



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Ecole Nationale Supérieure Agronomique
Département : Technologie alimentaire
Ecole doctorale : Sciences alimentaires

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة
القسم: التكنولوجيا الغذائية
مدرسة الدكتوراه: علوم غذائية

Thèse

En Vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat 3^{ème} Cycle en Sciences Agronomiques
Option: Sciences et Qualité des Aliments

Thème

**Recherche d'OGM dans quelques produits alimentaires
commercialisés en Algérie**

Présentée par : M^{lle} BRARA Zahia

Soutenue le : 23/ 06 /2021

Devant le jury composé de :

Président:	M. Bouznad Zouaoui	Professeur	ENSA(El-Harrach)
Directeur de thèse:	M. Bitam Arezki	Professeur	ENSA(El-Harrach)
Co-directrice de thèse:	M ^{me} Mafra Isabel	Ph.D	UP. FF (Portugal)
Examineur 1:	M. Abderrahmani Ahmed	Professeur	USTHB (Bab-Ezzouar)
Examinatrice 2:	M ^{me} Yahiaoui Karima	MCA	UMBB(Boumerdes)

Année Universitaire: 2020/2021

Remerciements

Je remercie en premier lieu Allah, le clément de m'avoir aidé dans l'achèvement de ce travail.

Ma profonde reconnaissance et gratitude, va tout d'abord à mon directeur de thèse, Monsieur BITAM A. professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'avoir eu l'amabilité d'encadrer ce travail ainsi que pour ses précieux conseils et ses orientations qu'il n'a pas manqué de me prodiguer durant sa réalisation. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Mes vifs remerciements vont également vers Monsieur KHELIFI L. professeur et ex-directeur de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'avoir cru en moi et de m'ouvrir les portes de son laboratoire où j'ai eu la chance d'initier mon travail ainsi que de m'avoir accompagné durant toutes les étapes de sa réalisation.

Je remercie également Monsieur BOUZNAD Z., professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de m'avoir honoré en acceptant de présider le jury de ce travail.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements et ma profonde gratitude aux membres du jury qui ont consacré leurs temps précieux à examiner ce travail, Monsieur Abderrahmani Ahmed, professeur à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene et Madame Yahiaoui Karima, maître de conférences A à l'Université M'hamed Bougara de Boumerdes.

Mes remerciements vont particulièrement au corps du laboratoire REQUIMTE-LAQV, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal, surtout à ma co-directrice de thèse, Madame MAFRA Isabel de m'avoir donné la chance de réaliser une partie importante de mon travail parmi son équipe.

Je remercie également toute personne ayant contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Hommage

Professeur Louanchi Meriem,

Il était prévu que vous fassiez partie des membres du jury de ma soutenance mais la volonté de dieu, Subhanahu wa Ta'ālā a fait que vous nous quittiez avant que cela se produise. L'intérêt que vous avez exprimé pour examiner mon travail fut un sacré honneur pour moi. Ayant la chance d'être parmi les personnes qui ont eu affaire avec vous peu avant que vous nous quittiez à jamais, je vous dois alors de témoigner de votre extrême gentillesse, attention et surtout professionnalisme.

La mort a toujours été un évènement douloureux et la perte est d'autant plus immense lorsqu'il s'agit d'une compétence de haut niveau qui a consacré sa vie à la recherche et le développement du secteur de l'agriculture en Algérie. Le 19 /04/2021 fut certes un jour triste pour toute la communauté scientifique et surtout pour notre chère école.

Mes sincères condoléances à toute la famille Louanchi, انا لله و انا اليه راجعون.



*Je dédie ce travail à
La mémoire de mon frère Mohamed, رحمه الله ;
Mes parents ;
Mes frères et Sœurs ;
Mes Neveux et Nièces ;
Toutes les personnes qui me sont chères.*

Table des matières

Remerciements.....	II
Hommage.....	III
Dédicaces.....	IV
Table des matières.....	V
Liste des tableaux.....	IX
Liste des figures.....	X
Liste des abréviations.....	XV
Introduction générale.....	1
Chapitre I: Les organismes génétiquement modifiés: présentation	
1. Introduction.....	4
2. Définitions et dénominations.....	4
3. Situation mondiale des OGM.....	5
4. Le Processus de transformation d'une culture GM.....	5
5. Classification des OGM.....	6
5.1 La première génération — OGM à trait unique.....	6
5.2 La deuxième génération — OGM à traits empilés.....	7
5.3 La troisième génération — OGM quasi-intragéniques.....	7
5.4 La quatrième génération : OGM intragéniques et cisgéniques.....	8
6. Le maïs génétiquement modifié.....	8
6.1 Généralités sur la culture de maïs.....	8
6.2 Les utilisations du maïs.....	9
6.3 Situation mondiale du maïs.....	9
6.4 Situation du maïs en Algérie.....	10
6.5 Le maïs transgénique.....	10
6.5.1 Le maïs transgénique résistant aux insectes (Maïs Bt).....	11
6.5.2 Le maïs transgénique résistant aux herbicides.....	12
Chapitre II: Méthodes de détection des organismes génétiquement modifiés	
1. Introduction.....	14
2. Les dosages biologiques.....	14
3. Les méthodes basées sur les protéines.....	14
3.1 Western blot.....	14

3.2	ELISA.....	15
3.3	Bandelettes à Flux Latéral (BFL).....	16
4.	Les méthodes à base d'ADN.....	17
4.1	La technique de Southern blot	17
4.2	La technique PCR.....	18
4.2.1	Les principes fondamentaux de la technique PCR.....	18
4.2.2	Séquences cibles pour la PCR dans la détection d'OGM (spécificité)	19
4.2.3	La PCR qualitative	22
4.2.4	La PCR quantitative	23
4.2.5	Stratégie de détection et de quantification des OGM par PCR.....	27
5.	Les Méthodes alternatives de détection des OGM.....	29
5.1	La spectroscopie de masse.....	29
5.2	Les Biocapteurs.....	29
5.3	Les Puces à ADN (Microarrays).....	30

Chapitre III: L'encadrement des organismes génétiquement modifiés

1.	Introduction.....	31
2.	Réglementation	31
2.1	L'évaluation de la sécurité des aliments GM.....	31
2.2	Les instruments de réglementation à l'échelle internationale.....	32
2.2.1	Le PCB	33
2.2.2	Le comité du codex Alimentarius	33
2.2.3	L'OCDE.....	34
2.3	Les différentes approches règlementaires à l'échelle internationale.....	34
3.	L'étiquetage	36
3.1	L'étiquetage volontaire.....	36
3.2	L'étiquetage obligatoire.....	36
4.	La coexistence.....	39
5.	La traçabilité	39
6.	Le Principe de précaution	40
7.	La participation du public dans l'encadrement des OGM.....	42
8.	Réglementation en Algérie	42

Chapitre IV: La controverse autour des OGM

1.	Introduction.....	44
----	-------------------	----

2.	Les fondements du débat sur les OGM	44
3.	Les risques associés aux OGM	45
3.1	Les risques sanitaires	45
3.1.1	Le flux horizontal des gènes	45
3.1.2	La Toxicité	46
3.1.3	L'Allergénicité	48
3.2	Les impacts sur l'environnement des OGM	49
3.2.1	Le Flux génique	49
3.2.2	Evolution de la résistance aux herbicides	49
3.2.3	Evolution de la résistance aux insecticides et aux pesticides	50
3.2.4	Perturbation de la biodiversité et des écosystèmes	50
3.3	Les considérations d'ordre éthique des OGM	51
4.	Les préoccupations « Intrinsèques »	51
4.1.1	Les préoccupations extrinsèques	52
4.2	Les considérations socioéconomique	52
4.2.1	Le brevetage du patrimoine végétal	52
4.3	La Technologie terminator	53

Chapitre V: Matériel et méthodes

1.	Description des échantillons	54
1.1	Les échantillons de produits alimentaires à base de maïs	54
1.2	Les Matériaux de Reference Certifiés	62
2.	Préparation des échantillons	63
3.	Extraction d'ADN	63
3.1	Extraction d'ADN à partir des matériaux de référence certifiés (NucleoSpin food kit) 63	
3.2	Extraction d'ADN des échantillons de produits alimentaires	64
4.	Qualité et intégrité d'ADN :	65
5.	Concentration d'ADN	66
6.	PCR qualitative	66
7.	PCR en temps réel	73

Chapitre VI: Résultats et discussion

1.	Introduction	75
2.	Evaluation de l'ADN des échantillons alimentaires	76

2.1	La concentration en ADN	77
2.2	La pureté	80
2.3	La qualité des extraits d'ADN	81
3.	Evaluation de la capacité d'amplification de l'ADN	84
4.	Le dépistage P-35S/T-NOS	89
5.	Détection spécifique aux évènements transgéniques :	97
6.	PCR en temps réel	106
	Conclusion générale	113
	Références Bibliographiques	115
	Annexes	136
	Annexe 1: Les produits alimentaires analysés au cours de ce travail	136
	Annexe 2 : Appareillage.....	145

Liste des tableaux

Tableau 1 : Evolution des superficies et de la production du maïs en Algérie (FAOSTAT, 2021(b)).	10
Tableau 2 : Liste des produits alimentaires consistant en / ou contenant le maïs.	56
Tableau 3 : Matériaux de référence certifiés utilisés pour les différents événements testés.	62
Tableau 4 : Les amorces utilisées dans la PCR qualitative	68
Tableau 5 : Composition des mix des PCR qualitatives et leurs programmes de température.	70
Tableau 6 : Amorces et sondes utilisées dans la PCR en temps réel.	73
Tableau 7 : composition des PCR en temps réel.	74
Tableau 8 : Concentration et pureté des extraits d'ADN d'échantillons de maïs doux extraits par la Méthode de wizard.	77
Tableau 9 : Concentration et pureté des extraits d'ADN d'échantillons de produits sans gluten extraits par la Méthode de wizard.	77
Tableau 10 : Concentration et pureté des extraits d'ADN d'échantillons de cornflakes extraits par la Méthode de wizard.	78
Tableau 11 : Concentration et pureté des extraits d'ADN d'échantillons de chips extraits par la Méthode de wizard.	78
Tableau 12 : Concentration et pureté des extraits d'ADN d'échantillons de céréales pour bébé extraits par la Méthode de wizard.	78
Tableau 13 : Concentration et pureté des extraits d'ADN d'échantillons de cornflakes extraits par la Méthode de wizard.	78
Tableau 14 : Résultats de la PCR qualitative.	88
Tableau 15 : Concentration et masse des étalons obtenus par dilution en série pour les événements testés	107
Tableau 16 : Les performances analytiques des PCR en temps réel	108
Tableau 17 : Résultats quantitatifs de la PCR en temps réel	109

