

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة – الحراش – الجزائر
Ecole Nationale Supérieure Agronomique - El Harrach -Alger

Ecole Doctorale : **Biotechnologies Végétales**

مدرسة الدكتوراه : **تقانة حيوية نباتية**



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en

Biotechnologies végétales

Présenté par : M^{elle} BELALIA NAWEL

Sujet

Détection des OGM dans l'agriculture et l'alimentation en
Algérie : cas du maïs transgénique

Jury

Président	M^r SABAOU N.	Professeur	ENS
Directeur de thèse	M^{me} LOUANCHI M.	Maître de conférences	ENSA.
Examineurs	M^r KHELIFI L.	Professeur	ENSA.
	M^r ABDELGUERFI A.	Professeur	ENSA.

Soutenu le 24 Juin 2010

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet sur « la participation du public au processus de mise en place d'un cadre de biosecurité en Algerie » coordonné par l'AREA-ED (Association de Réflexion d'Echange et d'Action pour l'Environnement et le Développement) et financé par la coopération allemande (GTZ), au laboratoire de Phytopathologie et de Biologie Moléculaire de l'ENSA (Alger).

Je tiens à remercier tout d'abord Madame Louanchi M. pour l'attention et l'intérêt qu'elle a porté à mon travail. Je la remercie pour sa disponibilité, ses précieux conseils et surtout la confiance qu'elle m'a accordé. Qu'elle trouve ici toute ma reconnaissance.

Je tiens à exprimer mes remerciements et mon profond respect à Monsieur Sabaou N. professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Kouba, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.

Mes vifs remerciements et ma profonde gratitude vont à mon enseignant Monsieur Khelifi L. professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach et Monsieur Abdelguerfi A. professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Oumari C., Madame Djebari K., Mademoiselle Abdellaoui K. et Mademoiselle Lala S. pour le soutien et l'encouragement qu'ils m'ont apporté.

Un merci particulier à Mademoiselle Salhi L.N. avec qui j'ai eu le plaisir à travailler, je la remercie pour sa disponibilité et ses précieux conseils. Sans oublier Hayet avec qui j'ai partagé les moments les plus difficiles de mon expérimentation.

Mes remerciements vont également à Madame Benhasir F., Fouzi et Mohamed pour leur aide et leur disponibilité tout au long de l'expérimentation. Ainsi qu'à tous ce qui ont participé de près ou de loin à réaliser ce travail.

Il m'est agréable de remercier chaleureusement mes deux chères parents, mes deux frères et ma sœur pour la compréhension, les encouragements et le soutien qu'ils m'ont apporté tout au long de cette étude. Sans oublier mon beau frère et mon petit neveu Aymen. Enfin, toute ma sympathie à tous les étudiants en post graduation ainsi qu'à tous mes amis.

Table des matières

Table des matières

1. Introduction général	1
2. Analyse bibliographique	3
2.1. La culture de maïs.....	3
2.1.1. Taxonomie et description du maïs.....	3
2.1.2. Situation mondiale.....	3
2.1.2.1. Utilisation de la culture du maïs.....	3
2.1.2.2. Superficies et productions.....	4
2.1.2.3. Commerce du maïs.....	4
2.1.3. Situation en Algérie.....	5
2.1.3.1. Productivité et zones de production.....	5
2.1.3.2. Les importations du maïs.....	6
2.2. Les plantes génétiquement modifiées.....	7
2.2.1. État mondial des plantes génétiquement modifiées.....	7
2.2.1.1. Superficies cultivées.....	7
2.2.1.2. Principales plantes cultivées.....	7
2.2.1.3. Les éléments génétiques utilisés dans les cultures GM.....	7
2.2.2. Le maïs transgénique.....	9
2.2.3. Maïs transgéniques résistants aux insectes.....	9
2.2.3.1. Caractéristiques de <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bt</i>).....	9
2.2.3.2. Les δ -endotoxines de <i>Bt</i>	10
2.2.3.3. Mode d'action des protéines Cry.....	10
2.2.3.4. Les lignées de maïs <i>Bt</i> transgéniques commercialisées.....	11
2.2.3.5. Le statut réglementaire des lignées de maïs <i>Bt</i>	11
2.2.3.6. Méthode de développement de certaines lignées <i>Bt</i>	12
Cas du maïs Bt-176.....	12
Cas du maïs MON 810.....	13
Cas du maïs StarLink (CBH-351).....	14
2.2.4. Maïs transgéniques résistants aux herbicides.....	15
2.2.4.1. Cas du maïs résistant au glyphosate (RR).....	15
2.2.4.2. Lignées de maïs transgéniques RR commercialisées.....	16
2.2.4.3. Méthode de développement de la lignée RR GA21.....	17
2.3. Evaluation des risques liées aux OGM.....	17

2.3.1. Les risques liés à l'utilisation du maïs GM.....	17
2.3.1.1. Aspects environnementaux.....	18
Impacts sur les organismes non cibles.....	18
Evolution de résistances aux toxines <i>Bt</i>	18
Dissémination des transgènes par pollinisation croisée.....	19
Transferts géniques horizontaux.....	19
Mutagenèse insertionnelle.....	20
2.3.1.2. Aspects sanitaires.....	20
Allergénicité.....	20
Toxicité.....	21
2.3.1.3. Incertitudes scientifiques.....	21
2.3.1.4. Considérations socio économiques et éthiques.....	22
2.3.2. Evaluation des risques liés aux OGM.....	23
2.4. Identification et détection des OGM.....	24
2.4.1. Echantillonnage.....	24
2.4.1.1. Plan d'échantillonnage.....	25
2.4.1.2. Hétérogénéité des caractères contrôlés	25
2.4.1.3. Protocole de l'échantillonnage.....	26
2.4.1.4. Echantillonnage des semences.....	29
2.4.1.5. Echantillonnage des produits alimentaires emballés.....	30
2.4.1.6. Echantillonnage des PGM	30
2.4.2. Méthodes de détection moléculaires.....	31
2.4.2.1. Généralités.....	31
2.4.2.2. Criblage et identification.....	32
2.4.2.3. Quantification.....	32
PCR compétitive	33
PCR en temps réel	33
2.4.2.4. Autres Méthodes moléculaires.....	33
Puce à ADN (DNA chips).....	33
PCR-ELIZA.....	34
2.4.2.5. Limites de détection et de quantification.....	34
2.4.3. Méthodes de détection immunoenzymatiques	35
2.4.3.1. Les immuno-essais.....	35
Le test ELISA.....	36
Les bandelettes de détection (strip test).....	36
2.4.3.2. Le Western blot.....	37

3. Matériels et Méthodes	39
3.1. Echantillons de maïs	39
3.1.1. Nature des échantillons.....	40
3.1.1.1. Maïs destiné aux cultures et à l'alimentation humaine (épis).....	40
3.1.1.2. Maïs destiné à l'alimentation humaine.....	40
3.1.1.3. Maïs destiné à l'alimentation animale.....	41
3.1.2. Echantillonnage des lots.....	41
3.1.2.1. Collection des échantillons élémentaires	41
3.1.2.2. Formation des échantillons composites.....	42
3.1.2.3. Formation des échantillons de laboratoire.....	42
3.1.2.4. Broyage des échantillons de laboratoire.....	42
3.2. Méthode de détection par criblage (Screening).....	44
3.2.1. Obtention de l'ADN.....	44
3.2.1.1. Méthodes d'extraction utilisées.....	44
Protocole à base de CTAB.....	44
Protocole à base du SDS.....	44
3.2.1.2. Visualisation de l'ADN sur gel d'électrophorèse.....	47
3.2.1.3. Détermination de la concentration en ADN	47
3.2.2. Mise au point de la technique PCR.....	47
3.2.2.1. Les séquences d'ADN ciblées.....	48
Détection du gène ZEIN spécifique au maïs.....	48
Détection du promoteur 35S et du terminateur nos.....	48
3.2.2.2. Préparation des échantillons pour la PCR	49
3.2.2.3. Réaction d'amplification.....	50
3.2.2.4. Electrophorèse des amplifias sur gel d'agarose	51
3.3. Méthode de détection par bandelettes (Strip test).....	51
3.3.1. Préparation des échantillons.....	52
3.3.2. Application du test.....	53
4. Résultats et discussion	54
4.1. Détection par criblage par PCR (screening).....	54
4.1.1. Comparaison des méthodes d'extraction d'ADN	54
4.1.1.1. Résultats obtenus	54
4.1.1.2. Discussion.....	56
4.1.2. Amplification des séquences cibles	58
4.1.2.1. Amplification du gène zein.....	58

4.1.2.2. Détection du promoteur 35 S.....	59
4.1.2.3. Détection du terminateur nos.....	60
4.1.2.4. Discussion.....	61
4.2. Résultats de la détection par bandelettes.....	63
4.2.1. Maïs destiné aux cultures et à l'alimentation humaine (épis)	64
4.2.2. Maïs destiné à l'alimentation humaine (pop corn et maïs doux).....	65
4.2.3. Maïs destiné à l'alimentation animale	67
4.2.4. Discussion	68
5. Conclusion générale	71
Références bibliographiques.....	73

Liste des abréviations

ADN	: Acide Désoxyribonucléique.
AFSSA	: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.
AHAT	: Alimentation Humaine Animale et Transformation.
ALGEX	: Agence national de promotion du commerce extérieur.
AGPM	: Association Générale des Producteurs de Maïs.
BET	: Bromure d'Ethidium
Bt	: <i>Bacillus thuringiensis</i> .
CaMV	: Virus de la mosaïque du chou- fleur
CDB	: Convention sur la Diversité Biologique.
CNIS	: Centre National de l'information et des Statistiques.
CP4-EPSPS	: 5-énolpyruvyl-shikimate-3-Phosphate synthase souche CP4.
CTAB	: Cetyltrimethyl-Ammonium Bromide.
DAS-ELISA	: Double-Antibody Sandwich-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
DO	: Densité optique.
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
FAO	: Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.
GIPSA	: The Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration (Etats-Unis).
GM	: Génétiquement modifié.
GNIS	: Groupement National Interprofessionnel des Semences et des plants (France).
GOX	: Glyphosate Oxydoréductase.
GRAIN	: Genetic Resources Action International, une organisation non gouvernementale internationale.
hsp70	: Heat Shock Protein 70
ISAAA	: International Service for Acquisition of Agri-biotech Applications.
ISO	: International Organisation for Standardisation.
ISTA	: International Seed Testing Association.
LOD	: Limite de Détection.
LOQ	: Limite de Quantification.
NCM	: Nordic Council of Ministers
npt II	: Néomycine phosphotransferase de type II
OGM	: Organisme génétiquement modifié.
OMS	: Organisation mondiale de la santé.
ONAB	: Office National des Aliments du Bétails.
OVM	: Organisme vivant modifié.

PCR	: Polymerase Chain Reaction.
PGM	: Plante Génétiquement Modifiée.
P-CDPK	: promoteur d'une protéine kinase calcium dépendante.
P-PEPC	: Promoteur de la phosphoenolpyruvate carboxylase.
P-35 S	: promoteur 35 S.
RH	: Résistance à l'Herbicide.
RR	: Roundup Ready.
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate.
SEB 4	: Sample Extraction Buffer 4.
TBE	: Tris Borate EDTA.
T-nos	: terminateur nos.
UE	: Union Européenne.
USDA	: United States Department of Agriculture
UV	: Ultra Violets.

Unités utilisées

Ha	: Hectare.
Kg	: Kilogramme.
ml	: Millilitre
Mt	: Millions de tonnes.
nm	: Nanomètre.
Pb	: Paire de base.
Q	: Quintal.
USD	: United States Dollar.
µl	: Microlitre.

Liste des tableaux

Tableau 1.	Evolution des superficies, productions et rendements du maïs en Algérie.....	5
Tableau 2.	Evolution des importations du maïs en Algérie de 1998 à 2008.....	6
Tableau 3.	La détermination de la taille de l'échantillon en utilisant la distribution binomiale.....	27
Tableau 4.	La taille des échantillons optimaux.....	27
Tableau 5.	Détermination du nombre de sac à échantillonner.....	28
Tableau 6.	Exigence d'échantillonnage pour les sacs de semence ou de conteneurs de taille similaire contenant au moins 15 Kg mais pas plus de 100 Kg de semence.....	29
Tableau 7.	Exigence d'échantillonnage pour les grands conteneurs ou semence en vrac.....	30
Tableau 8.	Présentation des caractéristiques des échantillons de maïs analysés.....	39
Tableau 9.	Caractéristiques des amorces utilisées pour le screening.....	48
Tableau 10.	Récapitulatif des concentrations en réactifs du milieu réactionnel (mix).....	50
Tableau 11.	Présentation de la taille de l'échantillon de laboratoire et le volume du tampon d'extraction nécessaire pour les tests bandelettes.....	52
Tableau 12.	Présentation des valeurs des DO, de la pureté et de la concentration en ADN....	55
Tableau 13.	Présentation des résultats des tests par bandelettes.....	63

Liste des figures

Figure 1	Les promoteurs fréquemment utilisés dans les OGM commercialisés.....	8
Figure 2	Les gènes les plus fréquemment utilisés dans les OGM commercialisés.....	8
Figure 3	Les terminateurs fréquemment utilisés dans les OGM commercialisés.....	9
Figure 4	Schéma du gène synthétique Cry1Ab sous le contrôle du promoteur PEPC...	12
Figure 5	Schéma du gène synthétique Cry1Ab sous le contrôle du promoteur CDPK...	13
Figure 6	Représentation schématique du gène bar.....	13
Figure 7	Schéma du gène chimère Cry 1Ab du plasmide PV-ZMBK07, y compris le promoteur 35S amélioré, l'intron hsp70 du maïs et le terminateur nos.....	14
Figure 8	Schéma de la construction pRSVA9909 utilisée pour la transformation du CBH-351.....	15
Figure 9	Schéma de la construction pDE110 utilisée pour la transformation du CBH-351.....	15
Figure 10	Représentation schématique du fragment NotI du plasmide pDPG434.....	17
Figure 11	Echantillonnage à partir de wagons, camions, péniches ou navires.....	28
Figure 12	Niveaux de spécificité des amorces pour la détection des OGM par PCR.....	31
Figure 13	Principe des tests bandelettes.....	37
Figure 14	Schéma présentant les étapes de formation de l'échantillon de laboratoire....	43
Figure 15	Séquence du terminateur nos du gène Pat d'un maïs transgénique selon l'accès à la banque de gène N° AY123624.1.....	49
Figure 16	Séquence 73 du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et site d'hybridation des amorces p35S-cf3 et p35S-cr4 selon le brevet WO2007024782.....	49
Figure 17	Extraits d'ADN génomiques obtenus pour tous les échantillons.....	54
Figure 18	Profils électrophorétiques obtenus par amplification PCR de la séquence d'ADN cible du maïs à partir des ADN extraits avec le protocole à base du SDS.....	58
Figure 19	Profils électrophorétiques obtenus par amplification PCR de la séquence d'ADN cible du maïs à partir des ADN extraits avec le protocole à base du CTAB.....	59
Figure 20	Profils électrophorétiques des échantillons obtenus par amplification PCR de la séquence cible du promoteur 35S du CaMV.....	60
Figure 21	Profils électrophorétiques des échantillons obtenus par amplification PCR de	

	la séquence cible du terminateur T-Nos.....	61
Figure 22	Résultats des tests bandelettes pour les échantillons de maïs destinés à l'alimentation humaine et aux cultures (épis).....	65
Figure 23	Résultats des tests bandelettes pour les échantillons de maïs destinés à l'alimentation humaine (pop corn).....	66
Figure 24	Résultats des tests bandelettes pour les échantillons de maïs destinés à l'alimentation humaine (maïs doux).....	67
Figure 25	Résultats des tests bandelettes pour les échantillons de maïs destinés à l'alimentation animale.....	68

Liste des planches

Planche 1 : Protocole d'extraction d'ADN à base de CTAB.....45

Planche 2 : Protocole d'extraction d'ADN à base du SDS.....46

Liste des annexes

Annexe 1 : Liste des maïs GM Bt.

Annexe 2 : Liste des autorisations du maïs **Bt** et **RR** aux Etats-Unis, l'Union Européenne et en Afrique du sud.

Annexe 3 : Liste des maïs GM **RR** contenant le transgène EPSPS.

Annexe 4 : Description des échantillons de maïs Pop Corn.

Annexe 5 : Description des échantillons de maïs doux.

Annexe 6 : Réactifs utilisés pour le protocole d'extraction à base de CTAB.

Annexe 7 : Réactifs utilisés pour le protocole d'extraction à base de SDS.

Annexe 8 : Tampons utilisés lors de l'électrophorèse des ADN extraits.

Introduction générale

1. Introduction générale

Les questions relatives aux biotechnologies modernes sont depuis plusieurs années sujettes à de nombreux débats et controverses : aux possibles avantages que ces nouvelles technologies sont susceptibles d'amener pour le développement de l'agriculture, viennent s'opposer les risques relatifs de leurs effets défavorables sur la diversité biologique, l'environnement et la santé humaine.

En effet, les biotechnologies constituent un outil important pour le développement durable de l'agriculture, des pêches et des forêts, de l'industrie, du secteur de la santé publique ainsi que des ressources énergétiques.

Alors que de nombreux aspects des biotechnologies et de leurs applications ne prêtent guère à controverse, l'introduction des organismes génétiquement modifiés (OGM) dans les systèmes agraires et alimentaires et les activités de bioprospection et de biopiraterie dans un environnement caractérisé par un vide juridique, pourraient constituer de nouvelles menaces pour la biodiversité. Alors qu'elle est de plus en plus exposée à la menace de la surexploitation, la perte et la dégradation d'habitat, de même que la pollution, les espèces envahissantes et les changements climatiques, sa conservation est une condition préalable au développement durable et, à ce titre, constitue l'un des plus grands défis de notre époque.

A l'échelle internationale, ces OGM sont règlementés par le biais du Protocole de Cartagena sur la Prévention des risques biotechnologiques, adopté en Janvier 2000 et entré en vigueur le 11 Septembre 2003. Son objectif, en conformité avec la démarche de précaution, consiste à «contribuer à assurer un degré adéquat de protection pour le transfert, la manipulation et l'utilisation sans danger des organismes vivants modifiés résultants de la biotechnologies moderne, compte tenu également des risques pour la santé humaine, en mettant plus précisément l'accent sur les mouvements transfrontières».

En Algérie, le principe de précaution a été affirmé dès le départ par la promulgation en Décembre 2000 d'un arrêté ministériel interdisant l'introduction et l'utilisation de matériel végétal génétiquement modifié en tant que semence. Cependant, le protocole n'a été ratifié qu'en Juin 2004 et, aucun texte réglementaire n'a été établi depuis pour renforcer le contrôle des OGM. Avec l'ouverture du marché et l'importance des importations de matière première

ou produits dérivés d'OGM, l'Algérie doit renforcer ces capacités par l'élaboration de textes réglementaires traduisant les obligations du Protocole.

Par ailleurs, des études préliminaires ont montré la présence d'OGM dans les produits issus de soja (Ghazi, 2007) et de maïs (Louanchi et *al.*, 2008). Ceci montre clairement qu'indépendamment des obligations du Protocole, il faut mettre en place une politique d'étiquetage des produits alimentaires ce qui implique la mise en place d'un système de contrôle permettant la détection et l'identification des OGM.

La présente étude a pour objectif principal la détection de maïs transgénique dans l'alimentation et l'agriculture afin d'avoir un aperçu partiel sur le degré d'introduction des OGM en Algérie. L'étude consiste en une analyse qualitative des échantillons de maïs brut non transformé destinés aux cultures, à l'alimentation humaine et animale. Afin d'atteindre cet objectif, deux méthodes de détection ont été réalisées :

- Détection par criblage (PCR), effectuée en recherchant deux séquences largement utilisées dans les constructions transgéniques (promoteur P-35S et le terminateur de la nopaline synthase, T-nos) dans les différents échantillons collectés.
- Détection et identification immunologique spécifique des protéines transgéniques de différentes constructions génétiques commercialisées en utilisant les bandelettes de détection (Strip test).

Analyse bibliographique

2. Analyse bibliographique

2.1. La culture de maïs

2.1.1. Taxonomie et description du maïs

Le maïs appartient à la famille des *Poaceae*, sous-famille des *Andropogonoideae*, tribu des *Maydeae* dont les genres sont caractérisés par des épillets unisexués, soit dans des inflorescences différentes, soit réunis dans une même inflorescence. Cette tribu comprend 8 genres, 5 d'Asie (*Coix*, *Polytoca*, *Sclerachne*, *Chionachne*, *Trilobachne*) de faible importance et 3 américaines (*Zea*, *Tripsacum*, *Euclaena*) (Baudoin et al., 2002). Le genre *Zea* comprend 5 espèces, dont l'espèce cultivée *Zea mays* et 4 parents sauvages, tous originaires d'Amérique tropicale et appelés téosintes (Brink et Belay, 2006).

Le maïs, *Zea mays* ssp. *mays* ($2n=20$), est une plante herbacée cultivée comme une plante annuelle mais pouvant se comporter comme une plante bisannuelle. Elle se reproduit par fécondation croisée (allogamie) contrairement à la plupart des céréales (Simon, 2005).

2.1.2. Situation mondiale

2.1.2.1. Utilisation de la culture du maïs

Le maïs est destiné à l'alimentation humaine et animale et comme matière première pour de nombreuses applications industrielles (Brink et Belay, 2006). Ces utilisations diffèrent en fonction du niveau économique des pays. Dans les pays à faible revenu, le maïs est surtout réservé à la consommation humaine, sous forme d'épis immature, de farine ou de semoule. En revanche, il constitue une matière première pour l'alimentation du bétail, l'industrie de la semoule et celle de l'amidon dans les pays développés (Charrier et al., 2004).

Dans l'alimentation humaine, plusieurs variétés sont cultivées (maïs doux, perlé, denté, farineux et vitreux). Il se consomme frais, grillé ou bouilli, sous forme de graines cuites avec une légumineuse et est utilisé pour la fabrication de farine (Nyabyenda, 2005). Pour ce qui est de l'alimentation animale, le maïs peut apporter jusqu'à 80 % de l'énergie et 40 % de l'azote qui sont nécessaires aux bovins (AGPM, 2009). Il est utilisé sous forme de grains (humides et secs) ou de fourrage (GNIS, 2009). Le maïs également entre dans un grand

nombre de transformations en produits alimentaires (amidonnerie, semoulerie, distillerie et huilerie) et en produits synthétiques pour les industries chimiques, pharmaceutiques, cosmétiques et textiles (Brink et Belay, 2006).

Enfin, le maïs sert aussi à fabriquer des agro carburants et peut entrer dans la composition d'une essence moins polluante, en relevant l'indice d'octane des essences, en remplacement du plomb. L'oxygène qu'il contient favorise la combustion des hydrocarbures et contribue à réduire la production de monoxyde de carbone (AGPM, 2009).

2.1.2.2. Superficies et productions

Après le blé et le riz, la culture du maïs est la plus importante pour l'alimentation, directe ou indirecte, de l'homme. Selon la base de données de la FAO (FAOSTAT, 2009), la production mondiale du maïs en 2007 était de 791,7 Mt avec en tête des pays producteurs les Etats-Unis (331 Mt, 41,8% de la production mondiale) suivis de la Chine (19% ,151 Mt), le Brésil (6,5 %,52 Mt), le Mexique (2,9 % ,23 Mt), l'Argentine (2,6 %,21 Mt), l'Inde (2,2 %, 18 Mt) et la France (1,7% ,14 Mt). Ces 7 pays concentrent 76,7 % de la production mondiale.

Depuis les années 90, la production des pays industrialisés tend à stagner alors que les pays en développement, en particulier ceux d'Asie, enregistrent une progression rapide de leur production. La Chine est le 2^e producteur mondial et l'Indonésie et les Philippines connaissent une croissance annuelle de leur production supérieure à 4%. En Amérique latine et en Afrique, la tendance est également à la croissance (CMA / AOC, 2005).

2.1.2.3. Commerce du maïs

Selon les statistiques, parmi le volume annuel moyen de 75 millions de tonnes de maïs exporté à travers le monde, 60% environ sont américains (46 millions de tonnes), suivie par l'Argentine avec 11 millions de tonnes, la Chine avec 10 millions tonnes et le Brésil avec 4 millions de tonnes (FAOSTAT, 2009). Concernant les importations, le Japon occupe la première place pour 22% des importations mondiales, soit 17 Mt. Il est suivi de la Corée du Sud (12%, 9 Mt) et le Taiwan (6%, 5 Mt). La Malaisie, l'Indonésie et l'Arabie Saoudite sont aussi de gros importateurs. Au total, l'Asie importe 35 millions de tonnes, le continent américain 18 millions et l'Afrique 11 millions, avec comme importateurs importants l'Egypte, L'Algérie et l'Afrique du Sud (CMA / AOC, 2005).

2.1.3. Situation en Algérie

2.1.3.1. Productivité et zones de production

La culture du maïs est pratiquée en Algérie, probablement depuis son introduction au 15^e siècle à partir d'Espagne (Laumont et Laby, 1950). Sa culture est marginale car considérée comme trop exigeante avec beaucoup de soins et d'entretien (Saidani, 1977). Les superficies auraient été de 53000 hectares pour atteindre moins de 10000 hectares durant la colonisation (Laumont, 1951).

A partir de l'indépendance, la culture a connu une régression sensible pour arriver à près de 1000 hectares en 2007. Par ailleurs, des fluctuations sont observées. Entre 1998 et 2007, la production a sensiblement augmenté pour diminuer à partir de 2007 et les rendements les plus importants ont été obtenus durant l'année 2006 avec plus de 65 Q/ha pour 374 hectares cultivés. Les rendements les plus faibles sont observés en 2007 avec 10 Q/ha pour une superficie cultivée de 1000 hectares (FAOSTAT, 2009).

Tableau 1. Evolution des superficies, productions et rendements du maïs en Algérie

Année	Superficie (Ha)	Production (tonne)	Rendement (Q/Ha)
1998	180	310	17,2
1999	240	537	22,4
2000	430	1556	36,2
2001	400	1087	17,2
2002	250	837	33,5
2003	340	981	28,9
2004	210	679	31,8
2005	339	1148	33,9
2006	374	2456	65,7
2007	1000	1000	10,0

Source FAOSTAT, 2009

Les zones de production du maïs sont relativement dispersées et limitées. Sa culture reste cantonnée dans les périmètres irrigués, mais aussi dans certaines plaines littorales à bonne pluviométrie. En 1975, la répartition régionale de la culture était la suivante : Blida (Mitidja), El Asnam (périmètre du Chélif), Annaba, Alger, Tlemcen, Médéa, Guelma, Skikda et Jijel. Le reste est disséminé entre toutes les wilayas du pays en de petites surfaces variant de 20 à 60 hectares, réparties en plusieurs localisations et parcelles. Souvent cette culture ne représente que la superficie réalisée comme brise-vents dans les parcelles de maraîchage (Benzaghrou, 1976).

2.1.3.2. Les importations du maïs

Les importations de maïs sont principalement sous forme de grain, dont une partie est destinée pour la semence. La plus grande part est destinée à l'alimentation animale ou l'industrie agroalimentaire. Durant la période 1999 à 2004, l'importation du maïs grain a dépassé un million de tonnes, pour atteindre 2 millions entre 2004 et 2008 (Tableau 2).

Tableau 2. Evolution des importations du maïs en Algérie de 1998 à 2008

	Maïs en grain (Kg)		Maïs doux (Kg)	Farine (Kg)	Amidon (Kg)
	Semence	Autres			
1998	/	956327615,7	183382,96	245,00	1401041,00
1999	71320,00	273099299900	102005,00	123039,00	6091297,00
2000	8076,60	1481972860,00	389941,52	356630,00	3577727,00
2001	105248,21	1678617017,00	471818,80	348810,00	3817393,00
2002	29919,11	1901648529,72	853023,40	509549,00	5659430,00
2003	23024,00	1544186631,20	756580,00	555955,00	5042335,00
2004	28195,00	1790320449,80	1131772,02	23315,00	8231822,00
2005	22000,00	2452032338,00	988603,71	5610,00	9236461,00
2006	63372,00	2194097675,00	1468487,31	20250,00	7697099,40
2007	40001,00	2282845280,00	1905957,00	595299,00	13766320,00
2008	/	2199317724,00	2152181,00	734794,00	17087679,00

Source CNIS, 2009

Les importations de maïs grain peuvent s'expliquer par la demande en matières première pour l'alimentation animale car le maïs et le soja occupent les 90% de la ration distribuée aux espèces aviaires (Ouachem, 2006). Les importations concernent également le maïs conditionné. Entre 1998 et 2008, une nette progression des importations du maïs doux a été constatée, passant de 183 tonnes en 1998 à 2152 tonnes en 2008. D'autres formes de maïs sont également importées comme la farine et l'amidon dont l'importation est en nette augmentation, passant de 245 Kg de farine et 1401 tonnes d'amidon en 1998 à 734 et 17087 tonnes, respectivement, en 2008 (Tableau 2). D'une manière générale, les importations de maïs, toutes formes confondues augmentent malgré la hausse des coûts sur le marché mondial. En effet, la valeur des importations de maïs a augmenté de 298,35 millions USD en 2004 à 625,8 millions USD en 2008. Les fournisseurs de l'Algérie sont l'Argentine avec 65% des importations, suivi des Etats-Unis 25%, le Canada 6% et la France avec 3% (ALGEX, 2008).

2.2. Les plantes génétiquement modifiées

2.2.1. État mondial des plantes génétiquement modifiées

2.2.1.1. Superficies cultivées

En 2008, la superficie mondiale des plantes génétiquement modifiées (GM) a atteint des superficies de 125 millions d'hectares. Plus de 25 pays en cultivent cependant, la majorité des superficies (91,6%) sont essentiellement réparties dans 5 pays : USA (62,5 millions d'hectares), Argentine (21 millions), Brésil (15,8 millions), Inde (7,6 millions), Canada (7,6 millions). Dans une moindre mesure mais en croissance, sont retrouvés des pays comme la Chine (3,8 millions), le Paraguay (2,7 millions) et l'Afrique du Sud (1,8 million). Les autres pays cultivent moins d'un million d'hectares (James, 2008).

2.2.1.2. Principales plantes cultivées

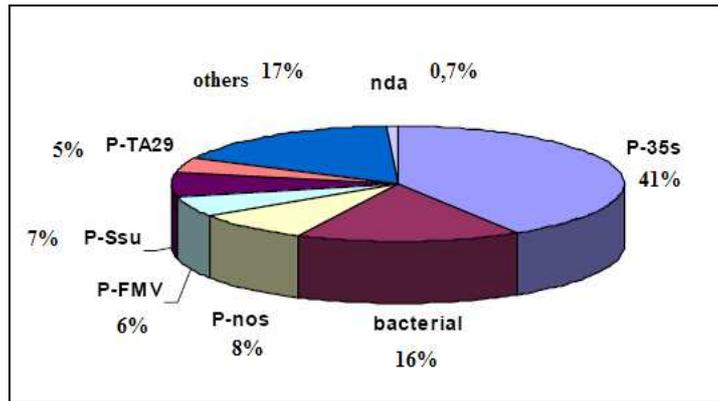
Quatre principales plantes cultivées couvrent 98% des superficies cultivées. Il s'agit du soja GM (65,8 millions d'hectares, 53 % des superficies), du maïs (37,3 millions d'hectares, 28% des superficies), du coton (15,5 millions d'hectares, 12 % des superficies) et du colza (5,9 millions d'hectares, 5% des superficies). Les 2% restants concernent la betterave sucrière, le peuplier, la courgette, la luzerne et la papaye (James, 2008).

Les principaux caractères introduits occupant plus de 98% des superficies toutes cultures confondues sont : la tolérance aux herbicides (63% des superficies, 79 millions d'hectares), la production d'insecticides (15% des superficies, 19,1 millions d'hectares), les deux caractères combinés (21% des superficies, 26,9 millions d'hectares) (James, 2008).

2.2.1.3. Les éléments génétiques utilisés dans les cultures GM

Les séquences d'ADN insérées dans les plantes transgéniques actuellement approuvées sont (Bast, 2003) :

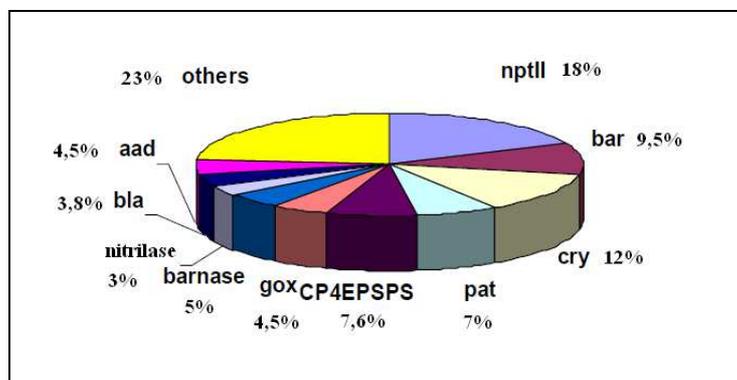
- Promoteurs utilisés : Un des promoteurs les plus utilisés, est celui du 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). Toutefois, des promoteurs spécifiques aux tissus ou induits par les blessures ont également été utilisés (Jouanin et *al.*, 1998) ainsi que des promoteurs de *Nicotiana tabacum* (P-TA29), *Arabidopsis thaliana* (P-Ssu), 35S du virus de la mosaïque de la scrofulaire (P-FMV), *Agrobacterium tumefaciens* (P-nos) (Figure 1).



