre, l'étude vise à mettre sous la lumière l'éventuelle présence d'OGM dans les aliments importés des pays d'Amérique latine aux pays MENA, ceci sera effectuée en ciblant le promoteur p35S et des éléments régulateurs ainsi que le terminateur T-nos par méthode d'amplification de détection à base d'ADN.

2. Matériel végétal utilisé

Les différents échantillons testés proviennent de sources différentes, incluant celui collecté du marché local et ceux importés de puis le JRC qui est le laboratoire de recherche scientifique et technique de l'Union européenne, l'échantillon testé du marché local a été choisi de façon aléatoire, le tableau ci dessous indique la provenance et l'état de chacun de nos échantillons :

Table 5.1 Echantillons collectés dans le commerce

Matériel	Origine	Etat
Riz (<i>Orizasetiva</i>)	Marché local	Aliment semi-transformé (*)

Table 5.2 Echantillons témoins

Matériel	Origine	Etat
Riz - (<i>Orizasetiva</i>)	JRC	Aliment semi-transformé (*)
Maïs - (<i>Zea mais</i>)	JRC	Aliment semi- transformé (*)
Soja +(<i>Glycine max</i>)	JRC	Aliment semi-transformé (*)

(*) : Farine

3.Méthode d'analyse utilisée

Dans cet essai la méthode qui a été utilisée est une analyse par amplification (PCR conventionnelle, ciblant les éléments régulateurs les plus communs P35S et Tnos).

Afin de pouvoir amplifier les séquences cible il est essentiel d'avoir une quantité suffisante d'ADN de bonne qualité. Pour ce faire la mise en œuvre de l'expérimentation passe par quatre étapes :

- 1) Extraction d'ADN à partir des différents échantillons.
- 2) Evaluation de la qualité et de la quantité des ADN extraits (dosage et électrophorèse).
- 3) Amplification par PCR.
- 4) Lecture des résultats par électrophorèse.

3.1.Extraction d'ADN

L'extraction d'acides nucléiques d'un matériau biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité des débris cellulaires. La procédure de lyse idéale est souvent un compromis de techniques et doit être suffisamment rigoureuse pour briser le matériau de départ complexe (par exemple, le tissu), mais suffisamment douce pour préserver l'acide nucléique cible.

Toutes les extractions ont été réalisées en double en incluant un contrôle des conditions d'environnement et un blanc. L'extraction a été réalisée selon la méthode CTAB (.....) avec quelques modifications:

- Préchauffer le tampon CTAB 2X dans un bain marie à 60°C
- Broyer le matériel végétal (environ 150mg) dans un mortier avec l'azote liquide
- A l'aide de spatule, transférer le broyat dans un tube à vis mettre les tubes contenant le broyat dans l'azote liquide
- Ajouter 900µl de tampon CTAB 2X et préchauffer à 65°C
- Homogénéiser au vortex
- Incuber 60min dans un bain marie à 65°C avec agitation
- Centrifuger 15min à 10000 rpm à 4°C
- Récupérer le surnageant (~800µl) dans un nouveau tube d'ependorf de 2ml(stocker le culot à 4°C à l'abri de la lumière)

- Ajouter 800 µl (1vol) Chloroforme/Alcool isoamylique (24 ;1)
- Agiter pendant 45min à vitesse lente (100 à 150 rpm) sur une table d'agitation
- Centrifuger 15min à 10000 rpm à 4°C
- Récupérer la phase aqueuse supérieure à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube d'eppendorf
- Ajouter 3 à 5 µl de RNase (10mg/ml) agiter par inversion et incuber 30min à 37°C
- Ajouter 540 µl (2/3 Vol) d'isopropanol froid (-20°C)
- Inverser les tubes doucement jusqu'à l'apparition d'une pelote blanche
- Laisser précipiter à -20°C pensant 5 à 10min
- Centrifuger 10min à 10000 rpm à 4°C
- Eliminer le surnageant très délicatement (à l'aide de micropipette)
- Ajouter 500µL de solution lavage 1
- Incuber pensant 15min à température ambiante
- Centrifuger 5min à 10000 rpm à 4°C
- Eliminer le surnageant et ajouter 500µL de la solution de lavage 2
- Ne pas incuber plus de 5min
- Centrifuger 5min à 10000 rpm à 4°C
- Eliminer le surnageant et secher l'ADN à l'air libre pendant 10 à 20min
- Suspender le culot d'ADN dans 100 µL de TE 0,1X
- Stocker l'ADN pendant une nuit à 4°C avant dosage

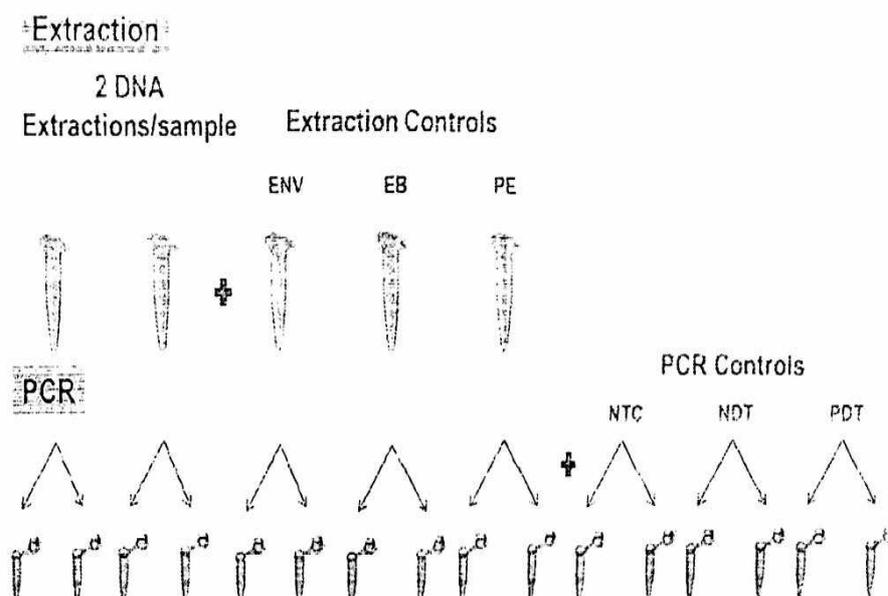


Figure 5.1 Extraction d'ADN controles

(1) ENV :control environnement c'est un tube qui à été laissé ouvert durant la préparation des échantillons, ce contrôle est utilisé pour contrôler la contamination de l'ADN dans l'environnement,(2) EB :Extraction blanc , de l'eau distillée est ajouté à la place des échantillons, ce contrôle est utilisé pour contrôler la contamination de l'ADN dans les réactifs d'extraction d'ADN, (3) PE : témoin positif, un échantillon de bonne qualité ou un matériau de référence est utilisé , cette commande est utilisée pour vérifier la réussite de l'extraction d'ADN