Liste des figures

Figure 1 : la conception d'une construction génique (GNIS, 2020).	6
Figure 2 : Dégâts causés par la larve de la pyrale de maïs sur la tige de maïs (GNIS, 2021(b)).	11
Figure 3 : Schéma général de la méthode ELISA sandwich.....	16
Figure 4 : Schéma général d'un test immunologique en bande à flux latéral : (a) illustration du principe de test et l'emplacement relatif des lignes de contrôle et de test sur une bande de nitrocellulose, (b) Les bandelettes de test observées verticalement et trempées dans des tubes avec des solutions à analyser pour un analyte donné (Mafra et Oliveira, 2005).	17
Figure 5 : Représentation schématique d'un cycle d'amplification PCR.	19
Figure 6 : Représentation schématique d'un insert typique et de quatre types d'analyses basées sur la PCR montrant une spécificité croissante (Holst-Jensen <i>et al.</i> ,2012).	21
Figure 7 : Agents se liant à l'ADN double brin (Double-stranded DNA binding dyes: Lightcycler assay). (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel (Poitras et Houde, 2002).	25
Figure 8 : Essai Taqman (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.	26
Figure 9 : Procédure de détection des OGM.	28
Figure 10 : Carte représentant la réglementation d'étiquetage à travers le monde (Krinke et Verriere, 2017).	38
Figure 11 : Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique des échantillons de maïs conserve suivants : SC1 SC2, SC3, SC4, SC5, SC6, SC7, SC8, SC9, SC10, SC11, SC12, SC13, SC14, SC15, SC16, Blanc.	81
Figure 12 : Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique des échantillons de maïs conserve suivants : SC17, SC18, SC19, SC20, SC21, SC22, SC23, SC24, SC25, SC26, SC27, SC28, SC29, SC30, SC31, Blanc.	81
Figure 13 : Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique des échantillons de cornflakes : DP1, DP2, DP4, DP5, DP6, DP7, DP8, DP9, DP10, DP11, DP12, DP13, DP14, DP15, DP16, DP17, DP18, DP19, DP20, DP21, DP22, DP23, DP24, DP25, DP26, Blanc.	81
Figure 14 : Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique des échantillons de cornflakes CF1, CF2, CF3, CF4, CF5, CF6, CF7, CF8, CF9, CF10, CF11, CF12, CF13, CF14, CF15, CF16, CF17, CF18, CF19, CF20, CF21,CF22, CF23, CF24, CF25, CF26, CF26, Blanc.	82
Figure 15 : Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique des échantillons de Chips et céréales pour bébés CC1, CC2, CC3, CC4, CC5, CC6, CC7, CC8, CC9, IC1, IC2, IC3, IC4, IC5, IC6.	82

Figure 16 : Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique des échantillons de Popcorn: Blanc, PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, PC7, PC8.....	82
Figure 17 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'invertase de maïs (IVR F / IVR R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, SC1, SC2, SC3, SC4, SC5, SC6, SC7, SC8, SC9, SC10, SC11, SC12, SC13, SC14, SC15, SC16, Contrôle Positif, Contrôle Négatif.....	84
Figure 18 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'invertase de maïs (IVR F / IVR R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, SC17, SC18, SC19, SC20, SC21, SC22, SC23, SC24, SC25, SC26, SC27, SC28, SC29, SC30, SC31, Contrôle Positif, Contrôle Négatif.....	84
Figure 19 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de La zéine de maïs (Mz F / Mz R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, CF1, CF3, CF5, CF7, CF10, CF13, CF16, CF18, CF20, CF25, Contrôle Négatif.....	85
Figure 20 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de La zéine de maïs (Mz F / Mz R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, CF2, CF4, CF6, CF8, CF9, CF11, CF12, CF14, CF15, CF17, CF19, CF21, CF22, CF23, CF24, CF26, Contrôle Négatif.....	85
Figure 21 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de La zéine de maïs (Mz F / Mz R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP14, DP15, DP16, DP17, DP18, DP23, DP7, DP12, Contrôle Positif, Contrôle Négatif.....	85
Figure 22 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de La zéine de maïs (Mz F / Mz R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : DP13, DP19, DP20, DP21, DP22, DP26, Marqueur moléculaire, DP1, DP2, DP5, DP9, DP10, DP11, DP24, DP25, Contrôle Négatif.....	86
Figure 23: Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de La zéine de maïs (Mz F / Mz R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants: IC1, IC2, IC3, IC4, IC5, IC6, Marqueur moléculaire, M CC1, CC2, CC3, CC4, CC5, CC6, CC7, CC8, CC9, Contrôle Négatif.....	86
Figure 24 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de la zéine du maïs (Mz-F / Mz-R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, PC7, PC8, Contrôle Négatif.....	86
Figure 25 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du promoteur 35S (35S-cf3 / 35S-cr4) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : 1 ^{ère} rangée : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP14, DP15, DP16, DP17, DP18, DP23, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP22, DP26/ 2 ^{ème} rangée : Marqueur moléculaire, DP1, DP2, DP5, DP9, DP10, DP11, DP24, DP25, Contrôle Positif 1 (Bt11, 0.1%), Contrôle Positif 2 (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.....	90
Figure 26 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du terminateur NOS (HA-nos118f / HA-nos118r) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : 1 ^{ère} rangée : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP14, DP15, DP16, DP17, DP18, DP23, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP22, DP26/ 2 ^{ème} rangée : Marqueur	

moléculaire, DP1, DP2, DP5, DP9, DP10, DP11, DP24, DP25, Contrôle Positif 1 (Bt11, 0.1%), Contrôle Positif 2 (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.....90

Figure 27 : 1^{ère} rangée : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du promoteur 35S (35S-cf3 / 35S-cr4) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : IC1, IC2, IC3, IC4, IC5, IC6, Marqueur moléculaire, CC2, CC3, CC4, CC5, CC6, CC7, CC8, CC9, Contrôle Positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif / 2^{ème} rangée : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du terminateur NOS (HA-nos118f / HA-nos118r) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : IC1, IC2, IC3, IC4, IC5, IC6, Marqueur moléculaire, CC2, CC3, CC4, CC5, CC6, CC7, CC8, CC9, Contrôle Positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.....91

Figure 28 : 1^{ère} rangée : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du promoteur 35S (35S-cf3 / 35S-cr4) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, CF1, CF5, CF6, CF7, CF8, CF10, CF11, CF12, CF15, CF16, CF17, CF19, CF22, CF23, CF24, CF25, CF26, Contrôle Positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif / 2^{ème} rangée : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du terminateur NOS (HA-nos118f / HA-nos118r) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, CF1, CF5, CF6, CF7, CF8, CF10, CF11, CF12, CF15, CF16, CF17, CF19, CF22, CF23, CF24, CF25, CF26, Contrôle Positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.....91

Figure 29 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du promoteur 35S (35S-cf3 / 35S-cr4) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : 1^{ère} rangée : Marqueur moléculaire, SC1, SC2, SC5, SC6, SC7, SC8, SC10, SC11, SC12, SC13 SC14, SC16, SC17, SC18 / 2^{ème} rangée : Marqueur moléculaire, SC19, SC20, SC22, SC23 SC24, SC25, SC26, SC27, SC28, SC29, SC30, SC31, Contrôle positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.....92

Figure 30 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du terminateur NOS (HA-nos118f / HA-nos118r) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : 1^{ère} rangée : Marqueur moléculaire, SC1, SC2, SC5 SC6, SC7, SC8, SC10, SC11, SC12, SC13 SC14, SC16, SC17, SC18 / 2^{ème} rangée : Marqueur moléculaire, SC19, SC20, SC22, SC23 SC24, SC25, SC26, SC27, SC28, SC29, SC30, SC31, Contrôle positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.....92

Figure 31 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du promoteur 35S à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, PC7, PC8, Contrôle positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif. .93

Figure 32 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du terminateur NOS (HA-nos118f / HA-nos118r) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, PC7, PC8, Contrôle positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.....93

Figure 33 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique MON810 (VW01 / VW03) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (MON810 /2%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (MON810, 2%), Contrôle Négatif.....97

Figure 34 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique MON863 (P863-3F/ P863-4R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (MON863, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (MON863, 1%), Contrôle Négatif.98

Figure 35 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique TC1507(TC-F/ TC-R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (TC1507, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (TC1507, 1%), Contrôle Négatif. 98

Figure 36 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique NK603(NK-F/ NK-R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (NK603, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (NK603/1%), Contrôle Négatif. ..98

Figure 37 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique GA21(GA-F/ GA-R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (GA21, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (GA21, 1%), Contrôle Négatif. ...99

Figure 38 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique DAS59122 (DAS-AF/ DAS-AR) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (DAS59122, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (DAS59122, 1%), Contrôle Négatif.99

Figure 39 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique MIR604 (MIR604-AF/ MIR604-AR) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (MIR604, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (MIR604, 1%), Contrôle Négatif.....99

Figure 40 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique Bt11 (Bt11 3-5'/ Bt11 3-3') à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif. 100

Figure 41 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique Bt176 (cry03/ cry04) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (Bt176, 1%), Contrôle Négatif.

(b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (Bt176, 1%), Contrôle Négatif.	100
Figure 42 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique 3272 (3272-F/ 3272-R1) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4. (b) : Marqueur moléculaire, CC7, CF16, CF23, Contrôle Positif (3272, 1%), Contrôle Négatif.	100
Figure 43 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique DAS40278 (DAS40-F1/ DAS40-R3) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : 1 ^{ère} rangée : Marqueur moléculaire, SC1, SC2, SC5 SC6, SC7, SC8, SC10, SC11, SC12, SC13 SC14, SC16, SC17, SC18, SC19, SC20, SC22, SC23/ 2 ^{ème} rangée : Marqueur moléculaire, SC24, SC25, SC26, SC27, SC28, SC29, SC30, SC31, CC2, CC3, CC4, CC5, CC6, CC7, CC8, CC9, Contrôle Positif (DAS40278, 1%), Contrôle Négatif.	101
Figure 44 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification DE l'évènement transgénique DAS40278 (DAS40-F1/ DAS40-R3) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : 1 ^{ère} rangée : Marqueur moléculaire, DP1, DP2, DP4, DP5, DP6, DP7, DP8, DP9, DP10, DP11, DP12, DP13, DP14, DP15, DP16, DP17, DP18 / 2 ^{ème} rangée : Marqueur moléculaire, DP19, DP20, DP21, DP22, DP23, DP24, DP25, DP26, IC1, IC2, IC3, IC4, IC5, IC6, Contrôle Positif (DAS40278, 1%), Contrôle Négatif.	101
Figure 45 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique DAS40278 (DAS40-F1/ DAS40-R3) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : 1 ^{ère} rangée : Marqueur moléculaire, CF1, CF5, CF6, CF7, CF8, CF10, CF11, CF12, CF15, CF16, CF17, CF19, CF22, CF23 / 2 ^{ème} rangée : Marqueur moléculaire, CF24, CF25, CF26, PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, PC7, PC8, Contrôle Positif (DAS40278, 1%), Contrôle Négatif.	102
Figure 46 : Synergy TM HTMulti-Mode Microplate Reader	145
Figure 47 : Thermocycleur MJ Mini (Bio-Rad).....	145
Figure 48 : Thermocycleur iCycler (Bio-Rad).....	145
Figure 49 : Système d'imagerie Gel Doc TM EZ imager (Bio-Rad).....	146
Figure 50 : Système de détection par PCR en temps réel CFX96 TM (Bio-Rad)	146