Source Bast, 2003

Figure 1. Les promoteurs fréquemment utilisés dans les OGM commercialisés

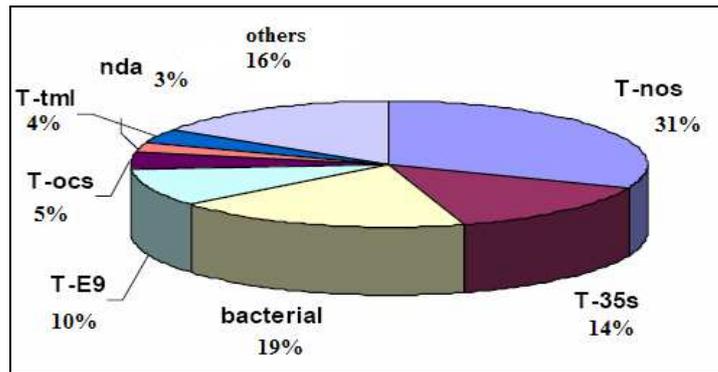
- Gènes utilisés : Plus de 40 gènes différents sont actuellement approuvés. Parmi les plus fréquents : le transgène nptII provenant du transposon 5 d'*E. coli* conférant la résistance à certains antibiotiques appartenant aux aminoglycosides ; les gènes Cry codant pour l'endotoxine δ de *Bacillus thuringiensis* qui se retrouvent dans 51 produits transgéniques (Agbios, 2009) ; les gènes CP4-EPSPS, bar et pat ont également été utilisés, isolés respectivement d'*Agrobacterium tumefaciens* sp. souche CP4, *Streptomyces hygroscopicus* et *Streptomyces viridochromogenes* (Bast, 2003) (Figure 2).



Source Bast, 2003

Figure 2. Les gènes les plus fréquemment utilisés dans les OGM commercialisés

- Termineurs utilisés : La terminaison qui clôt la séquence modifiée est souvent une partie du gène de la nopaline synthase (T-nos) qui provient d'*Agrobacterium tumefaciens* (Roetschi et Deru, 2004). D'autres termineurs sont également utilisés comme les termineurs issus de : *Pisum sativum* (T-E9), *Agrobacterium tumefaciens* (T-ocs, T-tml), virus de la mosaïque du chou-fleur (T-35S) (Figure 3).



Source Bast ,2003

Figure 3. Les terminateurs fréquemment utilisés dans les OGM commercialisés

2.2.2. Le maïs transgénique

Le maïs génétiquement modifié a été cultivé pour la première fois au Etats-Unis (1996) et au Canada (1997). Une décennie plus tard, il a été cultivé dans 13 pays sur un total de plus de 35 millions d'hectares (Hellmich et al, 2008). Il représente 28% de la superficie cultivée en OGM et 24% de la surface cultivée en maïs (James, 2008). Concernant les caractères introduits, la résistance aux herbicides est la plus fréquente (54% des surfaces) suivie de la résistance aux insectes (31%) (James, 2006).

2.2.3. Maïs transgéniques résistants aux insectes

L'obtention de maïs résistant aux insectes fait suite aux attaques importantes de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis*, l'un des principaux insectes ravageurs du maïs causant des pertes de rendements considérables (Feillet, 2009) et étant la cible d'une majeure partie de maïs transgéniques (Dalecky et al, 2007). C'est à partir des connaissances sur la lutte biologique que l'idée est venue de rechercher les gènes responsables de la production d'insecticide par les bactéries, comme notamment *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Belzile, 2002).

2.2.3.1. Caractéristiques de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)

Bacillus thuringiensis Bt est un bacille à Gram positif, aérobic et sporulé, présent pratiquement dans tous les sols. Les cellules végétatives mesurent 5µm de longueur et 1µm de largeur et sont pourvues de courts flagelles cillés. Le Bt est une bactérie ubiquiste qui se rencontre dans le sol, l'eau, l'air et sur le feuillage. Il se distingue du *B. cereus* par sa

capacité de produire une protéine cristallisée durant la sporulation (Höfte et Whiteley, 1989). Le Bt a été isolé pour la première fois en 1901 par le bactériologiste japonais S. Ishiwata à partir de vers à soie (*Bombyx mori* L.) infectés. En 1911, en Allemagne, E. Berliner a rédigé la première description scientifique de la bactérie. En 1916, Aoki et Chigasaki ont montré que l'activité du Bt était due à une toxine présente dans les cultures sporulées, mais absente dans les jeunes cultures végétatives (Beegle et Yamamoto, 1992).

2.2.3.2. Les δ -endotoxines de Bt

Le Bt produit un corps d'inclusion parasporal de nature cristalline durant sa sporulation. Ce cristal est constitué d'un ou de plusieurs types de protéines. Ces protéines cristallisées insecticides sont communément désignées « **Crystal protéin** » et les gènes codant leur synthèse « gène Cry » (De Maagd et al, 1999). Ces protéines sont hautement insecticides à de très faibles concentrations et permettent le contrôle de certaines espèces d'insectes appartenant aux ordres des Lépidoptères, Diptères et des Coléoptères (Schnepf, 1995). En 1989, Höfte et Whiteley ont proposé un système de classification des protéines cristallisées et des gènes codant leur synthèse. Cette classification repose sur la structure des protéines cristallisées et sur la gamme d'hôtes. Les gènes Cry sont répartis dans quatre grandes classes, selon que la spécificité des protéines s'exprime à l'endroit des Lépidoptère (I), des Lépidoptères et des Diptères (II), des Coléoptères (III) ou des Diptères (IV). Chaque classe est divisée en un certain nombre de sous-classes possédant des propriétés insecticides et structurales propres.

2.2.3.3. Mode d'action des protéines Cry

Les protéines cristallisées exercent leurs effets sur l'hôte en lysant les cellules épithéliales de l'intestin moyen et en provoquant la paralysie du tube digestif. L'insecte infecté cesse de se nourrir et finit par mourir s'il ne parvient pas à se rétablir. Une fois ingérés, les cristaux se dissolvent dans l'environnement alcalin de l'intestin moyen de l'hôte. La protéolyse de la protéine cristallisée solubilisée ou protoxine, par les protéases de l'intestin moyen, produit le fragment toxique (toxine). Une fois liée à des récepteurs spécifiques présents sur les membranes des cellules épithéliales, la toxine induit la formation de pores dans la membrane des cellules épithéliales et, ce faisant, provoque la mort des cellules et des larves infectées (Ranjekar et al., 2003 ; Jouanin et al., 1998).

A partir du mode d'action des protéines cristallisées du Bt, on peut supposer qu'au moins quatre paramètres interviennent dans la fonction de la protéine cristallisée : 1) l'efficacité de

la solubilisation ; 2) l'efficacité de la conversion protoxine-toxine ; 3) la liaison aux récepteurs spécifiques des membranes ; 4) la formation des pores membranaires. Tous ces paramètres déterminent la spécificité d'une protéine cristalline (spectre insecticide) (Joung et Coté, 2000). Les différences dans l'étendue de solubilisation expliquent parfois les différences dans le degré de toxicité des protéines Cry (Schnepf et *al.*, 1998).

2.2.3.4. Les lignées de maïs Bt transgéniques commercialisées

Depuis la commercialisation des premiers cultivars de maïs Bt en 1995 jusqu'à maintenant, un total de 34 événements de transformation commercialisés contenant les transgènes Bt ont été mis au point par les compagnies de biotechnologie ; à savoir : Bayer CropScience, Syngenta, Aventis CropScience, Dow AgroSciences, Pioneer et Monsanto avec une large dominance (Annexe 1). Les transgènes Bt utilisés pour le développement de ces événements de transformation dérivent de neuf gènes Bt : [Cry1Ab, Cry1Ac et Cry2Ab] de Bt. subsp.kurstaki ; [Cry 9C] de Bt. subsp.tolworthi ; [Cry1F] de Bt. var aizawai ; [Cry34Ab1 et Cry35Ab1] du Bt souche Ps 149B1 ; [Cry3Bb1] du Bt. kumamotoensis et [Cry3A] de *Bacillus thuringiensis* subsp. tenebrioni (Agbios, 2009).

Le gène Cry1Ab est le plus fréquemment utilisé et se retrouve dans 16 événements de transformation. Le gène Cry9C et Cry1Ac ont été utilisés pour créer respectivement le CBH-351 (StarLink) et le DBT-418 (Bt XtraTM). Depuis 2003, des variétés dirigées contre la chrysomèle du maïs ont été commercialisées, utilisant soit le gène Cry3Bb seul ou le couple de gènes Cry34Ab1 et Cry35Ab1 (Andow, 2008). Le gène Cry3Bb a été exploité par Monsanto pour mettre au point l'événement Mon863, Mon88017 et trois hybrides résultant du croisement de ces derniers avec d'autres lignées de maïs transgéniques (Agbios, 2009). Pour augmenter l'efficacité de la protection contre la chrysomèle, les entreprises Pioneer et Dow ont mis au point le maïs transgénique DAS-59122-7 produisant les deux toxines Cry34Ab1 et Cry35Ab1 (Bourguet et *al.*, 2002). La toxicité de ces deux protéines ne s'exprime qu'en présence des deux protéines en même temps. Ni l'une ni l'autre protéine n'est toxique à elle seule (Andow, 2008). Les gènes Cry1F et Cry2A ont été utilisés pour conférer la résistance aux insectes Lépidoptères (Agbios, 2009).

2.2.3.5. Le statut réglementaire des lignées de maïs Bt

Les premières autorisations de mise en culture des maïs Bt datent de 1995 aux Etats-Unis, et 1997 à l'union européenne et en Afrique du sud. 14 lignées transgéniques contenant le transgène Bt sont autorisées à l'alimentation humaine et animale et aux cultures aux Etats-

Unis. 10 lignées sont autorisées par l'union européenne avec 2 événements de transformation (Mon810 et Event 176) pour l'agriculture et l'alimentation humaine et animale, 7 lignées destinées à l'alimentation humaine et animale et en dernier une seule lignée (Mon 863×Mon 810) autorisée à l'alimentation animale (Annexe 2). En outre, en Afrique du sud, en Chine, en Argentine, au Canada, au Philippines, au Taiwan, en Corée et au Mexique (le centre d'origine du maïs), des lignées ont été approuvées et commercialisées. Au Japon, toutes les lignées de maïs Bt sont autorisées à l'exception du maïs StarLink. Ce dernier n'est autorisé qu'à l'alimentation animale aux Etats-Unis et a été interdit à la consommation humaine car la protéine Cry9C qu'il synthétise résiste à la dégradation dans les jus gastriques et à la chaleur, propriétés susceptibles de provoquer des allergies (Noisette, 2001).

2.2.3.6. Méthode de développement de certaines lignées Bt

Cas du maïs Bt-176.

Cette lignée a été transformée par la technique de l'ADN recombinant et par bombardement d'embryons au moyen de microprojectiles à partir de *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki*, active contre certaines espèces de lépidoptères, dont la pyrale du maïs. Il est composé de deux gènes chimères Cry1Ab synthétiques. L'un est lié au promoteur de transcription de la phosphoenolpyruvate carboxylase du maïs (P-PEPC), assurant son expression dans les tissus verts (Matsuoka et *al.*, 2000) (Figure 4). Le second est lié au promoteur d'une protéine kinase du maïs dépendante du calcium (P-CDPK), assurant son expression dans le pollen (Figure 5) (Matsuoka et *al.*, 2000). Ces deux chimères se terminent par un terminateur du virus de la mosaïque du chou-fleur (T-CaMV 35S) et comprennent également un intron 9 du gène phosphoenolpyruvate carboxylase du maïs (Querci et Mazzara ,2006).

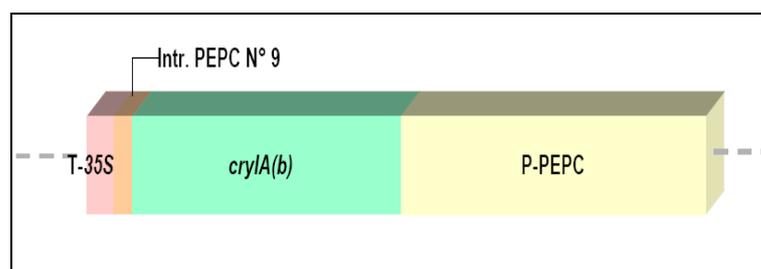


Figure 4. Schéma du gène Cry1Ab sous le contrôle du promoteur PEPC

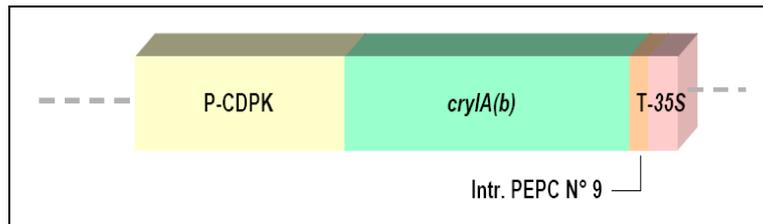


Figure 5. Schéma du gène synthétique Cry1Ab sous le contrôle du promoteur CDPK

Le gène de tolérance au glufosinate-ammonium (*bar*) a été co-introduit en tant que marqueur de sélection afin que les embryons transformés puissent être identifiés en milieu sélectif et que les gènes introduits puissent être suivis durant la sélection des plantes.

Selon un rapport de l'organisme Food Standards Australia New Zealand (2000), les données moléculaires ont révélé que la lignée Bt-176 contient une copie du gène *bar*, sous le contrôle de transcription du promoteur 35S et du terminateur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (respectivement P-CaMV 35S et T-CaMV 35S) (Matsuoka et al., 2000) (Figure 6).

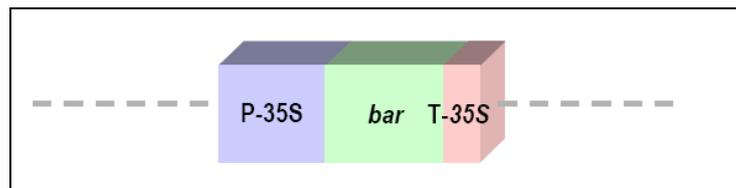


Figure 6. Représentation schématique du gène *bar*

Les deux gènes chimères synthétiques Cry1Ab ont été insérés par clonage dans un même vecteur plasmidique (pCIB 4431). Un second vecteur plasmidique (pCIB 3064) renfermait le gène *bar* conférant la tolérance au glufosinate-ammonium, isolé de la bactérie terricole *Streptomyces hygroscopicus*. Ces deux vecteurs ont ensuite été introduits dans la lignée de maïs consanguine CG00526 (*Zea mays* L.) par bombardement d'embryons immatures au moyen de microprojectiles. Des analyses moléculaires de la plante transformée ont révélé qu'au moins deux copies de chaque construction plasmidique ont pu s'insérer dans le génome de la lignée de maïs (Querci et Mazzara, 2006).

Cas du maïs MON 810.

Cette lignée a été mise au point par la technique de l'ADN recombinant et en bombardant les cellules végétales de microprojectiles avec une copie du gène Cry 1Ab sous le contrôle du puissant promoteur constitutif 35S amélioré du virus de la mosaïque du chou-fleur, et la séquence de tête de l'intron hsp70 du maïs (Figure 7) (Bast, 2003). Elle résulte du génotype

Hi-II du maïs à la suite d'une transformation biolistique avec un mélange d'ADN plasmidique : le plasmide PV-ZMBK07 porteur du gène Cry1Ab et le plasmide PV-ZMGT10 porteur des gènes EPSPS-CP4 et *gox*. Les deux plasmides étaient également porteurs du gène *nptII* (pour la sélection bactérienne) sous le contrôle d'un promoteur bactérien, et d'une origine de répllication d'un plasmide pUC (*ori-pUC*) nécessaire pour la répllication des plasmides dans *E. coli* (Querci et Mazzara ,2006).

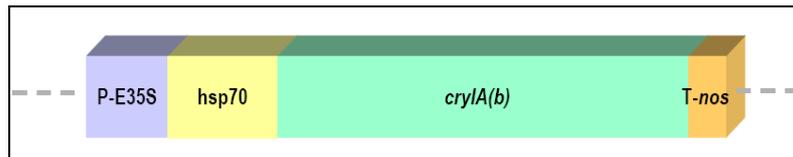


Figure 7. Schéma du gène chimère Cry 1Ab du plasmide PV-ZMBK07, y compris le promoteur 35S amélioré, l'intron hsp70 du maïs et le terminateur nos

Les deux vecteurs ont été introduits dans les cellules végétales cultivées par bombardement de microprojectiles. Les cellules ayant ainsi acquis une tolérance au glyphosate ont été sélectionnées puis cultivées dans un milieu de culture cellulaire en vue de la régénération du végétal (Armstrong et *al.*, 1991).

Des analyses moléculaires fournis par les auteurs indiquent que seuls les éléments du gène chimère PV-ZMBK07 ont été intégrés dans le génome de la lignée MON 810 en tant qu'insert unique, comprenant le promoteur 35S amélioré du virus de la mosaïque du chou-fleur, la séquence de tête de la hsp70 et le gène tronqué Cry1Ab (Querci et Mazzara ,2006). Le signal de terminaison nos, présent dans le plasmide PV-ZMBK07, est perdu suite à une troncature 3' de la cassette génique et sa non intégration dans le génome hôte (Bast, 2003).

Cas du maïs StarLink (CBH-351)

La lignée de maïs CBH-351, non commerciale StarLink, a été génétiquement modifiée pour résister aux attaques de la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*). Ces nouvelles plantes contiennent le gène Cry9C de *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi* souche BTS02618A. Cette lignée est également modifiée pour exprimer le gène *bar* cloné à partir de la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* codant pour l'enzyme phosphinothricine-N-acétyltransférase (PAT), marqueur de choix permettant l'identification des cellules végétales transformées. Elle a été produite par transformation biolistique de la lignée de maïs hybride backcrossed (PA91 x H99) x H99 avec deux plasmides, pRSVA9909 et pDE110. Le premier plasmide

porte le gène modifié Cry9C et le second porteur du gène bar (Figures 8 et 9) (Bast, 2003). L'expression du gène Cry9C est régulée par le promoteur et le terminateur 35S du CaMV, celle du gène bar est également contrôlée par le promoteur 35S du CaMV et le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens* (Agbios, 2009).

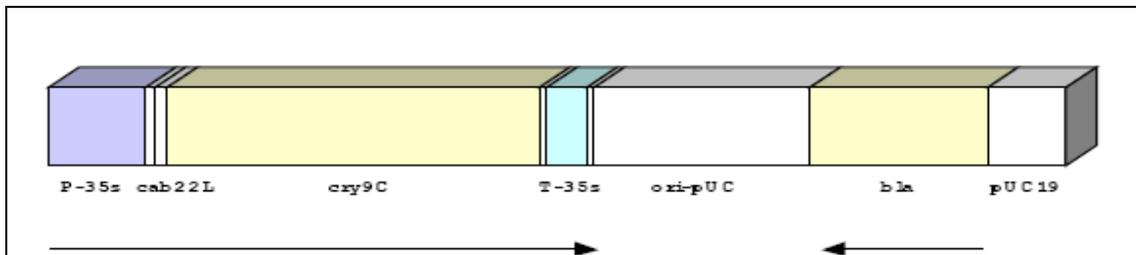


Figure 8. Schéma de la construction pRSVA9909 pour la transformation du CBH-351

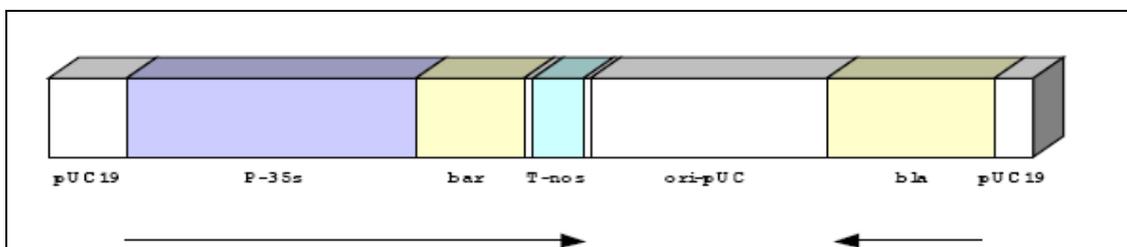


Figure 9. Schéma de la construction pDE110 pour la transformation du CBH-351

2.2.4. Maïs transgéniques résistants aux herbicides

La résistance aux herbicides est la capacité d'une plante à survivre et se reproduire après exposition à une dose d'herbicide qu'elle ne tolère pas normalement. Chez les plantes, la résistance se produit naturellement en réponse à une pression de sélection ou peut être introduite par les techniques du génie génétique (Prather et *al.*, 2000). La majorité des plantes ont été modifiées pour tolérer le glyphosate et le glufosinate (Zimny et E. de Vries, 2005) par l'introduction d'une forme insensible de la cible de l'herbicide ou par l'introduction d'enzymes de métabolisation de l'herbicide (Scalla, 1998).

2.2.4.1. Cas du maïs résistant au glyphosate (RR)

Le glyphosate, N-(phosphonomehyl) glycine, sous forme de sel d'isopropylamide dans le «Roundup», est un herbicide total, à large spectre d'action, pénétrant dans les végétaux par les feuilles, puis transporté de manière systémique dans la plante jusqu'aux racines (Delabays et Bohren, 2007). Cet herbicide agit comme un inhibiteur de la 5-enolpyruvyl-

shikimate-3-phosphate-synthase (EPSPS), enzyme qui catalyse la biosynthèse des acides aminés aromatiques (Funke et *al.*, 2006). La perturbation de cette voie affecte la synthèse des protéines et celle de nombreux composants cellulaires tels que les auxines, les flavonoïdes, les anthocyanines et les quinones (Heck et *al.*, 2005).

Des travaux ont permis d'identifier des enzymes EPSPS insensibles au glyphosate pour développer des cultures résistantes à cet herbicide. La 1^e modification génétique aboutissant à une tolérance est réalisée sur le tabac en 1998 (Zimny et E. de Vries, 2005). Plusieurs microorganismes tolérant le glyphosate sont identifiés dont *Agrobacterium sp* souche CP4, *Achromobacter sp* souche LBAA et *Pseudomonas sp* souche PG 2982 (Barry et *al.*, 1992). Les enzymes de ces bactéries isolées ont été désignées comme des EPSPS de classe II en se basant sur leur efficacité catalytique en présence du glyphosate et la variabilité de leurs séquences en comparaison avec l'EPSPS des plantes (Barry et *al.*, 1997).

La création des plantes tolérantes au glyphosate repose d'abord sur l'introduction d'une forme résistante de l'enzyme cible, dénommée CP4-EPSPS en raison de la souche d'*Agrobacterium* dont elle provient. Elle est peu sensible au glyphosate et possède une bonne efficacité enzymatique (Scalla, 1997). Cependant, les plantes transformées ne possèdent pas la capacité à métaboliser le glyphosate. Leur croissance quand elles sont traitées au glyphosate est ralentie probablement en raison de l'accumulation du glyphosate dans les méristèmes (Kishore et *al.*, 1992). Deux gènes associés sont nécessaires : un gène de sensibilité moindre au glyphosate, accompagné d'un adressage au chloroplaste, et un gène de détoxification qui dégrade le glyphosate (Aigle et *al.*, 1996). Ce type de gène est recherché dans les microorganismes car le glyphosate est dégradé dans le sol par voie microbienne, et des bactéries utilisent le glyphosate comme seule source de phosphore (Scalla, 1997 ; Zablotowicz et Reddy, 2004). Le gène du glyphosate oxydoréductase (GOX), isolé à partir de la souche LBr de *Pseudomonas sp*, a été employé avec le gène EPSPS (Mulwa et Muwanza, 2006). Tous les cultivars contenant le gène EPSPS accompagné ou non du gène GOX forment le système des cultures dites *Round up Ready* (RR).

2.2.4.2. Lignées de maïs transgéniques RR commercialisées

A l'heure actuelle, 20 lignées de maïs transgéniques RR contenant le gène EPSPS ont été mises au point et commercialisées dans les différents pays (Annexe 3). Les trois événements de transformation GA21, MON 832 et NK603 sont des lignées à caractère simple conférant la résistance au glyphosate. Les autres événements de transformation sont des hybrides à deux caractères résultant d'un croisement conventionnel entre le GA21, MON

832 et NK603 avec d'autres lignées transgéniques contenant les transgènes Bt. Ces hybrides sont tolérants au glyphosate et résistants aux insectes. Ce sont principalement, le GA 21 et NK 603, qui ont le plus grand nombre d'autorisations (Agbios, 2009).

2.2.4.3. Méthode de développement de la lignée RR GA21

GA21 est un maïs Roundup Ready, tolérant au glyphosate, désherbant systémique utilisé dans le monde entier en tant qu'herbicide total. Un fragment linéaire NotI du plasmide pDPG434 a été utilisé pour la transformation. Il porte une copie du gène EPSPS isolé à partir du maïs puis modifié par mutagenèse *in vitro* afin de rendre cette enzyme insensible à l'inactivation par le glyphosate. L'expression de ce gène EPSPS modifié est contrôlée en partie par le promoteur actine du riz et le terminateur T-nos du gène de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*. Une séquence d'ADN d'origine végétale codant un peptide de transit chloroplastique (OTP) a été fusionnée avec le gène EPSPS modifié (Figure 10) (Bast, 2003). Elle dérive du gène ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase (RuBisCo) isolé à partir du maïs et du tournesol. Ce peptide signal, associé au gène EPSPS modifié, facilite l'importation de la protéine nouvellement traduite dans les chloroplastes (Agbios, 2009).

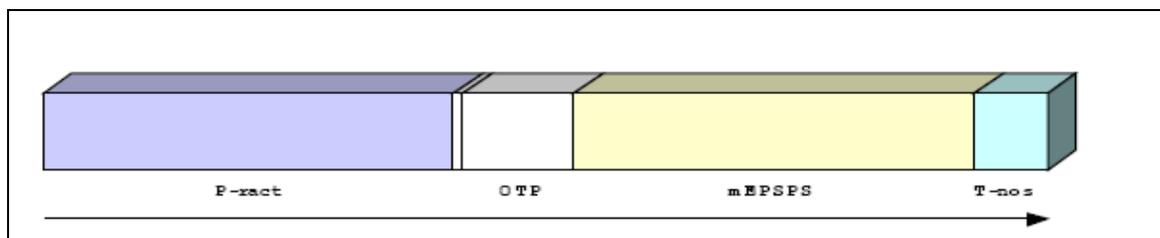


Figure 10. Représentation schématique du fragment NotI du plasmide pDPG434

Les analyses moléculaires des plantes transformées montrent que le génome du maïs GA21 contient un insert d'ADN. Cet insert est constitué de deux copies complètes de la cassette du gène EPSPS modifié et une troisième copie, sans terminateur nos (Bast, 2003).

2.3. Evaluation des risques liées aux OGM

2.3.1. Les risques liés à l'utilisation du maïs GM

De manière générale les risques liés aux OGM sont principalement de deux ordres. Des risques sanitaires liés aux dangers d'allergie ou de toxicité dues aux nouveaux gènes

introduits dans les organismes , et des risques pour l'environnement qui sont non seulement bien réels, mais aussi difficiles à contrôler (Nihoul et Mahieu 2005). Cela dit, le Protocole de Cartagena sur la biosécurité préconise le principe de précaution et met en place des procédures d'évaluation des risques basés sur des méthodes scientifiques avérées de contrôle et intègre les considérations socio-économiques.

2.3.1.1. Aspects environnementaux

Impacts sur les espèces non cibles

La spécificité d'action des toxines insecticides synthétisées par les plantes Bt s'est révélée très relative (Rosi-Marshall et al., 2007) car ces plantes produisent directement les toxines sous forme solubles et actives ce qui provoque un élargissement du spectre d'activité des toxines Bt (Ceballos, 2008). De nombreux exemples illustrent l'impact sur les espèces non cibles comme pour :

- Le papillon monarque (Hansen et Obrycki, 2000 ; Losy et al., 1999 ; Zangerl et al., 2001), où une exposition prolongée du papillon au maïs Bt affectait son comportement (Prasifka et al., 2007) et sa survie (Dively et al., 2004).
- Les Lépidoptères non cibles vis-à-vis des plantes exprimant la toxine Cry1Ab (Felke et al., 2002 ; Stanley-Horn et al., 2001).
- Les insectes prédateurs vis-à-vis des plantes Bt (Dutton et al., 2002; Hilbeck et al., 1998 ; Prütz et Dettner ,2004 ; Bernal et al.,2002). Cet impact serait lié à une mauvaise santé des proies herbivores causée par l'ingestion de protéines Cry et à une baisse de leur qualité nutritionnelle (Michaud, 2005).
- Les organismes du sol soumis aux protéines recombinantes, excrétées dans le sol par les exsudats racinaires (Borisjuk et al., 1999; Saxena et Stotzky 2001; Saxena et al., 1999 ; 2002) ou libérées des tissus de la plante en décomposition (Saxena et Stotzky 2001). Ces effets portent sur des bactéries et des champignons (Cataldini et al., 2005 ; Icoz et Stotzky ,2008), des nématodes (Manachini et al., 2004; Griffiths et al., 2005), des protozoaires et une microfaune active (Kowalchuk et al., 2003; O'Callaghan et al., 2005).

Evolution de résistances aux toxines Bt

Il est aujourd'hui établi que l'usage généralisé d'un produit phytosanitaire, risque d'entraîner des phénomènes de résistance (Pimentel et Burgess, 1985). Choisir des cultivars Bt s'apparente à un traitement préventif systématique puisque cette décision intervient en début de saison, à un moment où l'abondance des ravageurs n'est pas encore connue. Les toxines

produites par les plantes Bt le sont ensuite de manière constitutive : les insectes y sont exposés tout au long de la saison. Dans les zones géographiques où ces plantes Bt sont massivement mises en culture, le risque d'évolution de résistances aux toxines de Bt est donc particulièrement élevé (Dalecky et al., 2007). Ainsi, des résistances aux toxines de Bt ont pu être sélectionnées en laboratoire chez plus de 17 espèces d'insectes (Huang et al., 1999 ; Tabashnik et al., 2003) ainsi que pour un lépidoptère ravageur du maïs, *Heliothis virescens*, vis-à-vis des toxines Cry1 (Gould et al., 1995). Le seul exemple à ce jour connu en champ est la teigne des crucifères *Plutella xylostella* (Ferré et Van Rie, 2002).

Afin de limiter la sélection d'allèles de résistance, la stratégie Haute-Dose/ Refuge (HDR), consiste à planter des parcelles de plantes non transgéniques, appelées refuges, à proximité des parcelles de plantes Bt (Gould, 1998). Elles permettent le maintien d'un pool d'insectes sensibles qui vont se croiser avec les individus résistants se développant sur les plantes Bt (Bourguet, 2006). Cette stratégie reste coûteuse et contraignante (Dalecky et al., 2007) et son efficacité dépend de la résistance qui doit être récessive (Bourguet et al., 2000). Si la résistance est dominante, la stratégie refuge ne jouerait plus son rôle et si elle est additive, son efficacité serait réduite (Gallais et Ricoch, 2006).

Dissémination des transgènes par pollinisation croisée

La contamination post-récolte des semences et le transfert de matériel génétique par hybridation d'une culture agricole à l'autre sont des phénomènes courants (Beckie et al., 2003 ; Dorey, 2000 ; Friesen et al., 2003). Ces échanges ont soulevé beaucoup de questions dans le cas des cultures transgéniques notamment sur la coexistence des différents modes de production agricole et le maintien d'un niveau de pureté élevé des semences. Le cas le plus connu est la confirmation de la contamination des variétés de maïs mexicain dans son aire d'origine au Mexique par des plantes Bt (Quist et Chapela, 2001).

Transferts géniques horizontaux

Plusieurs études ont été menées pour évaluer l'incidence des transferts horizontaux impliquant des molécules d'ADN recombinant dans le milieu édaphique (Bertolla et Simonet, 1999 ; Gebhard et Smalla, 1998 ; Nielsen et al., 1998 ; Paget et al., 1998 ; Widmer et al., 1997). Un transfert direct de transgènes et gènes marqueurs des plantes GM à des champignons du sol a été observé (Hoffman et al., 1994). D'autres auteurs ont démontré un transfert de transgènes et gènes marqueurs des plantes GM à des bactéries du sol (De Vries et Wackernagel, 1998).

Mutagenèse insertionnelle

Le processus de transgénèse permet l'intégration de nouveaux caractères. Cependant, le lieu d'insertion du transgène demeure le plus souvent aléatoire (Gelvin, 2003) et pourrait influencer l'expression des gènes dans la plante (Masoero *et al.*, 1999; Saxena et Stotsky, 2001; Elmore *et al.*, 2001) et de ce fait une altération des fonctions cellulaires de la plantes ou une modification de la teneur de certains composés organiques pourraient résulter d'un événement de mutagenèse insertionnelle (Michaud, 2005). C'est notamment le cas du maïs Bt 11, Bt 176 et MON810 dont la teneur en lignine était augmentée de 33 à 97% (Saxena et Stotzky, 2001 ; Poerschmann *et al.*, 2005 ; Flores *et al.*, 2005).

2.3.1.2. Aspects sanitaires

Les dangers concernant la sécurité alimentaire des aliments dérivant de plantes génétiquement modifiées pourraient avoir trois origines (Afssa ,2002) :

- Un effet direct du transgène, qui peut synthétiser une protéine induisant des effets toxiques ou allergéniques.
- Des interactions métaboliques qui peuvent faire apparaître, et éventuellement accumuler des métabolites pouvant être toxique (effet indirect des transgènes).
- L'extinction de gènes ou leur expression, pouvant engendrer des effets inattendus avec production de substances toxiques.