3.2. Contrôles de la qualité et de la quantité des ADN extraits

3.2.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les extraits ADN obtenu ont été migrés sur gel d'agarose à 0,8% et la révélation du résultat à été réalisé sous lumière UV en présence de bromure d'éthidium.

3.2.2. Quantification des ADN extraits

Les quantités d'ADN obtenu pour chaque extrait ont été mesuré par dosage spectrophotométrique à l'aide d'un spectrophotomètre type *NanodropThermo 2000*.

Le nanodrop est un appareil qui mesure l'absorbance des acides nucléiques à deux longueurs d'ondes dans l'UV (260, 280nm) et converti les valeurs ainsi obtenu en quantité selon le coefficient d'extinction molaire de l'acide nucléique en question (40 pour l'ARN et 50 pour l'ADN).

Le rapport des absorbances mesurées à 260 et à 280 nm permet d'évaluer le degré de pureté de l'extraction. Ainsi, un extrait d'ADN pur a un rapport 260/280 égale à 1,8, une valeur inférieur renseigne sur une contamination par les protéines alors qu'une valeur supérieur indique la présence d'ARN dans l'extrait.

3.2.3. Réaction de polymérisation en chaine (PCR) :

La détection par réaction PCR de la présence de matériel biologique génétiquement modifié suite à un événement de transformation génétique repose sur l'aptitude à amplifier spécifiquement une séquence nucléotidique faisant parti de la construction génétique utilisée pour la transformation.

Les séquences à amplifier qui ont été ciblées par notre travail sont représentées par les éléments régulateurs les plus utilisés en transgène végétale:

- Le Promteur P35S : Promoteur du virus de la mosaïque du chou-fleur
- Le TermintaurTnos : Nopalinesynthaseterminator

Pour le contrôle de l'efficacité des conditions de la PCR nous avons utilisé un gène endogène, le suchrose phosphate synthase (SPS).

➤ Conditions de la réaction :

L'amplification des séquences cibles à été réalisé dans un mix réactionnelle (voir Annexe) en présence d'ADN polymérase thermostable la Taq DNA polymérase et dans un volume réactionnel final de 20 µl.

Toutes les réactions ont été réalisées en double en incluant un contrôle positif et un contrôle négatif.

3.2.3.1. Programmes utilisés

Pour l'amplification des séquences nucléotidiques cibles, nous avons utilisé les programmes suivants :

- Programme utilisé pour l'amplification du P35S et du Tnos :

		Température	Temps
35 X	{	Dénaturation initiale	95°C 3min
		Dénaturation	95°C 25 sec
		Hybridation	62°C 30 sec
		Elongation	72°C 45 sec
		Elongation finale	72°C 7 min

- Programme utilisé pour l'amplification du gène SPS :

		Température	Temps
35 X	{	Dénaturation initiale	95°C 3min
		Dénaturation	95°C 25 sec
		Hybridation	58°C 30 sec
		Elongation	72°C 45 sec
		Elongation finale	72°C 3 min

3.2.3.2. Analyse des résultats de la PCR

Les extraits ADN obtenu ont été migrés sur gel d'agarose 2% et la révélation du résultat à été réalisé sous lumière UV en présence de bromure d'éthidium.

Pour l'estimation de la taille des fragments d'ADN amplifiés, les bandes observées sont comparées à un marqueur de taille de 100pb.

4. Résultats et interprétation

4.1. Qualité de l'extraction d'ADN

4.1.1. Analyse au Nanodrop

La concentration et la pureté des échantillons d'ADN ont été mesurées à l'aide du spectrophotomètre scientifique Thermo NanoDrop 2000, dans le but de vérifier l'état de notre extraction ainsi que la qualité de nos ADN, le tableau suivant indique la quantité des ADN extraits ainsi que des ratios d'absorbance indiquant la pureté de nos échantillons :

Table 5.3 résultats de l'analyse au Nanodrop

Echantillon	ng/ μ l	260/280	260/230
Maïs (<i>Contrôle négatif</i>)	157,2	2,03	2,18
Riz (<i>Echantillon Test 1</i>)	122,4	2,07	2,02
Soja (<i>Contrôle positif</i>)	255,8	2,06	1,71
Riz 2 (<i>Echantillon Test 2</i>)	1978,1	2,16	2,15
Extraction Blanc	0,0		
Control Environment	0,0		

Les valeurs de la quantité d'ADN des échantillons mesuré au nanodrop sont situées entre 157 comme valeur minimal et 1978 comme valeur maximale, ce qui démontre la présence des ADN et en une quantité suffisante.

Le ratio 260/280 donne des valeurs situés entre 2,03 et 2,16 ce qui démontre une légère présence d'ARN.

Le rapport de A260/A230 devrait être d'environ 2 pour ce qui est des échantillons pur, nos résultats montre que nos échantillons sont situés entre 1,71 et 2,18 ce qui veut dire que nos ADN sont pure avec de légères traces de polyphénols.

➤ Interprétation du résultat :

La quantité d'ADN est suffisante pour un bon déroulement d'une réaction PCR, où la concentration recommandée est de 100ng/ μ l, les rapports montrent que nos échantillons sont pure mais avec une légère présence d'ARN extraite en même temps que les ADN, dans notre cas la présence d'ARN ne constitue pas un élément qui pourra réduire l'efficacité de notre réaction PCR, vu la spécificité de l'ADN polymérase.