Liste des abréviations

- ADN:** Acide DésoxyriboNucléique
- ADN-T:** ADN de Transfert
- ADPIC :** Aspects des Droits de Propriété Intellectuelle qui touchent au Commerce
- BFL:** Bandelettes à Flux Latéral
- Bt:** *Bacillus thuringiensis*
- CaMV:** *Cauliflower Mosaic Virus*
- CCA:** Commission du Codex Alimentarius
- EFSA:** European Food Safety Authority
- ELISA:** Enzyme-linked Immunosorbent Assay
- EPA:** Environmental Protection Agency
- EPSP:** Enolpyruvylshikimate-3-phosphate
- EPSPS:** Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
- ERE:** Evaluation des Risques Environnementaux
- FAO :** Food and Agriculture Organization of the United Nations
- FG:** Flux de Gènes
- GM:** Génétiquement Modifié
- IgE:** Immunoglobuline E
- OCDE:** Organisation de Coopération et de Développement Economiques
- LC/MS/MS:** Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
- OGM:** Organisme Génétiquement Modifié
- OMS:** Organisation Mondiale de la Santé
- OVM:** Organisme Vivant Modifié
- PCB:** Protocole de Cartagena sur la Biosécurité
- PCR:** Polymerase Chain Reaction
- Qc-PCR:** Quantitative-compétitive PCR
- RT-PCR:** Real-Time PCR
- SDS:** Sodium Dodecyl Sulfate
- Taq:** *Thermus aquaticus*
- THG:** Transfert Horizontal de Gènes
- TLG:** Transfert latéral de Gènes
- UE:** Union Européenne

Introduction générale

Introduction générale

L'avènement et l'application du génie génétique a révolutionné les pratiques d'amélioration des plantes en leur permettant l'acquisition de nouveaux traits d'intérêt. Grâce à cette application de la biotechnologie, il est devenu possible de transférer des séquences de gènes individuels sélectionnés entre organismes d'une même espèce mais également entre espèces non apparentées (García-Cañas et Cifuentes, 2012). En effet, l'universalité du code génétique et la découverte de la structure d'ADN, de sa composition chimique et des mécanismes de sa synthèse a permis d'agir directement sur les séquences d'ADN, les couper, les déplacer et les réassocier pour donner des informations différentes ou nouvelles et même à les intégrer et les faire exprimer dans le patrimoine génétique de certaines plantes d'intérêt économique et agronomique (Gachet, 2003). Les organismes modifiés de cette manière sont appelés transgéniques ou organismes génétiquement modifiés.

Contrairement à d'autres types d'organismes génétiquement modifiés, par exemple les OGM à vocation thérapeutique, les OGM destinés à l'agriculture et à l'alimentation humaine, en particulier, représentent un sujet très controversé. Décidément, les industriels internationaux des cultures transgéniques entretiennent soigneusement les mythes sur les bénéfices que ces dernières peuvent procurer en terme de sécurité alimentaire et la lutte contre la famine ainsi que de répondre à l'évolution rapide de la demande d'aliments émanant d'une population croissante et de plus en plus exigeante en matière de qualité. En revanche, l'attention du public s'est accrue ces dernières années concernant l'utilisation du génie génétique dans la production de denrées alimentaires et les préoccupations concernant leurs risques potentiels pour la santé humaine, l'environnement et la biodiversité ont pris de l'ampleur (Godfray *et al.*, 2010 ; Manzanares-Palenzuela *et al.*, 2015).

Les risques réels et / ou perçus des organismes génétiquement modifiés (OGM) ont incité les organismes de réglementation internationaux à prendre des mesures concernant la biosécurité des OGM et à adopter des réglementations en matière d'étiquetage des denrées alimentaires permettant aux consommateurs d'identifier le produit d'intérêt et d'exercer leur droit de choisir (Premanandh *et al.*, 2012 ; Manzanares-Palenzuela *et al.*, 2015). En Algérie, la discussion autour de la réglementation des OGM et d'autres questions connexes est apparue avec l'adoption du protocole de Cartagena sur la biosécurité. Le pays a ratifié le protocole et promulgué un règlement interdisant l'importation, la production, la distribution, la commercialisation et l'utilisation du matériel végétal génétiquement modifié, sauf à des fins de recherche scientifique (Arrêté ministériel n° 910 du 24 décembre 2000). Cependant, aucune

Introduction générale

réglementation spécifique pour contrôler la présence ou l'utilisation des OGM dans les aliments ainsi qu'aucune réglementation pour l'étiquetage n'ont été établies.

La nécessité de se conformer aux exigences de la législation a suscité beaucoup d'intérêt pour les méthodes d'analyse permettant la détection fiable de ces produits et c'est ainsi que plusieurs approches basées sur la détection d'ADN ou de protéines ont été développées (La Mura *et al.*, 2011; Zhang et Guo, 2011). En raison de leur grande stabilité par rapport aux protéines et de leur présence dans la plupart des tissus biologiques, les molécules d'ADN nouvellement introduites sont la cible de choix pour l'analyse des OGM utilisant l'amplification en chaîne par polymérase (PCR). Cette technique présente un fort potentiel grâce à sa rapidité, sa simplicité, sa sensibilité et sa spécificité et peut être utilisée à des fins qualitatives ou quantitatives. Les premières tentatives de quantification des OGM reposaient sur la PCR semi-quantitative ou compétitive, mais elles ont rapidement été remplacées par des alternatives plus sophistiquées, en particulier la PCR en temps réel (Studer *et al.*, 1998; Zimmermann *et al.*, 1998; Hübner *et al.*, 1999; Holst-Jensen *et al.*, 2003; Mafra *et al.*, 2008(a)). Les avantages de la PCR en temps réel, à savoir la réduction du temps et des artefacts suite à l'élimination de l'analyse électrophorétique sur gel d'agarose et la spécificité accrue conférée par l'utilisation de sondes, en font la technique de choix pour la quantification du matériel GM dans les produits agricoles et alimentaires (Mafra *et al.*, 2008(a); Marmiroli *et al.*, 2008).

Indépendamment du statut réglementaire des OGM, de nombreuses études ont montré une prévalence importante de ces derniers à travers le monde entier, y compris les produits dérivés du maïs. En Algérie, le recours massif aux importations en matière de denrées alimentaires, d'intrants agricoles comme les semences ou l'alimentation du bétail à partir de pays producteurs d'OGM pose le réel risque d'introduction d'OGM dans le pays. De plus, les capacités de contrôle étant inexistantes et ne faisant pas partie des priorités, les importations de produits alimentaires ou destinés à la transformation, ne subissent aucun contrôle et ne présentent pas d'exigence de traçabilité et d'étiquetage (Louanchi *et al.*, 2006). D'ailleurs, la présence du matériel génétiquement modifié dans des aliments disponibles dans le commerce local a déjà été démontrée (Louanchi *et al.*, 2017). Cependant, l'étude ne couvrait pas toutes les étapes de l'analyse des OGM et se limitait au dépistage à l'aide du promoteur 35S et du terminateur NOS. Par conséquent et à notre connaissance aucune information concernant l'identité, ni aucune donnée quantitative sur l'introduction du matériel GM dans les aliments commercialisés localement, ne sont disponibles.

La présente étude a pour objectif principal la détection du matériel génétiquement modifié dans des produits alimentaires à base de maïs, destinés à la consommation humaine mais

Introduction générale

surtout d'effectuer une identification et une quantification afin de fournir pour la première fois des données sur l'identité et les quantités du matériel génétiquement modifié introduit en Algérie. Afin d'atteindre cet objectif nous avons procédé en plusieurs étapes, à savoir :

- Une détermination des échantillons à ADN amplifiable par PCR ciblant les gènes endogènes de l'espèce de maïs ;
- Un criblage par PCR conventionnelle des échantillons amplifiables ciblant le promoteur 35S et le terminateur NOS qui sont les deux séquences régulatrices les plus utilisées en transformation génétique ;
- Une identification spécifique ciblant onze événements transgéniques chez les échantillons GM positifs. Il s'agit des événements suivants : Bt176, Bt11, MON810, GA21, NK603, MON863, TC1507, MIR604, DAS59122, 3272 et DAS40278 ;
- Une quantification des événements précédemment identifiés par RT-PCR.

Ce document se présente comme suit :

- Une Introduction générale.
- Une synthèse bibliographique organisée en 4 chapitres :
 - Chapitre 1 : Les organismes génétiquement modifiés : Présentation
 - Chapitre 2 : Méthodes de détection des organismes génétiquement modifiés
 - Chapitre 3 : L'encadrement des organismes génétiquement modifiés
 - Chapitre 4 : La controverse autour des OGM.
- Un chapitre sur les Matériels et Méthodes.
- Un chapitre sur les résultats et discussion.
- Une Conclusion générale.

Chapitre I

Les organismes
génétiquement
modifiés:Présentation

1. Introduction

L'application de la technologie du génie génétique aux cultures alimentaires a connu un succès remarquable en introduisant des caractéristiques d'intérêt, telles que la tolérance aux herbicides, la résistance aux insectes, une durée de conservation accrue ou encore une composition nutritionnelle modifiée. Depuis la première approbation d'OGM en 1996, le nombre de cultures génétiquement modifiées introduites sur le marché a augmenté de façon drastique, tout comme le nombre de pays concernés, la diversité des nouveaux caractères et le commerce international.

2. Définitions et dénominations

Selon l'OMS, Les organismes génétiquement modifiés (OGM) peuvent être définis comme des organismes (c.-à-d. plantes, animaux ou microorganismes) dont la structure génétique a été modifiée d'une manière qui ne se produit pas naturellement par accouplement et/ou recombinaison naturelle (OMS, 2014).

Le processus consistant à modifier génétiquement un organisme s'appelle transgénèse. Cette technologie moderne possède plusieurs autres appellations courantes « biotechnologie moderne », « technologie génique », parfois aussi « technique de l'ADN recombinant » ou « génie génétique ». Elle permet d'introduire des gènes d'un organisme à l'autre et à les rendre opérationnels, même si ces organismes appartiennent à des espèces non apparentées.

Lorsque le terme OGM est appliqué aux cultures, le terme fait référence à des plantes utilisées à des fins agricoles dans lesquelles un ou plusieurs gènes, codant pour des caractères souhaitables, ont été introduits de façon stable dans le génome hôte. Les gènes introduits peuvent provenir non seulement de la même espèce ou d'une autre espèce végétale, mais aussi d'organismes qui n'ont aucun rapport avec la culture receveuse et donnent naissance, dans la majorité des cas, à un produit génique (une protéine) (Qaim, 2009 ; Querci *et al.*, 2020) .