Allergénicité

Les aliments d'origine végétale comme animale sont une source importante d'allergènes et de maladies allergiques, il est donc nécessaire d'envisager le risque potentiel allergénique des aliments transgéniques (Moneret –Vautrin, 2002). L'allergénicité des produits GM peuvent être évaluée selon deux plans (Craig *et al.*, 2007) :

- Une évaluation des risques potentiels d'une néo-allergénicité de la protéine transgénique ou d'une allergénicité croisée de cette protéine avec d'autres allergènes ;
- Une évaluation d'une allergénicité intrinsèque de l'organisme hôte qui peut être modifiée par la modification génétique (Prescott et Hogan, 2006) puisque l'insertion du transgène peut donner lieu par effet pléiotropique, c'est-à-dire par interaction avec le fonctionnement d'autres gènes, à la surexpression d'allergènes endogènes de la plante (Wal, 2001).

Un des exemples est le maïs Starlink qui est une variété de maïs jaune modifiée pour produire une protéine transgénique appelée Cry 9C à caractère insecticide. Cette protéine est codée par un gène (Cry 9C) provenant de *Bacillus thuringiensis* (Bt) de la souche tolworthi (Agbios, 2009). Cette variété de maïs transgénique cultivée aux États-Unis était destinée seulement à la consommation animale car elle présente des caractéristiques allergènes à savoir : une plus faible décomposition dans les conditions artificielles de digestion, en comparaison avec la protéine Cry 1A ; une thermorésistante et une repense IgE a été observée dans un modèle animal (Moneret –Vautrin, 2002). Mais cette culture n'a pu être séparée des autres et a été retrouvée dans la consommation humaine, autant sur le marché intérieur des États-Unis, que sur le marché extérieur (Debuissy, 2003).

Toxicité

La plupart des protéines dans le régime alimentaire normal sont ingérées sans aucun effet négatif, mais certaines d'entre elles ont le potentiel d'affecter la santé. Comme les protéines et les peptides ont un large éventail de fonctions dans les organismes, les différents effets possibles des protéines transgéniques doivent être envisagés (Craig et *al.*, 2007).

La toxicité à court terme est relativement simple à établir. Les méthodes toxicologiques classiques, utilisées pour évaluer les pesticides ou les médicaments, s'appliquent aussi à la caractérisation des OGM végétaux. La méthode implique d'abord qu'on identifie et qu'on isole la substance à évaluer. On l'administre ensuite à des rats, en notant les doses qui sont létales à court terme et celles qui le sont après une longue exposition. On vérifie ensuite si la concentration du produit dans la plante est inférieure ou non à ces seuils. Cependant, comme pour plusieurs substances chimiques présentes dans l'alimentation, il n'existe pas de moyens fiables pour prévoir les risques d'apparition d'effets toxiques à long terme.

2.3.1.3. Incertitudes scientifiques

L'intégration du transgène dans le génome de l'hôte est complexe et les risques de cette intégration non maîtrisée, peuvent être définis selon Hilbeck et *al.*, (2006) par :

- La mutation du gène récepteur par insertion du transgène peut perturber sa fonction.
- La juxtaposition du promoteur du transgène dans des gènes adjacents de la plante pouvant modifier l'expression d'un gène.
- Des réarrangements aboutissant à la synthèse de produits de gènes non désirés.
- La répétition des séquences transgéniques pouvant augmenter l'instabilité par recombinaison homologe et la probabilité des réarrangements à l'intérieur du génome.

- L'incorporation du transgène dans un élément transposable lui permettant de se mouvoir indépendamment du génome.

Les transgènes peuvent devenir silencieux ou inactifs au cours de la croissance et du développement de la plante GM par (Ho, Ching, 2003) :

- des mécanismes de défense protégeant l'intégrité de l'organisme, rendant inactif ou silencieux le transgène intégrant le génome.
- l'instabilité structurelle du transgène lui-même et sa tendance à se fragmenter.
- la présence d'endroits privilégiés pour réceptionner et recombinaison le transgène.

Différents effets tels que la suppression, le réarrangement, la répétition, la recombinaison ainsi que l'interaction de gènes ont été observés pour des loci transgéniques (Yin et *al.*, 2004). Dans le même contexte, les observations obtenues montrent, par rapport aux cassettes décrites dans les données publiques, des délétions (MON810, GA21, Bt 176), des recombinaisons (T25, Bt 176) et des répétitions de l'insert ou de l'élément génétique au sein de l'insert ou dispersés dans le génome (T25, GA21, Bt 176) (Collonnier et *al.*, 2003).

L'instabilité des transgènes est une question majeure en matière de sécurité, une variété GM qui a changé son identité depuis sa caractérisation par la société obtentrice, rend non valide tous les tests de sécurité ou toutes les évaluations qui auront pu être faites. Cela peut rendre impossible les tests réalisés pour identifier cette variété GM lors des contrôles ultérieurs, après son lancement et sa distribution et donc toute action de retrait du marché en cas de découverte de dommages non prévus (Ceballos et Kastler, 2004).

2.3.1.4. Considérations socio économiques et éthiques

Le principal argument de vente des plantes Bt réside dans l'attendue réduction des quantités d'insecticides appliquées sur les cultures (Thirtle et *al.*, 2003). De nombreuses études ont montré qu'il existait une rentabilité lorsque l'on utilisait des plantes GM, notamment liée à une réduction des coûts des pesticides comme en Afrique du sud (Gouse et *al.*, 2005), en Espagne (Gomez-Barbero et Rodriguez-Cerezo, 2006 ; Demont et Tollens, 2004), en Argentine (Hopp, 2004) contrairement aux Etats-Unis où l'adoption de la culture du maïs Bt a eu un impact économique négatif (Fernandez-Cornej et Mc Bride, 2000). Ces études ont cependant été réalisées sur une ou deux années de cultures transgéniques et il n'existe pour l'instant pas d'études exhaustives sur les effets à long terme. Par ailleurs, les bénéfices économiques sont difficiles à évaluer dans la mesure où dans les pays en développement, les semences ont été distribuées gratuitement (Gomez-Barbero et Rodriguez-Cerezo, 2006).

Dans le cas du maïs Bt, il faut noter qu'il ne présente évidemment aucun intérêt économique en l'absence d'attaque de pyrale. Avec une attaque faible, l'agriculteur sera perdant par rapport aux cultures conventionnelles. Donc, l'intérêt économique des maïs Bt ne peut apparaître que dans des zones où les attaques de pyrale sont assez fortes et systématiques (Gallais et Ricroch, 2006).

Une des questions éthiques les plus pertinentes réside dans l'appropriation du vivant par les brevets. Le patrimoine génétique, longtemps considéré comme bien commun de l'humanité est devenu en quelques années une ressource brevetable qui tendrait à encourager le pillage des ressources génétiques et à renforcer le risque d'exclusion d'une partie de l'humanité des avantages de la biotechnologie moderne. Les agriculteurs des pays en développement seraient non seulement contraints de renoncer à la culture des variétés traditionnelles au profit des cultures transgéniques, mais aussi d'être dépendants des multinationales qui imposeront leur monopole dans la commercialisation des semences (Ouréye, 2006 ; Graham, 2001 ; Parayil, 2003 ; Charle, 2001). Des analyses ont montré que les brevets dans les pays en développement et en Afrique en particulier sont détenus par des multinationales sans aucune contre partie pour les pays en question (Grain, 2000). A l'heure actuelle, la plupart des plantes transgéniques sont commercialisées par quelques multinationales et 87% du marché de ces plantes est contrôlé par une seule entreprise, Monsanto (Gallais et Ricroch, 2006). Cette main mise fait craindre l'émergence d'oligopoles qui pourrait contrôler le marché des semences et qui s'approprieraient progressivement les ressources génétiques à partir desquelles les variétés végétales seraient développées

De plus, il est possible que les cultivateurs puissent perdre le droit de récupérer les graines de leurs propres variétés, si ces variétés sont contaminées par des gènes brevetés (Amand, 2004). Ainsi, les variétés locales sélectionnées, risqueraient de disparaître impliquant une érosion de la diversité génétique.

2.3.2. Evaluation des risques liés aux OGM

Les OGM sont des organismes réglementés à l'échelle internationale ou nationale. Les cadres réglementaires utilisant le Protocole de Cartagena sur le Biosécurité mettent en jeu le principe de précaution. Ce dernier peut se traduire par une interdiction totale ou partielle, un moratoire ou une étude au cas par cas.

L'application du Protocole repose sur quatre éléments clés : la mise en place d'un système administratif, l'élaboration d'une législation traduisant tous les articles du Protocole, l'organisation des procédures d'évaluation et de gestion des risques et la mise en place des mécanismes de participation du public.

Il faut noter que le Protocole se préoccupe surtout de la dissémination des OVM dans l'environnement et accorde peu d'importance aux produits issus des OVM, comme les produits agroalimentaires, qu'ils soient en vrac ou préemballés ou sous forme de produits transformés manufacturés. A cet effet et s'inspirant des textes réglementaires concernant le *Codex Alimentarius* de la FAO, une politique d'étiquetage peut être mise en œuvre en parallèle de celle relative au Protocole de biosécurité.

Dans tous les cas, évaluation et gestion des risques du protocole ou étiquetage, la connaissance des transgènes reste indispensable pour l'identification et le contrôle de tous les OGM mis sur le marché. Leur détection cible soit le matériel génétique inséré soit la protéine en résultant, le métabolite ou le phénotype, en exploitant leurs caractéristiques et leur traduction.

2.4. Identification et détection des OGM

L'application d'une méthode correcte d'échantillonnage est importante pour la fiabilité du résultat, surtout quand il s'agit d'évaluer la conformité ou non d'un lot en vue de l'accepter ou de le refuser en fonction du risque d'erreur. Lors de la quantification d'un caractère donné, trois sources d'erreur peuvent survenir : le procédé d'échantillonnage, la manipulation de l'échantillon et l'exactitude et la précision de la méthode d'analyse (FAO/OMS, 2004). Minimiser ces types d'erreurs est nécessaire pour garantir une meilleure précision et exactitude du résultat final de l'analyse.

2.4.1. Echantillonnage

Pour toutes les méthodes d'échantillonnage, il est important que les échantillons prélevés présentent collectivement les mêmes caractéristiques du lot dont ils proviennent. Un échantillon représentatif est défini comme un échantillon sélectionné en utilisant une

méthode d'échantillonnage simple et aléatoire, celle-ci implique que chaque masse du lot a la même chance de figurer dans l'échantillon (Remund et *al.*, 2001).

2.4.1.1. Plan d'échantillonnage

C'est un ensemble de règles selon lesquelles un lot doit être contrôlé et évalué et comprend la démarche à suivre pour choisir, prélever, séparer des échantillons à partir d'un lot, en vue d'obtenir l'information recherchée de façon qu'une décision sur le lot puisse être prise. La plupart des procédures supposent le choix d'un échantillon (ou de plusieurs) dans un lot, son contrôle et la décision concernant le lot selon le résultat obtenu. La définition précise d'une procédure d'échantillonnage en vue d'acceptation nécessite la sélection de critères comme le caractère à mesurer, la taille du lot, un plan par attributs ou par mesures, le niveau de qualité limite (QL) pour des lots isolés ou le niveau de qualité acceptable (NQA) pour une série continue de lots, le niveau de contrôle, la taille de l'échantillon, les critères en vue d'acceptation ou de rejet du lot et les procédures à adopter en cas de litige

Dans l'estimation d'un paramètre, l'erreur d'échantillonnage –partie de l'erreur totale- est due à tout ou partie des paramètres tels que l'hétérogénéité des caractères contrôlés, la nature aléatoire d'un échantillonnage, les caractéristiques connues et acceptables des plans d'échantillonnage

2.4.1.2. Hétérogénéité des caractères contrôlés

L'échantillon à analyser peut être homogène ou hétérogène pour le caractère à analyser. Si l'échantillon est un mélange de particules GM et non GM, on dira qu'il est hétérogène (formé de deux types de particules). Dans un échantillon hétérogène, la distribution des particules GM peut être uniforme ou non. Quand la distribution n'est pas uniforme les particules GM sont groupées en masse compacte dans des zones particulières du lot.

Dans les phases ultérieures de l'échantillonnage, où l'échantillon est réduit en taille, la distribution du matériel GM est souvent considérée uniforme à condition que l'échantillon soit mélangé de façon approfondie. Cependant à travers le processus de broyage des graines ainsi que l'extraction de l'ADN, des changements dans les proportions GM / non GM peuvent être introduites. Cet effet peut être plus profond au cours de l'étape de l'extraction. La distribution des copies d'ADN GM ou non GM dépend de la ploïdie des tissus .En outre il peut y avoir des différences quantitatives et qualitatives entre l'ADN extrait à partir des tissus de réserve comparé à l'ADN extrait des tissus embryonnaires (NCM, 2004).

2.4.1.3. Protocole de l'échantillonnage

Quelques définitions utiles (Kay et Paoletti ,2001) :

- Echantillon primaire : portion prélevée sur un lot au 1^e stade de l'échantillonnage. Il s'agira d'un élément prélevé sur un lot de produits préemballés ou de lot en vrac.
- Echantillon composite : combinaison de tous les échantillons primaires du lot.
- Echantillon de laboratoire : fraction de l'échantillon composite obtenue par échantillonnage aléatoire, testée au laboratoire d'analyse (partie ou totalité).
- Echantillon test : portion de l'échantillon de laboratoire obtenu quand celui est reparti ou réduit en taille pour l'analyse (processus d'extraction).
- Echantillon d'analyse : partie de l'échantillon test qui est entièrement analysée lors de la réaction d'essai.

Selon Kay et Paoletti (2001), l'échantillonnage des produits agricoles non transformés s'articulent sur les étapes suivantes :

- Formation de l'échantillon composite : Il est obtenu en combinant les échantillons primaires prélevés selon les principes décrits pour les graines (normes ISO) et les semences (Règles de l'ISTA). Il doit être formé d'au moins 30 échantillons élémentaires et d'être 20 fois plus large que l'échantillon de laboratoire.
- Formation de l'échantillon de laboratoire : Il est obtenu par le biais d'un échantillonnage aléatoire, en mélangeant tous les échantillons élémentaires suivi de divisions à des portions de plus en plus petites (1/2 ,1/4 ...).
- Formation de l'échantillon test : Après le broyage et l'homogénéisation de l'échantillon de laboratoire, une portion (poudre de l'ordre de 1 g) produira l'échantillon test.
- Formation de l'échantillon d'analyse : Dans le cas d'une PCR, l'obtention de l'ADN de l'échantillon test caractérise l'échantillon d'analyse (Kay et Paoletti, 2001).

Taille de l'échantillon de laboratoire

Si l'échantillon composite est bien mélangé puis divisé correctement, l'échantillon de laboratoire est obtenu par un processus de sélection aléatoire. La taille (nombre de graine) de l'échantillon de laboratoire à analyser peut être déterminée par la limite supérieure en OGM pour chaque quantité (taille) de graines formant l'échantillon à des niveaux de probabilité de 90% , 95% et 99% suivant une distribution binomiale (Tableau 3).

Tableau 3. Détermination de la taille de l'échantillon en utilisant la distribution binomiale

Nombre de graine	Niveau de probabilité		
	90%	95%	99%
100	2,28%	2,95%	4,50%
200	1,14%	1,49%	2,28%
300	0,76%	0,99%	1,52%
400	0,57%	0,75%	1,14%
800	0,29%	0,37%	0,57%
1200	0,19%	0,25%	0,38%
2000	0,12%	0,15%	0,23%
2500	0,09%	0,12%	0,18%
3000	0,08%	0,10%	0,15%
6000	0,04%	0,05%	0,08%
10000	0,02%	0,03%	0,05%

Source, Kay et Paoletti ,2001

Sur le site web USDA GIPSA, une théorie de l'échantillonnage est discutée pour la détection des graines biotechnologiques, suggérant que pour la détection de 0,1-5% d'échantillon biotechnologique, les tailles des échantillons de laboratoire doivent être comprises entre 881 et 18 g pour une probabilité de 95% et 27-1354 g pour 99 % (Tableau 4) (GIPSA, 2000).

Tableau 4. La taille des échantillons optimaux

Concentration des graines GM (%)	Nombre de graine		Poids approximatif (g)	
	95%	99%	95%	99%
0,1	2995	4603	881	1354
0,5	598	919	176	271
1,0	299	459	88	135
2,0	149	228	44	68
3,0	99	152	30	45
4,0	74	113	22	34
5,0	59	90	18	27

Pour les tests qualitatifs, la taille des échantillons peut être déterminée par une formule relativement simple. Compte tenu de la limite supérieure en OGM et la probabilité de détection, la taille de l'échantillon est calculée avec la formule suivante:

$$N = \log (1-(G/100))/\log (1-(P/100))$$

-N est la taille de l'échantillon (nombre de graine).

-G est la probabilité (en pourcentage) qu'au moins une graine génétiquement modifiée sera présente dans l'échantillon de laboratoire.

-P est le pourcentage de graines génétiquement modifiées dans l'échantillon de laboratoire

Kay et Paoletti (2001) suggèrent que l'échantillonnage doit être réalisé conformément aux norme ISO 13690 (ISO, 1999a) et norme ISO 6644 (ISO, 2002).

ISO 13690 : échantillonnage des lots statiques en vrac des grandes cultures et moutures. Il concerne l'échantillonnage des lots de légumineuses et de produits de monture dont la taille maximale est de 500 tonnes. Le protocole porte sur l'échantillonnage manuel ou mécanique sur des profondeurs allant de 3m à 12m. Chaque échantillon doit être formé d'au moins 3000 graines afin de respecter la limite de détection et de révéler l'hétérogénéité potentielle du lot.

Echantillonnage des sacs : Les échantillons élémentaires sont pris des différentes parties du sac (haut, milieu et bas) à l'aide de lance à sac. Pour le taux d'échantillonnage, il n'existe aucune indication concernant la taille minimale ou maximale des sacs (Tableau 5).

Tableau 5. Détermination du nombre de sac à échantillonner

Nombre de sac dans le lot	Nombre de sac à échantillonner
Jusqu'à 10	Chaque sac
10 à 100	10 choisi au hasard
Plus de 100	Racine carré du nombre totale des sacs

Echantillonnage de wagons sur rail ou route, camions, péniches ou navires. Chaque wagon est échantillonné conformément au schéma présenté en figure 11 présentant le nombre et l'emplacement des échantillons élémentaires à prendre en fonction de la taille du lot.

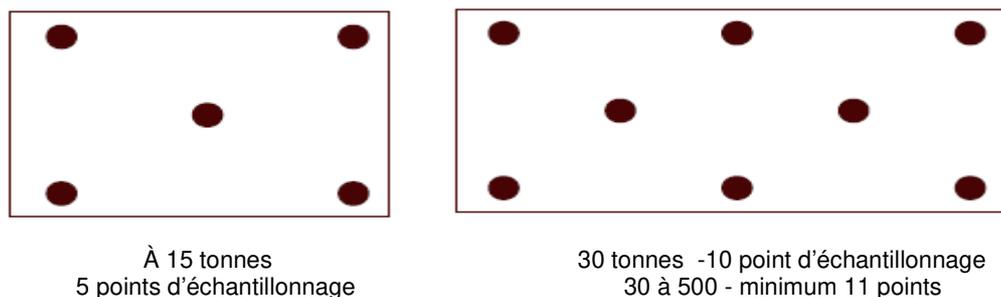


Figure 11. Echantillonnage à partir de wagons, camions, péniches ou navires

Echantillonnage des silos, des entrepôts et des bacs. Les graines sont échantillonnées à l'aide d'un système de grille, et le nombre minimal d'échantillons élémentaires à prélever est déterminé comme suit : la racine carrée du tonnage divisé par 2 et arrondi à l'entier le plus proche.

Dans les trois cas, les échantillons élémentaires sont combinés soigneusement pour former l'échantillon composite. La taille de l'échantillon de laboratoire est déterminée selon le type et l'exigence du test, mais le minimum recommandé est de 1 Kg.

ISO 6644 : échantillonnage des céréales et des produits de moutures en mouvement. Cette méthode est applicable à toutes les profondeurs de masse des céréales et des produits de moutures céréaliers. Un appareil d'échantillonnage mécanique est utilisé pour prélever l'échantillon élémentaire ou une série, à partir d'un lot de façon continue, intermittente et à maintes reprises. Le dispositif de prélèvement doit être capable de prendre des échantillons élémentaires de l'ensemble de la section transversale, ou autant que possible. L'ISO 6644 est utilisé pour les lots en vrac dépassant 12 m de profondeur. La taille maximale des lots est de 500 tonnes et celle de l'échantillon élémentaire est de 1kg pour l'échantillonnage discontinu. Une taille maximale de 100 kg, pour l'échantillon composite est recommandée pour un taux d'échantillonnage de 1 échantillon /5 tonnes.

2.4.1.4. Echantillonnage des semences

Les règles de l'ISTA sont recommandées pour l'échantillonnage afin de détecter des semences GM dans des lots conventionnels et de prendre un échantillon de laboratoire d'environ 3000 graines pour un seuil de détection compris entre 0,3 et 0,7 % (NCM, 2004). Ces règles stipulent que la taille maximale des lots de semences à échantillonner est jusqu'à 40 tonnes pour le maïs et 10 tonnes pour le colza. Aucune information sur la taille minimale du lot de semence n'est mentionnée. La fréquence d'échantillonnage varie de 3 échantillons élémentaires par conteneur pour les petits conteneurs (tableau 6), à 1 échantillon par 700g pour les grands conteneurs ou semence en vrac (Tableau 7).

Tableau 6. Exigence d'échantillonnage pour les sacs de semence ou de conteneurs de taille similaire contenant au moins 15 Kg mais pas plus de 100 Kg de semence.

Nombre de conteneurs dans le lot	Le nombre minimal d'échantillon élémentaire à prendre
1-4	3 échantillons élémentaires pour chaque conteneur
5-8	2 échantillons élémentaires pour chaque conteneur
9-15	1 échantillon élémentaire pour chaque conteneur
16-30	15 échantillons élémentaires pour le lot de semence
31-59	20 échantillons élémentaires pour le lot de semence
60 et plus	30 échantillons élémentaires pour le lot de semence

Tableau 7. Exigence d'échantillonnage pour les grands conteneurs ou semence en vrac

Taille du lot	Le nombre minimal d'échantillon élémentaire à prendre
Jusqu' à 500Kg	Au moins 5 échantillons élémentaires
501-3 000 Kg	1 échantillon élémentaire pour chaque 300 Kg mais pas moins de 5
3001-20 000Kg	1 échantillon élémentaire pour chaque 500 Kg mais pas moins de 10
20 001 Kg et plus	1 échantillon élémentaire pour chaque 700 Kg mais pas moins de 40

Lorsque les conteneurs de semences ont une contenance inférieure à 15 Kg de semences, une masse de 100 Kg est prise comme unité de base et les petits conteneurs sont combinés pour former une unité d'échantillonnage ne dépassant pas cette masse. Pour ces unités de base on utilise les procédures d'échantillonnage prescrites dans le tableau 6.

L'instrument utilisé pour l'échantillonnage doit être capable d'atteindre toutes les parties du lot. Les échantillons sont généralement pris à l'aide de lances, et celle-ci vont des petites lances aux grands instruments multi-cloisonnés. Les échantillons élémentaires doivent être à peu près de la même taille. Une fois que tous les échantillons sont prélevés et semblent être uniformes, ils sont combinés pour former l'échantillon composite. Dans le laboratoire, l'échantillon composite est complètement mélangé puis réduit pour former l'échantillon de laboratoire.

2.4.1.5. Echantillonnage des produits alimentaires emballés

Les procédures décrites dans les normes ISO 2859 (ISO, 1999b) sont recommandées pour les produits alimentaires emballés (les cookies par exemple) (Querci *al.*, 2007).

2.4.1.6. Echantillonnage des PGM

L'échantillonnage est fait à partir de plantes aléatoirement distribuées dans toute la récolte et non concentrées dans une partie ou un secteur du champ. Un tracé en W dans le champ doit fournir une diffusion appropriée de l'échantillonnage. Pour les plantes en croissance, une feuille doit être prélevée près du sommet de la plante et être placée dans un sachet en plastique neuf et propre, en utilisant des gants jetables. Il n'est, cependant, pas nécessaire d'employer différents sacs pour différents échantillons de feuilles (Lübeck, non daté). L'assurance que l'échantillon est représentatif dépend de deux facteurs :

- Le plan de prélèvement : l'« échantillon du champ », doit être statistiquement représentatif du plus grand lot de matériel, et de taille suffisante pour permettre l'analyse à la sensibilité désirée.

- L'échantillon analysé en laboratoire : nommé « échantillon analytique » doit être représentatif de l'échantillon du champ soumis à l'analyse.

2.4.2. Méthodes de détection moléculaires

2.4.2.1. Généralités

A l'heure actuelle, la méthode basée sur la détection de l'ADN GM la plus utilisée est la PCR (Polymerase Chain Reaction). Elle consiste à multiplier, par voie enzymatique, le fragment d'ADN recherché. La détection est possible grâce à l'effet amplificateur de la réaction (synthèse de millions de copies du fragment) qui met en évidence le fragment d'ADN recherché, pour autant qu'il soit présent dans l'extrait (Berben *et al.*, 2000). C'est une méthode de laboratoire chère, et demande de la technicité et des conditions de travail rigoureuses. Néanmoins, elle est plus sensible (10 à 100 fois) et plus spécifique que les méthodes basées sur la détection des protéines.

Les principaux éléments qui déterminent le niveau de spécificité de la PCR sont les amorces et plus particulièrement la sélection des éléments auxquels les amorces sont orientées. Par conséquent, la disponibilité d'une information précise et complète est une condition préalable au développement de méthodes spécifiques basées sur la détection de l'ADN (Holst-Jensen *et al.*, 2003). Quatre niveaux de spécificité peuvent être obtenus par la méthode PCR (Figure 12) (Miraglia *et al.*, 2004) :

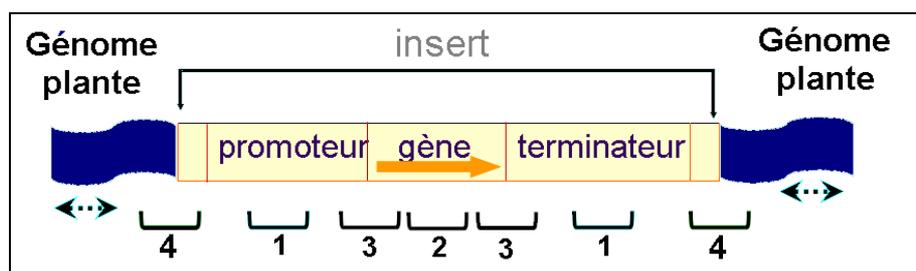


Figure 12. Niveaux de spécificité des amorces pour la détection des OGM par PCR

- 1 : Les méthodes les moins spécifiques sont appelées méthodes de criblage et concernent des éléments d'ADN cibles, tels que les promoteurs et les terminateurs qui sont présents dans de nombreux OGM.
- 2 : concerne les méthodes spécifiques aux gènes qui ciblent une partie de l'ADN du gène actif associé à la modification génétique. Par exemple, le gène Bt ou le gène EPSPS. Ce

niveau permet de fournir des informations sur le caractère de l'OGM mais aucune information sur son autorisation, car le gène détecté peut être utilisé dans plusieurs événements de transformation indépendants.

- 3 : concerne les méthodes spécifiques aux constructions qui ciblent la jonction entre deux éléments d'ADN, tel que le promoteur et le gène actif. Cependant, une même construction génétique peut servir à la transformation de plusieurs espèces et être à l'origine, pour une même espèce, de plusieurs OGM (Ricroch et *al.* 1998), comme c'est le cas du maïs MON 809 et MON 810 ayant été transformés par le même plasmide (Agbios, 2009).
- 4 : la plus haute spécificité est perçue lorsque la cible est la jonction, située au niveau du site d'intégration entre l'ADN inséré et le génome hôte donnant une séquence nucléotidique unique puisque l'intégration de la construction transgénique dans le génome de la plante se fait de façon aléatoire (Thomas et *al.*, 1994 ; Jacobs et *al.*, 1995). Ces méthodes sont spécifiques aux événements de transformation.

2.4.2.2. Criblage et identification

Le criblage et l'identification sont couramment réalisés par la PCR conventionnelle. Pour le criblage, les amorces ciblent les promoteurs et les terminateurs, les plus fréquemment rencontrés étant originaires d'*Agrobacterium tumefaciens* et du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) (Hemmer, 1997). Sur 66 cultures GM analysées, 62 contiennent au moins un élément génétique provenant de ces deux organismes (Basts, 2003). D'un point de vue pratique, les méthodes de criblage sont utilisées pour une réduction rapide du nombre d'échantillons à tester par la détection directe des échantillons négatifs.

Pour l'identification des OGM, les amorces sont spécifiques soit aux gènes, permettant l'identification des caractères introduits ; des constructions ou des événements de transformation (Griffiths et *al.*, 2003).

2.4.2.3. Quantification

Cette étape consiste en la détermination de la quantité exacte des OGM présents dans l'échantillon et l'évaluation de la conformité au niveau d'un certain seuil. Plusieurs facteurs, comme les caractéristiques de l'ADN cible, le niveau d'optimisation de la réaction ainsi que d'autres facteurs de cinétique intrinsèque affectent l'efficacité de la réaction PCR, conduisant à la perte des caractéristiques de proportionnalité entre la quantité d'ADN modèle initial et le produit final de la PCR vers la fin de la réaction. Pour contourner cette limite de la PCR

conventionnelle d'autres techniques ont été développées afin d'établir un lien plus fiable entre la concentration initiale de l'ADN cible et la quantité de produit final de la PCR (Querci *et al.*, 2007) comme la PCR compétitive et la PCR en temps réel (Engel *et al.*, 2006).

PCR compétitive

Cette méthode est basée sur la co-amplification de la matrice d'ADN cible et d'une quantité donnée d'ADN standard interne (compétiteur) portant les mêmes sites de fixation d'amorces. Etant donné que la quantité initiale du compétiteur est connue et que les niveaux d'amplification de la cible et de l'ADN compétiteur sont les mêmes, la quantité des deux produits PCR, est représentative du taux d'ADN cible et des compétiteur présents dans l'échantillon à analyser avant la réaction d'amplification (Weighardt , 2006).

PCR en temps réel

Les systèmes de PCR en temps réel reposent sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits (Poitras et Houde, 2002). La détection quantitative en temps réel des amplicons utilise les agents se liant à l'ADN double brin, comme le colorant SYBR Green (Morrison *et al.*, 1998) ou les sondes fluorescentes comme les amorces scorpion (Whitcombe *et al.*, 1999), les balises moléculaires (Tyagi et Kramer, 1996), les sondes de transfert entre molécules fluorescentes (Wittwer *et al.*, 1997) et les sondes de dégradation TaqMan qui semblent être les plus utilisées (Heid *et al.*, 1996 ; Poitras et Houde, 2002).

La quantification des OGM implique l'analyse d'un ensemble complet de normes (calibreurs) comme les ADN génomiques ou plasmidiques, qui fournissent une courbe d'étalonnage. Les résultats obtenus pour les différents échantillons à tester sont comparés à cette courbe étalon pour déterminer leurs concentrations en ADN (Jasbbeer *et al.*, 2008).

2.4.2.4. Autres méthodes moléculaires

Puce à ADN (DNA chips)

La technologie des puces à ADN, connue sous le nom « microarray » permet l'analyse simultanée de plusieurs amplicons en une seule réaction (Elenis *et al.*, 2008). Elles sont constituées d'un ensemble de sondes immobilisées sur un support en verre, en plastique ou

en silinium, complémentaires des séquences à détecter (Deisingh et Badrie, 2005 ; Zammattéo et al., 2000). Les sondes sont distribuées sur des milliers de zones de réaction aboutissant à une densité de 10^6 sites / cm^2 (Wang, 2000).

Plusieurs types de puces sont conçues pour la détection des OGM : pour le criblage, avec des sondes spécifiques des promoteurs et des terminateurs les plus utilisés ; pour l'identification de l'OGM ; pour la détection des espèces (Xu *et al.*, 2006) ; pour l'identification de 9 événements de transformation autorisés et commercialisés pour le maïs, le colza et le soja, avec des limites de détection de l'ordre de 0,1% (Leimanis *et al.*, 2006).

Les avantages de cette technologie sont : la miniaturisation, la haute spécificité, la rapidité de criblage, la flexibilité car de nouvelles sondes peuvent être ajoutées et la possibilité de fournir des informations sur les OGM inconnus (Leimanis *et al.*, 2006 ; Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2007).

PCR-ELISA

Cette méthode est basée sur l'hybridation en phase liquide des produits de la PCR biotinilés avec des sondes marquées à la digoxigénine. L'hybridation spécifique des fragments d'ADN marqués à la biotine et à la digoxigénine sera quantifiée par une analyse ELISA qui consiste en une capture des hybrides formés sur une microplaque à l'aide de la streptavidine (Liu *et al.*, 2004). Cette technique permet l'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons (Laetitia *et al.*, 2003).