➤ L'analyse de l'état de Fragmentation :

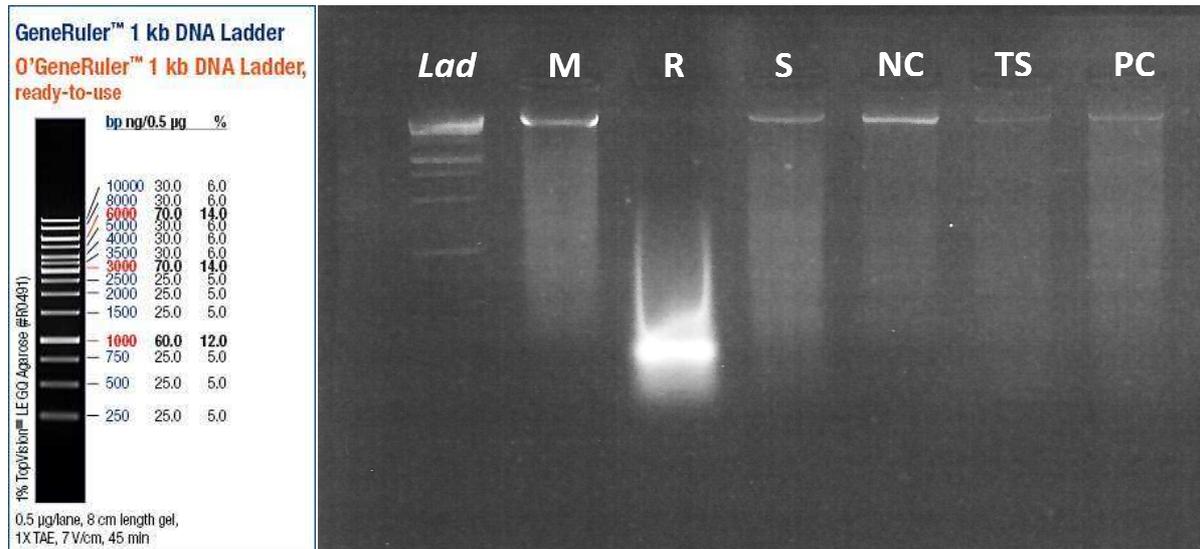


Figure 5.2 **Résultat PCR de l'état de fragmentation**

Gel d'agarose à 1% avec des échantillons d'ADN génomique (10 µl de la solution d'ADN génomique a été chargé), un gel de TBE 0,5 X immergé dans l'électrophorèse TBE 0,5 x à 100 volts / 20 min.

Lad : Ladder : Marqueur de taille : 1 ADN kb Ladder O'GeneRuler(250-10000 pb) , M : maïs , R : Riz , S : soja , NC : Contrôle négatif , TS : Echantillon Test et PC : Contrôle positif.

➤ **Interprétation du résultat :**

Dans chaque puits de dépôt, nous observons la présence de bandes fluorescente qui renseigne sur la qualité d'acides nucléiques extraits, ainsi la bande d'intensité élevé (Riz 2) qui a présenté la plus forte concentration lors du test au nanodrop est apparu sur le gel plus dégradé que le restes des échantillons, ce qui correspond généralement à une présence de grands fragments d'ADN génomique.

Les traces de fluorescence moins nette observée dans les différents puits de dépôt indiquent la présence d'ARN contaminant car nous n'avons pas utilisé de ARNase.

4.1.2. L'amplification d'ADN

Pour la réaction PCR, nous avons utilisé le Kit Master Mix 2X Applied Biosystems AmpliTaq Gold® et 100ng de chaque échantillon d'ADN.

Pour le Gène SPS Nous avons utilisé le programme à 35 cycles.

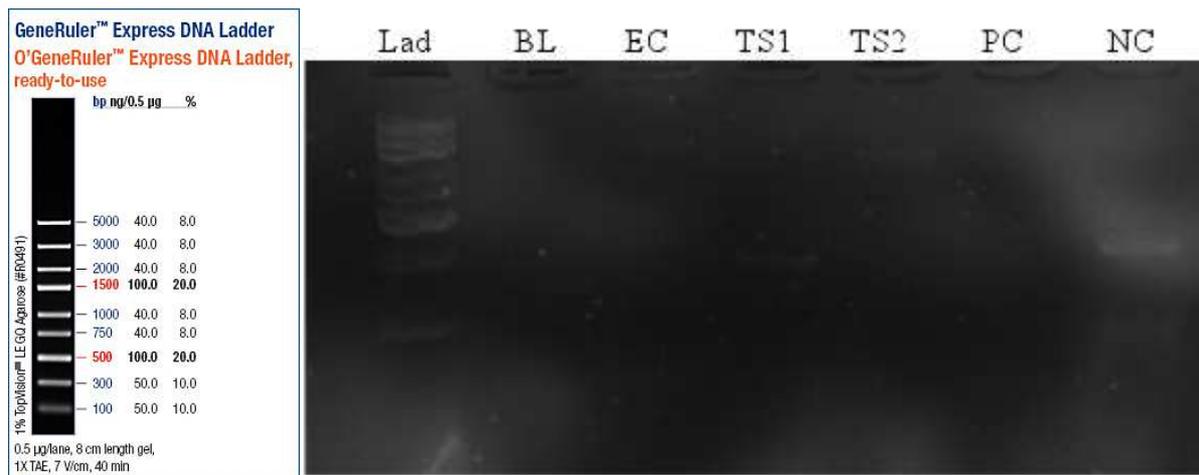


Figure 5.3 **Résultat PCR du gène SPS**

Vérification du produit de PCR (10 µl) pour le gène SPS sur un gel d'agarose à 2 %, un gel de TBE 0,5 X immergé dans l'électrophorèse TBE 0,5 x à 100 volts / 30 min.

Lad Ladder Marqueur de taille , Bl: Blank (pas de modèle) , CE : Contrôle de l'Environnement , R : Riz 2 , TS : Echantillon Test (Riz) , PC : Contrôle positif et NC : contrôle négatif .