Les organismes génétiquement modifiés (OGM) lorsqu'ils sont consommés directement ou après transformation sont appelés aliments génétiquement modifiés (GM). Ces aliments subissent une modification génétique artificielle pendant la phase de production de matières premières (Tsatsakis *et al.*, 2017(a)).

Remarque : bien que le génie génétique soit également utilisé avec succès dans des organismes autres que les plantes, y compris les bactéries, les champignons, les insectes et les virus, les organismes génétiquement modifiés les plus couramment appliqués et souvent

discutés sont les cultures génétiquement modifiées à vocation alimentaire (Hokanson *et al.*, 2014) et c'est ces OGM qui font l'objet de notre document.

3. Situation mondiale des OGM

En 2019, les cultures génétiquement modifiées ont été cultivées sur une superficie totale de 190,4 million d'hectares, une superficie qui s'est multipliée par un facteur d'environ 112 fois par rapport à celle enregistrée à la première année de leur commercialisation en 1996 et qui ne dépassait pas 1,7 millions d'hectares. La répartition des cultures GM à travers le monde est très hétérogène. Sur 29 pays ayant cultivé des cultures GM en 2019, 5 pays ont planté 90% des superficies, il s'agit notamment des états unis (71,5 millions d'hectares), du Brésil (52,8 millions d'hectares), l'Argentine (24 millions d'hectares), le Canada (12,5 millions d'hectares) et l'Inde (11,9 millions d'hectares) (ISAAA, 2021(a)).

Concernant les plantes cultivées, ce sont quatre principales plantes qui couvrent 99% des superficies cultivées, il s'agit du soja GM (91,9 millions d'hectares représentant 48% des superficies), suivi du maïs GM (60,9 millions d'hectares), du Cotton GM (25,7 millions d'hectares) et du canola GM (10,1 millions d'hectares). Le 1% restant est occupée par la betterave sucrière, la pomme de terre, les pommes, la courgette, la papaye et l'aubergine (ISAAA, 2021(a)).

Sur la base des superficies mondiales cultivées pour les cultures individuelles, 79% du coton, 74% du soja, 31% du maïs et 27% du canola cultivés en 2019 ont été GM.

4. Le Processus de transformation d'une culture GM

La première et principale étape dans la transformation d'une culture génétiquement modifiée consiste à identifier un gène conférant la caractéristique souhaitée (appelée «trait» dans les cultures génétiquement modifiées) (Glenn *et al.*, 2017). Afin que le gène s'exprime en une protéine, d'autres éléments doivent lui être associés pour former ce qu'on appelle une construction GM. Ces caractéristiques supplémentaires comprennent un signal promoteur (de début) et un signal terminateur (d'arrêt) (**Figure 1**). Souvent, un gène marqueur est également inclus permettant la sélection des cellules transformées de celles non transformées (Markoulatos *et al.*, 2004).

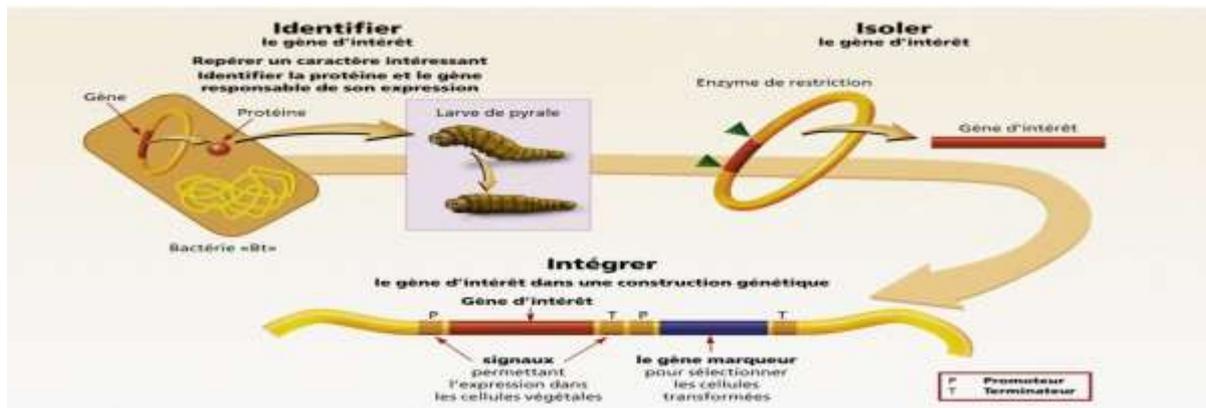


Figure 1 : la conception d'une construction génétique (GNIS, 2020).

La prochaine étape consiste en la transformation génétique proprement dite et qui consiste à introduire la cassette de transgène dans le génome de la plante cible. La capacité de transformer avec succès une plante dépend de plusieurs facteurs, y compris la disponibilité de tissus cibles qui sont compétents pour la propagation ou la régénération, une méthode efficace pour la livraison de l'ADN, la capacité de sélectionner les cellules transformées et la capacité de récupérer des plantes fertiles et GM (Narva *et al.*, 2014). La transformation à médiation d'Agrobacterium et la transformation par bombardement avec des particules recouvertes d'ADN sont les deux méthodes le plus couramment utilisées pour insérer le transgène dans le génome de la plante (Rao *et al.*, 2009 ; Prado *et al.*, 2014).

Après transformation (par Agrobacterium ou bombardement), la cassette se trouve incorporée dans le génome de l'hôte dans une ou plusieurs cellules, qui sont examinées et induites à se régénérer en plantes fertiles. Le dépistage des cellules ayant incorporé l'ADN introduit est facilité par l'utilisation des marqueurs de sélection (voir la **Figure 1**) qui transmettent une propriété ou un attribut facilitant l'identification et la récupération des cellules transformées. Le terme «événement» est utilisé pour désigner une seule plante régénérée à partir d'une seule cellule transformée. Un événement est défini par la séquence d'ADN spécifique qui a été insérée dans le génome de l'hôte par la transformation ainsi que le site particulier de l'insertion (Mumm, 2013).

5. Classification des OGM

5.1 La première génération — OGM à trait unique

Les premiers OGM disponibles sur le marché étaient des plantes portant des gènes à caractère unique combinés avec des éléments transgéniques, principalement le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV P-35S), et le Terminateur (T-NOS) dérivé

Chapitre I: Les organismes génétiquement modifiés : Présentation

d'*Agrobacterium tumefaciens*. La construction génétique fonctionnelle responsable d'un trait désiré contient au moins un promoteur, un gène et un terminateur (Holst-Jensen *et al.* 2012). Les vecteurs de transformation portaient une construction de gène marqueur supplémentaire, habituellement inactive du point de vue transcriptionnel dans la plante. À quelques exceptions près, les caractères étaient agronomiques, dominés par la tolérance aux herbicides (glyphosate, gluphosinate et oxinyl) et par la résistance aux insectes (diverses formes de protéines Cry de *Bacillus thuringiensis*) (Holst-Jensen, 2009).

La présence de ces éléments et leur distribution, combinaisons et organisation spécifiques dans différents OGM représentent des informations qui peuvent être exploitées par les analystes. Par conséquent, les méthodes de test des OGM étaient axées sur la détection d'éléments génériques ou de caractéristiques trouvées dans les OGM, tels que les éléments promoteurs et les éléments de terminaison (méthodes basées sur l'ADN) ou les protéines Cry sous leur forme native.

5.2 La deuxième génération — OGM à traits empilés

Une nouvelle tendance a commencé avec le nouveau millénaire, où de multiples caractéristiques agronomiques ont été combinées (empilement de gènes ou pyramidage). Il s'agit généralement de croisements hybrides d'OGM de première génération (par exemple, maïs Bt11 × GA21) ou d'OGM de première génération retransformés (coton MON15985, retransformé à partir de coton MON531) (Holst-Jensen, 2009 ; Holst-Jensen *et al.*, 2012).

Sur le plan analytique, les OGM à caractères empilés représentent un vrai défi et deux problèmes majeurs de détection sont survenus avec ce type de cultures/aliments GM :

- Aucune des méthodes de détection existantes ne pourrait discriminer la présence combinée dans l'échantillon de différents OGM individuels à caractères uniques (par exemple : le maïs MON-00863-5 ; le maïs MON-00810-6 ; le maïs MON-00603-6) et leur empilement (le maïs MON-00863-5 × MON-00810-6 × MON-00603-6). (Žel *et al.*, 2012).

- Une analyse approfondie des gènes peut nécessiter la possibilité de discriminer entre les cultures GM à caractères empilés et les cultures GM à caractère non intentionnel, qui pourraient être produites par pollinisation croisée entre deux événements de cultures GM uniques dans les champs adjacents (Lin et Pan, 2016).

5.3 La troisième génération — OGM quasi-intragéniques

La troisième génération d'OGM est constituée de soi-disant quasi-intragéniques ou OGM pour lesquels les éléments transgéniques insérés n'ont pas été utilisés dans d'autres OGM

(connus). Ce sont des OGM où la majeure partie de l'insert est dérivée de l'hôte et où la partie recombinante de l'insert est très restreinte (par exemple, limitée aux segments courts dérivés du vecteur de clonage). L'événement AV43-6-G7 de la pomme de terre est un exemple d'OGM quasi-intragéniques.

Commun aux OGM de troisième génération est également qu'ils sont beaucoup plus difficiles à détecter que les OGM de première et de deuxième génération (Holst-Jensen *et al.*, 2012).

5.4 La quatrième génération : OGM intragéniques et cisgéniques

Les véritables intragéniques et en particulier les cisgéniques sont susceptibles d'être introduits en tant que quatrième génération d'OGM (Lusser *et al.*, 2011). Dans ces OGM, les éléments insérés seront invariablement dérivés du pool génétique disponible pour la recombinaison naturelle pour les espèces réceptrices (Holst-Jensen *et al.*, 2012). Cela pourrait soulever moins de préoccupations, mais la diversité des gènes de caractères disponibles et attractifs serait considérablement réduite. Fait intéressant, les premiers OGM commerciaux ont été intra-géniques; la tomate Flavr Savr de Calgene et une tomate semblable de Zeneca ont été modifiées par insertion d'une version tronquée d'un gène polygalacturonase de la tomate (Lang et Dörnenburg, 2000). Le silence des gènes indésirables via les intragéniques est une autre option qui peut réduire les inquiétudes en matière de sécurité et d'éthique (Weeks *et al.*, 2008).