2.4.2.5. Limites de détection et de quantification

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) sont définies comme étant les plus faibles quantités que l'on peut détecter et quantifier de manière fiable. Ces deux limites sont spécifiques aux méthodes et dépendent de l'échantillon à analyser (Miraglia *et al.*, 2004). En effet l'efficacité de la PCR dépend de la qualité et la pureté de l'ADN qui varient du degré de transformation de l'échantillon et de la méthode d'extraction de l'ADN utilisée. Trois types de limite de détection et de quantification sont présentés (Berdal et Holst-Jensen, 2001) :

La limite absolue correspond au plus petit nombre de copies d'ADN GM détectable à une probabilité d'au moins 95% de détection et de quantification correctes.

La limite relative correspond au plus faible pourcentage de matériel GM qui peut être détecté/quantifié dans les conditions normales. Un nombre maximal de copie d'ADN de référence est inclus pour déterminer la LOD relative (Holst-Jensen, non daté).

$$\text{LOD}_{\text{relative}} = \frac{\text{LOD}_{\text{absolue}}}{\text{REF}_{\text{max}}} \times 100\%$$

REF^{Max} : correspond au nombre maximal de copie d'ADN de référence.

La limite pratique correspond à la limite appliquée à l'échantillon qui est en cours d'analyse (en tenant compte de la quantité d'ADN et la limite absolue) (Holst-Jensen, non daté).

$$\text{LOD}_{\text{pratique}} = \frac{\text{LOD}_{\text{absolue}}}{\text{REF}_{\text{observé}}} \times 100\%$$

REF^{observé} : correspond au nombre de copie d'ADN de référence observé.

Pour les méthodes basées sur la détection de l'ADN, la LOD et la LOQ dépendent de la taille du génome, du nombre de transgène insérés par génome, du type de matrice présente, de l'efficacité de l'extraction et la sensibilité du test (Van Den Eede et *al.*, 2002).

2.4.3. Méthodes de détection immunoenzymatiques

2.4.3.1. Les immuno-essais

Les immuno-essais sont des méthodes de détection des protéines par le biais d'anticorps qui couplés à une enzyme peuvent être détectés par réaction colorimétrique avec le substrat de l'enzyme. Les anticorps sont générés en injectant la substance à détecter, l'antigène, à des lapins ou des souris. Les anticorps sont purifiés, liés à une enzyme et utilisés en tant que réactifs pour détecter la substance d'intérêt.

Une condition requise pour l'élaboration de méthodes de détection immunologiques est de disposer d'anticorps extrêmement spécifiques dirigés contre la nouvelle protéine à détecter. Les méthodes actuellement disponibles dans le commerce sont développées pour la détection de la toxine Bt, qui confère la résistance aux insectes, et la protéine EPSPS pour la tolérance à un herbicide (Eyquem, 2006).

Ces immuno-essais sont relativement plus rapides, moins chères et simples à mettre en place. Ils sont réservés aux produits consommés non transformés (fruits, certains légumes,

graines) ou ceux issus d'une légère transformation. Cependant, ces méthodes peuvent être utilisées pour la détection mais ne peuvent pas servir à l'identification d'un événement de transformation particulier car plusieurs lignées transgéniques produisent la même protéine d'intérêt (Griffiths et *al.*, 2003).

Le test ELISA

Le test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est un essai immunoenzymatique utilisant un immunoreactif enzymatique (antigène ou anticorps) et un immunoabsorbant (antigène ou anticorps) lié à un support solide. La technique DAS-ELISA ou ELISA direct mise au point par (Clark et Adams (1977) est la plus utilisée pour la détection des OGM (Cochet et *al.*, 1998 ; Stave, 2002).

Certains kits ELISA sont fournis avec des calibreurs (concentrations connues de l'analyte cible en solution) et un témoin négatif (exempt d'analyte cible) pour l'interprétation visuelle et instrumentale des résultats d'essai. Ces normes (calibreurs et témoin) montrent différentes nuances de bleu aux différentes concentrations. En comparant la couleur de l'échantillon par rapport aux normes, il est possible de déterminer visuellement la concentration de l'échantillon. Cette interprétation est semi-quantitative. Alternativement l'interprétation quantitative est réalisée par la mesure de la densité optique de tous les échantillons et des témoins. A partir de la courbe standard, on peut calculer alors la concentration des échantillons (Lübeck, non daté).

Les bandelettes de détection (strip test)

Les strip test sont considérés comme une variante de la méthode ELISA (Ahmed, 2002). Chaque bandelette est constituée de trois composantes : un réservoir du tampon contenant un anticorps marqué (couplé à une particule colorée : or colloïdal ou latex), une fenêtre de lecture du résultat et d'un filtre de couverture (Figure 13a). L'essai est effectué en insérant une bandelette dans un microtube contenant la solution à tester, elle comprend l'extrait du tissu végétal obtenu par broyage des feuilles ou des graines. La solution se déplace vers le haut par capillarité jusqu'à atteindre le réservoir du tampon solubilisant ainsi les anticorps spécifiques marqués qui se lient à la protéine transgénique cible et forment un complexe anticorps-analyte. (Fig.13b) (Ahmed, 2004). La présence d'une ligne simple (ligne de contrôle) sur la membrane indique un résultat négatif et la présence de deux lignes indique un résultat positif. Ces bandelettes de détection sont des techniques qualitatives ou semi quantitatives. En suivant les procédures appropriées d'échantillonnage, il est possible

d'obtenir, à une probabilité de 99%, un intervalle de confiance d'au moins 0,15 % d'OGM pour un lot donné (Lübeck, non daté). Ce sont des tests simples, économiques, rapides, appropriés comme méthodes de dépistage précoce dans la chaîne alimentaire et nécessitent un minimum de formation et d'équipement (Van Den Bulcke et *al.* 2007).

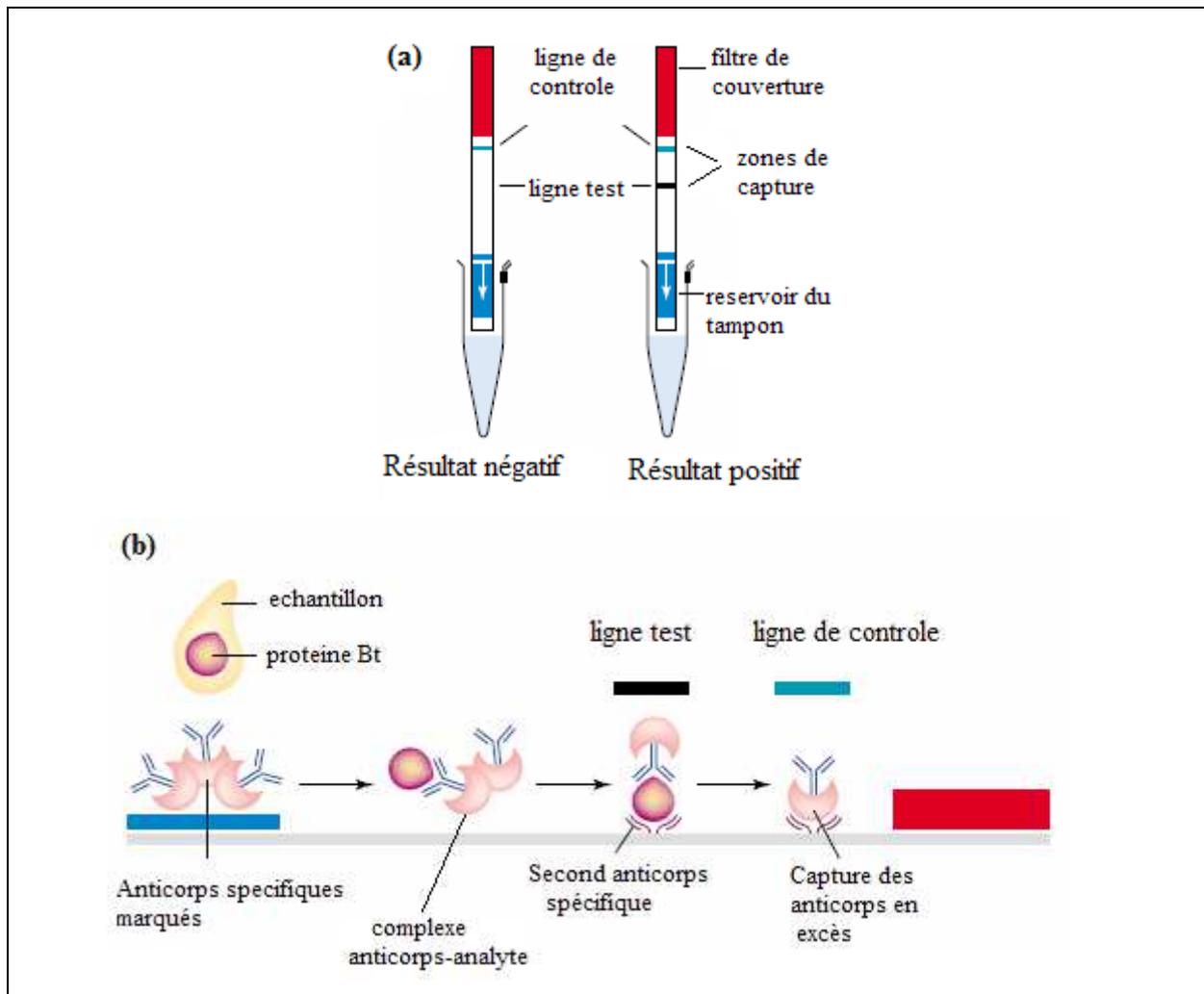


Figure 13 : Principe des tests bandelettes (source : Ahmed, 2002, modifié).

2.4.3.2. Méthode de Western Blot

Le western blot est une méthode très spécifique qui fournit des résultats qualitatifs et permet de savoir si un échantillon contient la protéine cible au-dessous ou au-dessus d'un seuil prédéterminé (Lipton et *al.*, 2000). Cette méthode est particulièrement utile pour l'analyse de protéines insolubles (Brett et *al.*, 1999).

De plus, les problèmes de solubilisation, agrégation et copréciptation de la protéine cible avec d'autres protéines sont à écarter puisque la séparation des protéines s'effectue dans

des conditions de dénaturation (Sambrook et Russel, 2000). Toutefois, cette méthode est plus adaptée aux recherches appliquées que pour les essais de routine (Ahmed, 2002).

Les échantillons à analyser sont solubilisés avec des détergents et des agents réducteurs, puis séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du sodium dodécyl sulfate (SDS). Ces composants sont ensuite transférés sur un support solide, généralement une membrane de nitrocellulose, dont les sites d'interactions non spécifiques avec les anticorps sont bloqués. Ces sites spécifiques sont ensuite sondés avec des anticorps (soit un antisérum polyclonal à haut titre ou un mélange d'anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes antigéniques dénaturés). Enfin, ces anticorps couplés à leurs protéines cibles sont colorés par le nitrate d'argent ou par un deuxième réactif immunologique comme la protéine A couplée à la peroxydase ou la phosphatase alcaline (Sambrook et Russel, 2000). Les limites de détection de cette méthode varient entre 0,25% pour les semences et 1% pour la farine grillée (Yates, 1999).

En général, l'immundétection présente 2 inconvénients. La détection d'une protéine n'est possible que si le transgène s'est exprimé, ce qui n'est pas toujours le cas dans les conditions de culture des PGM en plein champ. De plus, si le transgène ne code pas une nouvelle protéine. De plus, les traitements et les transformations subis par l'OGM auront des effets importants sur la dénaturation de la protéine comme la modification de sa structure (Deisingh et Badrie , 2005).

Matériel et méthodes

3. Matériel et Méthodes

3.1. Echantillons de maïs

Les échantillons testés au cours de cette étude concernent le maïs sous forme de graines et de feuilles destinés aux cultures, à l'alimentation humaine et animale. Au total, 45 échantillons ont été collectés (Tableau 8).

Tableau 8. Présentation des caractéristiques des échantillons de maïs analysés.

Destination	Code	Marque/Variété	Provenance	
Alimentation humaine (Pop corn)	P 1	Boom magic	Amérique latine	
	P 2	Circus	Argentine	
	P 3	Three star	Argentine	
	P 4	Alicampo	Argentine	
	P 5	Premium	Argentine	
	P 6	Ploopie	Argentine	
	P 7	Tasty pop	Argentine	
	P 8	Primore	Argentine	
	P 9	Snack corps	Argentine	
	F 2	Circus	Argentine	
	F 3	Three star	Argentine	
	F 4	Ploopie	Argentine	
	F 5	Tasty pop	Argentine	
	Alimentation humaine (Mais doux)	B 1	Del monte	Chine
		B 2	Golden Land	Chine
B 3		Prince	Chine	
B 4		Le jardinier	Taïlande	
B 5		El mithali	Taïlande	
B 6		D'aucy	UE	
B 7		Familia	UE	
B 8		Princesse	France	
Alimentation humaine et Agriculture	E 1 à E 19	-	-	
	F16 – F17	-	-	
Alimentation animale	A 1		ONAB	
	A 2		ONAB	
	A 3	-	ONAB	

3.1.1. Nature des échantillons

3.1.1.1. Maïs destiné aux cultures et à l'alimentation humaine (Epis)

19 échantillons de maïs destinés aux cultures ont été échantillonnés dans les différentes régions du Nord Algérien. Les sept premiers (E2 à E8) ont été collectés en 2007 dans les régions réparties sur l'axe routier Tipaza - Annaba. (Tipaza, Alger, Boumerdes, Tizi-Ouzou, Bejaia, Skikda et Annaba). L'échantillon E1, provenant du sud algérien, peut être considéré comme le contrôle négatif car il est issu d'une sélection classique. Les onze échantillons restants (E9 à E19) ont été collectés en Juillet 2008 en prospectant les régions suivantes: Bordj El Kiffan, Dergana, Aïn Taya, Sercouf, Douaouda, Tipaza, Bordj bouarrerij et Hraoua.

D'après les bases de données de Agbios (2009), les concentrations les plus élevées de certaines protéines transgéniques ont été révélées dans les tissus foliaires. Pour cela un test de germination a été mené sur les deux échantillons E 16 et E17 avec 200 graines pour chacun. Après germination des graines (96% et 98% respectivement), nous les avons laissé croître jusqu' à atteindre le stade deux feuilles .Ces dernières ont été prélevées pour constituer les échantillons F16 et F17.

3.1.1.2. Maïs destiné à l'alimentation humaine

Les échantillons de maïs destinés à l'alimentation humaine utilisés dans cette étude se présentent sous deux formes : du maïs pop-corn et du maïs doux en grain conditionné.

Nous avons collecté neuf échantillons de maïs pop-corn (P1 à P9) de marques différentes et qui sont tous issus d'Amérique Latine et spécialement d'Argentine (Tableau 8). Ces échantillons sont importés par le secteur privé (annexe 4).

Un test de germination a été également mené sur quatre échantillons de pop-corn (P2, P3, P4 et P5) avec 200 graines pour chacun. Après germination des graines (85%, 96%, 98% et 97% respectivement) nous les avons laissé croître jusqu' à atteindre le stade deux feuilles. Ces dernières ont constitué respectivement les échantillons F2, F3, F4 et F5.

En ce qui concerne le maïs doux en grain conditionné, huit échantillons (B1 à B8), de marques et d'origines différentes, ont été collectés au niveau des supermarchés d'Alger Centre. Trois d'entre eux proviennent de Chine, deux de Thaïlande, deux de l'Union

européenne et le dernier de l'Union européenne et particulièrement de France. Les principaux importateurs de ces produits sont cités en annexe 5.

Pour tous les échantillons destinés à l'alimentation humaine, une attention particulière a été accordée à l'étiquetage mentionné sur l'emballage. Sur les neuf échantillons de maïs pop-corn, deux échantillons (P1 et P4) sont étiquetés "Sans OGM" ou "GMO Free". En ce qui concerne les échantillons de maïs doux, deux échantillons (B7 et B8) provenant de l'Union Européenne, sont étiquetés " Sans OGM". Pour le reste des échantillons, aucune indication quant à la présence ou l'absence d'OGM n'a été mentionnée.

3.1.1.3. Maïs destiné à l'alimentation animale

Trois échantillons de maïs grain (A1, A2 et A3) destinés à l'alimentation animale ont été collectés. Le premier a été échantillonné au début de l'année 2008, et les 2 autres vers la fin de la même année. Ces trois échantillons proviennent tous de l'Office National des Aliments du Bétail (ONAB); les échantillons A1 et A2 proviennent de l'ONAB de Kouba tandis que le troisième échantillon provient de l'ONAB de Baba Ali.

3.1.2. Echantillonnage des lots

3.1.2.1. Collection des échantillons élémentaires

Au cours de cette étude, une attention particulière a été accordée à l'étape de l'échantillonnage afin d'obtenir des échantillons représentatifs des lots dont ils proviennent. Cependant, vu l'impossibilité de pratiquer nous-mêmes l'échantillonnage dans certains cas, d'une part, et le manque d'information sur la taille des lots initiaux, d'autre part, quelques échantillons seulement ont été collectés conformément au protocole d'échantillonnage recommandés tels que décrits pour la détection et l'identification des OGM.

Maïs destiné aux cultures et à l'alimentation humaine

Sur les 19 échantillons de maïs destinés aux cultures, dix (E10 à E19) ont été échantillonnés conformément au protocole d'échantillonnage des plantes génétiquement modifiées en prélevant un épi (au lieu d'une feuille) de chaque plant, en sillonnant la parcelle en W, aller et retour (Lübeck, non daté). Les neuf échantillons restants ont été achetés chez les détaillants situés à proximité des champs.

Maïs pop-corn destiné à l'alimentation humaine

Deux échantillons de maïs pop-corn (P6 et P7) sur neuf ont été échantillonnés conformément à la norme ISO 13690 utilisée par Kay et Paoletti (2001). Ils proviennent d'un grossiste qui disposait moins de 100 sacs pour chaque marque de maïs pop-corn. La norme ISO 13690 préconise l'échantillonnage de 10 sacs, choisis au hasard, dans un lot contenant de 10 à 100 sacs. Au total, 10 sacs pour chaque marque ont été échantillonnés en prélevant 3 échantillons élémentaires pour chaque sac en différents points (haut, milieu et le bas).

3.1.2.2. Formation des échantillons composites

D'après les étapes de l'échantillonnage décrites précédemment, l'échantillon composite doit être 20 fois plus large que l'échantillon de laboratoire. Pour cela, 30 échantillons élémentaires (600 graines pour chacun) de chaque lot sont mélangés pour former l'échantillon composite.

3.1.2.3. Formation des échantillons de laboratoire

Chaque échantillon composite formé est bien homogénéisé puis réduit en taille après plusieurs divisions successifs jusqu'à atteindre la taille de 1000 graines pour chaque échantillon de laboratoire.

Pour les autres échantillons, l'échantillonnage n'est pas significatif puisque nous ne connaissons pas la taille des lots initiaux.

3.1.2.4. Broyage des échantillons de laboratoire

Pour tous les types d'analyse, excepté les biodosages, une étape de broyage est nécessaire. Il faut en effet extraire les protéines ou l'ADN. Il est donc indispensable de broyer les grains ou les feuilles. Pour que l'analyse soit fiable, il est extrêmement important d'homogénéiser le broyat afin d'avoir le même pourcentage d'OGM partout (Bourbousse, 2006).

Pour chaque échantillon de maïs à analyser, un échantillon de laboratoire de 1000 graines est préparé. Ces graines sont moulues à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine bien homogénéisée.

Au moment du broyage, le moulin devait être nettoyé soigneusement lors du passage d'un échantillon à l'autre afin d'éviter toute contamination entre les échantillons.

De plus, avant le broyage de chaque échantillon, environ 50 graines appartenant au nouvel échantillon à broyer sont moulues avec le même broyeur ; la poudre ainsi obtenue est éliminée et le moulin est à nouveau nettoyé. C'est après cette étape que le reste des graines du même échantillon, sont broyées (Tozzini *et al.*, 2000).

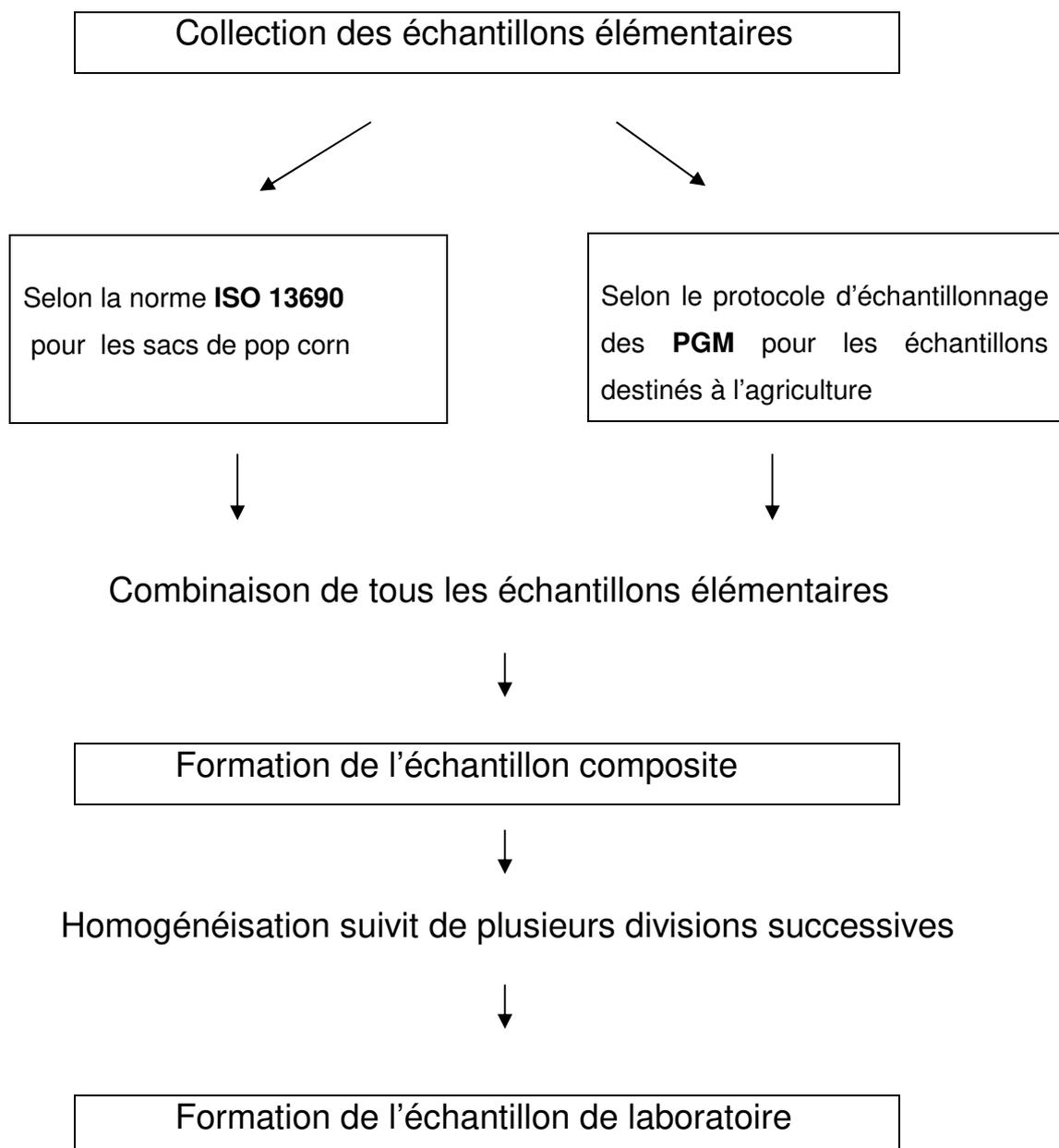


Figure 14. Schéma présentant les étapes de formation de l'échantillon de laboratoire

3.2. Méthode de détection par criblage par PCR (Screening)

3.2.1. Obtention de l'ADN

3.2.1.1. Méthodes d'extraction utilisées

Au cours de cette étude, deux protocoles d'extraction de l'ADN à partir des graines de maïs ont été expérimentés, l'un à base de CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) et l'autre à base du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Ces deux protocoles comprennent plusieurs étapes dont les plus importantes sont :

- La rupture des parois cellulaires en broyant le tissu végétal avec l'azote liquide (Anklam, 2002).
- La lyse des membranes cellulaires en utilisant un détergent (CTAB ou SDS).
- L'inactivation des nucléases endogènes par l'ajout de l'EDTA.
- Élimination des polysaccharides par précipitation.
- Élimination des protéines par précipitation à l'acétate de potassium (pour le protocole à base du SDS) ou par extraction au chloroforme (pour le protocole à base de CTAB).
- Enfin, solubilisation et concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool ou au sel.

Protocole à base de CTAB

Cette méthode utilise comme détergent le CTAB selon le protocole préconisé par Somma (2006). Les étapes et la composition des différents tampons sont décrites en planche 1 et annexe 6 respectivement.

Protocole à base de SDS

Une deuxième méthode basée sur l'utilisation du SDS a été également réalisée (planche 2). Elle est basée sur le protocole de Dellaporta et *al.*, 1983 modifié par Tozzini et *al.*, 2000. Les réactifs et solutions utilisés sont décrits en annexe 7.

Planche 1 : protocole d'extraction d'ADN à base de CTAB (Somma, 2006)

1. Transférer 100 mg d'un échantillon homogène dans un tube stérile de 1,5 ml pour micro centrifugeuse.
2. Ajouter 300 µl d'eau desionisée stérile et mélangez avec une tige.
3. Ajouter 500 µl de tampon au CTAB et mélangez avec une tige.
4. Ajouter 20 µl de protéinase K (20 mg/ml), mélangez et placez dans un incubateur à 65 °C pendant 30 à 90 minutes.
5. Ajouter 20 µl de RNase A (10 mg/ml), mélangez et laissez incuber à 65°C pendant 5 à 10 min.
6. Centrifuger pendant 10 min à environ 16 000 × g.
7. Transférer le liquide surnageant dans un tube pour micro centrifugeuse contenant 500 µl de chloroforme. Mélangez pendant 30 secondes.
8. Centrifuger pendant 10 min à 16 000 × g jusqu' au moment où la séparation de phase se produit.
9. Transférer 500 µl de la couche supérieure dans un nouveau tube de micro centrifugation contenant 500 µl de chloroforme et mélangez.
10. Centrifuger pendant 10 min à environ 16 000 × g.
11. Transférer la couche supérieure dans un nouveau tube de micro centrifugation
12. Ajouter 2 volumes de solution de précipitation au CTAB et mélanger par pipetage.
13. Laisser incuber pendant 60 min à température ambiante.
14. Centrifuger pendant 5 min à 16 000 × g.
15. Jeter le liquide surnageant et dissoudre le précipitât dans 350 µl de NaCl (1,2 M).
16. Ajouter 350 µl de chloroforme et mélanger pendant 30 secondes.
17. Centrifuger pendant 10 minutes à 16 000 × g jusqu'à ce que la séparation de phase se produise.
18. Transférer la couche supérieure dans un nouveau tube de micro centrifugation.
19. Ajouter 0,6 volume d'isopropanol et mélanger.
20. Centrifuger pendant 10 min à 16 000 × g puis jeter le liquide surnageant.
21. Ajouter 500 µl de solution d'éthanol froid à 70 % et mélanger délicatement.
22. Centrifuger pendant 10 min à 16 000 × g puis jeter le liquide surnageant.
23. Sécher les culots et dissoudre l'ADN dans 100 µl d'eau stérile desionisée.

Planche 2 : protocole d'extraction d'ADN à base de SDS (Tozzini et *al.*, 2000)

1. Ajouter 700µl du tampon d'extraction, composé de 50 mM Tris-Hcl pH 8, 10 mM.EDTA, 100 mM NaCl., 10 mM 2-mercaptoéthanol et 1 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), à 70 mg de la poudre de maïs.
2. Incuber durant 10mn à 65°C.
3. Ajouter 200µl d'acétate de potassium (5M), mélanger au vortex et placer dans la glace durant 10min.
4. Centrifuger à 12000 rpm pendant 10min à 4°C.
5. Prélever 400µl du surnageant, les transférer dans un nouveau tube de 1,5ml.
6. Ajouter un volume de 2-propanol, mélanger au vortex et centrifuger à 2.000 rpm pendant 10 min à 4°C.
7. Eliminer le surnageant, laver le culot 2 fois avec l'éthanol 70 %.
8. En fin, le culot est séché puis dissout dans 50 µl d'eau desionisée stérile.

3.2.1.2. Visualisation de l'ADN sur gel d'électrophorèse

Les ADN génomiques extraits sont visualisés sur un gel d'agarose à 0,6%. Pour cela 0,36 g d'agarose sont dissous dans 60 ml de tampon TBE 1X dont la composition est décrite en annexe 8. Le mélange est chauffé jusqu'à ébullition dans un four à micro-onde permettant ainsi la dissolution complète de l'agarose. Après refroidissement, 2µl de BET (0,5µg/ml) sont rajoutés. Le mélange est versé dans un support dont les deux extrémités ont été soigneusement fermées par du papier adhésif et dans lequel un peigne a été installé préalablement.

Les extraits d'ADN ont été mélangés au tampon de charge dont la composition est décrite en annexe 8, raison de 8µl d'ADN et 2µl de tampon. 10µl de chaque mélange sont déposés un à un dans les puits du gel et sont mis à migrer 30 minutes à 100 volts. La visualisation des profils électrophorétiques, est réalisée à l'aide d'un trans-illuminateur à Ultraviolet et le gel est photographié avec un appareil numérique.

3.2.1.3. Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN

La quantification des ADN extraits a été réalisée par spectrophotométrie, une technique qui consiste à quantifier l'ADN par la mesure d'une densité optique. En effet, l'ADN absorbe les UV à la longueur d'ondes de 260nm. La densité optique obtenue nous permet d'estimer la quantité (concentration) d'ADN. Par ailleurs, les protéines absorbent les UV à une longueur d'ondes de 280nm. Le calcul du rapport de la densité optique de l'ADN sur celle des protéines ($DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}}$) nous renseigne sur la qualité de l'ADN (pureté).

Pour cela 10 µl d'ADN ont été dilués dans 1990µl d'eau distillée puis exposés aux UV émis par le spectrophotomètre. La lecture de la densité optique est effectuée à 260 puis à 280 nm, et la concentration en ADN est calculée par la formule suivante :

$$\text{ADN } (\mu\text{g} / \mu\text{l}) = DO_{260} \times 200 \text{ (facteur de dilution)} \times 50 \mu\text{g} / \text{ml} \times 10^{-3}$$

3.2.2. Mise au point de la technique PCR

Pour chaque échantillon, trois réactions PCR ont été mises au point. L'une pour évaluer la qualité de l'ADN extrait et les deux autres pour détecter la présence du transgène.

3.2.2.1. Les séquences d'ADN ciblées

Détection du gène Zein spécifique au maïs

Les amorces ZEIN 3 et ZEIN 4 (Promega) spécifiques du gène Zein du maïs ont été utilisées pour confirmer la présence et la qualité (amplifiabilité) de l'ADN extrait des échantillons à analyser (Querci et Mazzara, 2006). Si l'ADN cible extrait est présent, intact et amplifiable, on peut s'attendre à l'amplification d'une bande de 277 pb.

Détection du promoteur 35S et du terminateur nos

Les séquences les plus répandues pour la régulation d'un transgène sont le promoteur 35S, qui dérive du virus de la mosaïque du chou-fleur CaMV, et le terminateur nos provenant d'*Agrobacterium tumefaciens*.

L'identification de l'une de ces séquences régulatrices dans les échantillons de maïs indique la présence d'OGM (Querci et *al.*, 2006). Pour cela les amorces p35s-cf3 et p35S-cr4 sont utilisées pour la détection spécifique du promoteur 35S et les amorces HA-nos 118-f et HA-nos 118-r pour détecter le terminateur nos (Lipp et *al.*, 2001). Les amplicons escomptés sont des fragments de 123 et 118 pb respectivement. Les deux paires d'amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 9 et leurs sites de fixation sont représentés en figures 15 et 16.

Tableau 9. Caractéristiques des amorces utilisées pour le screening (Querci et *al.*, 2006)

Séquence cible	Nom de l'amorce	Taille de l'amorce	Séquence	Taille de l'amplicon
Zein	ZEIN 3	19pb	AGTGCGACCCATATTCCAG	277 pb
	ZEIN 4	21pb	GACATTGTGGCATCATCATTT	
Promoteur 35S	p35S-cf3	21 pb	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG	123 pb
	p35S-cr4	25 pb	TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC	
Terminateur nos	HA-nos 118-f	24 pb	GCATGACGTTATTTATGAGATGGG	118 pb
	HA-nos 118-r	24 pb	GACACCGCGCGGATAATTTATCC	

```

1 ccagttaggc cagttacca gatctgagtc gacctgcaga tcggttcaaac atttggcaat
61 aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgccgat gattatcata taatttctgt
121 tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttatatt atgagatggg
                                     HA-nos 118-f
181 tttttatgat tagagtcccg caattataca tttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc
241 gcgcaaaacta ggataaatta tcgcgcgcgcg tgtcacatctat gttactagat ctgggcctcg
                                     HA-nos 118-r
301 tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg
361 gcacttttctg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatgtgttt atttttctaa atacattcaa
421 atatgtatcc gctcatggag ggattcttggt atttttgggtg gagaccattt cttggtctaa
481 aatctgtagg tgttagcctc tagtattatt gaaaatggtc gctcatggct attttcatca
541 aaaatggggg ttgtgtggcc atttatcatc gaccagaggc tcgtacacct caccacacat
601 atgtttcctt gccatagatt acattcttgg atttctgggtg gaaaccattt cttggttaaa
661 aactcgtagc tgttagcctt cggattattt gaaaatggtc attcatggct atttttcggc
721 aaaatggcgg ttgtgtggcc catttga

```

Figure 15. Séquence du terminateur nos du gène Pat d'un maïs transgénique selon l'accès à la banque de gène N° AY123624.1(NCBI).

```

1 cccatggagt caaagattca aatagaggac ctaacagaac tcgccgtaaa gactggcgaa
61 cagttcatac agagtctctt acgactcaat gacaagaaga aaatcttcgt caacatgggtg
121 gagcacgaca cgcttgtcta ctccaaaaat atcaaagata cagtctcaga agaccaaagg
181 gcaattgaga cttttcaaca aagggaata tccggaaacc tctctggatt ccattgcca
241 gctatctgtc actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag gtggctccta caaatgccat
301 cattgcgata aaggaaaggc catcgttgaa gatgcctctg ccgacagtgg tcccaaagat
361 ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg ttccaaaccac gtcttcaaag
                                     p35S-cf3
421 caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc ccaactaagct
481 tcgcaagacc ctctctctat ataaaggaagt tcatttcatt tggagaggac aggg
//
                                     p35S-cr4

```

Figure 16. Séquence 73 du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et sites d'hybridation des amorces p35S-cf3 et p35S-cr4 selon le brevet WO2007024782 (NCBI).