➤ Observation :

Dans chaque puits de dépôt, nous observons :

- Pour le TS1 (l'échantillon test 1) : une amplification positive avec une bande estimée à 300pb (comparé au marqueur de taille)
- Pour le TS2 (l'échantillon test 2) : une amplification non spécifique
- Pour le PC (le contrôle positif) : absence d'amplification
- Pour le NC (le contrôle négatif) : une amplification non spécifique

➤ Interprétation des résultats :

Dans chaque puits de dépôt , nous observons une migration des ADN caractérisé par le mouvement des bandes fluorescente qui renseigne sur la présence d'acide nucléique, pour ce qui est de la bande qui apparait pour l'échantillon test 1 et qui est estimé à 300 pb (en comparant avec le marqueur de taille) renseigne la bande d'intérêt à la taille de l'amplicon qui est de 276pb pour le gène SPS et qui est une amplification positive , pour ce qui est de la bande à faible intensité qui apparait pour l'échantillon test 2, la bande est due à une amplification non spécifique .

- Pour le promoteur P35S Nous avons utilisé le même programme à 35 cycles

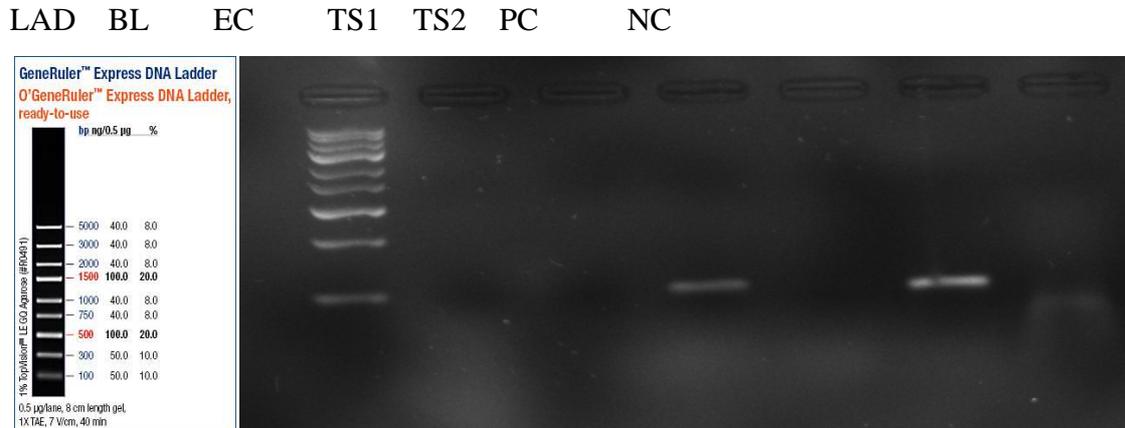


Figure 5.4 **Résultat PCR du promoteur P35S**

Vérification du produit de PCR (10 µl) pour le promoteur P35S : gel d'agarose à 2%, un gel de TBE 0,5 X immergé dans l'électrophorèse TBE 0,5 x à 100 volts / 30 min.

Lad : Ladder Marqueur de taille ,Bl: Blanc (pas de modèle) , CE : Contrôle de l'Environnement , R : Riz 2 , TS : Echantillon Test (Riz) , PC : Contrôle positif et NC : contrôle négatif.

➤ Observation :

Dans chaque puits de dépôt, nous observons :

- Pour le TS1 (l'échantillon test 1) : une amplification positive
- Pour le TS2 (l'échantillon test 2) : absence d'amplification
- Pour le PC (le contrôle positif) : une amplification positive
- Pour le NC (le contrôle négatif) : une amplification non spécifique

➤ Interprétation des résultats :

La présence d'amplification pour l'échantillon test 1 ainsi que le contrôle positif démontre qu'ils ont bien été transformés génétiquement car le promoteur P35S est un des constituants de la construction génétique utilisé pour les OGM, pour l'amplification du contrôle négatif cela est du à un excès d'amorce

- Pour le terminateur T-nos Nous avons utilisé le même programme à 35 cycles ;

LAD BL EC TS1 TS2 PC NC

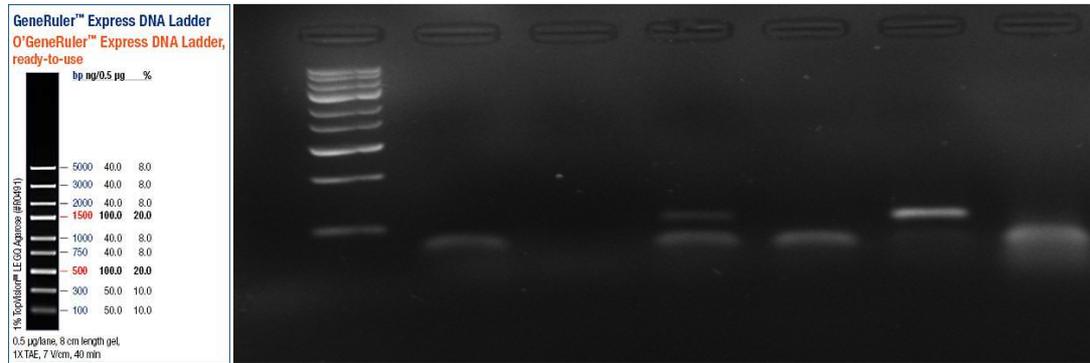


Figure 5.5 Résultat PCR du terminateur T-nos

Vérification du produit de PCR (10 μ l) pour le Terminateur T-nos sur gel d'agarose à 2%, un gel de TBE 0,5 X immergé dans l'électrophorèse TBE 0,5 x à 100 volts / 30 min.

Lad : Ladder : Marqueur de taille , Bl: Blanc (pas de modèle) , CE : Contrôle de l'Environnement , TS1:Echantillon test 1, TS2 : Echantillon Test 2 (Riz) , PC : Contrôle positif et NC : contrôle négatif .