Chez ces OGM, la détection des éléments insérés seuls ne peut être utilisée comme preuve de modification génétique. Heureusement, même pour ces OGM, l'ordre spécifique et les lieux d'insertion des éléments insérés offriront un potentiel de détection et d'identification à base d'ADN. Il est particulièrement important que des motifs spécifiques à des événements spécifiques associés aux locus d'insertion) apparaissent également dans ces OGM. Les schémas d'expression génique offrent également un potentiel, quoique limité, de détection des intragéniques et des cisgéniques (Holst-Jensen *et al.*, 2012).

6. Le maïs génétiquement modifié

6.1 Généralités sur la culture de maïs

Le maïs (*Zea mays*), de la famille des poacées, est une haute plante annuelle au système racinaire fibreux abondant. Il s'agit d'une espèce à pollinisation croisée, où les inflorescences femelles (épis) et mâles (panicules) occupent des endroits distincts sur la plante. Les épis, souvent à raison d'un par tige, sont les structures où se développent un nombre variable de rangées (de 12 à 16) de grains, qui fourniront de 300 à 1000 grains (FAO, 1993).

Chapitre I: Les organismes génétiquement modifiés : Présentation

La plante de maïs peut être définie comme un système métabolique dont le produit final est principalement l'amidon qui est déposé dans les grains. Ces derniers représentent les grains de céréales les plus gros, pesant 250 à 300 mg chacun (Lawrence, 1991). Ils représentent environ (42%) du poids sec de la plante et sont le plus souvent de couleur blanche ou jaune, mais on en trouve également des noirs, des rouges et des mixtes (FAO, 1993).

6.2 Les utilisations du maïs

Le maïs possède trois grands types d'utilisations, à savoir l'alimentation animale, l'alimentation humaine et l'industrie agroalimentaire. L'utilisation du maïs dans l'alimentation animale (que ce soit sous forme d'ensilage ou de grain) constitue le premier débouché (environ les deux tiers globalement) et concerne surtout les pays industrialisés. Pour ce qui concerne l'alimentation humaine, le maïs a été l'aliment de base de toutes les civilisations précolombiennes. Actuellement, dans de nombreux pays de l'hémisphère Sud, principalement en Amérique Centrale et du Sud, en Afrique, en Inde et en Asie du Sud-Est, le maïs est une culture vivrière, destinée à l'alimentation humaine. Il est consommé sous forme de bouillie, de pâtes ou de galettes cuites. Dans les pays riches, le maïs est plus consommé sous forme de pop-corn, de maïs doux (sweet corn) ou de céréales pour le petit déjeuner (cornflakes). Le maïs représente également la matière première de plusieurs industries agroalimentaires à savoir l'industrie de l'amidonnerie, l'industrie de la semoulerie et la distillerie (GNIS, 2021 (a)).

Remarque: De nombreuses utilisations non alimentaires du maïs existent également, entre autres la production de plastiques biodégradables, de colles, d'adhésifs ainsi que de différents composants pour les industries textiles, papetières, chimiques et pharmaceutiques.

6.3 Situation mondiale du maïs

Le maïs (*Zea mays* L.) est la principale culture du monde et occupe la première place parmi les cultures céréalières en termes de production. Pour l'année 2019, la production mondiale atteindrait environ 1 milliard et 148 millions de tonnes où les Etats-Unis viennent très largement en tête avec 347 millions de tonnes de tonnes soit 30% de la production mondiale suivies par la chine (261 millions de tonnes) et du Brésil avec une production d'environ 100 millions de tonnes (FAOSTAT, 2021(a)).

6.4 Situation du maïs en Algérie

En raison de son exigence élevée en eau ainsi que sa grande demande d'attention, la culture du maïs est marginalisée en Algérie. Cependant, son importance dans l'industrie agroalimentaire se traduit par un recours massif aux importations.

La période coloniale allant de 1854 à 1878 fut marquée par l'introduction de variétés de maïs françaises et espagnoles avec l'augmentation considérable et rapide des plantations de maïs partant de 5076 ha à 33075 ha. Par la suite, une nette régression fut enregistrée et la culture fut progressivement abandonnée (Latati, 2015).

Durant la période allant de 1961 à 1989, les surfaces dédiées au maïs ont enregistré une baisse de 6000 à 1000 ha. A partir de 1990 et jusqu'en 2016, la culture de maïs a fait l'objet d'un désintéressement total dont témoignent les surfaces minuscules enregistrées durant cette période. En 2017 et 2018, les surfaces ont connu de nouveau une certaine augmentation et ont dépassé le seuil de 2000 ha pour rechuter en 2019 à 1500ha (**Tableau 1**).

Le maïs en Algérie est principalement destiné à l'alimentation animale où il représente avec le soja 80% de l'alimentation de bétail. Le maïs représente également une matière première de grande importance dans de nombreuses industries agroalimentaires et il constitue le produit de base du marché sans gluten qui connaît un certain essor ces dernières années marqué par une introduction par plusieurs marques de plusieurs types de produits sans gluten dans le marché (pâtes, couscous, semoule, biscuits...).

Tableau 1 : Evolution des superficies et de la production du maïs en Algérie (FAOSTAT, 2021(b)).

Années	Superficies (ha)	Production (tonnes)	Années	Superficies (ha)	Production (tonnes)
1961	5837	5689	2010	139	359
1970	6290	6438	2012	686	1755
1980	1530	1478	2015	712	2794
1989	1000	2400	2017	2025	2634
1990	140	231	2018	2250	4142
2000	430	1556	2019	1533	6368

6.5 Le maïs transgénique

Le maïs génétiquement modifié est une variété cultivée (cultivar) de maïs (*Zea mays*) dont le patrimoine génétique a été modifié par l'Homme. Il a été cultivé pour la première fois aux USA (1996) et au Canada (1997). Le maïs représente la deuxième culture GM après le soja,

avec 32% de la superficie mondiale totale en OGM pour l'année 2019. Sur 197 million d'hectares de surface mondiale cultivée en maïs, 30% soit 60,9 million d'hectares était génétiquement modifié (ISAAA, 2021(a)).

Le maïs est la culture où le génie génétique a été largement utilisé pour améliorer ses divers traits, il possède le nombre le plus élevé d'évènements transgéniques soit 240 évènements. Concernant les caractères introduits, on distingue 06 caractères commerciaux à savoir, la tolérance au stress abiotique, l'augmentation de la taille des épis, la tolérance aux herbicides, la résistance aux insectes, la modification de la qualité de produit, système de contrôle de pollinisation (ISAAA, 2021(b)). Toutefois la résistance aux insectes et la tolérance aux herbicides constituent les principales modifications génétiques du maïs.

6.5.1 Le maïs transgénique résistant aux insectes (Maïs Bt)

Le maïs résistant aux insectes a été obtenu en introduisant un gène bactérien (Cry) codant pour une protéine insecticide dans le génome du maïs afin de résister à l'attaque des larves de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* connues pour causer des pertes de rendements considérables (**Figure 2**). Ce gène a été cloné à partir d'une bactérie du sol, *Bacillus thuringiensis* (Bt), qui se distingue par la production d'une ou plusieurs inclusions cristallines en phase de sporulation dont certaines ont une activité entomopathogène (Belzile, 2002 ; Loudhaief, 2016).



Figure 2 : Dégâts causés par la larve de la pyrale de maïs sur la tige de maïs (GNIS, 2021(b)).

Les inclusions cristallines produites par Bt sont appelées δ -endotoxines ou toxines Cry (pour Crystal) et les gènes les codant comme des « gènes "Cry" ». L'activité insecticide de ces toxines est spécifique d'un ordre d'insectes: par exemple, les protéines Cry1 et Cry2 sont actives sur certains Lépidoptères, alors que les toxines Cry3 sont actives sur certains Coléoptères et les toxines Cry4 sur des espèces de Diptères. Certaines toxines Cry sont actives sur d'autres invertébrés comme les nématodes (Cry 5 et Cry 6) et les Gastéropodes (Cry1Ab), alors que

d'autres n'ont pas d'effets sur les invertébrés (comme Cry41A, Cry45A, Cry46A, Cry63A et Cry64A) mais ont une activité spécifique contre différentes cellules cancéreuses humaines. Parmi les 335 toxines Cry connues et produites par les différentes souches de Bt, au moins 125 ont une activité insecticide mais une vingtaine seulement ont été sélectionnées pour leurs action contre certaines nuisibles et sont utilisées commercialement soit sous forme de bio-insecticides (sporangies contenant des combinaisons de toxines Cry) soit dans les OGM (Loudhaief, 2016).

Le mécanisme d'action des protéines Cry implique la lyse des cellules épithéliales de l'intestin moyen de l'hôte, provoquant ainsi la paralysie du tube digestif. Une fois ingérés, les cristaux se dissolvent dans l'environnement alcalin de l'intestin moyen de l'hôte. Le traitement protéolytique 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 ce qui provoque la mort des cellules et des larves infectées (Belalia, 2010 ; Lombardo *et al.*, 2016).

6.5.2 Le maïs transgénique résistant 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 de génie génétique. La tolérance des cultures GM aux herbicides été achevée soit par :

- L'introduction d'un gène codant pour une enzyme cible, insensible à l'herbicide.
- Ou par l'introduction d'un gène codant pour une enzyme métabolisant et donc détoxifiant l'herbicide (Engel *et al.*, 2002).

La résistance au glyphosate, l'active ingrédient de l'herbicide Roundup et qui a été achevée par la première approche (Gasser et Fraley, 1989) représente la technologie de résistance aux herbicides la plus adoptée.

6.5.2.1 Le Maïs résistant au glyphosate

Le glyphosate [N-(phosphonométhyl) glycine] est un herbicide non sélectif, à large spectre, appliqué en postlevée par voie foliaire. Une fois absorbé par les feuilles des plantes, les propriétés physicochimiques uniques du glyphosate permettent sa translocation systémique via le phloème, d'une manière similaire à celle de la sève élaborée jusqu'aux racines (Huang *et al.*, 2015).

Le mode d'action du glyphosate consiste en l'inhibition de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), une enzyme clé de la voie shikimate impliquée dans la biosynthèse d'acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine et d'autres composés secondaires importants (Ravisankar *et al.*, 2017). 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.

Le pyruvate de phosphoénol (PEP) étant le substrat naturel de l'EPSPS, et le produit de la réaction étant le 5-énolpyruvyl shikimate 3-phosphate (EPSP), le glyphosate est en concurrence avec le PEP pour le même site actif d'EPSPS. Le défi dans l'ingénierie des cultures GT à travers des EPSPS insensibles a été d'identifier les EPSPS avec un K_m favorable pour le PEP mais un K_i beaucoup plus élevé pour le glyphosate (Huang *et al.*, 2015).