3.2.2.2. Préparation des échantillons pour la PCR

Pour chaque échantillon d'ADN, une dilution est effectuée pour obtenir une concentration finale de 10 ng/µl. Les réactifs nécessaires ainsi que leurs concentrations respectives dans le mélange sont représentés dans le tableau 10.

Tableau 10: Récapitulatif des concentrations en réactifs du milieu réactionnel (mix).

Réactif	Concentration finale	Quantité pour un échantillon
Eau deionisée stérile		32,75 µl
Tampon PCR 10x	1 x	5,00 µl
25mM de Mg Cl ₂	2,5mM	5,00 µl
4mM de dNTP	0,2mM	2,50 µl
Amorce sens	0,5µM	1,25 µl
Amorce antisens	0,5µM	1,25 µl
ADN polymérase Taq	0,025 U/µl	0,25 µl

Dans un microtube Eppendorf de 1,5ml, les réactifs précédemment cités sont rajoutés dans l'ordre indiqué dans tableau 10 puis mélangés par pipetage. 2µl d'ADN sont ensuite rajoutés dans chaque tube.

3.2.2.3. Réaction d'amplification

L'amplification est réalisée dans un thermocycleur programmable PTC 100 (Peltier Thermal Cycler) de M.j.Research. Les différents programmes utilisés ont servis à amplifier respectivement les séquences cibles du maïs, du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur et du terminateur Nos (Querci et *al.*, 2006).

Programme PCR (ZEIN3 / ZEIN4)

	Température	Durée
Dénaturation initiale	95°C	3 mn
Dénaturation	96 °C	1 mn
Hybridation	60°C	1 mn
Extension	72 °C	45 s
Nombre de cycles	40	
Extension finale	72 °C	3 mn
	4 °C	∞

Programme PCR (p35S-cf3 / p35S-cr4)

	Température	Durée
Dénaturation initiale	95 °C	3 mn
Dénaturation	95 °C	25 s
Hybridation	62 °C	30 s
Extension	72 °C	45 s
Nombre de cycles	50	
Extension finale	72 °C	7 mn
	4 °C	∞

Programme PCR (HA-nos118-f/HA-nos118-r)

	Température	Durée
Dénaturation initiale	95 °C	3 mn
Dénaturation	95 °C	25 s
Hybridation	62 °C	30 s
Extension	72 °C	45 s
Nombre de cycles	50	
Extension finale	72 °C	7 mn
	4 °C	°°

3.2.2.4. Electrophorèse des amplifias sur gel d'agarose

Les produits de l'amplification du promoteur 35 S et du terminateur nos ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2,5 % dans du tampon TBE 1X. Ceux du gène Zein, ont été séparés sur un gel à 1,5 % (Querci *et al.*,2006). A cet effet 12µl d'une solution contenant 5µl d'ADN amplifié et 7µl de tampon de charge sont mis à migrer à 80 volts pendant 2 heures et en présence d'un marqueur de poids moléculaire (50 pb ladder).

La révélation est faite sous lumière ultraviolette après coloration du gel dans une solution de Bromure d'éthidium. Les photographies ont été réalisées à l'aide d'un appareil photo numérique.

3.3. Méthode de détection par bandelettes (Strip test)

Cette méthode est basée sur la détection des protéines transgéniques dans les produits peu ou non transformés. Son principe permet, en quelques minutes, la confirmation du bon fonctionnement des bandelettes, d'une part, et la détection de ces protéines recombinantes d'autre part (Stave, 2002).

Au cours de cette étude, quatre protéines transgéniques (Cry1Ab, Cry1Ac, Cry9C et CP4-EPSPS) codées par les gènes les plus fréquemment utilisés dans la modification génétique du maïs, ont été détectées dans les différents échantillons collectés (graines et feuilles).

Chaque échantillon est testé par trois bandelettes différentes :

- Une permet la détection de la protéine CP4-EPSPS conférant la résistance à l'herbicide Roundup Ready chez le maïs RR.

- La deuxième est spécifique à deux protéines Cry (endotoxines), Cry1Ab et Cry1Ac, permettant ainsi leur détection dans le maïs Bt
- La troisième bandelette détecte la protéine Cry9C produite par le maïs StarLink (CBH-351)

3.3.1. Préparation des échantillons

Le protocole fourni par les fournisseurs du kit de détection (Agdia) préconise les étapes suivantes :

- Broyer les graines en poudre fine (comme décrit dans le paragraphe 3.1.3)
- Préparer des disques de 5mm de diamètre à partir des échantillons de feuilles à analyser.
- Transférer 20 à 25g de la poudre dans un bocal de 500ml. Concernant les feuilles, déposer les disques préparés dans un mortier pour faciliter l'extraction.
- Ajouter le volume nécessaire du tampon d'extraction SEB 4 (Sample Extraction Buffer) selon le ratio préconisé par Agdia (Tableau 11) puis mélanger délicatement 10 à 15 secondes.
- Laisser décanter 30 secondes avant le test.

Tableau 11: Présentation de la taille de l'échantillon de laboratoire et le volume du tampon d'extraction nécessaire pour les tests bandelettes

	Feuille	Graine
Taille de l'échantillon de laboratoire	Une feuille par plant pour 100 plants	1000 graines
Taille du sous- échantillon	100 disques de 5 mm de diamètre	20 à 25 grammes
Nature du tampon d'extraction	SEB 4	SEB 4
Ratio	1 : 20	1 : 2,5
Quantité du tampon	40 à 60 ml	40 à 60 ml

3.3.2. Application du test

A l'aide d'une pipete jetable, transférer 500µl du surnageant dans un microtube Eppendorf puis introduire la bandelette dans le tube (flèche vers le bas) en prenant soin de ne pas submerger plus de 0,5 cm. Il faut attendre 5 à 10 minutes pour lire et interpréter les résultats obtenus :

- Si une seule ligne apparaît, la ligne de contrôle, le test est négatif
- Si deux lignes apparaissent, la ligne de contrôle et la ligne test, le test est donc positif.
- Si aucune ligne n'apparaît, le test n'est pas valide.

Pour chaque série de test, deux contrôles, positif et négatif, ont été préparés selon le protocole préconisé par les fournisseurs du kit (Agdia), puis testés avec les trois bandelettes utilisées.

Résultats et discussions

4. Résultats et discussion

4.1. Détection par criblage par PCR (screening)

4.1.1. Comparaison des méthodes d'extraction d'ADN

4.1.1.1. Résultats obtenus

L'obtention d'un ADN pur et de bonne qualité compte parmi les facteurs les plus critiques pour une analyse PCR. Pour cela, deux protocoles d'extraction d'ADN basés sur l'utilisation de deux détergents différents (CTAB et SDS) ont été réalisés. Pour les deux protocoles, l'électrophorèse sur gel d'agarose à 0,6 % a révélé la présence de bande de bonne intensité pour tous les échantillons testés (Figure 17).

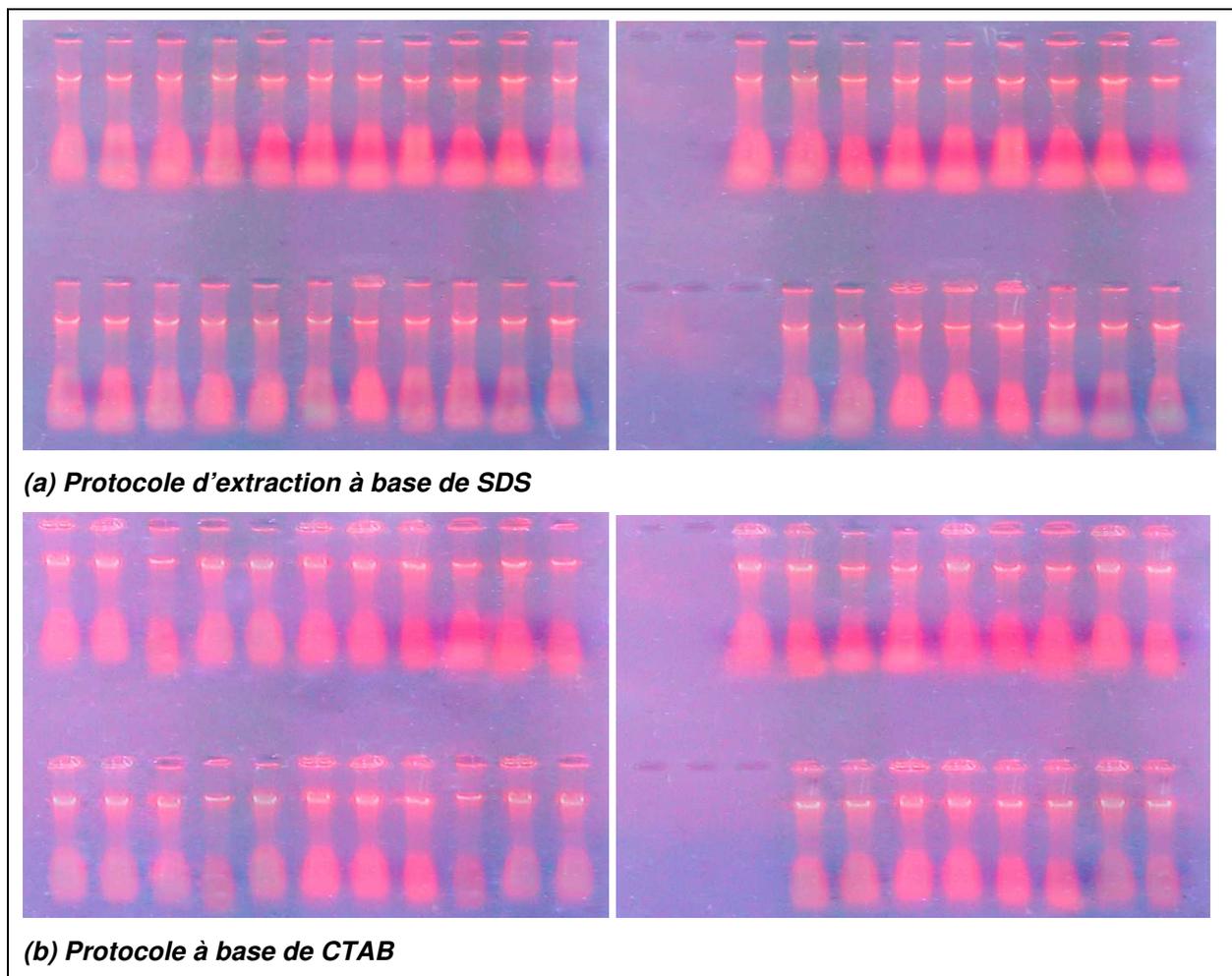


Figure 17. Extraits d'ADN génomiques obtenus pour tous les échantillons

La qualité et la quantité de ces ADN ont été estimées par spectrophotométrie en mesurant la densité optique à 260 nm et en calculant le rapport D0260/ DO280 (Tableau 12).

Tableau 12. Présentation des valeurs des DO, de la pureté et de la concentration en ADN

Echantillon	Protocole CTAB			Protocole SDS		
	<i>Do 260</i>	<i>Do260/Do280</i>	<i>Concentration ng/ul</i>	<i>Do 260</i>	<i>Do260/Do 280</i>	<i>Concentration ng/ul</i>
E1	0,018	1,36	180	0,081	1,57	810
E 2	0,020	1,41	200	0,073	1,65	730
E 3	0,023	1,53	230	0,068	1,55	680
E 4	0,028	1,64	280	0,053	1,52	530
E 5	0,025	1,56	250	0,088	1,64	880
E 6	0,021	1,45	210	0,033	1,57	330
E 7	0,027	1,58	270	0,061	1,74	610
E 8	0,031	1,51	310	0,049	1,67	490
E 9	0,049	1,61	490	0,042	1,59	420
E 10	0,034	1,52	340	0,046	1,60	460
E 11	0,028	1,45	280	0,094	1,52	940
E 12	0,032	1,62	320	0,059	1,63	590
E 13	0,041	1,69	410	0,070	1,80	700
E 14	0,035	1,60	350	0,080	1,68	800
E 15	0,024	1,50	240	0,057	1,65	570
E 16	0,041	1,46	410	0,053	1,75	530
E 17	0,043	1,32	430	0,058	1,57	580
E 18	0,025	1,25	250	0,040	1,65	400
E 19	0,046	1,30	460	0,042	1,55	420
P 1	0,029	1,34	290	0,039	1,54	390
P 2	0,016	1,33	160	0,044	1,45	440
P 3	0,038	1,41	380	0,046	1,44	460
P 4	0,032	1,28	320	0,039	1,48	390
P 5	0,018	1,23	180	0,038	1,45	380
P 6	0,028	1,27	280	0,035	1,57	350
P 7	0,039	1,25	390	0,037	1,65	370
P 8	0,040	1,31	400	0,045	1,70	450
P 9	0,021	1,33	210	0,047	1,50	470
B1	0,046	1,30	460	0,050	1,56	500
B2	0,036	1,56	360	0,054	1,48	540
B3	0,047	1,42	470	0,045	1,60	450
B4	0,032	1,44	320	0,057	1,58	570
B5	0,044	1,41	440	0,061	1,45	610
B6	0,025	1,55	250	0,052	1,62	520
B7	0,030	1,33	300	0,055	1,43	550
B8	0,045	1,30	450	0,048	1,47	480
A 1	0,040	1,32	400	0,045	1,56	450
A 2	0,034	1,29	340	0,031	1,60	310
A 3	0,025	1,20	250	0,047	1,42	470

Sur le plan quantitatif, le protocole à base du SDS a donné de meilleurs résultats pour la majorité des échantillons.

En effet ce protocole nous a permis d'obtenir des quantités d'ADN comprises entre 310 et 940 ng/µl. Cependant la qualité (pureté) de l'ADN obtenu, en comparaison avec la référence d'un ADN de bonne qualité, est moindre pour les deux protocoles.

Pour le protocole à base du SDS, les valeurs relatives du rapport D0260/ D0280 varient de 1,42 à 1,80 avec 30 échantillons sur 39 ayant des valeurs supérieures à 1,50. Celles du protocole à base de CTAB sont comprises entre 1,2 et 1,69 avec 26 échantillons ayant une valeur inférieure à 1,5 (Tableau 12).

4.1.1.2. Discussion

Au cours de cette étude, deux protocoles d'extraction d'ADN ont été expérimentés. Pour les deux protocoles, le broyage des échantillons dans un mortier préalablement stérilisé, en présence d'azote liquide, a facilité la rupture des parois cellulaires (Anklam, 2002). La dégradation des membranes cellulaires a été assurée par l'addition du SDS ou du CTAB afin de libérer l'ADN dans le tampon d'extraction (Puchooa et Venkatasamay ,2005).

L'extraction d'ADN par le protocole de Tozzini et *al.*, (2000), basé sur l'utilisation du SDS, se récapitule par une lyse thermique, en présence du B-mercaptoethanol et d'EDTA, suivie de deux réactions de précipitation par l'acétate de potassium et l'isopropanol .Son étape clé est la précipitation simultanée des protéines et des polysaccharides par des concentrations élevées en acétate de potassium et en présence du SDS (Weising et *al.*, 2005).

En effet, au cours de la phase de lyse par le SDS, les protéines et les polysaccharides sont piégés dans un complexe revêtu par le dodecylsulfate (Niu et *al.*, 2008). Après addition de l'acétate de potassium, ce complexe est précipité sous forme de potassium dodecyl sulfate (Weising et *al.*, 2005) après substitution des ions sodium par les ions potassium (Dellaporta et *al.*,1983 ; Niu et *al.*, 2008). L'ADN reste alors en suspension. Les étapes de précipitation et de purification de l'ADN sont accomplies par l'utilisation de l'isopropanol et l'éthanol.

Nous remarquons que cette méthode ne nécessite aucune extraction organique (Niu et *al.*, 2008 ; Weising et *al.*, 2005) utilisant le chloroforme ou le phénol, ce qui représente un avantage considérable par rapport aux autres méthodes (Weising et *al.*, 2005). D'après

Weising et *al.* (2005), le protocole de Dellaporta et *al.*, 1983 est une alternative raisonnable des méthodes d'extraction au CTAB.

Cependant, selon Tanaka et Ikeda (2002) et Somma (2006), les méthodes d'extraction au CTAB sont fréquemment utilisées pour extraire l'ADN des végétaux et d'aliments qui en dérivent. Ces méthodes mettent à profit les propriétés du CTAB, permettant ainsi l'élimination des polysaccharides et des composés polyphénoliques qui affectent la pureté de l'ADN. En effet, le CTAB est un détergent cationique qui forme un complexe insoluble avec l'ADN à faible teneur en sel (inférieure à 0,4 M) (Murray et Thompson, 1980). Dans ces conditions de faible salinité, les contaminants de l'ADN ne précipitent pas et peuvent être enlevés par extraction hors la phase aqueuse au moyen du chloroforme. Ce dernier dénature les protéines et facilite la séparation des phases aqueuses et organiques (Somma, 2006).

Une fois le complexe ADN/CTAB purifié, une étape de précipitation de l'ADN est réalisée. Au cours de cette phase, l'ADN est libéré du détergent à l'aide d'une solution de précipitation composée d'un mélange de CTAB et de NaCl à une concentration élevée.

Sur le plan quantitatif, le protocole à base du SDS a donné de meilleurs résultats pour la plupart des échantillons, en comparaisons avec le protocole à base de CTAB. Mais la qualité (pureté) des ADN obtenus est moindre pour les deux protocoles utilisés avec une légère différence. Pour le protocole à base du SDS, les valeurs relatives du rapport DO260/ DO280 se rapprochent de celle d'un ADN de bonne qualité de référence rapportée entre 1,8 et 2. Celles du deuxième protocole sont un peu loin de cette référence. Cette qualité est liée à la présence de contaminant de la suspension d'ADN par des substances, telles que les protéines, les phénols (Sambrook et *al.*, 1989) et les polysaccharides (Sambrook et *al.*, 1989 ; Murray et Thompson, 1980 ; Fang et *al.*, 1992).

Ces polysaccharides rendent la préparation d'ADN très visqueuse et inhibent l'activité des enzymes (Do et Adams, 1991). Avec les phénols, ces derniers peuvent donc détériorer la qualité de l'ADN ou inhiber les enzymes telles que les endonucléases de restriction et les polymérases (Weising et Kahl, 1998). L'utilisation ultérieure de cet ADN, nécessite une étape supplémentaire de purification (Fang et *al.*, 1992 ; Sambrook et *al.*, 1989 ; Murray et Thompson, 1980). Cette haute qualité d'ADN est indispensable pour les méthodes d'analyse d'ADN basées notamment sur l'utilisation d'enzymes de restriction (Vos et Kuiper, 1998). Elle n'est cependant pas très nécessaire pour les méthodes d'analyse basées sur

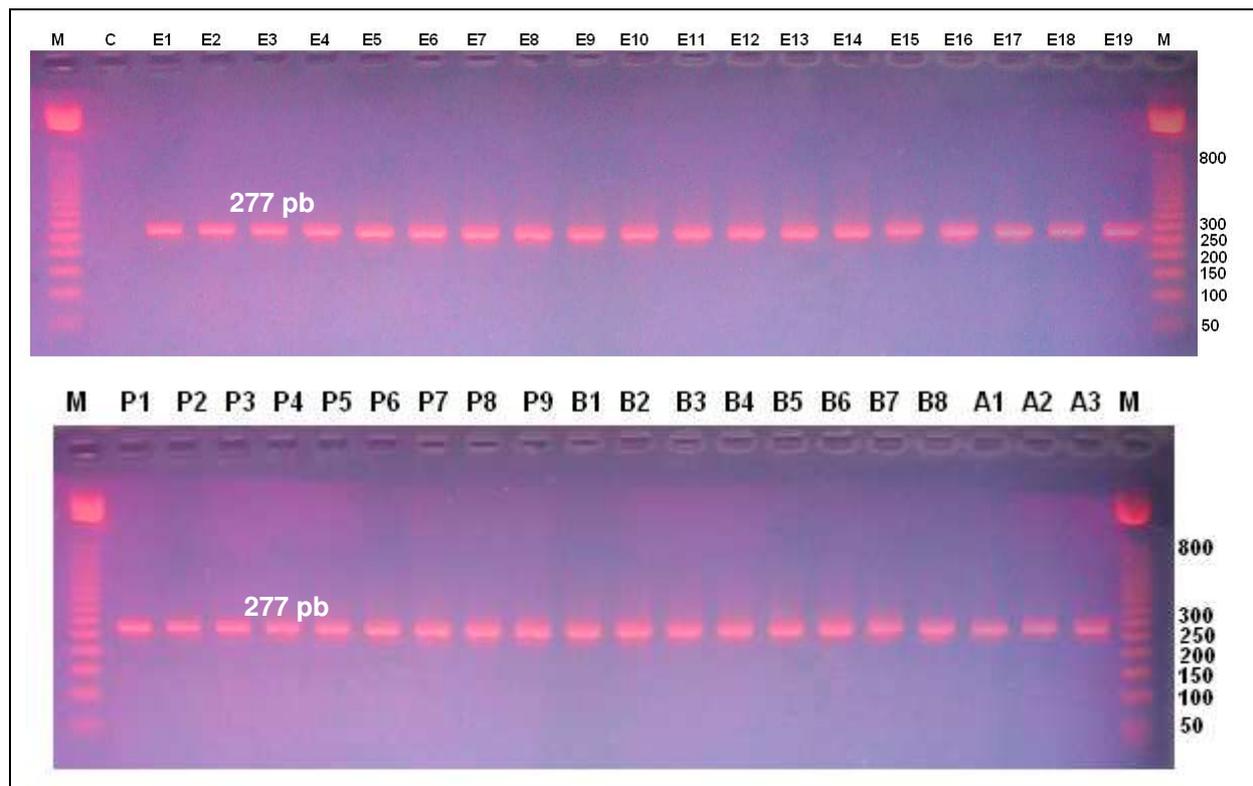
l'amplification enzymatique (Rafalski, 1998) du moment que la Taq polymérase ne nécessite pas un ADN de haute qualité (Ovesna *et al.*, 2002).

4.1.2. Amplification des séquences cibles

4.1.2.1. Amplification du gène Zein

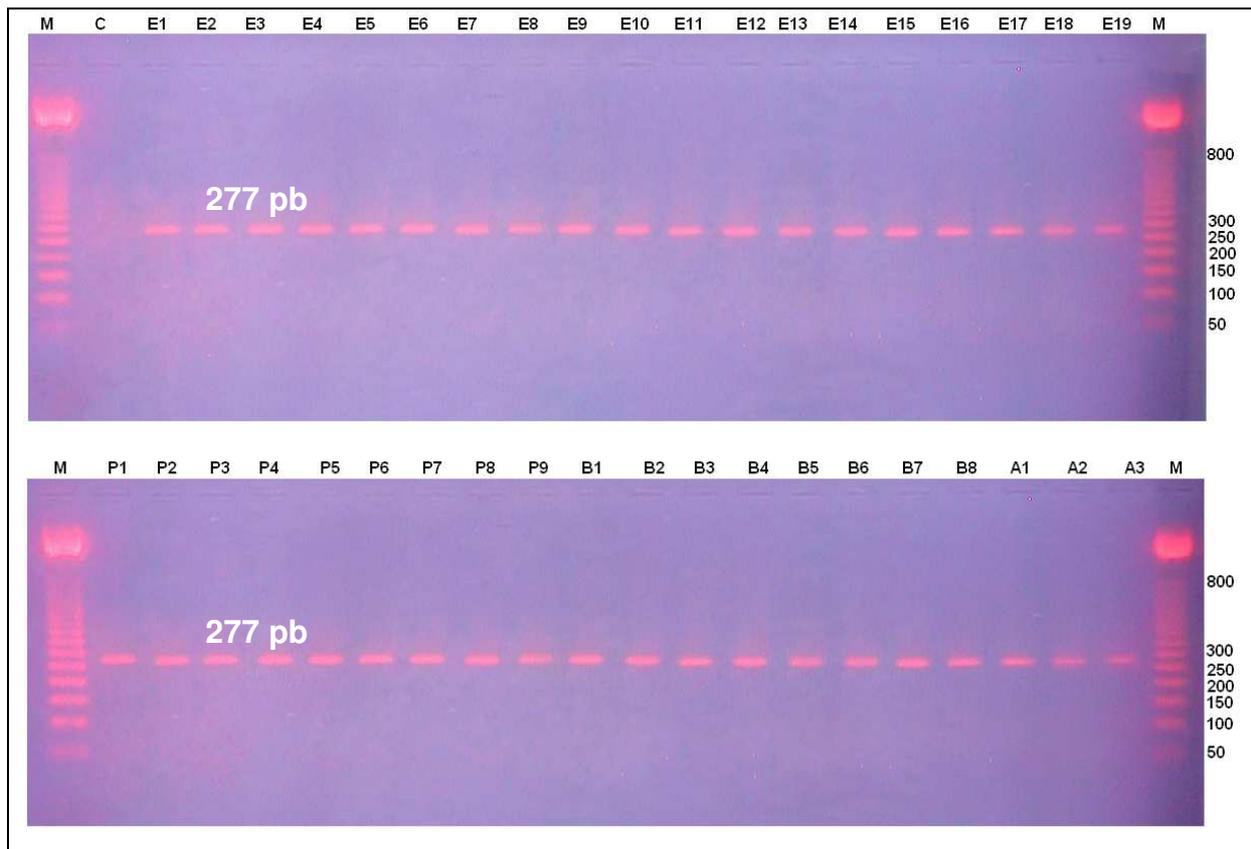
La paire d'amorce ZEIN3/ZEIN4 est utilisée pour détecter le gène Zein naturel du maïs en tant que contrôle de la qualité de l'ADN extrait. Si la qualité de l'ADN est suffisante, une bande spécifique Zein de 277 pb sera observée sur le gel (Querci *et al.*, 2006).

Pour les deux protocoles d'extraction utilisés, l'amplification a permis la production d'un fragment de 277 pb pour tous les échantillons analysés (Figures 18 et 19). Cela signifie que les deux protocoles ont permis d'obtenir un ADN de maïs amplifiable.



Echantillons : Semences et grains (E1-E19) ; Alimentation humaine (pop-corn : P1-P9 ; Boîtes de maïs : B1-B8) ; Alimentation animale (A1-A3) ; Contrôle PCR (C) ; Echelle de taille (M)

Figure 18. Profils électrophorétiques obtenus par amplification PCR de la séquence d'ADN cible du maïs à partir des ADN extraits avec le protocole au SDS.



Echantillons : Semences et grains (E1-E19) ; Alimentation humaine (pop-corn : P1-P9 ; Boîtes de maïs : B1-B8) ; Alimentation animale (A1-A3) ; Contrôle PCR (C) ; Echelle de taille (M)

Figure 19. Profils électrophorétiques obtenus par amplification PCR de la séquence d'ADN cible du maïs à partir des ADN extraits avec le protocole à base du CTAB.

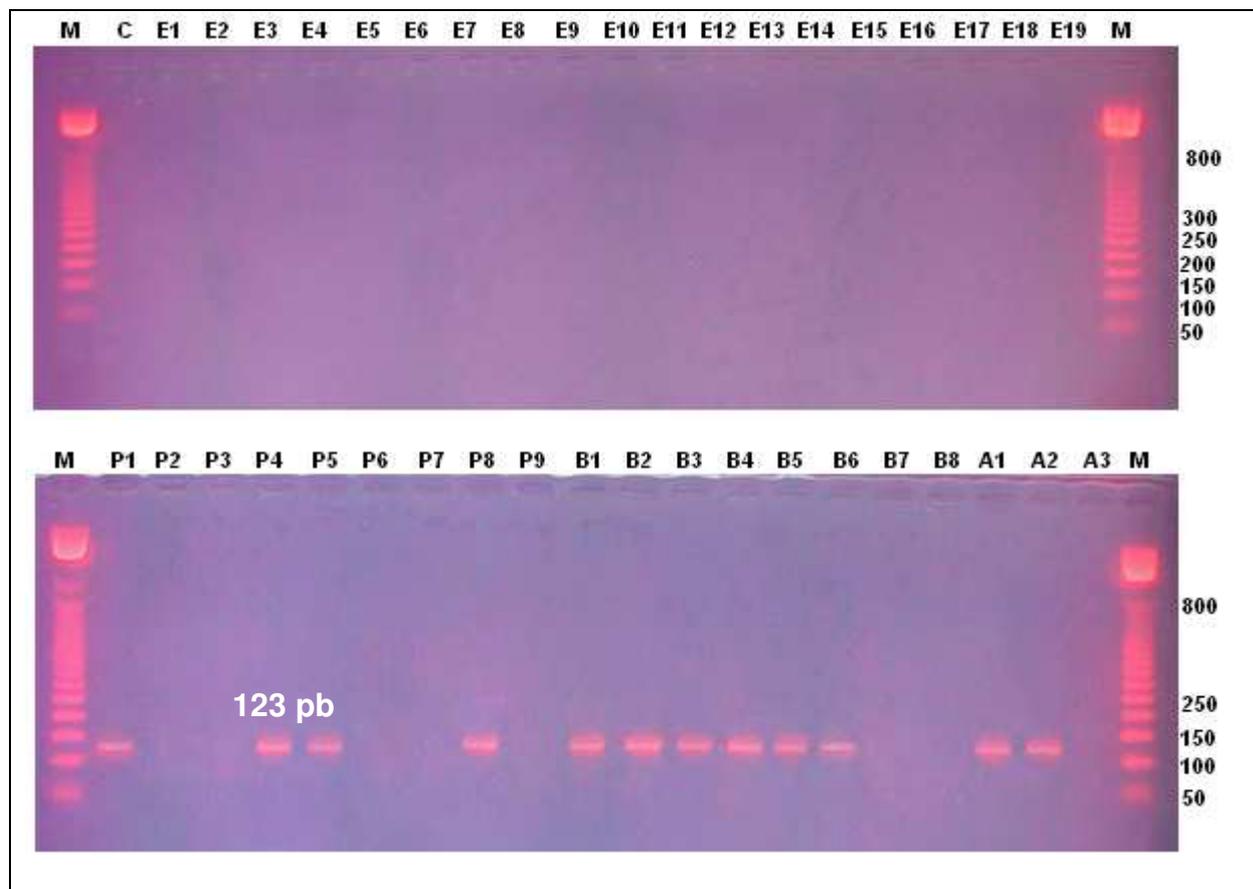
Cependant, comme le montre les figures 17 et 18, les bandes obtenues après amplification des ADN extraits par le protocole à base du SDS sont plus intenses que celles obtenues par le protocole à base du CTAB. Pour le contrôle PCR (C), aucun amplicon n'a été observé sur le gel.

4.1.2.2. Détection du promoteur 35 S

Pour la détection de la séquence du promoteur 35 S du CaMV, la paire d'amorce p35s-cf3 / p35S-cr4 produisant un fragment de 123 pb a été utilisée. Les échantillons d'ADN proviennent de l'extraction à partir du protocole à base de SDS.

Les produits de l'amplification révèlent la présence d'un fragment de l'ordre de 123 pb pour 12 échantillons sur l'ensemble des échantillons testés. Parmi ces derniers, dix sont destinés à l'alimentation humaine, notamment les échantillons issus de pop-corn (P1, P4, P5, P8) et de boîtes de maïs (B1, B2, B3, B4, B5, B6) et deux (A1 et A2) sont destinés à l'alimentation

animale. Pour le reste des échantillons, ainsi que pour le contrôle négatif (E1) et le contrôle PCR (C), aucune bande n'a été amplifiée (Figure 20).