➤ Observation :

Dans chaque puits de dépôt, nous observons :

- Pour le TS1 (l'échantillon test 1) : une amplification positive
- Pour le TS2 (l'échantillon test 2) : absence d'amplification
- Pour le PC (le contrôle positif) : une amplification positive
- Pour le NC (le contrôle négatif) : une amplification non spécifique

➤ Interprétation des résultats :

La présence d'amplification pour l'échantillon test 1 ainsi que le contrôle positif démontre qu'ils ont bien été transformés génétiquement car le terminateur Tnos est un des constituants de la construction génétique utilisé pour les OGM, pour les autres amplifications (échantillon test 2 ainsi que le négatif contrôle) cela est dû à un excès d'amorce

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Dans le contexte du projet collaboratif des méthodes de détection des OGM dans la région MENA, nos résultats ont montré que parmi les échantillons test que nous avons étudié il y'a probablement une présence de modification génétique sur l'un des échantillons, car les éléments régulateurs d'une construction génétique typique d'un organisme génétiquement modifié à été détecté que ce soit pour le promoteur P35S ou pour le Terminator, par ailleurs la certitude de nos résultats ne peut être affirmé qu'en reproduisant l'essai, pour ce qui est de l'autre échantillon testé, il ne pourrait être génétiquement modifié car aucun élément de la construction génétique n'a été détecté.

Les perspectives de ce travail visent à reprendre les procédures de détection depuis l'extraction des ADN à la lecture des résultats par électrophorèse et de faire un séquençage qui appuiera nos résultats pour pouvoir dès lors affirmer que l'échantillon test 2 est génétiquement modifié.

Les réglementations sur les organismes génétiquement modifiés nécessitent de plus en plus de tests fiables et reproductibles. Puisque l'identification et la quantification des OGM sont actuellement des processus longs et complexes et que le nombre d'OGM ne cesse d'augmenter, les laboratoires de génie-génétique et de biologie moléculaire doivent dupliquer leurs efforts pour apporter des analyses fiables et une détection d'OGM crédible pour une éventuelle traçabilité en Algérie.

Bibliographie

Bibliographie

- [Ahmed 2002]Ahmed F.E., *Detection of genetically modified organisms in foods*, Trends in Biotechnology, Volume 20, Issue 5, pp215–223, Elsevier, 2002.
- [Alasaad et al. 2016]Noor Alasaad, Hussein Alzubi, Ahmad Abdul Kader, *Data in support of the detection of genetically modified organisms(GMOs) in food and feed samples*, Data in Brief, Volume 7,pp: 243–252, Elsevier, 2016.
- [Angers-Loustau et al. 2014]Alexandre Angers-Loustau, Mauro Petrillo, Laura Bonfini, Francesco Gatto, Sabrina Rosa, AlexandrePatak and Joachim Kreysa, *JRC GMO-Matrix: a web application to support Genetically Modified Organisms detection strategies*, BMC Bioinformatics, BMC Bioinformatics, Volume 417, Issue 15, BioMed Central, 2014.
- [Apel&Hirt 2004]Klaus Apel, HeribertHirt, *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*, Annual Review of Plant Biology, Volume 55, pp 373-399, Annual Reviews, 2004.
- [Bae et al. 2013]Mi-Jung Bae , Young-SaengKim, Sup Kim, Yong-Hoe Choe, Eun-Jin Lee, Yul-Ho Kim, Hyang-Mi Park, Ho-Sung Yoon, *Transgenic rice overexpressing the Brassica juncea gamma-glutamylcysteinesynthetase gene enhances tolerance to abiotic stress and improves grain yield under paddy field conditions*, Molecular Breeding, Volume 31, Issue 4, pp 931-945, Springer-Verlag , 2013.
- [Bilgiç et al. 2013] Huseyin B. Bilgiç, TülinKaragenç, Martin Simuunza, Brian Shiels, Andy Tait, HasanEren, and William Weir , *Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of Theileriaannulata, Babesiabovis and Anaplasma marginale in cattle*, Experimental Parasitology, Volume 133, Issue 2, pp 222–229,Elsevier, 2013.
- [Bonny 2003]Sylvie Bonny, *Why are most Europeans opposed to GMOs? Factors explaining rejection in France and Europe*, Electronic Journal of Biotechnology, Volume 6, Issue 1, Universidad Católica de Valparaíso, 2003.
- [Del Gaudio et al. 2010]S. Del Gaudio, A. Cirillo, G. Di Bernardo, U. Galderisi, M. Cipollaro, *A preamplification approach to GMO detection in processed foods*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, Volume 396, Issue 6, pp 2135-2142, Springer-Verlag , 2010.
- [Del Gaudio et al. 2012]S. Del Gaudio, A. Cirillo, G. Di Bernardo, U. Galderisi and M. Cipollaro, *Verification of Real-Time PCR Methods for Qualitative and Quantitative Testing of Genetically Modified Organisms*, Journal of Food Quality,Volume 35, Issue 6, pages 442–447, John Wiley & Sons, 2012.
- [Dinkins et al. 2002]Dinkins R. D., Keim K. R., Farno L. & Edwards, L. H., *Expression of the narrow leaflet gene for yield and agronomic traits in soybean*.Journal of Heredity Volume 93, pp 351-356, 2002.
- [Gendron 2009]Louis Gendron, *Détection des OGM non autorisés par une méthode d'empreinte génétique, Essai sur le maïs et le soya*, Mémoire de Maître ès sciences, Université Laval, Québec, 2009.