6.5.2.2 Le maïs résistant au glufosinate :

Le glufosinate [Acide (RS)-2-amino-4-(hydroxyméthylphosphinyl) butyrique] est un herbicide non sélectif de post-levée utilisé dans le monde entier pour le contrôle à large spectre des espèces de graminées et de dicotylédones. Le glufosinate inhibe l'activité de la glutamine synthétase (GS), une enzyme qui convertit le glutamate plus l'ammoniac en glutamine et est donc essentielle pour le métabolisme de l'azote des plantes. L'inhibition irréversible de GS par le glufosinate résulte en une accumulation rapide d'ammoniac toxique, qui inhibe la photosynthèse et finalement provoque une nécrose du tissu foliaire et la mort de la plante (Jalaludin *et al.*, 2017).

La résistance au glufosinate dans le maïs GM est obtenue par l'insertion de deux gènes, *bar* et *pat*, qui codent pour l'enzyme phosphinothricine acétyl transférase. Cette enzyme acétyle le glufosinate en un composé non toxique, le N-acétyl glufosinate. Les deux gènes ont été isolés de micro-organismes du sol où le gène *pat* a été isolé de *Streptomyces viridochromogenes* et le gène *bar* à partir de *Streptomyces hygroscopicus* (Ruhland *et al.*, 2004 ; Nandula, 2019).

Le maïs résistant au glufosinate a été commercialisé pour la première fois en 1996, empilé à la résistance aux insectes Bt et en tant que caractère autonome en 1997. Il a été également associé au maïs résistant au glyphosate en tant que «caractère à double empilement» au milieu des années 2000 (Nandula, 2019).

Chapitre II

**Méthodes de
détection des
organismes
génétiquement
modifiés**

1. Introduction

Le but des méthodes analytiques est de mettre en évidence l'information génétique supplémentaire portée par les OGM en comparaison avec leurs homologues conventionnels. L'analyse et la détection des OGM reposent donc sur l'étude de l'ADN contenu dans les denrées alimentaires et le criblage de séquences bien précises propres aux OGM. Cette recherche peut être directe et consiste alors à détecter les gènes étrangers ou les séquences bordant ces gènes ou indirecte en mettant en évidence les produits des gènes (les protéines) introduits dans les plantes (Gachet, 2003).

2. Les dosages biologiques

Les dosages biologiques reposent sur le principe d'exposer des plantules d'un lot de semences à un herbicide auquel les plantes OGM sont tolérantes contrairement aux non-OGM qui en demeurent sensibles et de Comparer le nombre de plantules survivant à l'herbicide avec celui de plantules affectées afin d'estimer la valeur relative de la teneur en OGM dans le lot de semences. Ces essais biologiques ont pour avantage d'être Peu coûteux, n'exigeant pas de compétences pour les utilisateurs et d'avoir la capacité de confirmer les propriétés biologiques souhaitées des OGM. Ils peuvent, cependant, être appliqués que pour mettre en œuvre certaines Propriétés biologiques, nécessitent habituellement plus de temps que les dosages basés sur les protéines et l'ADN et leur spécificité est limitée (Holst-Jensen, 2009).

3. Les méthodes basées sur les protéines

De nombreuses plantes GM contiennent des transgènes qui codent pour la production de protéines qui leur confèrent de nouveaux caractères d'intérêt. Les protéines « étrangères » produites chez les OGM peuvent être détectées par l'application de techniques physicochimiques et immunologiques. Les essais les plus répandus sont les essais immunologiques où les protéines ciblées sont détectées par des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, suivie par une analyse immunochimique (Hernández *et al.*, 2005).

3.1 Western blot

Le western blot ou transfert de protéines, appelé également buvardage de western est une méthode de biologie moléculaire qui permet la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique. Elle consiste à solubiliser les échantillons à doser par des détergents et des agents réducteurs qui sont ensuite soumis à une séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS), sous

des conditions de dénaturation, suivie d'une immobilisation sur des supports membranaires solides (généralement de nitrocellulose ou difluore de polyvinylidène) (Ahmed, 2002). Des anticorps spécifiques sont incubés avec le protéome immobilisé sur le support membranaire dont les sites d'interaction non spécifiques sont bloqués afin de minimiser les interactions entre membrane et anticorps de façon à ce que les anticorps appliqués ne peuvent s'attacher à la membrane que sur les sites d'interaction de la protéine cible. La présence de l'antigène cible est révélée par différents réactifs immunologiques secondaires (anticorps secondaires, protéine A ou protéine G) couplés à des enzymes reporteurs telles que la phosphatase alcaline ou la peroxydase de raifort (Hernández *et al.*, 2005).

Le western blot est une méthode d'analyse hautement spécifique qui fournit des résultats qualitatifs et permet de savoir si un échantillon donné contient la protéine cible au-dessus ou en dessous d'un seuil prédéterminé (Markoulatos *et al.*, 2004). Cette méthode connaît, cependant certains obstacles tel que la limitation pour les objectifs de quantification en plus d'être très consommatrice de temps, c'est pour cela qu'elle n'est pas aujourd'hui une praxis commun dans l'analyse d'OGM (Rogan *et al.*, 1999).

3.2 ELISA

La méthode immuno-enzymatique ELISA de l'anglais (enzyme-linked immunosorbent assay) est une technique immunologique qui implique l'utilisation d'une enzyme pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon donné (Asensio *et al.*, 2008).

Il existe plusieurs variantes d'ELISA dont l'ELISA directe et l'ELISA sandwich qui sont les plus utilisées pour l'authentification des produits alimentaires. Dans le cas spécial des OGM, la procédure la plus acceptée est l'ELISA de type sandwich où l'analyte est enserré entre deux anticorps : un anticorps de capture et un anticorps de détection (Hernández *et al.*, 2005 ; Kamle et Ali, 2013). Que ce soit dans des plaques de microtitration ou dans des tubes de microcentrifugation, les surfaces sont recouvertes avec des anticorps spécifiques afin de piéger l'antigène cible, une fois incubés avec l'extrait protéique. Un deuxième anticorps couplé à des réactifs reporteurs, est utilisé par la suite pour faciliter la détection de l'antigène piégé (Hernández *et al.*, 2005). En ELISA sandwich, la concentration protéique est directement proportionnelle à l'intensité de la couleur développée (Plus la concentration de la protéine cible est élevée, plus l'intensité de la couleur sera élevée) (Kamle et Ali, 2013).

Jusqu'à présent, plusieurs méthodes ELISA spécifiques aux produits géniques largement exprimés dans les plantes génétiquement modifiées ont été développées, tel que le produit génique neomycin phosphotransferase II (nptII), l'enzyme 5 EPSPS, l'insecticide Cry1Ab du

Bacillus thuringiensis et la protéine PAT. Seulement deux méthodes ELISA, qui sont pour la détection de la protéine CP4 EPSPS dans le soja Roundup ready et pour la détection de la protéine Cry1Ab dans MON810 ont fait, cependant, l'objet de larges études collaboratives internationales afin d'évaluer la possibilité d'utiliser de tels méthodes pour déterminer la concentration des ingrédients GM dans des échantillons de grains broyés (Jasbeer *et al.*, 2008).

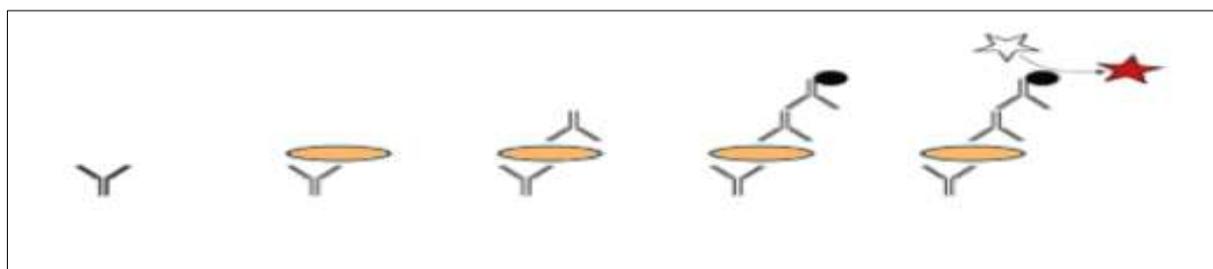


Figure 3 : Schéma général de la méthode ELISA sandwich.



3.3 Bandelettes à Flux Latéral (BFL)

Basé sur le principe ELISA, un système qualitatif rapide, rentable et facile à utiliser a été développé sous le nom de la technologie de bandes à flux latéral (en Anglais : lateral flow strip). (Hernandez *et al.*, 2005). Des anticorps doubles, immobilisés, spécifiques pour reconnaître la protéine exprimée, sont conjugués à un réactif coloré (nanoparticules d'or) et incorporés dans une bandelette de nitrocellulose. Cette bandelette, une fois trempée dans l'extrait protéique d'un tissu végétal hébergeant une protéine GM, mène à une réaction colorée (Kamle et Ali, 2013). Le complexe d'or conjugué, coloré en rouge coule vers l'autre côté de la bandelette par un mouvement capillaire. Le processus de migration du complexe s'arrête dans une zone de capture, menant à l'apparition d'une bande colorée discrète uniquement si l'antigène est présent (Hernandez *et al.*, 2005).

Les BFL peuvent donner des résultats de type oui ou non (présence ou absence) dans un délai de 05 à 10 minutes et sont disponibles pour le commerce pour la détection de Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Ab et CP4 EPSPS. Elles ont pour avantage d'être faciles à utiliser, et tractables sur le champ, cependant la disponibilité d'anticorps de haute qualité pour le nombre croissant de protéines transgènes attendues dans le future proche pose un réel problème.

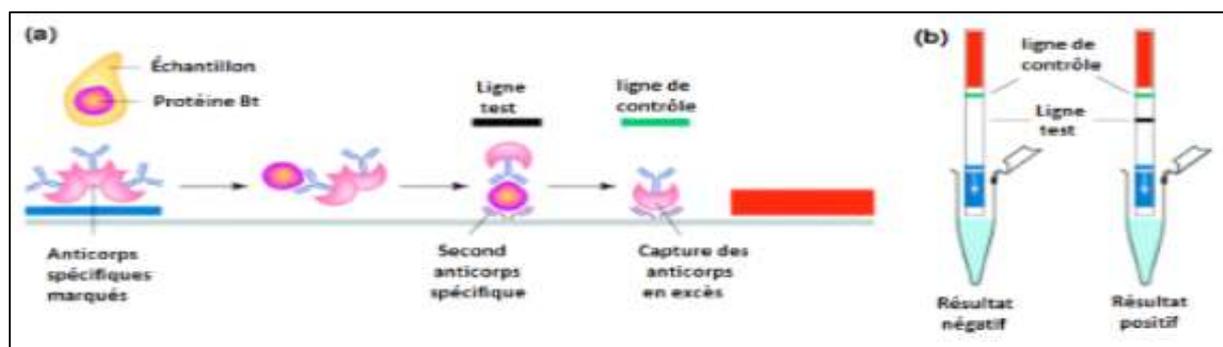


Figure 4 : Schéma général d'un test immunologique en bande à flux latéral : (a) illustration du principe de test et l'emplacement relatif des lignes de contrôle et de test sur une bande de nitrocellulose, (b) Les bandelettes de test observées verticalement et trempées dans des tubes avec des solutions à analyser pour un analyte donné (Mafra et Oliveira, 2005).