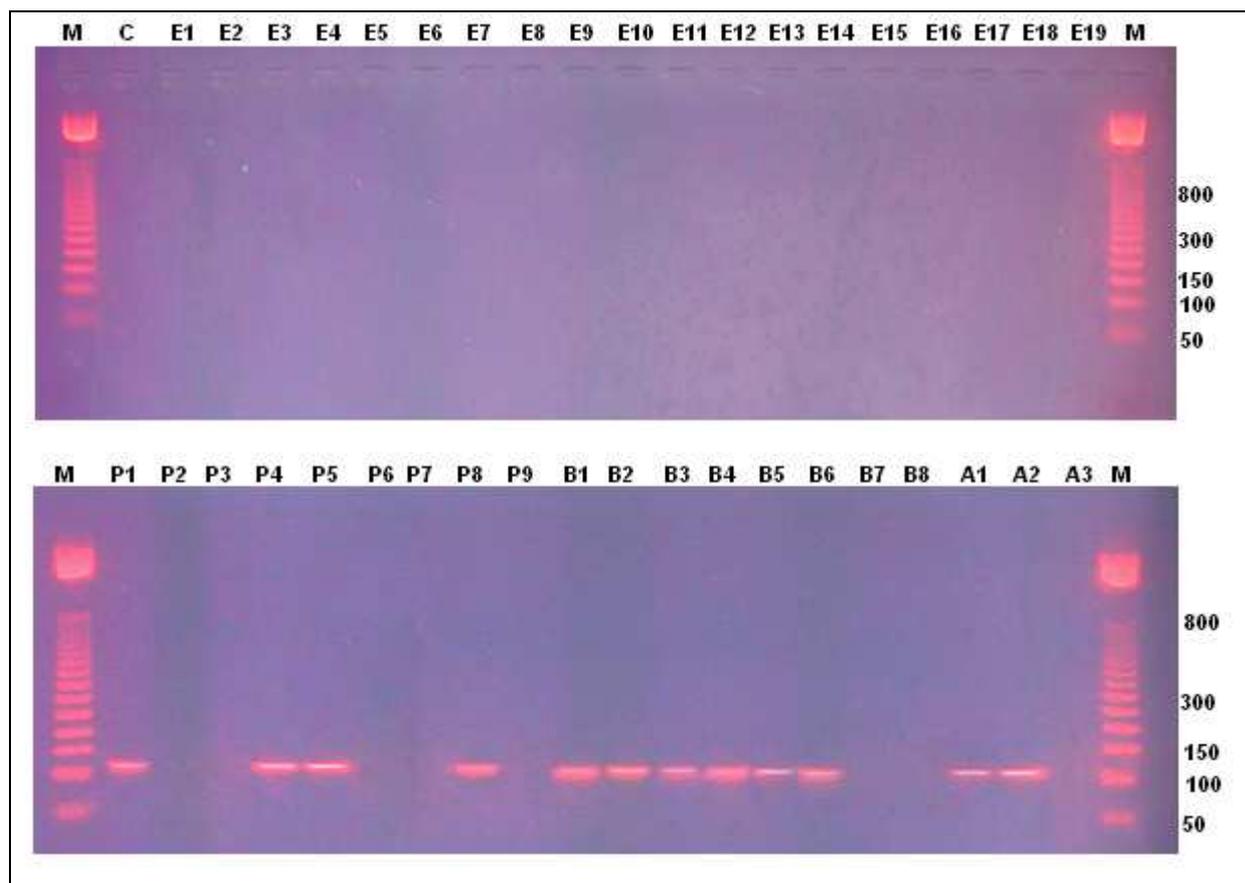
Echantillons : Semences et grains (E1-E19) ; Alimentation humaine (pop-corn : P1-P9 ; Boîtes de maïs : B1-B8) ; Alimentation animale (A1-A3) ; Contrôle PCR (C) ; Echelle de taille (M)

Figure 20. Profils électrophorétiques des échantillons obtenus par amplification PCR de la séquence cible du promoteur 35S du CaMV.

4.1.2.3. Détection du terminateur nos

En plus du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, l'élément génétique le plus couramment utilisé pour la régulation des transgènes est le terminateur nos. Au cours de cette étude, la paire d'amorces HA-nos 118-f et HA-nos 118-r a été utilisée pour détecter le T-nos en produisant un fragment de 118pb.

Une bande de 118 pb a été amplifiée pour les 12 échantillons déjà révélés positifs pour la présence du promoteur 35S. Il s'agit des échantillons destinés à l'alimentation du bétail (A1 et A2) et à l'alimentation humaine, pop-corn (P1, P4, P5, P8) et boîtes de maïs (B1, B2, B3, B4, B5, B6). Pour les échantillons destinés à l'agriculture (E1 à E19) aucune bande n'est visible sur le gel (Figure 21).



Echantillons : Semences et grains (E1-E19) ; Alimentation humaine (pop-corn : P1-P9 ; Boîtes de maïs : B1-B8) ; Alimentation animale (A1-A3) ; ContrôlePCR (C) ; Echelle de taille (M)

Figure 21. Profils électrophorétiques des échantillons obtenus par amplification PCR de la séquence cible du terminateur T-Nos.

4.1.2.4. Discussion

Au cours de cette étude, 39 échantillons de maïs sous forme de graine ont été analysés. L'ADN de chaque échantillon a été amplifié par trois paires d'amorces.

La première, ZEIN3/ZEIN4, est utilisée en tant que contrôle de la qualité de l'ADN extrait (Querci et Mazzara, 2006). Elle nous a permis de vérifier l'efficacité des deux protocoles d'extraction utilisés, le premier à base de CTAB (Somma, 2006) et le second à base du SDS (Tozzini et *al.*, 2000).

Pour ces deux protocoles, l'électrophorèse des amplifiats obtenus par cette paire d'amorce a révélé l'amplification du gène Zein pour tous les échantillons testés. Ces résultats confirment que les deux protocoles sont bien adaptés à l'extraction, à partir des graines de maïs, d'un ADN de qualité et quantité suffisantes et appropriées pour une analyse PCR. De plus, la comparaison des profils électrophorétiques des amplifiats montre que les bandes obtenues

par le protocole à base du SDS sont plus lumineuses que celles obtenues par le protocole à base de CTAB.

Deux autres réactions PCR ont été mises au point en utilisant les paires d'amorces p35s-cf3 / p35S-cr4 et HA-nos 118-f / HA-nos 118-r afin de détecter respectivement le promoteur 35S et le terminateur nos. En effet, la détection de ces deux séquences est couramment utilisée comme méthode de criblage pour la détection des OGM (Holst-Jensen *et al.*, 2003), car la plupart des événements de transformation mis sur le marché contient l'une des deux séquences ou bien les deux en même temps (Holden *et al.*, 2010).

Le criblage du promoteur 35S du CaMV seul n'est pas suffisant pour confirmer la présence d'OGM car 38% des OGM ne seront pas détectés (Meyer, 2006). La combinaison des deux séquences abaisse ce taux de faux négatifs à 28% (Von Götz, 2010).

De plus, il est important de faire la différence entre les aliments contenant des OGM des aliments non OGM infectés ou contaminés par le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) (Wolf *et al.*, 2000 ; Waiblinger *et al.*, 2010). Pour cela, la procédure préconise l'amplification du terminateur nos pour confirmer la présence du transgène régulé par le P-35S et non pas la présence du CaMV (Wolf *et al.*, 2000).

D'autres gènes peuvent également faire l'objet de cible pour un test de criblage comme le gène Phosphinotricine N-acetyl transférase (PAT), bar, néomycine phosphotransférase II (npt II) et le gène de la β -lactamase (Von Götz, 2010 ; Dörries *et al.*, 2010).

Les résultats de l'amplification montrent la présence du P-35S et du T-nos dans 12 échantillons sur l'ensemble des échantillons testés. Ces résultats permettent de proposer l'existence de lignées transgéniques régulées par les le promoteur 35S du CaMV et du terminateur nos. Par conséquent, tous les événements de transformation du maïs ayant des transgènes non régulés par l'une de ces séquences sont à écarter.

Cependant, tous les échantillons positifs à un test de criblage doivent être vérifiés en utilisant une méthode spécifique aux constructions ou aux événements de transformation (Holst-Jensen *et al.*, 2003 ; Griffiths *et al.*, 2003) afin d'identifier les événements ou les caractères introduits (Lipp *et al.*, 2005). Les résultats obtenus permettent cependant la réduction du nombre d'échantillons et ceux qui seront positifs seront analysés par des méthodes plus spécifiques (Waiblinger *et al.*, 2010 ; Michelini *et al.*, 2008).

Enfin, il est intéressant de signaler que ces tests de criblage sont l'une des stratégies analytiques utilisées pour détecter les OGM inconnus, pour lesquels aucun test spécifique n'est disponible (Dörries *et al.*, 2010).

4.2. Résultats de la détection sérologique par bandelettes

Au cour de cette étude, les différents échantillons collectés (semence, graine et feuille) ont été analysés quant à la présence des quatre protéines transgéniques suivantes : Cry 1Ab, Cry 1Ac, Cry 9C et CP4-EPSPS. Les tests ont été effectués conformément au protocole fourni par les fournisseurs du kit (Agdia) et en présence de deux contrôles : positif et négatif (Tableau 13).

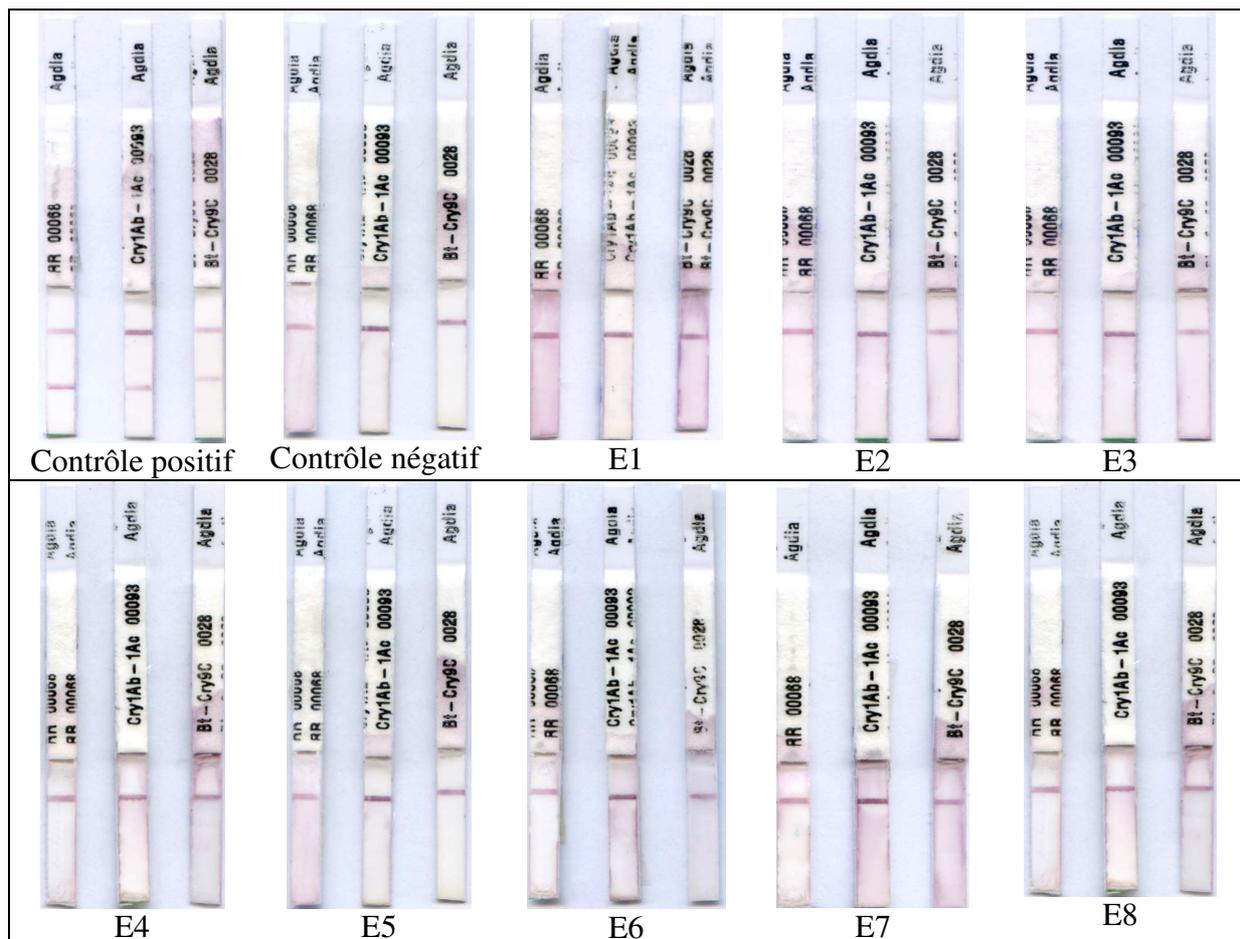
Tableau 13. Présentation des résultats des tests par bandelettes

Destination	Echantillon	Cry 9C	Cry 1Ab/1Ac	EPSPS
Agriculture et Alimentation humaine (Epis)	E1-E19	-	-	-
	F16-F17	-	-	-
Alimentation humaine (pop corn)	P 1	Positif	-	-
	P 2	-	-	-
	P 3	-	-	-
	P 4	Positif	-	-
	P 5	Positif	-	-
	P 6	-	-	-
	P 7	-	-	-
	P 8	Positif	-	-
	P 9	-	-	-
	F2	-	-	-
	F3	-	-	-
	F4	-	-	-
	F5	-	-	-
	Alimentation humaine (Maïs doux)	B 1	Positif	-
B 2		Positif	-	-
B 3		Positif	-	-
B 4		Positif	-	-
B 5		Positif	-	-
B 6		Positif	-	-
B 7		-	-	-
B 8		-	-	-
Alimentation animale	A1	-	Positif	Positif
	A2	-	Positif	Positif
	A3	-	-	-

Les résultats montrent l'apparition de la ligne de contrôle pour tous les échantillons testés, ce qui nous a permis de confirmer le bon fonctionnement des bandelettes. Concernant la ligne test, des réactions positives ont été observées pour dix échantillons de maïs destinés à l'alimentation humaine (pop corn et maïs doux) et deux échantillons destinés à l'alimentation animale (Tableau 13).

4.2.1. Maïs destiné aux cultures et à l'alimentation humaine (épis)

Sur l'ensemble des échantillons de maïs collectés dans les différentes régions du nord (E2 à E 19) aucune réaction positive n'a été observée pour les trois testes effectués (figure 22). Pour les échantillons de feuille F16 et F17 aucune protéine transgénique n'a été détectée, confirmant ainsi les résultats obtenus pour les échantillons de graine correspondant (E16 et E17).



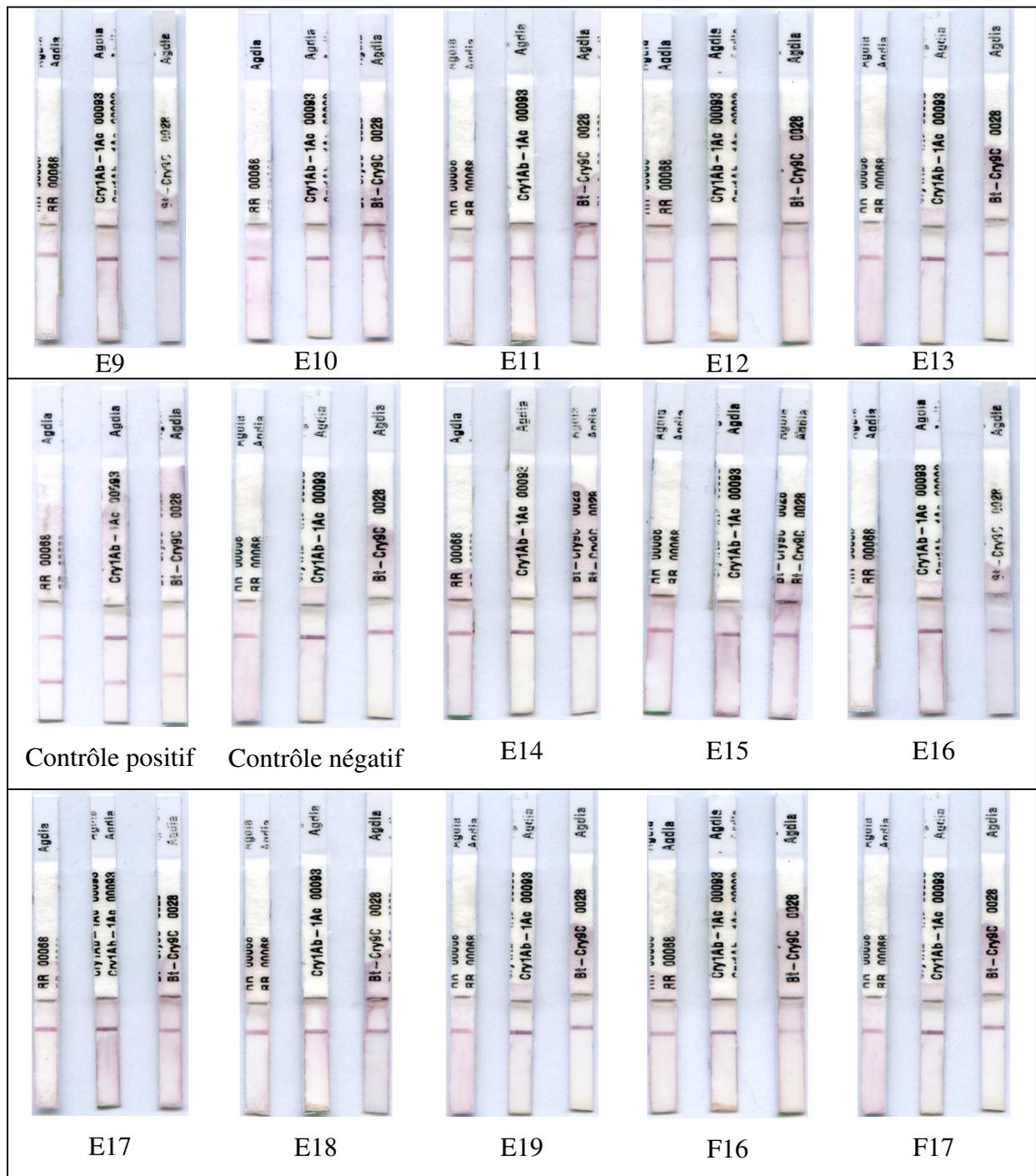


Figure 22. Résultats des tests bandelettes sur les échantillons de maïs destinés à l'alimentation humaine et aux cultures (épis).

4.2.2. Maïs destiné à l'alimentation humaine (pop corn et maïs doux)

Neuf échantillons de maïs pop corn ont été analysés, quatre parmi eux (P1, P4, P5 et P8) ont montré une réaction positive pour la protéine transgénique Cry 9C. Ces derniers,

importés tous d'Argentine, correspondent respectivement aux marques suivantes : Boom magic, Alicampo, Premium et Primore (annexe 4). Pour le reste des échantillons (P2, P3, P6, P7, P9, F2, F3, F4 et F5), des réactions négatives pour les quatre protéines transgéniques recherchées, ont été observées (Figure 23).

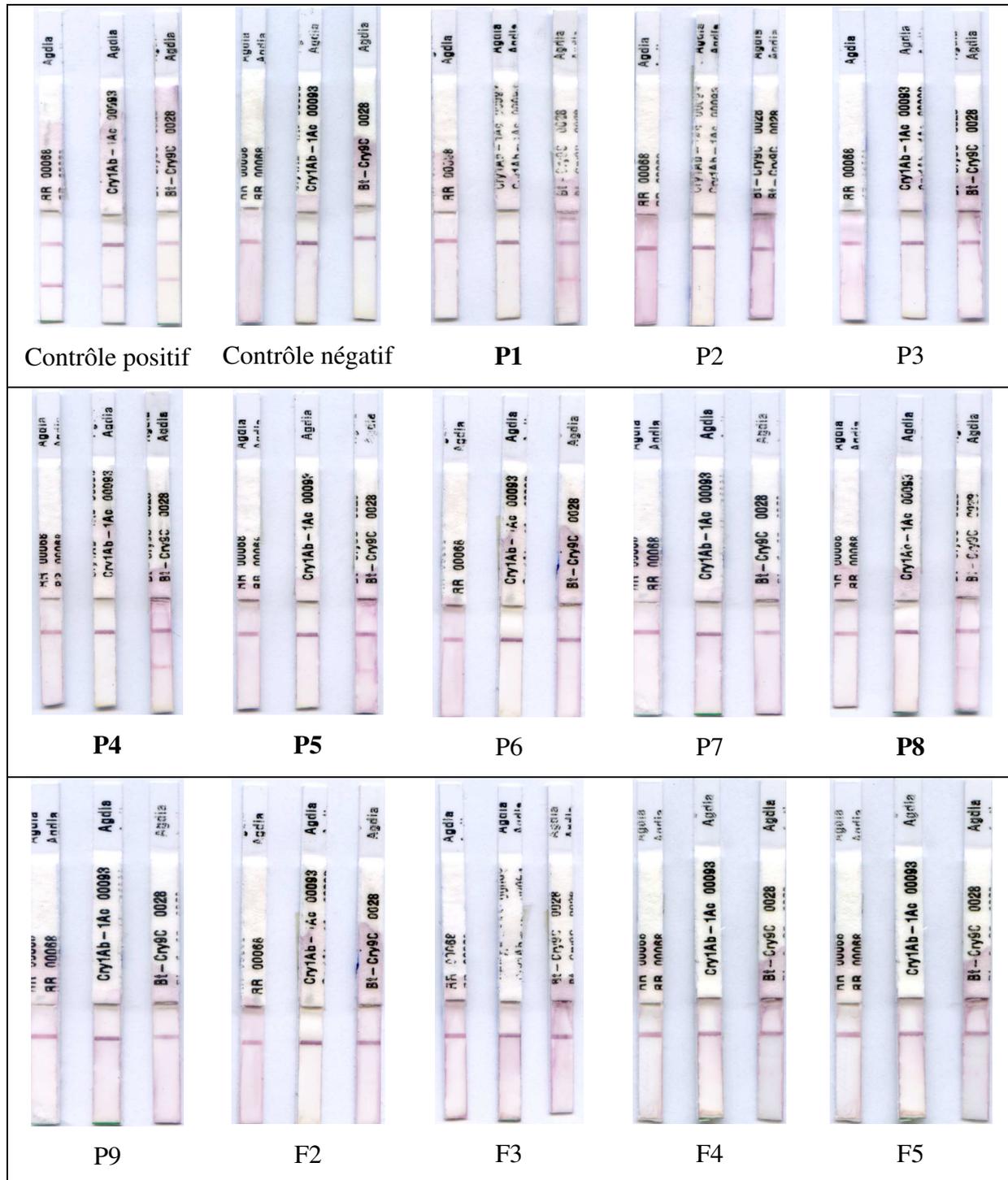


Figure 23. Résultats des tests bandelettes sur les échantillons de maïs destinés à l'alimentation humaine (pop corn).

Concernant les échantillons de maïs doux, six échantillons (B1 à B6) non étiquetés étaient tous positifs quant à la présence de la protéine Cry 9C. Les marques de ces échantillons sont respectivement : Del monte, Golden Land, Prince, Le jardinier, El mithali et D'aucy.

Deux échantillons seulement (B7 et B8) étiquetés "sans OGM" correspondant respectivement aux marques Princesse et Familia, étaient exempts des protéines transgéniques recherchées (Figure 24) et (annexe 5).

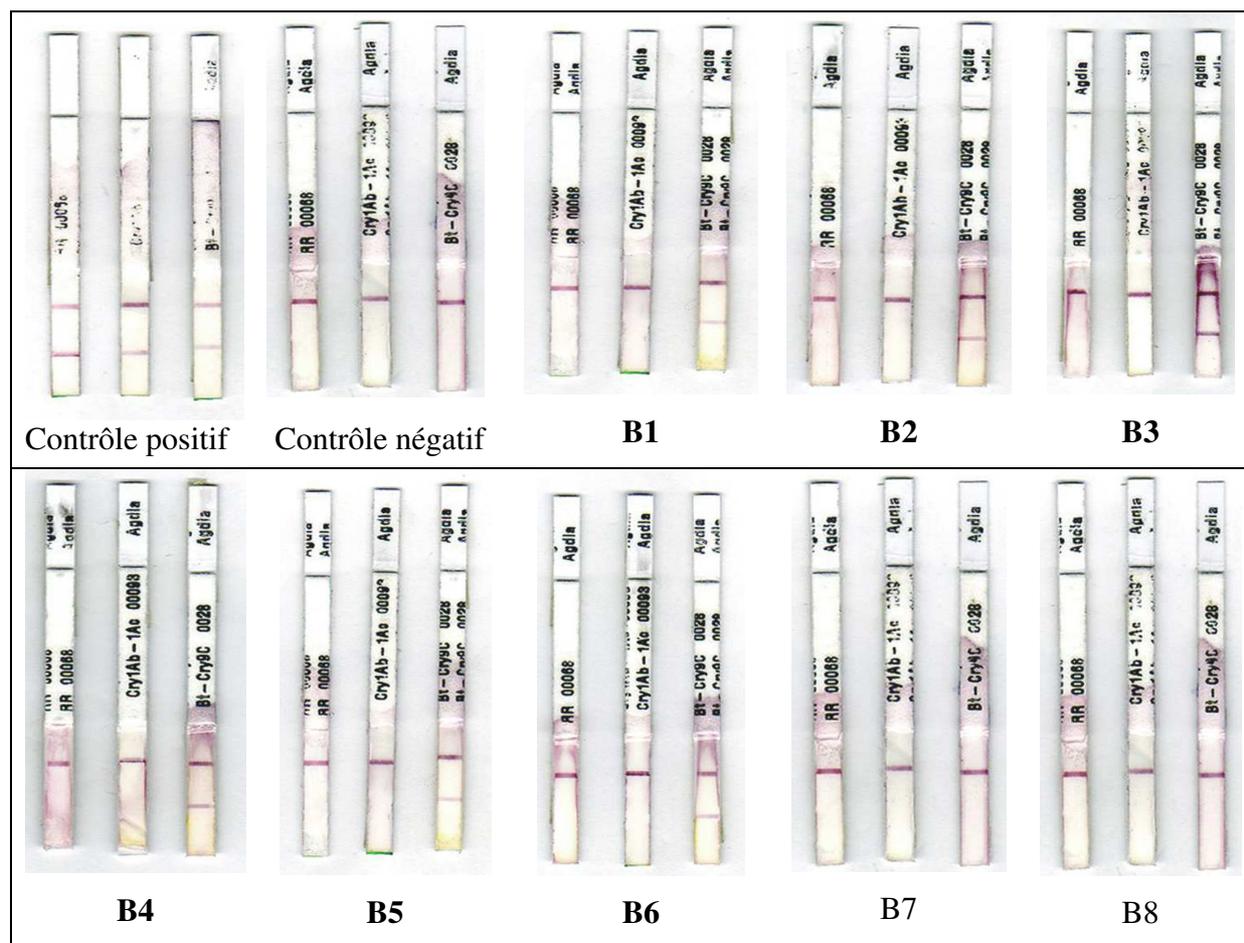


Figure 24. Résultats des tests bandelettes sur les échantillons de maïs destinés à l'alimentation humaine (maïs doux).

4.2.3. Maïs destiné à l'alimentation animale

Les deux échantillons de maïs (A1 et A2) provenant de l'Office National de l'Alimentation du Bétail (ONAB) d'Alger ont montré des réactions positives quant à la présence simultanée de deux protéines transgéniques : la protéine Cry 1Ab ou Cry 1Ac et la protéine CP4-EPSPS.

Le troisième échantillon A3 s'est avéré négatif pour les quatre protéines transgéniques recherchées (Figure 25).

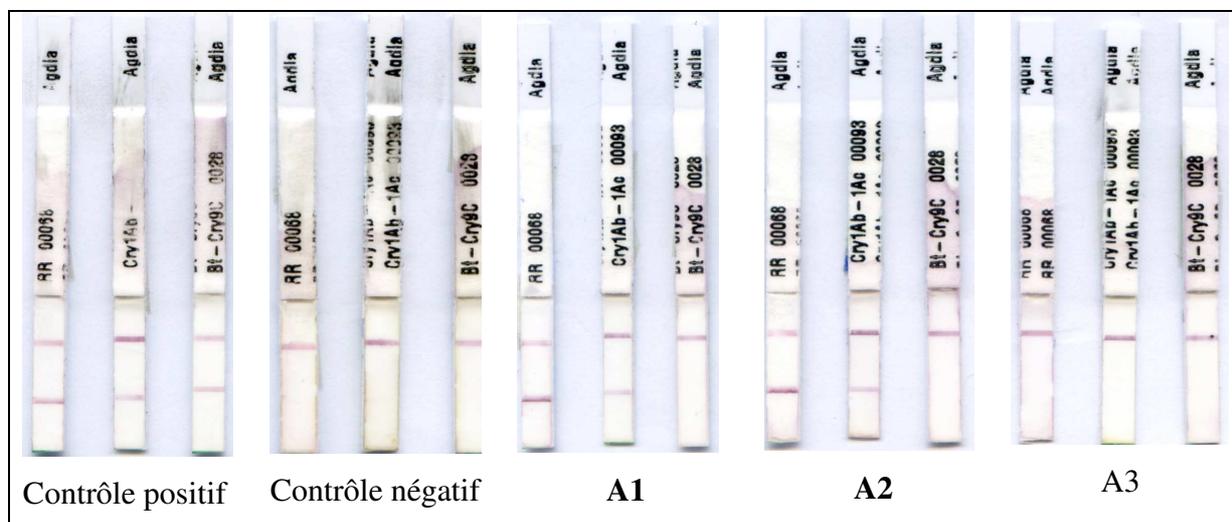


Figure 25. Résultats des tests bandelettes sur les échantillons de maïs destinés à l'alimentation animale.

4.2.4 Discussion

Sur les 45 échantillons testés, dix destinés à l'alimentation humaine contiennent la protéine transgénique Cry 9C et deux destinés à l'alimentation animale contiennent à la fois une protéine Cry (Cry 1Ab ou Cry 1Ac) et la protéine CP4-EPSPS. Au total, 12 échantillons positifs ont été détectés, ce qui représente 30% des échantillons analysés.

L'utilisation des contrôles positifs et négatifs, montre que les sérums dirigés contre les protéines transgéniques issues de bactéries, ne reconnaissent pas les protéines végétales et qu'il n'existe donc aucune réaction croisée, comme cela a pu être confirmé dans d'autres travaux (Van den Bulcke et *al.*, 2007). De plus, ces résultats de détection sur bandelettes confirment les résultats obtenus au cours de l'analyse de séquences d'ADN cibles par PCR, suggérant ainsi la présence d'OGM dans le maïs destiné à l'alimentation. Par ailleurs, ils nous permettent de conclure sur la fiabilité et la spécificité de ces tests pour des analyses de routine.

Sur l'ensemble des événements de transformation contenant des transgènes Bt, le CBH-351 est le seul qui contient le gène Cry 9C codant pour l'endotoxine Cry9C. Nos résultats montrent que 10 échantillons ont été détectés et identifiés comme étant la lignée de maïs

CBH-351 (non commercial StarLink) mise au point par Aventis Crop Science (Agbios, 2009). Ce résultat met en évidence une carence des systèmes réglementaires dans la mesure où dans le monde, ce maïs est clairement interdit à la consommation humaine.

En ce qui concerne les échantillons de maïs destinés à l'alimentation animale (A1 et A2), trois possibilités sont envisagées :

- il s'agit de lignée de maïs transgénique à double caractères, produisant simultanément une endotoxine Cry (Cry 1Ab ou Cry 1Ac) et la protéine CP4-EPSPS. D'après les bases de données (Agbios, 2009), une seule lignée transgénique contient le gène Cry 1Ac, la lignée DBT 418. Cependant cette lignée ne produit pas la protéine transgénique CP4-EPSPS, ce qui permet de l'exclure et de conclure que les lignées transgéniques présentes dans les échantillons d'alimentation animale combinent les caractères Cry 1Ab et CP4-EPSPS. Dans ce cas, il s'agirait des lignées Mon 802, Mon 809 ou Mon 80100.
- Il s'agit d'un hybride issu d'un croisement conventionnel entre deux lignées transgéniques, une lignée Bt et une lignée RR. Plusieurs lignées possèdent ces deux caractères comme : NK 603 X MON 810 ; MON 810 X MON 88017 ; Bt11 X GA21 GA21X MON 810 ; MON 863X MON 810 X NK603 ; Bt11X MIR 604 X GA21.
- Une mixture de deux lignées transgéniques bien distinctes (Bt et RR)

Dans le premier cas de figure, l'identification des évènements de transformation est possible grâce aux méthodes de détection spécifiques aux évènements de transformation. Par ailleurs, à l'heure actuelle, il n'y a aucune approche analytique qui permet la distinction entre le deuxième et le troisième cas à savoir, la distinction entre un mélange de deux lignées et un croisement entre celles-ci (Akiyama et *al.*, 2005 ; Holden et *al.*, 2010 ; Von Götzt, 2010).

Concernant la concentration des trois protéines transgéniques, le fournisseur des kits (Agdia) précise que les bandelettes ont une sensibilité d'une graine GM pour 1000 graines de maïs non GM, soit 0,1%. Ceci nous permet de suggérer que la présence d'OGM est détectée dans nos 12 échantillons à un taux supérieur ou égal à 0,1%.

D'après les bases de données de Agbios (2009), les concentrations les plus élevées de certaines protéines transgéniques ont été révélées dans les tissus foliaires. Ceci nous a amené à faire germer des graines de certains lots de pop corn (P2, P3, P4 et P5) et de semences (E16 et E17) pour obtenir les plantules (F2, F3, F4, F5, F16 et F17). Les résultats

ont confirmé l'absence de protéines transgéniques dans les lots P2, P3, E16 et E17. Cependant, les échantillons de feuilles F4 et F5 se sont révélés négatifs également alors que les échantillons de graines correspondants, P4 et P5 étaient positifs quant à la présence de la protéine Cry 9C. Dans la mesure où ces deux lots ont été criblé sur la base des séquences du promoteur P35S du CaMV et du terminateur T-nos et identifié par le test bandelette, ce résultat peut être expliqué soit par une faible expression du transgène au niveau des tissus foliaires, ou bien par une instabilité des transgènes au cours de la germination et de la croissance des plantules.