- [Griffith 1928]Griffith F, *The Significance of Pneumococcal Types*,The Journal of Hygiene, Volume 27, Issue 2, pages 442–447, 1928.
- [Gros et al. 1991]Gros P, Dhir R, Croop J, Talbot F. *A single amino acid substitution strongly modulates the activity and substrate specificity of the mouse mdr1 and mdr3 drug efflux pumps*. ProcNatlAcadSci U S A., Volume 88, Issue 16, pp7289–7293, 1991.
- [Hemmer 1997]Hemmer, W. (1997). *Aliments dérivés d’organismes génétiquement modifiés et méthodes de détection*. Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Program Biotechnology – Rapport 2/97, 61 pages. http://www.bats.ch/bats/publikationen/1997-2_gmo/index.php.
- [Hinchee et al. 1988]Hinchee, M.A.W., Connor-Ward, D.V., Newell, C. A., McDonnell, R.E., Sato, S.J.,Gasser,C. S., Fischhoff, D. A., Re, D. B., Fraley, R. T. and Horsch, R. B.,*Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer*. Bio/Technology, Volume 6, pp 915–922, (1988).
- [Holst-Jensen et al. 2012]Arne Holst-Jensen , Yves Bertheau , Marc de Loose , Lutz Grohmann , Sandrine Hamels , LotteHougs , DanyMorisset, Sven Pecoraro , Maria Pla , Marc Van den Bulcke, DoerteWulff,*Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials*, Biotechnology Advances, Volume 30, Issue 6, pp:1318-1335,Elsevier, 2012.
- [Huang et al. 2013]Xuan Huang, Jian Wang, Zhen Du, Chen Zhang, Lan Li, ZiqinXu, *Enhanced resistance to stripe rust disease in transgenic wheat expressing the rice chitinase gene RC24*,Transgenic Research, Volume 22, Issue 5, pp 939-947, Springer-Verlag, 2013.
- [Kiddle 2014] GuyKiddle, *Letter to the Editor regarding “Detection of the 35S promoter in transgenic maize via various isothermal amplification techniques: a practical approach*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, Volume 406, Issue 30, pp 8059-8060, Springer-Verlag,2014.
- [Leimanis et al. 2006]Serge Leimanis, Marta Hernández, Sophie Fernández, Francine Boyer, Malcolm Burns, ShirinBruderer, Thomas Glouden, Neil Harris, OthmarKaeppli, Patrick Philipp, Maria Pla, Pere Puigdomènech, Marc Vaitilingom, Yves Bertheau, José Remacle, *A Microarray-based Detection System for Genetically Modified (GM) Food Ingredients*,Plant Molecular Biology, Volume 61, Issue 1, pp 123-139, Kluwer Academic Publishers, 2006.
- [Lin et al. 1987]Lin, F. D. ;Knabe, D. A. ; Tanksley, T. D. Jr., *Apparent digestibility of amino acids, gross energy and starch in corn, sorghum, wheat, barley, oat groats and wheat middlings for growing pigs*. J. Anim. Sci., Volume 64, Issue 6, pp 1655-1663, 1987.
- [Lübeck 2002]LübeckMette, *Detection of genetically modified plants methods to sample and analyse GMO content in plants and plant products*,Livre, Ministry of Environment, The Danish Forest and Nature Agency, 2002.
- [Markoulatos et al. 2004]Markoulatos P, Siafakas N, Papathoma A, Nerantzis EB, Betzios B, Dourtoglou V, Moncany M ,*Qualitative and Quantitative Detection of Protein and Genetic Traits in Genetically Modified Food*, Food Reviews International, Volume 20, Issue 3275-296, Taylor & Francis Group, 2004.

- [Mittler 2012]Ron Mittler, *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*, Trends in Plant Science, Volume 7, Issue 9, pp 405-410, Elsevier, 2012.
- [Paarlberg 2010]Robert Paarlberg, *GMO foods and crops: Africa's choice*, New Biotechnology, Volume 27, Issue 5, pp 609–613, Elsevier, 2010.
- [Querci et al. 2010]MaddalenaQuerci, Marc Van den Bulcke, Jana Žel, Guy Van den Eede, Hermann Broll, *New approaches in GMO detection*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, Volume 396, Issue 6, pp :1991–2002, Springer-Verlag, 2010.
- [Shou et al. 2004]HuixiaShou, Patricia Bordallo and Kan Wang, *Expression of the Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize*, Journal of Experimental Botany Volume 55, Issue 399, pp 1013-1019, Oxford University Press, 2004.
- [Singh et al. 2011]Singh, Sultan; Kushwaha, B. P. ; Nag, S. K. ; Mishra, A. K. ; Bhattacharya, S. ; Gupta, P. K. ; Singh, A., *In vitro methane emission from Indian dry roughages in relation to chemical composition*, Current Science, Volume.101, Issue 1, 2011.
- [Sun et al. 2015]HeSun, Zhi-hongLang, Wei Lu, JieZhang, Kang-laiHe, Li Zhu, Min Lin, Da-fang Huang, *Developing transgenic maize (Zea mays L.) with insect resistance and glyphosate tolerance by fusion gene transformation*, Journal of Integrative Agriculture, Volume 14, Issue 2, pp 305-313, Elsevier, 2015.
- [Wang et al. 2015]Cong Wang,Rong Li, Sheng Quan,Ping Shen,Dabing Zhang,Jianxin Shi1, Litao Yang, *GMO detection in food and feed through screening by visual loop-mediated isothermal amplification assays*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, Volume 407, Issue 16, pp 4829-4834, Springer Berlin Heidelberg, 2015.
- [Weber et al. 2006]Weber S, Moriniere V, Knüppel T, Charbit M, Dusek J, Ghiggeri GM, Jankauskienė A, Mir S, Montini G, Peco-Antic A, Wühl E, Zurowska AM, Mehls O, Antignac C, Schaefer F, Salomon R.*Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: results of the ESCAPE study.*, J Am SocNephrol., Volume 17, Issue 10, pp:2864-70, 2006.
- [Wu et al. 2014]Gentu Wu, Jiaoyu Wang, Yong Yang, Bo Dong, Yanli Wang, Guochang Sun, Chengqi Yan, Fei Yan, Jianping Chen, *Transgenic rice expressing rice stripe virus NS3 protein, a suppressor of RNA silencing, shows resistance to rice blast disease*, Virus Genes, Volume 48, Issue 3, pp 566-569, Springer-US, 2014

Annexe A

Annexe A

1. Extraction d'ADN

➤ **Liste des appareils et matériels :**

- Balance de précision
- Mortiers et pilon autoclavés, emballé dans du papier d'aluminium
- Spatule stérilisées à l'étuve
- Bain marie à 37°C
- incubateur
- Vortex
- Tubes eppendorf 1,5ml ou 2ml stériles
- Portoirs flottants pour microtube
- Tube à vis 2ml
- Micropipettes P20, P200, P1000
- Sous plaquettes
- Minuteur