4. Les méthodes à base d'ADN

Etant donné que la modification génétique par définition est une modification de l'ADN, il est évident que les méthodes basées sur l'ADN soient au plus haut niveau de traçabilité métrologique, par rapport aux méthodes décrites précédemment (Holst-Jensen, 2009). L'ADN n'est présent sous sa forme native que dans les cellules vivantes ou les cellules au repos. Quand celles-ci meurent, des mécanismes de dégradation enzymatique sont initiés, conduisant à la destruction de la cellule et de tous ses constituants. Cette dégradation cellulaire conduit à la formation de fragments d'ADN de différentes tailles qui peuvent être détectés (Marmiroli *et al.*, 2008). Lorsqu'il s'agit d'aliments transformés, l'utilisation de méthodes à base d'ADN s'impose, car comparé à la plupart des protéines, l'ADN présente une plus grande résistance aux températures élevées. La quantité d'ADN qui reste dans les aliments dépend d'une variété de facteurs qui peuvent inclure la présence de nucléases, les agents réducteurs, les concentrations d'ions métalliques et les agents de liaison. Dans les matrices complexes, en particulier celles qui ont été soumises à différents types de traitements, il est difficile de prédire la présence d'ADN et sa vérification expérimentale est indispensable (Conceição *et al.*, 2006).

4.1 La technique de Southern blot

La méthode consiste à fixer l'échantillon d'ADN isolé sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon, sondant avec des sondes d'acide nucléique double brin marquées, spécifiques à l'OGM, suivie de la détection de l'hybridation radiographiquement ou fluorométriquement ou par chimiluminescence. Antérieurement, les sondes ont été marquées avec le ^{32}P . Cependant, de l'ADN non radioactif marqué à la fluorescéine, des sondes marquées à la digoxigénine ou à la biotine, avec une sensibilité équivalente aux sondes ^{32}P ont été récemment utilisées ce qui évite le recours à la radioactivité dans les laboratoires. Ces sondes non radioactives ont réduit

le temps de détection à moins d'une heure, par opposition au marquage de 24 heures requis par le ^{32}P . Cependant puisque'une seule sonde est utilisée et aucune amplification n'est mise en œuvre, cette méthode est considérée comme étant moins sensible que la PCR, qui utilise deux amorces d'ADN (Ahmed, 2002).

4.2 La technique PCR

4.2.1 Les principes fondamentaux de la technique PCR

La découverte et le développement de la PCR sont attribués au scientifique américain Kary Mullis qui, en 1983, alors qu'il travaillait au sein de la firme biotechnologique Cetus Corporation, a créé la technique qui allait complètement révolutionner la biologie moléculaire. Son impact dans de nombreux domaines tels que la médecine, la génétique, la biotechnologie et la criminalistique était si important qu'en 1993, Mullis a remporté le prix Nobel de chimie (Bram, 2020; Karymullis, 2020).

Les méthodes basées sur la présence d'ADN reposent sur la complémentarité des deux brins d'ADN double brin qui s'hybrident spécifiquement. La PCR permet d'amplifier sélectivement des fragments spécifiques d'ADN qui se trouvent en faible quantité dans un mélange complexe d'autres séquences d'ADN, grâce à des petits éléments d'ADN complémentaires appelés amorces et qui s'utilisent en paires. Ces amorces sont conçues pour s'hybrider sur des sites de reconnaissance des séquences complémentaires de chacun des brins opposés du gène d'intérêt. Par le biais d'une série de cycles thermiques différentiels répétitifs, une enzyme de polymérase d'ADN aide à répliquer et à amplifier la séquence de manière exponentielle entre la paire d'amorces (Querci *et al.*, 2010).

Une réaction PCR est généralement constituée de 20 à 40 répétitions de 03 étapes consécutives de températures (cycles) :

a. La dénaturation : Au cours de l'étape de dénaturation, la réaction est maintenue à $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant environ 20 s. L'augmentation de la température provoque la fusion de l'ADN, séparant les liaisons hydrogène entre les bases complémentaires et déroulant l'hélice à double brin jusqu'à ce que la molécule soit présente sous une forme simple brin (Caetano-Anollés, 2013).

b. L'hybridation : durant cette étape, le mélange réactionnel est refroidi à une température généralement comprise entre $45\text{-}65\text{ }^{\circ}\text{C}$ permettant aux amorces de se lier à la séquence cible. Les amorces sens et anti-sens s'hybrident par appariement complémentaire

de bases avec les brins opposés de l'ADN. Ils doivent être complémentaires aux extrémités 3' du brin antiparallèle de l'ADN matrice (Jalali *et al.*, 2017).

c. L'extension: La troisième étape consiste à synthétiser deux copies parfaites de la molécule d'ADN double brin originale en ajoutant les nucléotides de droite à la fin de chaque amorce, en utilisant les brins comme matrice. le mélange réactionnel est chauffé à 72 ° C, la température optimale pour l'activité enzymatique de la Taq polymérase (de la bactérie *Thermus aquaticus*). La polymérase se lie au complexe hybride amorce-matrice puis assemble un nouveau brin complémentaire en utilisant les nucléotides libres dans le mélange réactionnel. La durée de cette étape d'extension peut être augmentée si la région de l'ADN à amplifier est longue. Cependant, la plupart des protocoles de PCR utilisent 1 minute à cette étape, ce qui est généralement suffisant pour une extension complète (Tripathi, 2005; Jalali *et al.*, 2017).

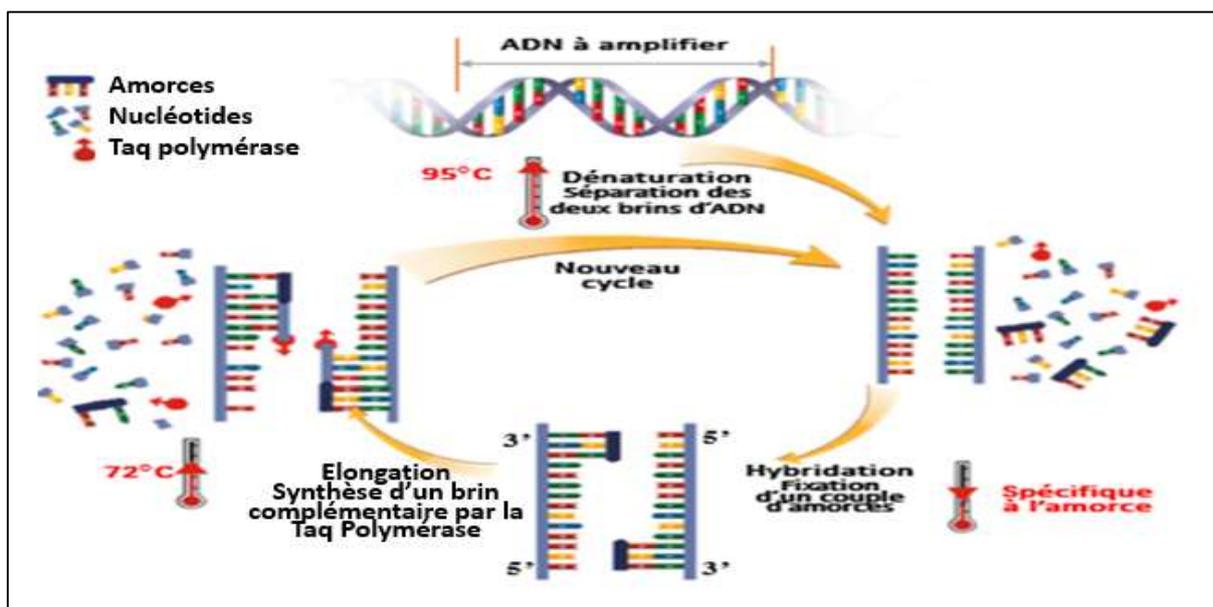


Figure 5 : Représentation schématique d'un cycle d'amplification PCR.

Une fois le cycle terminé, il peut être répété, et pour chaque cycle, le nombre de copies est doublé, ce qui entraîne une amplification exponentielle.

4.2.2 Séquences cibles pour la PCR dans la détection d'OGM (spécificité)

Comme indiqué dans le chapitre précédent, Un insert typique dans un OGM est composé d'au moins trois éléments : 1) l'élément promoteur, qui entraîne l'expression du gène inséré/altéré ; 2) le gène qui a été inséré/modifié, codant pour une fonctionnalité spécifique ; 3) l'élément terminateur, qui fonctionne comme un signal d'arrêt lors de la lecture du gène inséré/modifiés (Michelini *et al.*, 2008). La présence de ces éléments et leur distribution,

combinaison et organisation spécifiques dans différents OGM représentent des informations qui peuvent être exploitées par les analystes. Selon l'information mise en évidence, les méthodes de détection des OGM basées sur la PCR peuvent être regroupées en quatre niveaux de spécificité, décrits ci-dessous par ordre croissant. Le premier niveau de spécificité correspond à des méthodes dites de criblage (ou dépistage) alors que les autres niveaux représentent des méthodes de détection qui sont utilisées pour révéler plus de détails sur des échantillons connus à être OGM (**Figure 8**).

a. Détection propre aux éléments de régulation (Element-specific detection) :

Pour l'expression des gènes nouvellement intégrés, les développeurs des OGM utilisent un nombre limité d'éléments de régulation (promoteurs et terminateurs). Etant donné que ces éléments ont été fréquemment utilisés, ils sont des candidats idéaux pour le dépistage d'un grand nombre d'échantillons et sont utiles pour évaluer si un échantillon en vertu de l'enquête est susceptible de contenir ou pas du matériel d'origine GM. Les promoteurs et terminateurs les plus fréquemment rencontrés sont originaires d'*Agrobacterium tumefaciens* et du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). En outre, quelques gènes ayant fait l'objet d'un nombre significatif d'applications dans les plantes génétiquement modifiées, à savoir les gènes de tolérance aux herbicides comme le gène CP4 EPSPS dérivé d'*A. tumefaciens* sp. souche CP4, le gène codant la phosphinothricine acétyltransférase provenant de *Streptomyces hygroscopicus* (bar) ou de *S. viridochromogenes* (pat) ont été identifiés comme des cibles raisonnables pour le criblage (Marmioli *et al.*, 2008 ; Grohmann, 2010).