Concernant les échantillons de pop corn P1 et P4 étiquetés sans OGM, la présence du transgène a été confirmée par les deux méthodes de détection utilisées. Ce ci montre la nécessité de renforcer le contrôle des OGM et de vérifier nous même le contenu de nos cargaisons.

Nos résultats ont également montré que les lots de maïs destinés aux semences ne montraient pas la présence d'OGM sur la base des marqueurs utilisés et en semblent exemptes ce qui conforte la législation en vigueur sur l'interdiction de la dissémination du matériel végétal de multiplication génétiquement modifié dont les semences. Cependant, il faut signaler que les lots destinés à l'alimentation sous forme de grain pose également un problème de dissémination car une germination est possible comme cela a été observé pour le maïs pop corn.

Conclusion générale

5. Conclusion générale

La dissémination des OGM et notamment leur introduction dans l'agriculture et la chaîne alimentaire a suscité des craintes quant à de nouvelles répercussions néfastes sur l'environnement et la santé humaine. Ces préoccupations sont au cœur de la Convention sur la diversité biologique qui a fourni le cadre des négociations du Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques.

En ayant ratifié le Protocole en 2004 et vu les importations massives des produits destinés à l'alimentation et à la transformation et l'ouverture du marché des intrants agricoles, l'Algérie doit combler le vide réglementaire et législatif en matière de contrôle et d'évaluation des risques liés à l'utilisation des OGM. Par ailleurs et afin de renforcer leur contrôle, la mise en place d'une politique d'étiquetage concernant les produits manufacturés semble nécessaire, dans la mesure où les OGM sont interdits dans le monde et voire même inconnus.

Afin d'avoir un aperçu partiel du degré d'introduction des OGM, notre étude a porté sur le maïs par l'analyse d'échantillons issus de semences, de grains pour l'alimentation humaine et animale ainsi que des produits manufacturés destinés à l'alimentation humaine (Boîtes de maïs doux et pop corn). Pour cela deux méthodes qualitatives ont été appliquées : l'une est basée sur la détection de séquences d'ADN connues pour être présentes dans de nombreux OGM (Promoteur P-35S du caMV et Termineur T-nos) par amplification PCR et l'autre sur la détection de la présence de trois protéines transgéniques (Cry 1Ab/1Ac, Cry 9C et CP4-EPSPS) par les tests immunoenzymatiques sur bandelettes.

Pour la première méthode, une mise au point préalable a été réalisée pour optimiser la méthode d'extraction de l'ADN. Deux protocoles ont été comparés et diffèrent principalement par l'utilisation soit du SDS, soit du CTAB. Les résultats montrent que ces deux protocoles sont quasi équivalents et sont de toute façon préconisés pour l'extraction d'ADN amplifiable à partir des graines de maïs. Cependant, il est à noter que celui à base de SDS, en plus de sa simplicité, a permis d'obtenir des résultats relativement meilleurs du point de vue qualitatif et quantitatif.

L'analyse qualitative par criblage des séquences régulatrices d'ADN, a permis la détection de 12 échantillons positifs dont 10 sont destinés à l'alimentation humaine et deux à l'alimentation animale. Les résultats de l'analyse immunoenzymatique ont été confirmés par les résultats obtenus par PCR puisque les 12 échantillons positifs au criblage ont montré la

présence d'une ou deux protéines transgéniques et notamment la présence de la protéine Cry 9C.

Ces résultats montrent qu'il est donc possible de détecter de manière qualitative les OGM. Ils suggèrent aussi que la détection de la protéine Cry9C pose un réel problème car celle-ci est retrouvée dans le maïs StarLink, maïs qui avait dès 1998 posé des problèmes d'allergies et avait été retiré des réseaux de distribution aux Etats-Unis et complètement interdits dans l'Union Européenne. Il faut signaler également que ce maïs était destiné uniquement à l'alimentation animale et que de ce fait, il semble difficile puisqu'il a été retrouvé dans l'alimentation humaine de mettre en place des procédures rigoureuses pour la ségrégation des filières. Pour cela, il est relativement important en parallèle de la mise en place du cadre national de biosécurité de renforcer l'étiquetage des denrées alimentaires en ajoutant des règles concernant les OGM et des mécanismes permettant le contrôle.

Nos résultats montrent également que les échantillons de maïs destinés aux cultures semblent ne pas contenir d'OGM et ceci avec les deux méthodes utilisées. Il est clair que le maïs n'est pas une culture d'intérêt en Algérie mais il semble que l'importation des semences obéit à la réglementation en vigueur.

En conclusion, ce travail a permis de mettre au point un protocole de détection de routine se basant sur une méthode d'extraction relativement simple et un criblage pratiquement réalisable. Les perspectives entrevues sont d'une part :

- D'améliorer le travail de détection sérologique car celui-ci est relativement simple à mettre en place. La mise au point d'outils tels que des sérums spécifiques et les tests qualitatifs et quantitatifs pourrait également être envisagée afin de ne plus être dépendants des kits produits par quelques fournisseurs seulement.
- De poursuivre le travail d'identification par la détection des séquences d'ADN en développant les méthodes spécifiques aux OGM et aux évènements de transformation afin d'identifier les lignées transgéniques présentes. Par ailleurs, et dans la perspective d'une évaluation au cas par cas avec des procédures incluant des seuils d'acceptabilité, le développement des méthodes quantitatives par PCR en temps réel serait à envisager.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Afssa, 2002. Evaluation des risques relatifs à la consommation de produits alimentaires composés ou issus d'organismes génétiquement modifiés, 40 p. Disponible sur le site : <http://www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/1999sa0035.pdf>

Agbios, 2009. GM Database. Disponible sur le site : <http://www.agbios.com/dbase.php?action=ShowForm>.

AGPM ,2009. Disponible sur le site : <http://www.agpm.com/>

Ahmed F.E., 2002. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, Vol.20, pp.215-223.

Ahmed F.E., 2004. Protein-based methods: Elucidation of the Principles.pp.117-146.In: Testing of genetically modified organisms in food. Food Products Press, New York • London • Oxford.

Aigle M., Chupeau Y., Schoonejans E., 1996. Les plantes transgéniques résistantes aux herbicides pp.111-128. In : Les plantes transgéniques en agriculture : Dix ans d'expérience de la commission du Génie Biomoléculaire. Ed. Kahn A. Italie.

Akiyama H., Watanabe T., Wakabayashi K., Nakade S., Yasui S., Sakata K., Chiba R., Spiegelhalter F., Hino A., Maitani T., 2005. Quantitative Detection System for Maize Sample Containing Combined-Trait Genetically Modified Maize. *Analytical Chemistry*, vol.77, pp.7421–7428.

ALGEX (Agence national de promotion du commerce extérieur) ,2008. Commerce extérieur de l'Algérie.14p.

Amand P.S., 2004. Risks Associated with Genetically Engineered Corps.pp.351-363. In: Genetically Modified Crops: Their Development, Uses, and Risks. Ed. Liang, G. H., Skinner D. Z., New York.

Andow D.A., 2008. The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. *Collection of biosafety reviews*, Vol.4, pp.142-199. Disponible sur le site: <http://www.icgeb.org/~bsafesrv/publications/collections.html>

Anklam E., Gadani F., Heinze P., Pijnenburg H., Van Den Eede G., 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology*, Vol. 214, pp.3–26.

Armstrong C.L., Green C.E., Phillips R.L., 1991. Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*, Vol.65, pp.92-93.

Barry G. F., Kishore G. M., Padgett S. R., Stallings W. C., 1997. U.S. Patent 5633435.

Barry G. F., Kishore G. M., Padgett S. R. 1992 .Int. Patent 92_04449.

Bast, 2003. Genetically Modified (GM) Crops: Molecular and Regulatory Details. Version 2, BATS Centre for Biosafety and Sustainability, 192 p. Disponible sur le site: <http://www.bats.ch/gmo-watch/index.php>.

Baudoin J-P., Demol J., Louant B-P., Maréchal R., Mergeai G., Otoul E., 2002. Amélioration des plantes. Application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. Ed. Les presses agronomiques de Gembloux. 584p.

Beckie HJ., Warwick Sl., Nair H., Séguin-Swartz G., 2003. Gene flow in commercial fields of herbicide resistant canola (*Brassica napus*). *Ecological Applications*, Vol. 13, pp.1276-1294.

Beegle C.C., Yamamoto T., 1992. Invitation paper (C.P. Alexander Fund) : History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *Canadian Entomologist*, Vol.124, pp.587-616.

Belzile F. J., 2002. Transgenic, transplastomic and other genetically modified plants. *Biochimie*, Vol. 84, pp.1111-1118.

Benzaghoul M., 1976. Situation de la culture du maïs en Algérie .Perspective de développement. Mémoire de fin d'étude, Ministère de l'agriculture et de la réforme agraire ,121p.

Berben G., Janssen E., Debode F., 2000. Détection, identification et quantification des transgènes dans les aliments par quantification génique. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, Vol 4, pp.208-213.

Berdal K.G., Holst – Jensen A., 2001. Roundup Ready soybean event specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *European Food Research Technology*, Vol. 213, pp.432–438.

Bernal J.S., Griset J.G., Gillogly P.O., 2002. Impacts of developing on Bt maize-intoxicated hosts on fitness parameters of a stem borer parasitoid. *Journal of Entomological Science*, Vol.37, pp. 27-40.

Bertolla F., Simonet P., 1999. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and micro-organisms. *Research in Microbiology*, Vol.150, pp.375-384.

Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Logendra S., Petersen F., Gleba Y., Raskin I., 1999. Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nature Biotechnology*, Vol 17, pp.466-469.

Bourbousse C., 2006. Document de travail pour la réalisation d'un guide destiné aux agriculteurs et coopératives dans le cadre de la coexistence des filières OGM –non OGM Université Paris XI, 35p.

Bourguet D., Genissel A., Raymond M., 2000. Insecticide resistance and dominance levels. *Journal of Economic Entomology*, Vol.93, pp.1588-1595.

Bourguet D., Desquilbet M., Lemarié S., 2002. Gestion des maïs Bt aux USA. Mise en place des zones refuges. Document Inra. Disponible sur le site : <http://www.inra.fr/dpenv/bourgc48.htm>.

Bourguet D., 2006. Gestion de la résistance des insectes phytophages aux plantes génétiquement modifiées pp.93-94. In : Organismes génétiquement modifiés : aspects socio-

économiques, alimentaires et environnementaux, Premier séminaire de restitution du Programme ANR-OGM à Paris, 14 et 15 décembre 2006.

Brett G.M., Chambers S.J., Morgan M.R.A., 1999. Design and development of immunoassays for detection of proteins. *Food Control*, Vol. 10, pp 401–406.

Brink M., Belay G., 2006. Ressources végétales de l'Afrique tropicale 1. Céréales et légumes secs. Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas. 328p.

Castaldini M., Turrini A., Sbrana C., Benedetti A., Marchionni M., Mocali S., Fabiani A., Landi S., Santomassimo F., Pietrangeli B., Nuti M.P., Miclaus N., Giovannetti M., 2005. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, pp. 6719–6729.

Ceballos L., Kastler G., 2004. OGM, sécurité, santé : ce que la science révèle et qu'on ne nous dit pas. Synthèse des publications scientifiques concernant l'impact des cultures OGM sur l'environnement, la santé et la biodiversité, Editions Nature & Progrès, 94p.

Ceballos L., 2008. Impacts environnementaux des plantes Bt – Résumé. 17p.

Charle D., 2001, Lords of the Harvest: Biotech, Big Money, and the Future of Food. Ed. Perseus, Cambridge, 352 p.

Charrier A., Jacquot M., Hamon S., Nicolas D., 2004. L'amélioration des plantes tropicales. Ed. CIRAD, 630 p.

Clark M.F., Adams A.N., 1977. Immunosorbent assays in plant pathology. *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 19, pp. 475-483.

CMA / AOC, 2005. Conférence des Ministres de l'Agriculture de l'Afrique de l'Ouest et du Centre. Filière maïs dans la zone CMA/AOC, Note technique, 10p.

CNIS (Centre National de l'Information et des Statistiques), 2009.

Cochet O., Teillaud J L., Sautès C., 1998. Immunological Techniques Made Easy, Ed. Wiley J. 352 p.

Collonier C., Berthier G., Boyer F., Duplan M-N., Fernandez S., Kebdani N., Kobilinsky A., Romanuk M., Bertheau Y., 2003. Characterization of commercial GMO inserts: a source of useful material to study genome fluidity. In : Poster courtesy of Pr. Gilles-Eric Seralini, Président du Conseil Scientifique du CRII-GEN, www.crii-gen.org

Craig W., Tepfer M., Degrassi G., Ripandelli D., 2007. An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops, *Euphytica* , 28p.

Dalecky A., Bourguet D., Ponsard S., 2007 .Does the European corn borer disperse enough for a sustainable control of resistance to maize via the High Dose /Refuge strategy ? *Cahiers agriculture*, Vol.16, N°3, pp.171-176.

Debuissy C., 2003.Propagation des risques biotechnologiques : le cas du maïs StarLink, Ed. CIRANO (centre interuniversitaire de recherche et d'analyse des organisations), Montréal ,50p.

Deisingh A K., Badrie N., 2005. Detection approaches for genetically modified organisms in foods. *Food Research International*, Vol.38, pp.639-649.

Delabays N., Bohren C., 2007. Le glyphosate: bilan de la situation mondiale et analyse de quelques conséquences malherbologiques pour la Suisse. *Revue suisse de viticulture arboriculture horticulture*, Vol. 39, N° 5, pp. 333-339.

Dellaporta S., Wood J., Hicks J.B., 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. N°1, pp. 19-21.

De Maagd R., Bosch D., Stiekema W., 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in plant science*, Vol. 4, pp.9-13.

Demont M., Tollens E., 2004. First impact of biotechnology in the EU: Bt maize adoption in Spain, *Annals of applied biology*, Vol.145, pp.197-207.

De Vries J., Wackernagel W., 1998. Détection de gènes nptII (résistance à la kanamycine) dans les génomes de plantes transgéniques. *Molecular and General Genetics* , Vol.257, pp. 606-613.

Dively G.P., Rose R., Sears M.K., Hellmich R.L., Stanley-Horn D.E., Calvin D.D., Russo J.M., Anderson P.L. 2004. Effects on monarch butterfly larvae (Lepidoptera: Danaidae) after

continuous exposure to Cry1Ab expressing corn during anthesis. *Environmental Entomology* Vol.33, pp.1116-1125.

Do N., Adams R.P., 1991. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *BioTechniques*, Vol.10, pp. 162–166.

Dorey E., 2000. Taco dispute underscores need for standardized tests. *Nature Biotechnology*, Vol.18, pp.1136-1137.

Dörries H.H., Remus I., Grönewald A., Grönewald C., Berghof-Jäger K., 2010. Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 396 pp.2043–2054.

Dutton A., Klein H., Romeis J., Bigler F., 2002. Uptake of Bt-toxin in herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecological Entomology*. Vol.27, pp.441-447.

Elenis DS., Kalogianni DP., Glynou K., Ioannou PC., Christopoulos TK., 2008. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol.392, N°3, pp.347-354.

Elmore R.W., Roeth F.W., Nelson L.A., Shapiro C.A., Klein R.N., Knezevic S.Z., Martin A., 2001. Glyphosate resistant soybean cultivar yields compared with sister lines. *Agronomy Journal* ,Vol. 93, pp. 408-412.

Engel K.H., Mareano F., Ehlert A., 2006. Methods for detection of genetically modified organisms in composite and processed foods. Pp. 219-247. In: Genetically engineered food: Methods and detection. Ed.Heller K.J., Weinheim, Germany.

Eyquem F., 2006. Module 12 : Détection quantitative du Soja Roundup Ready par ELIZA.23p. In: Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. Ed. Ed. Querci M, Jermini M, Van Den Eede G, Italie.

Fang G., Hammar S., Grumet R., 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA, *BioTechniques*, Vol.13, pp. 52–55.

FAOSTAT, 2009.<http://faostat.fao.org/>

FAO/OMS, 2004. Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. Commission du codex alimentarius. Rapport de la 25^{ème} session du comité du code sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage, Budapest (Hongrie), 8 -12 Mars 2004 ,144p.

Feillet P., 2009. OGM, le nouveau Graal ? Un dialogue à quatre voix Le scientifique, l'écologiste, l'industriel et le journaliste. 57 p.

Felke M., Lorenze N., Langenbruch. G.-A., 2002. Laboratory studies on the effects of pollen from Bt-maize on larvae of some butterfly species. *Journal of Applied Entomology*; Vol.126, pp.320-325.

Fernandez-Cornejo J., McBride W., 2000. Genetically engineered crops for pest management in US agriculture: farm-level effects, USDA-Agricultural Economic Research service Agricultural Economics Report 786, Washington DC (USA). 28p.Disponible sur le site : <http://www.ers.usda.gov/publications/aer786/>

Ferré J., Van Rie J., 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* , Vol. 47, pp. 501-533.

Flores S., Saxena D., Stotzky G., 2005. Transgenic *Bt* plants decompose less in soil than non-Bt plants. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol.37, pp. 1073– 1082.

Friesen L.F., Nelson A.G., Van Acker RC., 2003. Evidence of contamination of pedigreed canola (*Brassica napus*) seed lots in Western Canada with genetically engineered herbicide resistance traits. *Agronomy Journal*, Vol. 95, pp.1342-1347.

Funke T., Han H., Healy-Fried M.L., Fischer M., Schonbrunn E., 2006. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 103, N° 35, pp.13010-130105.

Gallais A., Ricroch A., 2006. Plantes transgéniques : faits et enjeux. Ed.Quae, 284 p.

Gebhard F., Smalla K., 1998. Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 64, pp.1550-1554.

Gelvin S.B., 2003. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 67, pp.16-37.

GIPSA, 2000. Sampling for the detection of biotech grains. Disponible sur le site : <http://archive.gipsa.usda.gov/biotech/sample2.htm>.

GNIS, 2009. Disponible sur le site: <http://www.gnis.fr>

Gomez-Barbero M., Rodriguez-Cerezo E., 2006. Economic Impact of Dominant GM Crops Worldwide: Review, UPOPEAN COMMISSION DG JRC-IRTS Sustainability in Agriculture, Food and Health Unit, 49 p.

Gould F., Anderson A., Reynolds A., Bumgarner L., Moar W.J., 1995. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Economic Entomology*, Vol.88, pp.1545-1559.

Gould F., 1998 .Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology*, Vol. 43, pp. 701-726.

Gouse M., Pray C., Kirsten J., Schimmelpfenning D., 2005. A GM subsistence crop in Africa: the case of Bt white maize in South Africa, *International Journal of Biotechnology*, Vol 7, pp.84-94.

Graham G., 2001, Learning from the “Terminator”debacle, *International Journal of Biotechnology*, Vol.3, pp. 260-266.

Grain, Genetic Resources Action International, 2000. Des agents des droits de propriété intellectuelle (DPI) cherchent à faire dérailler le processus de l’OUA. 7 pages.

Griffiths K., Partis L., Croan D., Wang N., Emslie K. 2003. Review of technologies for detecting genetically modified materials in commodities and food. Australian Government Analytical Laboratories, 118p.

Griffiths B.S., Caul S., Thompson J., Birch A.N.E., Scrimgeour C., Andersen M.N., Cortet J., Messean A., Sausse C., Lacroix B., Krogh P.H., 2005. A comparison of soil microbial community structure, protozoa, and nematodes in field plots of conventional and genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Plant and Soil*. Vol.275, pp.135–146.

Hansen Jesse L.C., Obrycki J.J., 2000. Field deposition of Bt transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia*, Vol.25, pp. 241-248.

Heck. G. R., Armstrong C. L., Astwood J. D., Behr C. F., Bookout J. T., Brown S. M., Cavato T. A., DeBoer D. L., Deng M. Y., George C., Hillyard J. R., Hironaka C. M., Howe A.R., Jakse E. H., Ledesma B.E., Lee T.C., Lirette R.P., Mangano M. L., Mutz J. N., Qi Y., Rodriguez, R. E., Sidhu S. R., Silvanovich A., Stoecker M. A., Yingling R. A., You J., 2005. Genomics, molecular genetics and biotechnology: Development and Characterization of a CP4 EPSPS-Based, Glyphosate-Tolerant Corn Event. *Crop Science*. Vol. 44, pp.329–339.

Heid CA., Stevens J., Livak KJ., Williams PM., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, Vol.6, pp.986-994.

Hellmich R. L., Albajes R., Bergvinson D., Prasifka J.R., Wang Z.,Weiss M.J.,2008. The Present and Future Role of Insect-Resistant Genetically Modified Maize in IPM. Pp.119-158. In : Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs. Springer Netherlands.

Hemmer W., 1997. Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. Biosafety Research and Assessment of Technology Impact of the Swiss Priority Program Biotechnology – Report 2/97, 61p

Hilbeck A., Baumgartner M., Fried P.M., Bigler F., 1998. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology*, Vol.27, pp. 480-487.

Hilbeck A., Andow D.A., Fontes E.M.G., 2006. Environmental Assessment of genetically modified organisms.Vol.2.Methodologies for Assessment Bt cotton in Brazil. CABI publishing. 373 P.

Hoffman T., Golz C., Schieder O., 1994. Des séquences d'ADN étranger sont captées par une souche sauvage d'*Aspergillus niger* après co-culture avec les plantes transgéniques. *Current Genetics*, Vol.27, pp. 70-76.

Höfte H., Whiteley HR., 1989 Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, Vol 53, pp.242–255.

Holden M.J., Levine M., Scholdberg T., Haynes R.J., Jenkins G.R. 2010. The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol.396, N° 6, pp.2175 -2187.

Holst-Jensen A., Ronning S.B., Lovseth A., Berdal K.G. 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 375, pp. 985-993.

Holst-Jensen, non date. Detection, identification and quantification of GMOs and derived products: present and future challenges. Section for Food and Feed Microbiology.

Ho M.W., Ching L.L., 2003. Le plaidoyer en faveur d'un monde soutenable sans modification génétique .LSLS & TWN, London & Penang, 137 P.

Hopp E., 2004. Case study of a real biotech solution: Argentina: a “soybean republic” or a bet to future? Agricultural Biotechnology International Conference, 12–15 September 2004, Cologne, Germany.

Huang F., Buschman L.L., Higgins R.A., McGaughey W.H., 1999. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. *Science*, Vol.284, pp.965–967.

Icoz I., Stotzky G., 2008. Fate and effects of insect-resistant Bt crops in soil ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry*, Vol.40, pp. 559–586.

ISO, 1999a. International Standard 13690. Cereals, pulses and milled products – Sampling of static batches International Organization for Standardization. In: Statistical theory and analysis of GMO enforcement (Stage) Defra project CB0209.Final project report, January 2005. Central Science Laboratory, Sand Hutton, York.

ISO, 1999b. International Standard 2859. Sampling procedures for inspection by attributes. Part 1: sampling schemes indexed by acceptance quality limit (AQL) for lot by lot inspection. International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO, 2002. International Standard 6644. Flowing cereals and milled cereal products. Automatic sampling by mechanical means. International Organization of Standardization. In:

Statistical theory and analysis of GMO enforcement (Stage) Defra project CB0209. Final project report, January 2005. Central Science Laboratory, Sand Hutton, York.

Jacobs J.M.E., Van Ech H.J., Arens P., Verker-Bakker B., TE Lintel Hekkert B., Bastlaanssen H.J.M., EL –Kharbotly A., Pereira A., Jacobsen E., Stiekema W.J. 1995. A genetic map of potato (*S. tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons, and classical markers. *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 91, pp. 289–300.

James C., 2006. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. *ISAAA Brief*, N° 35. ISAAA: Ithaca, NY.

James C., 2008. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008. *ISAAA Brief*, No. 39. ISAAA: Ithaca, NY.

Jasbeer K., Ghazali F.M., Cheah Y. K., Son R., 2008. Application of DNA and Immunoassay Analytical Methods for GMO Testing in Agricultural Crops and Plant-Derived Products. *ASEAN Food Journal*, Vol. 15, N°1, pp. 1-25.

Jouanin L., Bonade-Bottino M., Girard C., Morrot G., Giband M., 1998. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science*. Vol.131, pp.1-11.

Joung K.B., Côté J.C., 2000. Une analyse des incidences environnementales de l'insecticide microbien *Bacillus thuringiensis*. *Bulletin technique* N°. 29. Centre de R&D en horticulture, Saint-Jean-sur-Richelieu, Qc. Disponible sur le site : <http://res2.agr.ca/stjean/crdh.htm>

Kays S., Paoletti C., 2001. Sampling strategies for GMO detection and/or quantification. European Commission Report, code EUR 20239 EN, Joint Research Center Publication Office, 16p.

Kishore G.M., Padgett S.R., Fraley R.T., 1992. History of herbicide tolerant crops, methods of development and current state of the art-emphasis on glyphosate tolerance. *Weed Technology*, Vol.6, pp.626-634.

Kowalchuk G.A., Bruinsma M., Van Veen J.A., 2003. Assessing responses of soil microorganisms to GM plants. *Trends in Ecology and Evolution*, Vol. 18, pp.403-410.

Laetitia P., Baraige F., Balois A M., Bertheau Y., Fach P., 2003. Screening of genetically modified organisms and specific detection of Bt176 maize in flours and starches by PCR-enzyme linked immunosorbent assay. *European Food Research and Technology*, Vol. 217, pp.83-89.

Laumont P., Laby H., 1950. Le maïs et sa culture en Algérie. *Bulletin Sté Agriculteurs*, N°545.

Laumont P., 1951. Observation sur le maïs hybride et intérêt de sa culture en Algérie.

Leimanis S., Hernandez M., Fernandez S., Boyer F., Burns M., Bruderer S., Glouden T., Harris N., Kaeppli O., Philip P., Pla M., Puigdomenech P., Vaitilingom M, Bertheau Y., Remacle J., 2006. A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients. *Plant Molecular Biologies*, Vol. 61, pp.123-139.

Lipp M., Bluth A., Eyquem F., Kruse L., Schimmel H., Van Den Eede G., Anklam E., 2001. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research and Technology*, Vol. 212, pp.497-504.

Lipp M., Shillito R., Giroux R., Spiegelhalter F., Charlton S., Pinero D., Song P., 2005. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. *Journal of AOAC International*, vol.88 pp.136–155.

Lipton C.R., Dautlick X., Grothaus G.D., Hunst P.L., Magin K.M., Mihaliak C.A., Ubio F.M., Stave J.W., 2000. Guideline for the validation and use of immunoassays for determination of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food additives. *Food and Agricultural Immunology*, Vol.12, pp.153-164.

Liu G., Su W., Xu Q., Long M., Zhou J., Song S., 2004. Liquid-phase hybridization based PCR-ELISA for detection of genetically modified organisms in food. *Food Control*, Vol.15, pp. 303-306.

Losey J.E., Rayor L.S., Carter M.E. . 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*.Vol. 399, p.214.

Lübeck M., (non daté) .Detection of genetically modified plants – methods to sample and analyse GMO content in plant and products, 32p. Disponible sur le site : <http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm>.

Manachini B., Landi S., Fiore M.C., Festa M., Arpaia S., 2004. First investigations on the effects of Bt-transgenic *Brassica napus* L. on the trophic structure of the nematofauna. *IOBC/WPRS Bulletin*, Vol. 27, pp.103–108.

Masoero F., Moschini M., Rossi F., Prandini A., Pietri A., 1999. Nutritive value, mycotoxin contamination and in vitro rumen fermentation of normal and genetically modified corn (Cry1A(b)) grown in northern Italy. *Maydica*, Vol.44, pp. 205-209.

Matsuoka T., Kawashima Y., Akiyama H., Miura H., Goda Y., Kusakabe Y., Isshiki K., Toyota M., Hino A., 2000. A method of detecting recombinant DNAs from four lines of genetically modified maize. *Journal of food Hygienic Society of Japan*, Vol.41, pp.137-143.

Meyer, 2006. Detection methods for genetically modified crops. Pp.201-218. In: *Genetically engineered foods: Methods and detection*. Ed. Heller K.J., Weinheim, Germany.

Michaud D., 2005. Impact environnemental des cultures transgéniques. I. La migration des transgènes. *Phytoprotection*, Vol.86, pp. 93-105.

Michelini E., Simoni P., Cevenini L., Mezzanotte L., Roda A., 2008. New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 392, pp.355-367.

Miraglia M., Berdal K.G., Brera C., Corbisier P., Holst-Jensen A., Kok E.J., Marvin H.J.P., Schimmel H., Rentsch J., Van Rie J.P.P.F. , Zagon J., 2004. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 42, pp. 1157-1180.

Moneret –Vautrin D., 2002. Risques allergiques des aliments transgéniques : stratégies de prévention. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, Vol.186, N° 8, pp1-8.

Morrison TM., Weiss JJ., Wittwer CT., 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, Vol. 24, pp. 954-962.

Mulwa R.M.S., Mwanza L.M., 2006. Biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/selectivity. *Crops Africaine Journal of Biotechnology*, Vol. 5, N°5, pp.396- 404.

Disponible sur le site: <http://www.academicjournals.org/AJB>

Murray M.G., Thompson W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, Vol. 8, pp. 4321–4325.

NCM (Nordic Council of Ministers), 2004. Control of GMO content in seed and feed – possibilities and limitation .TEMANORD, Copenhagen, 74 p.

NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nielsen K.M., Bones A.M., Smalla K., Van Elsas J.D., 1998. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria – a rare event? FEMS, *Microbiology Reviews*, Vol. 22, pp.79-103.

Nihoul P., Mahieu S., 2005. La sécurité alimentaire et la réglementation des OGM: perspective nationale, européenne et internationale. Ed. Larcier, 352p.

Niu C., Kebede H., Auld D.L., Woodward J. E., Burow G., Wright R.J., 2008. A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7, N° 16, pp. 2818-2822.

Noisette C., 2001. STARLINK : chronique d'un scandale annoncé. Bulletin *Inf'OGM* N° 18. Disponible sur le site d'Inf'OGM.

Nyabyenda P., 2005. Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique. Les légumineuses alimentaires, Plantes à tubercule et racines, céréales Ed. Gembloux, 225 p.

O'Callaghan M., Glare T.R., Burgess E.P.J., Malone L.A., 2005. Effects of plants genetically modified for insect resistance on non target organisms. *Annual Review of Entomology*, Vol.50 pp.271-292.

Ouachem D., 2006. Utilisation de l'argile dans l'alimentation des animaux domestiques. Rapport final d'un projet de recherche CNEPRU. Université de Batna.

Ourèye Sy., 2006. Rapports entre biodiversité, OGM et biotechnologies : perspectives africaines. Communication présentée lors de la 5^{ème} Session Ordinaire de la Commission Mondiale de l'Éthique des Connaissances Scientifiques et des technologies, Dakar, 6 – 9 Décembre.

Ovesna J., Didicova L., Horacek J., Sdilova E., Kucera L., Meskova L., 2002. Comparison of Different PCR-based Protocols for Detection of Roundup Ready Soybean. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, Vol. 38, N°1, pp. 55–63.

Paget E., Lebrun M., Freyssinet G., Simonet P., 1998. The fate of recombinant plant DNA in soil, *European Journal of Soil Biology*. Vol. 34, pp.81-88.

Parayil G., 2003. Mapping Technological Trajectories of the Green Revolution and the Gene Revolution from Modernization to Globalization, *Research Policy*, Vol. 32, pp.971–990.

Pimentel D., Burgess M., 1985. Effects of single versus combinations of insecticides on the development of resistance. *Environmental Entomology*, Vol.14, pp. 582-589.

Poerschmann J., Gathmann A., Augustin J., Langer U., Górecki T. 2005. Molecular composition of leaves and stems of genetically modified Bt and near-isogenic non-Bt maize – Characterization of lignin patterns. *Journal of Environmental Quality*, Vol.34, pp.1508-1518.

Poitras E., Houde A., 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, Vol.2, N°2, pp.2-11.

Prather T S., Ditomaso J.M., Holt J.S., 2000. Herbicide Résistance : Définition and Management Stratégies. Publication 8012. University of California, Division of Agriculture and Natural Ressources.14 p.

Prescott V.E., Hogan S.P., 2006. Genetically modified plants and food hypersensitivity diseases: usage and implications of experimental models for risk assessment. *Pharmacology & Therapeutics*, Vol.111, pp.374-383.

Prasifka P.L., Hellmich R.L., Prasifka J.R., Lewis L.C. 2007. Effects of Cry1Ab-expressing corn anthers on the movement of monarch butterfly larvae. *Environmental Entomology*, Vol.36, pp.228-233.

Prütz G., Dettner K., 2004. Effect of Bt corn leaf suspension on food consumption by *Chilo partellus* and life history parameters of its parasitoid *Cotesia flavipes* under laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Vol.111, pp.179-187.

Puchooa D., Venkatasamay K., 2005. A Protocol for the Isolation of DNA from *Trochetia boutoniana*. *International journal of agriculture and biology*, Vol. 7, N° 1, pp. 82-85.

Querci M., Mazzara M., 2006. Module 8 : Caractéristiques des systèmes PCR qualitatifs décrits dans le manuel.11p. In: Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. Ed. Querci M., Jermini M., Van den Eede G. Italie.

Querci M., Maretti M., Mazzara M., 2006. Module 9 : Détection qualitative du maïs MON 810, du maïs Bt 176 et du soja Roundup Ready par PCR.31p. In: Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. Ed. Querci M., Jermini M., Van den Eede G. Italie.