➤ **Liste des produits (chimiques et biologiques) :**

- Tampon CTAB 2x
- Chloroforme/Alcool isomylique (24 ;1)
- Isopropanol froid (conservé à -20°C)
- RNase A (10mg/ml)
- Solution lavage 1
- Solution lavage 2
- TE 0,1 X
- Chlorur de sodium NaCl
- Hydroxide de sodium NaOH
- Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (tris) (C₄H₁₁NO₃)

2. Mode opératoire

➤ **Préparation solutions et tampons**

a) Tampon CTAB 2X (ph=8) :

	<i>Concentration finale</i>	<i>PM (g/mol)</i>	<i>1 litre</i>	<i>200ml</i>	<i>100ml</i>
CTAB	2% (P/V)	364,45	20g	4g	2g
Tris de base	100 mM	121,14	12,11g	2,42g	1,21g
Na2EDTA	200 mM	372,24	7,44g	1,49g	0,75g
NaCL	1,4 M	58,44	81,8g	16,36g	8,18g
PVP 40	1% (P/V)		10g	2g	1g
H2O			Qsp 1L	Qsp 200ml	Qsp 100ml

b) Chloroforme/ Alcool isoamylique (24 ;1)

- Pour 25ml : 24ml Chloroforme + 1ml Alcool isoamylique
 - Pour 100ml : 96ml Chloroforme + 4ml Alcool isoamylique
- (Conservation à température ambiante)

c) Solution Lavage 1 :

	<i>Concentration finale</i>	<i>PM(g/mol)</i>	<i>litre</i>	<i>100ml</i>	<i>50ml</i>
Acétate d'ammonium	10mM	77,08	0,8g	0,08g	0,04g
H2O distillée			240ml	24ml	12ml
Ethanol 100%	Dissolution de l'acétate avant l'ajout de l'éthanol				
	76%		760ml	76ml	38ml

d) Solution lavage 2 :

	<i>Concentration finale</i>	<i>PM(g/mol)</i>	<i>1litre</i>	<i>100ml</i>	<i>50ml</i>
<i>Acétate d'ammonium</i>	10mM	77,08	0,8g	0,08g	0,04
<i>H2O distillée</i>			240ml	24ml	12ml
<i>Dissolution du sodium avant l'ajout de l'éthanol</i>					
Ethanol 100%	76%		760ml	76ml	38ml

e) **TE 1X (PH=8)**

	<i>Concentration finale</i>	<i>1Litre</i>	<i>500ml</i>	<i>100ml</i>
<i>TE 1X</i>	0,1 X	100ml	50ml	10ml
<i>H2O</i>		Qsp 1L	Qsp 500ml	Qsp 100ml

3.Evaluation de l'ADN

➤ **Equipement utilisé :**

- Spectrophotomètre
- Micro pipette

➤ **Matériel de laboratoire nécessaire :**

- Gants
- Filtres stériles
- lingettes sèches de laboratoire ou papier essuie tout

➤ **Procédure :**

L'ADN, l'ARN, les oligonucléotides et même les mononucléotides peuvent être mesurés directement dans des solutions aqueuses sous forme diluée ou non diluée en mesurant l'absorption A (également définie comme étant la densité optique, DO) en lumière ultraviolette (mais aussi dans le spectre visible). Si l'échantillon est pur (autrement dit, s'il ne contient pas de quantité significative de contaminants tels que des protéines, du phénol ou de l'agarose), la mesure spectrophotométrique de la quantité de rayons ultraviolets absorbés par les bases est une opération facile et précise. L'idéal pour cette méthode est des tampons aqueux à faibles concentrations ioniques (par exemple, un tampon TE). La concentration d'acides nucléiques est généralement déterminée par une mesure effectuée à 260 nm contre un échantillon appelé

« blanc ». L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A_{260}/A_{280} est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8, tandis que l'ARN pur devrait avoir une valeur d'environ 2,0. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A_{260}/A_{230} devrait être d'environ 2,2. Une méthode alternative, en l'occurrence la méthode de la plaque d'agarose aubromure d'éthidium, est utile lorsqu'on ne dispose que de faibles quantités d'acide nucléique. La quantité d'acide nucléique peut être estimée par comparaison à une gamme de concentrations en utilisant l'intensité de la fluorescence émise par le bromure d'éthidium lorsque celui-ci est irradié par la lumière UV. (JRC)

➤ **Equipement :**

- Balance analytique
- Micro pipette
- Micro onde
- Appareil d'électrophorèse
- Transilluminateur UV
- Système d'enregistrement d'imagerie de gel

➤ **Matériel de laboratoire :**

- Filtre stérile
- Gants
- Papier essuie tout

➤ **Réactifs :**

- Solution de bromure d'éthidium
- une solution tampon de chargement d'échantillon (6X)
- TBE (10X)
- 1 marqueur de taille de 1Kb

1- Préparation du gel d'agarose :

- 1) Peser une quantité appropriée d'agarose et ajoutez le TBE 1X
- 2) Dissoudre la solution dans un four à micro-ondes
- 3) Laisser la solution refroidir

- 4) Ajouter du bromure d'éthidium à une concentration finale de 0,5µg / ml
- 5) Verser la solution sur le plateau du gel , placez le peigne et laisser le gel se solidifier à température ambiante

2- Préparation d'échantillons d'ADN :

Mélanger 1 microlitre de tampon de charge (6X) avec 5uL d' échantillon d'ADN.

3- Electrophorèse :

- 1) Placez le plateau de gel dans l'appareil d'électrophorèse
- 2) Ajouter un volume suffisant de TBE (1X) pour couvrir le gel
- 3) Chargez le marqueur de taille de l'ADN et les échantillons préparés dans leurs puits correspondants
- 4) Exécutez le gel à 100 v pour 30-40min
- 5) Voir le gel sur une transilluminator UV et la photographie utilise un système d'enregistrement d'image

4- l'évaluation de l'ADN amplifié :

Le gène endogène SPS (phosphate de saccharose synthase) permet de vérifier l'amplification d'un échantillon d'ADN en ce qui concerne le riz et le maïs dans une réaction de PCR.