Querci M., Paoletti C., Van Den Eede G., 2007. From Sampling to Quantification: Developments and Harmonisation of Procedures for GMO Testing in the European Union. *Collection of Biosafety Reviews*, Vol. 3, pp. 8-41.

Quist D., Chapela I., 2001. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature*, Vol .414, pp.541-543.

Rafalski J.A., 1998 .Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. pp. 75–83. In: DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews, Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P., Ed., Wiley-VCH, New York.

Ranjekar P.K., Patankar A., Guitar V., Henagar R., Benter J., Kumar P.A. 2003. Genetic engineering of crop plants for insect resistance. *Current science*, Vol.84, pp.321-329.

Remund K.M., Dixon D.A., Wright D. L., Holden L.R., 2001. Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. *Seed Science Research*, Vol. 11, pp.101–119.

Ricroch A., Priolon J., Vincent J. 1998. Végétaux transgéniques : les enjeux pour la santé et l'environnement. Ed du GREP, Paris. 159 p.

Rodriguez-Lazaro D., Lombard B., Smith H., Rzezutka A., D'Agostino M., Helmuth R., Schroeter A., Burkhard M., Miko A., Guerra B., Davison J., Kobilinsky A., Hernandez M., Bertheau Y., Cook N., 2007. Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. *Trends in Food Science & Technology*, Vol.18, pp.306-319.

Roetschi A., Deru J-Y., 2004. Détection d'OGM dans les aliments pour animaux : aspects théoriques. *Revue suisse d'agriculture*, Vol. 36, N° 4, pp.143-147.

Rosi-Marshall E. J., Tank J. L., Royer T.V., Whiles M.R., Evans-White M., Chambers C., Griffiths N. A., Pokelsek J., Stephen M. L., 2007. Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol.104, N°41, pp.16204-16208.

Saidani M., 1977.La culture du maïs .Céréaliculture, N° 4 ,30 p.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Second Ed., Cold Spring Harbor, New York.

Sambrook J., Russel D., 2000. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, New York.

Saxena, D., Flores S., Stotzky G., 1999. Transgenic plants: insecticidal toxins in root exudates from Bt corn. *Nature*.Vol. 402, pp.480.

Saxena D., Stotzky G., 2001. Bt corn has higher lignin content than non-Bt corn. *American Journal of Botany*, Vol.88, pp.1704-1706.

Saxena D., Flores S., Stotzky G., 2002. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol.34, pp.133-137.

Scalla R., 1997. Biotransformation des herbicides par les plantes transgéniques résistantes. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, Vol 4, N°2, pp.113-119.

Scalla R., 1998. Ya-t'il des risques spécifiques liés à la consommation d'aliments issus de plantes transgéniques ? 4p. In : organismes génétiquement modifiés à l'INRA : Environnement, Agriculture et Alimentation. Ed .INRA, 150p.

Schnepf E., 1995. *Bacillus thuringiensis* toxins: regulation, activities and structural diversity. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 6, pp.305-312.

Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D R., Dean DH., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 62, pp.775–806.

Simon J-P., 2005. Les principales plantes alimentaire du monde : origine, évolution, culture et utilisation. Chapitre 6 et 7 : le maïs. Université de Montréal, 20 p.

Somma M., 2006. Module 4: Extraction et purification d'ADN .19 p. In: Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. Ed. Querci M., Jermini M., Van den Eede G. Italie.

Stanley-Horn D.E., Dively G.P., Hellmich R.L., Mattila H.R., Sears M.K., Rose R., Jesse L.C.J., Losey J.E., Obrycki J.J., Lewis L., 2001. Assessing the impact of Cry1Ab expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 98, pp.11931-11936.

Stave J., 2002. Protein immunoassays methods for detection of biotech crops: applications, limitations and practical considerations. *Journal of AOAC International*, Vol. 85, pp. 780-786.

Tabashnik BE., Carrière Y., Dennehy T., Morin S., Sisterson M., Roush R., Shelton A., Zhao J., 2003. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. *Journal of Economic Entomology*, Vol. 96, pp.1031-1038.

Tanaka J., Ikeda S., 2002 .Rapid and efficient DNA extraction Method from Various Plant Species Using Diatomaceous Earth a Spin Filter . ,*Breeding science*, Vol.52 , pp151-155.

Thirtle, C., Beyers L., Ismael Y., Piesse J., 2003. Can GM-Technologies Help the Poor? The Impact of Bt Cotton in Makhathini Flats, KwaZulu-Natal, *World Development* Vol. 31, pp.717-732.

Thomas C.M., Jones D.A., English J.J., Carroll B.J., Bennetzen J.L., Harrison K., Burbidge A., Bishop G.J., Jones J.D. 1994. Analysis of the chromosomal distribution of transposon-carrying T-DNAs in tomato using the inverse polymerase chain reaction. *Molecular and General Genetics*, Vol. 242, pp. 573–585.

Tozzini A.C., Martínez M. C., Lucca M.F., Rovere C.V., Distéfano A. J., Del Vas M., Hopp H. E., 2000. Semi-quantitative detection of genetically modified grains based on CaMV 35S promoter amplification. *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol.3, N°2, pp.1-5.

Tyagi S., Kramer FR., 1996. Molecular Beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, Vol. 14, pp. 303-308.

Van Den Bulcke M., De Schrijver A., De Bernardi D., Devos Y., MbongoMbella G., Leunda A., Moens W., Sneyers M., 2007. Detection of genetically modified plant products by protein strip testing: an evaluation of real-life samples. *European Food Research and Technology*, Vol.225, pp.49–57.

Van Den Eede G., Kays S., Anklam E. 2002. Analytical challenges: bridging the gap from regulation to enforcement. *Journal of AOAC International*, Vol. 85, pp 757–761.

Von Götz F., 2010. See what you eat—broad GMO screening with microarrays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol.396, pp. 1961–1967.

Vos P., Kuiper M., 1998. AFLP analysis. pp. 115-131. In DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews, Ed Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M., Wiley-VCH, New York,

Wal J.M., 2001. Biotechnology and allergic risk, *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, Vol.41, pp.36-41.

Wang J., 2000. From DNA biosensors to gene chips. *Nucleic Acids Research*, Vol.28, N°16, pp.3011-3016.

Waiblinger H.U., Grohmann L., Mankertz J., Engelbert D., Pietsch K., 2010. A practical approach to screen for authorised and unauthorised genetically modified plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 396 pp.2065–2072.

Whitcombe D., Theaker J., Guy SP., Brown T., Little S., 1999. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology*, Vol. 17, pp. 804–807.

Weising K., Kahl G., 1998. Hybridization-based microsatellite fingerprinting of plants and fungi. pp. 27–54. In: *DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews*, Ed Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M., Wiley-VCH, New York.

Weising K., Nybom H., Wolff K., Kahl G., 2005. *DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications*. Second Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 447p.

Weighardt F., 2006. Module 10 : PCR quantitative pour la détection d'OGM.21p. In : *Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés*. Ed. Querci M, Jermini M, Van Den Eede G, Italie

Widmer F., Seidler R.J., Donegan K.K., Reed GL., 1997. Quantification of transgenic plant marker gene persistence in the field, *Molecular Ecology*, Vol.6, pp.1-7.

Wittwer CT., Herrmann MG., Moss AA., Rasmussen RP., 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, Vol. 22, pp. 130-138.

Wolf C., Scherzinger M., Wurz A., Pauli U., Hübner P., Lüthy J. 2000. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. *European Food Research and Technology*, Vol.210, pp.367–372.

Xu J., Miao H., Wu H., Huang W., Tang R., Qiu M., Wen J., Zhu S., Li Y., 2006. Screening of genetically modified organisms using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray, *Biosens Bioelectron*, Vol.22, pp.71-77.

Yates K., 1999. *Detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms*. Brussels B-1200, Belgium: ILSI Europe.

Yin Z., Plader W., Malepszy S., 2004. Transgene inheritance in plants. *Journal of Applied Genetics*, Vol.45, N°2, pp. 127-144.

Zablotowicz R.M., Reddy K.N., 2004. Impact of glyphosate on the Bradyrhizobium Japonicum Symbiosis with Glyphosate-Resistant Transgenic Soybean .*A Minireview Journal of Environmental Quality*, N° 33, pp.825-831.

Zammatteo N., Jeanmart L., Hamels S., Courtois S., Louette P., Hevesi L., Remacle J., 2000. Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Analytical Biochemistry*, Vol. 280, pp.143-150.

Zangerl A.R., McKenna D., Wraight C.L., Carroll M., Ficarello P., Warner R., Berenbaum M.R., 2001. Effects of exposure to event 176 Bacillus thuringiensis corn pollen on monarch and black swallowtail caterpillars under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol.98, pp.11908-11912.

Zimny J., E. de Vries G., 2005. Herbicide tolerance. pp.19-25. In: *Genes on the Menu: Facts for Knowledge-Based Decisions*. Ed. Pechan P.M., E. de Vries G., Springer Berlin Heidelberg New York.

Annexes

Annexe 1 : Liste des maïs GM Bt (actualisée en juin 2009)

Évènement	Compagnie	Description	Description
176	Syngenta Seeds, Inc	Production d'insecticide	Gènes insérés: Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> Subsp. Kurstaki et le gène bar de <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
ACS-ZM003-2 × MON-00810-6	Bayer CropScience (Aventis CropScience (AgrEvo))	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel T25 × MON810 Gènes insérés: Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> Kurstaki et le gène PAT de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
BT11 (X4334CBR × 4374CBR)	Syngenta Seeds, Inc	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés: Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki et le gène PAT de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
CBH-351	Aventis CropScience	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés: Cry9C de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. tolworthi et le gène bar de <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
DAS-06275-8	DOW AgroSciences LLC	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés: Cry1F de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. aizawai et le gène bar de <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
DAS-5912267	DOW AgroSciences LLC et Pionner Hi-Bred International Inc	Production d'insecticide	Gènes insérés: Cry34Ab1 et Cry35Ab1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> souche PS149B1 et le gène bar de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
DAS-59122-7 × NK603	DOW AgroSciences LLC et Pionner Hi-Bred International Inc	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel DAS-59122-7 × NK603 Gènes insérés: Cry34Ab1 et Cry35Ab1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> souche PS149B1 Gène EPSPS d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> souche CP4 Gène PAT de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
DAS-59122-7 × TC1507 × NK603	DOW AgroSciences LLC et Pionner Hi-Bred International Inc	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel DAS-59122-7 et TC1507 × NK603 Gènes insérés: Cry34Ab1 et Cry35Ab1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> souche PS149B1; Cry1F de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. aizawai, Gène EPSPS d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> souche CP4 et le gène PAT de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
DAS-01507-1 × MON-00603-6	DOW AgroSciences LLC	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel TC 1507 × NK603 Gènes insérés: Cry1F de <i>Bacillus thuringiensis</i> ; le gène EPSPS d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> souche CP4 et le gène PAT de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
DBT418	Dekalb Genetics Corporation	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés: Cry1Ac de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki et le gène bar de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> .
MIR604	Syngenta Seeds, Inc	Production d'insecticide	Gène inséré: Cry 3A modifié de <i>Bacillus thuringiensis</i>
MON-00603-6 × MON-00810-6	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel NK603 × MON810 Gènes insérés: Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki et le gène EPSPS d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> souche CP4
MON-00810-6 × LY038	Monsanto Company	Production d'insecticide + Enrichissement en lysine	Hybride issu d'un croisement conventionnel MON810 × LY038 Gènes insérés: Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki
MON-00863-5 × MON-00603-6	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel MON863 × NK603 Gènes insérés: Cry3Bb1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> Subsp. Kumamotoensis, Gène EPSPS d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> souche CP4
MON-00863-5 × MON-00810-6	Monsanto Company	Production d'insecticide	Hybride issu d'un croisement conventionnel MON863 × MON810 Gènes insérés: Cry3Bb1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> Subsp. Kumamotoensis et Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki
MON-00863-5 × MON-00810-6 × MON-00603-6	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel MON863 × MON810 × MON603 Gènes insérés: Cry3Bb1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> Subsp. Kumamotoensis, Cry1Ab de <i>B. thuringiensis</i> subsp. Kurstaki et le gène EPSPS d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> souche CP4
MON-00021-9 × MON-00810-6	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel GA21 × MON810 Gènes insérés: Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki et le gène EPSPS d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> souche CP4
MON80100	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés: Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki et le gène EPSPS d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> souche CP4
MON802	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés: Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki; Gène EPSPS d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> souche CP4
MON809	Pionner Hi-Bred International Inc	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés: Cry1Ab synthétique de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki Gène EPSPS d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> souche CP4
MON810	Monsanto Company	Production d'insecticide	Production d'insecticide Gène inséré: Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki HD-1
MON810 × MON88017	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel MON810 × MON88017 Gènes insérés: Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki HD-1 et Cry3Bb1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kumamotoensis souche EG4691, Gène EPSPS d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> souche CP4

MON863	Monsanto Company		Production d'insecticide	Gène Bt inséré : Cry3Bb1 de Bacillus thuringiensis subsp. Kumamotoensis
MON88017	Monsanto Company		Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés : Cry3Bb1 de Bacillus thuringiensis subsp. Kumamotoensis souche EG4691, Gène EPSPS d'Agrobacterium tumefaciens souche CP4
MON 89034	Monsanto Company		Production d'insecticide	Gènes insérés : Cry 2Ab de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki
MON 89034× MON88017	Monsanto Company		Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés : Cry 2Ab de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki et Cry 3Bb1 de Bacillus thuringiensis Subsp. Kumamotoensis et le gène EPSPS d'Agrobacterium tumefaciens souche CP4
MON89034× NK603	Monsanto Company		Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés : Cry 2Ab de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki et le gène EPSPS d'Agrobacterium tumefaciens souche CP4
SYN-BTØ11-1 × IR162-4	SYN- Syngenta Seeds, Inc		Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel BT11 x MIR162 Gènes insérés: Cry1Ab de Bacillus thuringiensis, Gène PAT de Streptomyces viridochromogenes et le gène VIP3Aa de Bacillus thuringiensis souche AB 88
SYN-BTØ11-1× IR6Ø4-5	SYN- Syngenta Seeds, Inc		Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel BT11 x MIR6Ø4 Gènes insérés : Cry1Ab de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki , Cry3A de Bacillus thuringiensis et le gène PAT de Streptomyces viridichromogenes
SYN-BTØ11-1× IR6Ø4-5 × MON-ØØØ21-9	SYN- Syngenta Seeds, Inc		Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel BT11 x MIR6Ø4 x GA21 Gènes insérés: Cry1Ab de B. thuringiensis subsp. Kurstaki , Cry3A de B. thuringiensis ; le gène PAT de S. viridochromogenes et le gène EPSPS modifié du maïs
SYN-BTØ11-1× ØØØ21-9	MON- Syngenta Seeds, Inc		Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel BT11 x GA21 Gènes insérés : le gène Cry 1Ab de Bacillus thuringiensis , le gène EPSPS du maïs et le gène PAT de Streptomyces viridochromogenes
SYN-IR6Ø4-5× ØØØ21-9	MON- Syngenta Seeds, Inc		Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel MIR6Ø4 x GA21 Gènes insérés : Cry3A de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki tenebrioni et le gène EPSPS du Zea mays
TC15Ø7	Mycogen (c/o AgroSciences) ;Pionner Dupont)	Dow (c/o	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés: Cry1F de Bacillus thuringiensis var. aizawai et le gène PAT de Streptomyces viridochromogenes
TC15Ø7 × DAS-59122-7	DOW AgroSciences LLC Pionner Hi-Bred International Inc		Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel TC15Ø7 x DAS-59122-7 Gènes insérés : Cry1F de Bacillus thuringiensis var. aizawai ; Cry34Ab1 et Cry35Ab1 de Bacillus thuringiensis souche PS149B1. Gène EPSPS d'Agrobacterium tumefaciens souche CP4 et le gène PAT de Streptomyces viridochromogenes

Source : Agbios, 2009

Annexe 2 : Liste des autorisations des maïs Bt et RR aux Etats-Unis, l'Union Européenne et en Afrique du sud.

Évènement	Etats-Unis				Union Européenne				Afrique du Sud			
	Environnement	AHAT	Alim. Humaine	Alim. Animale	Environnement	AHAT	Alim. Humaine	Alim. Animale	Environnement	AHAT	Alim. Humaine	Alim. Animale
176	1995	1995			1997		1997	1997		2001		
ACS-ZM003-2xMON-00810-6	Autorisé uniquement au Japon.											
BT11 (X4334CBR, x 4374CBR)	1996	1996					1998	1998		2003	2002	
CBH-351	1998			1998								
DAS-06275-8	2004	2004										
DAS-59122-7	2005	2004				2007						
DAS-59122-7x NK603	Cependant autorisé dans les pays suivants : Japon 2005, Corée 2006, Mexique 2006, Philippines 2006.											
DAS-59122-7xTC1507 x NK603	Cependant autorisé dans les pays suivants : Japon 2005, Corée 2006, Mexique 2006.											
DAS-01507-1 x MON- 00603-6					2007							
DBT418	1997	1997										
MIR604	2007	2007										
MON-00603-6x MON- 00810-6						2007			2007	2004		
MON-00810-6 x LY038	Autorisé uniquement aux Philippines 2006 et au Japon 2007											
MON-00863-5x MON- 00603-6						2005						
MON-00863-5xMON-00810-6							2005					
MON-00863-5x MON- 00810-6 x MON- 00603-6	Cependant autorisé dans les pays suivants : Japon 2004, Corée 2004, Mexique 2006, Philippines 2004, Taiwan 2009											
MON-00021-9x MON- 00810-6						2005			2003			
MON80100	1995	1996										
MON802	1997	1996										
MON809	1996	1996										
MON810	1995	1996			1998	1998			1997	1997	1997	
MON810 x MON88017	Cependant autorisé dans les pays suivants : Japon 2005, Corée 2006, Mexique 2006, Philippines 2006, Taiwan 2009											
MON863	2003	2001							2006	2005		
MON88017	2005	2005										
SYN-BT011-1x MON- 00021-9	Cependant autorisé dans les pays suivants : Corée 2006, Philippines 2007, Japon 2007, Mexique 2007.											
TC1507	2001	2001			2005	2006			2002			
TC1507 x DAS-59122-7	Cependant autorisé dans les pays suivants : Japon 2005, Corée 2006, Mexique 2006, Philippines 2007.											
Bt11xMIR604	Cependant autorisé dans les pays suivants : Japon 2007, Corée 2007, Mexique 2007, Philippines 2007											
Bt11xGA21xMIR604	Cependant autorisé dans les pays suivants : Japon 2007 et Philippines 2008.											
Bt11x MIR162	2009											
MIR604xGA21	Cependant autorisé dans les pays suivants : Japon 2007, Mexique 2007, Philippines 2007.											
MON 89034	2008	2007										
MON 89034x MON88017	Cependant autorisé dans les pays suivants : Japon 2007, Mexique 2007, Philippines 2007											
MON89034x NK603	Cependant autorisé dans les pays suivants : Japon 2008 et Taiwan 2009.											

Source : Agbios ,2009

Annexe 3 : Liste des maïs GM RR contenant le transgène EPSPS.

Évènement	Compagnie		Description
DAS-59122-7 x NK603	DOW AgroSciences LLC et Pioneer Hi-Bred International Inc	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel DAS- 9122-7 x NK603 Gènes insérés : Cry34Ab1 et Cry35Ab1 de Bacillus thuringiensis souche PS149B1, Gène EPSPS d' Agrobacterium tumefaciens souche CP4 Gène PAT de Streptomyces viridochromogene
DAS-59122-7 x TC1507 x NK603	DOW AgroSciences LLC et Pioneer Hi-Bred International Inc	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel DAS-59122-7 et TC1507 x NK603 Gènes insérés : Cry34Ab1 et Cry35Ab1 de Bacillus thuringiensis souche PS149B1 et Cry1F de Bacillus thuringiensis var. aizawa, Gène EPSPS d' Agrobacterium tumefaciens souche CP4 et le gène PAT de Streptomyces viridochromogenes.
GA21	Syngenta Seeds, Inc	Résistance à un herbicide	Gène inséré : gène EPSPS m du Zea mays
MON-00021-9 x MON-00810-6	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement GA21 x MON810 Gènes insérés : Cry1Ab de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki et le gène EPSPS d'Agrobacterium tumefaciens souche CP4
SYN-IR604-5 x MON-00021-9	Syngenta Seeds, Inc	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel MIR604 x GA21 Gènes insérés: Cry3A de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki tenebrioni et le gène EPSPS du Zea mays
MON80100	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés : Cry1Ab de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki et le gène EPSPS d'Agrobacterium tumefaciens souche CP4
MON802	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés : Cry1Ab de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki ; Gène EPSPS d' Agrobacterium tumefaciens souche CP4
MON809	Pioneer Hi-Bred International Inc	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gène insérés: Cry1Ab synthétique de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki Gène EPSPS d' Agrobacterium tumefaciens souche CP4
MON810 x MON8801	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel MON810 x MON88017 Gènes insérés: Cry1Ab de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki HD-1 et Cry3Bb1 de Bacillus thuringiensis subsp. Kumamotoensis souche EG4691; Gène EPSPS d'Agrobacterium tumefaciens souche CP4
MON832	Monsanto Company	tolérance à un herbicide	Gène inséré : EPSPS d'Agrobacterium tumefaciens souche CP4
MON-00863-5 x MON-00810-6 x MON- 00603-6	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel MON863 x MON810 x MON603 Gènes insérés : Cry3Bb1 de Bacillus turingiensis Subsp. Kumamotoensis, Cry1Ab de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki et le gène EPSPS d'Agrobacterium tumefaciens souche CP4
MON-00863-5 x MON-00603-6	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel MON863 x NK603 Gènes insérés : Cry3Bb1 de Bacillus thuringiensis Subsp. Kumamotoensis, Gène EPSPS d' Agrobacterium tumefaciens souche CP4
MON88017	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés : Cry3Bb1 de Bacillus thuringiensis subsp. Kumamotoensis souche EG4691, Gène EPSPS d' Agrobacterium tumefaciens souche CP4
MON 89034 x MON88017	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés: Cry 2Ab de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki et Cry 3Bb de Bacillus thuringiensis Subsp. Kumamotoensis et le gène EPSPS d'Agrobacterium tumefaciens souche CP4
MON89034 x NK603	Monsanto Company	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Gènes insérés: Cry 2Ab de Bacillus thuringiensis Gènes insérés: Cry 2Ab de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki et le gène EPSPS d'Agrobacterium tumefaciens souche CP4
NK603	Monsanto Company	tolérance à un herbicide	Gène inséré : EPSPS d'Agrobacterium tumefaciens souche CP4
SYN-BT011-1 x MON-00021-9	Syngenta Seeds, Inc International Inc	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel BT11 x GA21 Gènes insérés : Cry1Ab synthétique de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki .Gène EPSPS modifié du Zea mays .
SYN-IR604-5 x MON-00021-9	Syngenta Seeds, Inc	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel MIR 604 x GA21 Gènes insérés : Cry3A de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki tenebrioni et le gène EPSPS modifié du Zea mays.
SYN-BT011-1 x SYN-IR604-5 x MON-00021-9	Syngenta Seeds, Inc	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel BT11 x MIR604 x GA21 Gènes insérés : Cry1Ab de Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki , Cry3A de Bacillus thuringiensis le gène PAT de Streptomyces viridochromogenes et le gène EPSPS modifié du maïs
TC1507 x NK603	DOW AgroSciences LLC	Production d'insecticide + tolérance à un herbicide	Hybride issu d'un croisement conventionnel TC 1507 x NK603 Gènes insérés : Cry1F de Bacillus thuringiensis, le gène EPSPS d' Agrobacterium tumefaciens souche CP4 et le gène PAT de Streptomyces viridochromogenes

Source : Agbios, 2009.

Annexe 4. Description des échantillons de maïs Pop Corn

	<p>Sac maïs Pop Corn Marque : Alicampo Poids net : 22 Kg Provenance : Argentine Exporté par : Remarque : Etiqueté sans OGM</p>
	<p>Sac maïs Pop Corn Marque : Primore Poids net : 22,65 Kg Provenance : Santa Fé, Argentine Exporté par : Primore R.S.L, Goody Cruz, Argentine</p>
	<p>Sac maïs Pop Corn Marque : Plopie Poids net : 20 Kg Provenance : Argentine Exporté par : Farm products S.R.L, Buenos-Aires, Argentine Site web: www.farmproducts.com.ar</p>
	<p>Sac maïs Pop Corn Marque: Premium Poids net : 20 Kg Provenance : Amérique latine Exporté par : M/S. Mehmood Kikha, General Trading LLC., Dubaï, UAE</p>
	<p>Sac maïs Pop Corn Marque: Snack Crops Poids net: 20 Kg Provenance: Argentine Exporté par: Snack Crops, San Martin, Argentine Site web: www.snackcrops.com</p>
	<p>Sac maïs Pop Corn Marque: Three Stars Poids net: 20, 65 Kg Provenance : Argentine Exporté par : Curcija, Buenos-Aires, Argentine</p>

Annexe 5. Description des échantillons de maïs doux

	<p>Maïs doux en grains Marque : Del Monte Poids net : 410 g Provenance : Chine Importé par : Stargoods company Alger, Algérie</p>
	<p>Maïs doux en grains Marque: Golden Land Poids net : 340 g Provenance : Chine Importé par : Sarl Imperial Trade Foods Borj El Kiffan, Alger, Algérie</p>
	<p>Maïs doux en grains Marque : Prince Poids net : 340 g Provenance : Chine Importé par : Sarl Parle Food Import-Export Gue de Constantine, Alger, Algérie</p>
	<p>Maïs doux en grains Marque : Le Jardinier Poids net : 340 g Provenance : Thaïlande</p>
	<p>Maïs doux en grains Marque : Al Mithali Poids net : 400 g Provenance : Thaïlande Importé par : Eurl Feth Alamine Import-Export. Rais Hamidou, Alger, Algérie.</p>
	<p>Maïs doux en graine Marque : D'aucy Poids net : 350 g Provenance : Union Européenne Importé par : Inter Trade Contact El Harrach, Alger, Algérie.</p>

	<p>Maïs doux en grains Marque : Familia Poids net : 300 g Provenance : Union européenne Importé par : La société BioPack Bir Khadem, Alger, Algérie. Remarque : Etiqueté sans OGM</p>
	<p>Maïs doux en grains Marque : Princesse Anne Poids net : 300 g Provenance : France Importé par : Société N.D.A. Bouchaoui, Algérie. Remarque : Etiqueté sans OGM</p>

Annexe 6. Réactifs utilisés pour le protocole d'extraction à base de CTAB

1-Tampon d'extraction au CTAB

- 20g/l CTAB 4g
- 1,4 M NaCl 16,4 g
- 0,1 M Tris-HCl 3,15g
- 20mM Na₂EDTA 1,4g
- Eau distillée 100 ml

Ajustez le pH à 8,0 en ajoutant 1M NaOH
Complétez pour obtenir 200 ml et stérilisez à l'autoclave.
Conservez le tampon à 4°C pendant maximum 6 mois.

2- Solution de précipitation au CTAB

- 5g/l CTAB 1g
- 0,04 M NaCl 0,5g
- Eau distillée 100 ml

Ajustez le pH à 8,0 en ajoutant 1M NaOH
Complétez pour obtenir 200 ml et stérilisez à l'autoclave
Conservez le tampon à 4°C pendant maximum 6 mois

3- NaCl 1,2 M

- NaCl 7,0 g
- Eau distillée 100 ml

Stérilisez à l'autoclave et conservez à température ambiante.

4-Solution d'éthanol 70%

5-Isopropanol

Annexe 7. Réactifs utilisés pour le protocole d'extraction à base de SDS

1-Tampon d'extraction

- 50 Mm Tris-HCl
- 10Mm EDTA
- 100Mm NaCl
- 10 Mm 2-mercaptoethanol
- 1% SDS

- Préparez chaque composant de la solution à part à une concentration plus élevée (solution mère).

- Autoclavez les solutions mères de Tris, EDTA, NaCl,... chacune à part en prenant soin de ne pas autoclaver le SDS et le mercaptoethanol.

- De chaque solution mère, prélevez le volume nécessaire afin de préparer un volume déterminé de tampon d'extraction aux concentrations voulus.

2-Acétate de potassium (5M)

- | | |
|------------------------|--------|
| ▪ Acétate de potassium | 49,07g |
| ▪ Eau distillée | 100ml |

Autoclavez avant l'utilisation

3-Isopropanol

4-Ethanol 70%

Annexe 8. Tampons utilisés lors de l'électrophorèse des ADN extraits

1-TBE 1X (Tris Borate ADTA)

- Tris base 10,8g
- Acide Borique 55g
- EDTA 0,5 M pH8 40ml
- Eau distillée 950ml

2-BET (Bromure d'éthyidium)

- 2 pastilles 0,2g
- Eau distillée 20 ml

3-Tampon de charge

- Bleu de Bromophénol 50 mg
- Glycérol 48 ml
- EDTA 0,5M pH8 2,4 ml
- Eau distillée 9,6 ml

Résumé : Détection des OGM dans l'agriculture et l'alimentation en Algérie : cas du maïs transgénique

L'objectif principal de la présente étude est de détecter la présence du maïs transgénique dans l'agriculture, l'alimentation humaine et animale afin d'avoir un aperçu partiel sur le degré d'introduction des OGM en Algérie. A cette fin, 45 échantillons de maïs brut ont été collectés dans les différentes régions du Nord Algérien.

Les échantillons ont été analysés par deux méthodes différentes, une méthode de détection de l'ADN GM (PCR), basée sur le criblage de deux séquences largement utilisées dans les constructions transgéniques (promoteur P-35S et le terminateur T-nos), et celle basée sur la détection de la protéine transgénique en utilisant les immunoessays (bandelettes de détection).

La présence du maïs transgénique a été confirmée par les deux méthodes dans 12 échantillons sur un total de 45 échantillons analysés. Parmi ces échantillons transgéniques, dix destinés à l'alimentation humaine contiennent la protéine Cry 9C du *Bacillus thuringiensis* qui confère la résistance aux insectes, et deux autres échantillons destinés à l'alimentation animale contiennent simultanément la toxine (Bt) Cry 1Ab ou Cry1Ac et la protéine CP4-EPSPS qui confèrent respectivement la résistance aux insectes et la tolérance à l'herbicide glyphosate. Les échantillons destinés à l'agriculture se sont révélés négatifs par les deux méthodes de détection utilisées.

Mots-clés : Détection des OGM, maïs, PCR, P-35S, T-nos, bandelettes de détection.

Abstract: Detection of GMOs in agriculture and food in Algeria : case of transgenic maize.

The main aim of the present study is to detect the presence of transgenic maize in agriculture, food and feed to give a first overview on the degree of introduction of GMO in Algeria. To this purpose, 45 samples of raw maize were collected from different region in North Algeria.

The samples were analysed for genetic modification by tow different methods, a DNA based detection method (PCR), based on screening of tow widely used sequences in transgenic constructs (P-35S promoter and T-nos terminator) and protein based method using immunoassays (Strip test).

The presence of transgenic maize was confirmed by both techniques in 12 samples out of 45 samples examined. Among these transgenic samples, 10 used for human consumption contain the *Bacillus thuringiensis* toxin , Cry 9C protein, which confers resistance to insects .Two other samples , intended for animals feed , contain simultaneously Cry 1Ab or Cry1Ac toxin and CP4-EPSPS protein which confer respectively resistance to insect and tolerance to herbicide Glyphosate (Roundup). The samples for culture have been detected negative by both techniques.

Key-words: GMO detection, maize, PCR, P-35S, T-nos, Strip test.

ملخص : الكشف عن الكائنات المعدلة وراثيا في الزراعة و الأغذية في الجزائر: مثال الذرة المعدل وراثيا .

الهدف الأساسي من هذه الدراسة هو الكشف عن وجود الذرة المعدل وراثيا في الزراعة و الأغذية و الأعلاف لإعطاء فكرة جزئية عن درجة إدخال الكائنات المعدلة وراثيا في الجزائر. لتحقيق هذا الغرض، تم جمع 45 عينة من الذرة الخام من مختلف مناطق شمال الجزائر .

تم تحليل العينات باستخدام طريقتين مختلفتين للكشف عن وجود التعديل الوراثي : طريقة الكشف عن الحمض النووي المعدل وراثيا باستعمال الـ PCR و ذلك باستهداف العناصر الوراثية الراجعة الاستعمال في البنات المعدلة وراثيا (Promoter P-35 و Terminator T-nos) و طريقة الكشف عن البروتين المورث باستخدام الـ Strip test

لقد أكد وجود الذرة المعدل وراثيا بكلتا الطريقتين في 12 عينة من بين 45 عينة تم فحصها . من بينها 10 عينات مستخدمة للاستهلاك البشري تحتوي على البروتين Cry 9C الذي يؤمن مقاومة الحشرات و عينتان مستخدمتان لتغذية الحيوانات تحتويان على نوعين من البروتينات المورثة : البروتين Cry 1Ab أو Cry 1Ac الذي يؤمن مقاومة الحشرات و البروتين CP4-EPSPS الذي يضيف مقاومة مبيد الحشرات الضارة (Glyphosate) . في ما يخص العينات المخصصة للزراعة ، لم يتم الكشف عن أي تعديل وراثي بكلتا الطريقتين.

الكلمات المفتاحية : الكشف عن الكائنات المعدلة وراثيا ، الذرة .