➤ **Equipement :**

- Micro pipette
- Thermo-cycler

➤ **Matériel de laboratoire :**

- Filtre stérile
- Gants
- Tubes de 2ml
- Tubes de PCR de 0,2ml

➤ **Contrôle ADN cible :**

- Contrôle positif :

Tout riz, maïs, soja certifié matériel de référence CRM ou des échantillons de bonne qualité peuvent être utilisés.

- Contrôle négatif :

➤ **Réactifs :**

- Eau distillée désionisée
- Tampon PCR 10X (100mM,20mM MgSO₄,80Mm (NH₄)₂SO₄, et 100Mm Tris-HCL à ph=8,5)
- dNTPs
- MgCL₂
- Amorces : SPS 1F 5'- TTGCGCCTGAACGATAT – 3'
SPS 2R 5'- GGAGAAGCACTGGACGAGG-3'
- ADNA Taq polymérase

➤ **Procédure :**

Préparation du *Master Mix* :

La mixture de la réaction de PCR contient :

- Tampon PCR 1X (10 Mm KCL, 2 Mm MgSO₄, 8Mm (NH₄)₂SO₄, et 10 Mm Tris-HCL à un PH=8,5)
- 200Nm de chaque dNTPs
- 2,5Mm MgCL₂
- 230 Nm de chaque primer
- 1unité de la Taq polymérase
- 100 ng de chaque échantillon d'ADN

5- Le dépistage du P35S :

➤ **Equipement :**

- Micro pipette
- Thermo-cycleur

➤ **Matériel de laboratoire :**

- Filtre stérile
- Gants
- Tubes de 2ml
- Tubes de PCR à 0,2ml

➤ **Contrôle positif :**

Tout échantillon préalablement examiné ou un p35S positif

➤ **Contrôle négatif :**

Tout échantillon préalablement examiné ou un p35S négatif

➤ **Réactifs :**

- L'eau distillée désionisée
- Tampon PCR
- dNTPs
- MgCL₂
- Amorces : Cf3 5' - CCACGTCTTCAAAGCAAGTCGG-3'
Cr4 5' - TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC-3'
- Taq polymérase

➤ **Procédure :**

Préparation du *Master Mix* :

La mixture de la réaction PCR ($V_t=50\mu\text{l}$) contient :

- Tampon de PCR 1X
- 2,5 Mm MgCL₂
- 0,2Mm dNTPs
- 0,5 μl de chaque primer
- 0,025U/ μl de Taq polymérase
- 2 μl d'échantillon d'ADN

6- Le dépistage du T-nos :

➤ **Equipement :**

- Micro pipette
- Thermo-cycleur

➤ **Matériel de laboratoire :**

- Filtre stérile
- Gants
- Tubes de 2ml
- Tubes de PCR à 0,2ml

➤ **Contrôle positif :**

Tout échantillon préalablement examiné ou un T-nos positif

➤ **Contrôle négatif :**

Tout échantillon préalablement examiné ou un T-nos négatif

➤ **Réactifs :**

- L'eau distillée désionisée
- Tampon PCR
- dNTPs
- MgCL₂
- Amorces : Cf3 5' - GCATGACGTTATTTATGAGATGGG-3'
Cr4 5' - GACACCGCGCGCGCCGCGATAATTTATCC-3'
- Taq polymérase

➤ **Procédure :**

Préparation du *Master Mix* :

La mixture de la réaction PCR (V_t=50μl) contient :

- Tampon de PCR 1X
- 2,5 Mm MgCL₂
- 0,2Mm dNTPs
- 0,5μl de chaque primer
- 0,025U/μl de Taq polymérase
- 2μl d'échantillon d'ADN

Techniques de Détection des OGM dans les Aliments

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et génomique végétale

Les organismes génétiquement modifiés (OGM) représentent une composante importante du marché mondial de l'alimentation humaine et animale, le taux de croissance des cultures génétiquement modifiées cultivées a augmenté de plus de 10% par an et a atteint 181,5 millions d'hectares dans le monde. Parallèlement à ce développement rapide des cultures GM, le public est toujours préoccupé par les risques potentiels des plantes GM et leurs dérivés. De ce fait une législation d'application a été mis en place pour vérifier la conformité avec les réglementations locales afin de donner le libre choix aux consommateurs, cette réglementation n'est néanmoins pas toujours appliqué, ce qui créé chez les consommateurs un profond doute et une non crédibilité quant aux produits importés tel que le maïs, le soja et le riz , l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés et leur dérivés dans la chaîne alimentaire doit être soumise à une réglementation stricte et l'étiquetage des aliments doit être obligatoire.

Par conséquent, la mise au point de méthodes fiables pour la détection des OGM, leur identification, quantification et leur traçabilité est devenu de plus en plus importante. Afin d'exécuter ces règlements sur l'étiquetage des OGM, il est essentiel de développer et de standardiser de façon efficace et crédible les méthodes d'analyse pour le contrôle du contenu GM dans les produits alimentaires ainsi que dans les aliments pour animaux.

Dans ce contexte, le présent mémoire a pour objectif de faire une synthèse sur les principales avancées réalisées dans ce domaine, de présenter nos propre résultats sur l'essai qui a été fait à fin de détecter la présence d'éventuel PGM présent sur le marché local en utilisant une technique d'analyse par amplification et de faire une synthèse des méthodes de détection dans le contexte du projet d'harmonisation des techniques de détection des OGM dans les pays (MENA) d'Afrique du nord et du moyen orient

Mots clés : *Organismes génétiquement modifiés, traçabilité, étiquetage, techniques de détection.*

Laboratoire de recherche : Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale.

Jury d'évaluation :

Président du jury :	Dr. BOUSBA Ratiba	(M.C - UFM Constantine).
Rapporteur :	Pr. YKHLEF Nadia	(Professeur - UFM Constantine).
Examineur :	Mr. TEMAGOULT Mahmoud	(M.A - UFM Constantine)

Date de soutenance : 18/06/2016