Les méthodes de criblage sont les méthodes les moins spécifiques et leur objectif est de couvrir autant d'OGM que possible, en même temps, limiter le coût de l'analyse.

b. Détection propre aux gènes d'intérêt (Gene-specific detection): Ces méthodes ciblent un fragment d'ADN du gène actif introduit, responsable de la modification génétique prévue. Le gène d'intérêt peut être d'origine naturelle, mais il est souvent légèrement modifié, par exemple par troncature ou altération de l'utilisation des codons (Jasbeer *et al.*, 2008).

c. Détection propre aux constructions (Construct-specific detection): Les séquences portant le gène d'intérêt et qui sont caractéristiques aux organismes transgéniques, sont détectées au niveau de leurs jonctions avec les séquences de régulation génétique (Iwobi *et al.*, 2012). Il s'agit donc d'une séquence chimère qui n'existe pas naturellement où les extrémités 5' et 3' sont dérivées de deux éléments séparés (différents). Les méthodes

“construct-specific” appliquent deux amorces d’oligonucléotides, où chacune s’hybride à un des éléments dans le chimère (Holst-Jensen *et al.*, 2012).

Plusieurs cultures GM partagent des configurations de constructions transgéniques similaires ce qui limite le pouvoir de résolution de ces méthodes. La méthode est simplement trop générale pour être utilisée dans l’identification des plantes GM pendant qu’elle reste inefficace pour le criblage vue qu’elle est limitée par sa spécificité aux constructions mais non pas aux éléments transgéniques universels. Donc malgré le pouvoir discriminatoire plus élevé des méthodes construct-specific par rapport à celui des méthodes element-specific, les méthodes construct-specific utilisées dans la détection de routine sont rares (Lin et Pan, 2016).

d. Détection spécifique aux évènements transgéniques (Event-specific detection): A ce niveau de spécificité la plus élevée, les séquences ciblées reviennent à la jonction unique trouvée au niveau du lieu de l’intégration entre l’ADN inséré et le génome récepteur (Miraglia *et al.*, 2004). Il s’agit des séquences chimères composées d’ADN de l’hôte et les séquences frontalières de la construction génétique insérée (Lin et Pan, 2016). Ces séquences sont uniques à un seul OGM, représentant une signature ou une étiquette sans équivoque d’un OGM particulier, qui dans la plupart des cas est créée de novo (de manière spontanée) lorsque la construction est intégrée dans le génome destinataire (Holst-Jensen *et al.*, 2012). Malheureusement, même les méthodes spécifiques aux événements possèdent leurs limites, spécialement lorsqu’on a affaire à des OGM à caractères empilés.

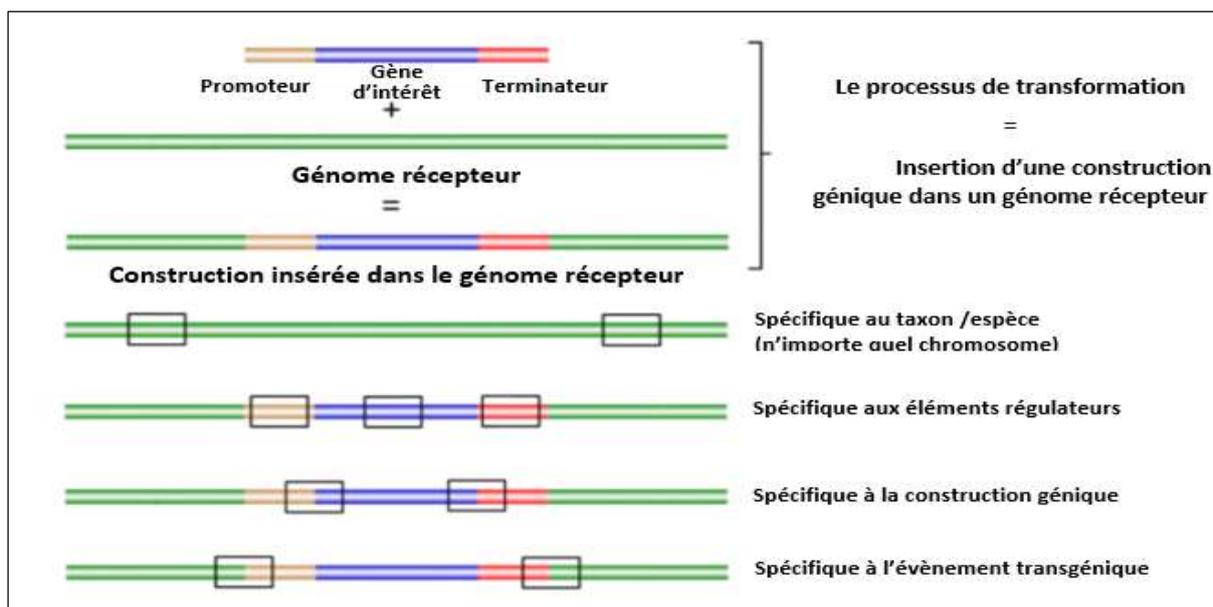


Figure 6 : Représentation schématique d'un insert typique et de quatre types d'analyses basées sur la PCR montrant une spécificité croissante (Holst-Jensen *et al.*, 2012).

Il existe plusieurs variantes de la technique PCR, que l'on peut classer en 2 grandes catégories à savoir, La PCR qualitative et La PCR quantitative.

4.2.3 La PCR qualitative

Les technologies de PCR qualitative sont principalement utilisées pour le criblage et /ou l'identification de fragments d'ADN transgéniques simples ou multiples à l'aide de PCR simples, multiples ou nichées (Zhang et Guo, 2011).

4.2.3.1 La PCR nichée

La PCR nichée consiste en l'utilisation de deux paires d'amorces pour un événement OGM donné. La première paire d'amorces amplifie une séquence spécifique de l'ADN cible, qui servira de matrice pour la seconde paire d'amorces (imbriquées). Par exemple, dans l'identification du gène Cry1Ab présent dans le maïs résistant aux insectes (Bt), on utilise des amorces externes (CRY1 et CRY2) qui délimitent une séquence de 420 pb et des amorces internes (CRY3 et CRY4) qui délimitent une séquence de 189 pb dans la séquence de 420 pb.

L'avantage de cette stratégie est sa grande spécificité, car si l'amplification d'un fragment faussement positif se produit avec la première paire d'amorces, la probabilité que la séquence imbriquée soit amplifiée est très faible (Conceição *et al.*, 2006).

4.2.3.2 La PCR multiplex

Le nombre d'événements transgéniques autorisés ayant rapidement augmenté, il est devenu nécessaire de développer des techniques permettant la détection multiple de plusieurs cibles. La PCR multiplex est une technique qui utilise plus d'une paire d'amorces dans le même test, permettant la détection et l'identification simultanée de plusieurs séquences d'ADN cible en une seule réaction. Cette technique qui promet un gain de temps et de réactifs nécessite, cependant, une plus grande manipulation, ce qui peut augmenter le risque de contaminations et de résultats faux positifs. Etant donné que chaque réaction nécessite des conditions d'optimisation différentes, à savoir des températures et des concentrations de réactifs différentes; la combinaison de différentes amorces peut entraîner l'amplification de séquences non cibles. De plus, lorsque plus d'un fragment cible est amplifié dans une réaction PCR, ils sont en compétition pour les réactifs. Si l'un d'entre eux est amplifié plus efficacement, le risque de résultats faux négatifs augmente. Pour cette raison, la validation des méthodes multiplex nécessite beaucoup de prudence (Gadani *et al.*, 2000 ; Conceição *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2014).

4.2.4 La PCR quantitative

Dès qu'un ou plusieurs événements liés aux OGM soient identifiés dans un échantillon donné, il devient nécessaire de passer aux procédures analytiques ultérieures visant à quantifier chaque événement détecté. La quantification des OGM est requise afin de répondre aux exigences de législation et d'étiquetage. Dans certains pays, la législation exige un étiquetage obligatoire, qui est communément associé à des seuils spécifiques. Les seuils de tolérance ou les seuils d'étiquetage varient d'un pays à l'autre et peuvent également être volontaires. En conséquence, les besoins spécifiques de quantification varient sensiblement (Tripathi, 2005 ; Milavec *et al.*, 2014). L'analyse quantitative des OGM repose sur la détermination de la quantité d'une cible spécifique à l'événement par rapport à une cible spécifique au taxon (c'est-à-dire le gène de référence).

Les premières tentatives de quantification des OGM par PCR étaient basées sur la PCR compétitive quantitative (QC-PCR), mais qui a été rapidement remplacée par des alternatives plus sophistiquées, en particulier PCR en temps réel.

4.2.4.1 La PCR compétitive

La PCR compétitive est basée sur la co-amplification de chaque séquence cible avec un étalon interne d'ADN synthétique concurrentiel (ADN compétiteur), qui ressemble étroitement à l'ADN cible et partage les mêmes amorces (Michelini *et al.*, 2008). Plusieurs réactions PCR sont nécessaires car chaque échantillon est amplifié avec des quantités croissantes de l'étalon interne, tout en gardant constants le volume et la concentration de l'échantillon (Gadani *et al.*, 2000). Lorsque l'ADN cible et le compétiteur sont amplifiés ensemble, les deux matrices vont rivaliser pour le même ensemble d'amorces. La procédure suppose que les réactions d'amplification de la séquence cible et de l'étalon interne (c.-à-d. le concurrent) se produisent avec la même efficacité dans n'importe quelle phase de la réaction, y compris la phase de plateau (Anklam *et al.*, 2002). A cause de cette compétition, le rapport des quantités des deux produits amplifiés reflète le rapport des quantités de l'ADN cible et du compétiteur.

Un rapport de 1 entre les deux produits d'amplification correspond au point d'équivalence au cours duquel l'amplicon du concurrent donne la même intensité de signal que l'ADN cible sur le gel d'agarose. Du moment où la quantité du compétiteur est connue, la quantité de l'ADN cible est donc estimée. L'amplicon produit à partir de l'étalon interne est généralement plus petit que celui produit par l'ADN cible, de 20-25 pb, ce qui permet de les distinguer sur le gel (Markoulatos *et al.*, 2004). En mettant en place deux PCR compétitives, une pour la culture GM (par exemple, le maïs Bt) et l'autre pour l'espèce d'intérêt (le maïs), comprenant de l'ADN

concurrent dans les 2 PCR, on peut estimer la quantité de la culture GM comparativement à l'espèce par extrapolation à partir du degré de dilution et la concentration du concurrent.

4.2.4.2 La PCR en temps réel

La PCR quantitative en temps réel est la technique de choix pour la quantification du matériel GM dans les produits agricoles et alimentaires. Elle permet la surveillance en continu (en temps réel) de la réaction d'amplification dans un environnement fermé sans interférer avec la réaction. Un signal issu de la fluorescence d'agents colorants entremêlés dans l'ADN double brin ou de sondes de fluorescence spécifiques de la séquence cible et correspondant à une quantité accrue du produit d'amplification peut être mesuré et visualisé sur un écran d'ordinateur et un logiciel se charge de convertir immédiatement le signal en estimations quantitatives (Jasbeer *et al.*, 2008 ; Mafra *et al.*, 2008 (a)). La combinaison d'une sensibilité et d'une spécificité excellentes, de données reproductibles, d'un faible risque de contamination et d'un temps de manipulation réduit, qui rend inutile une analyse post-PCR, a fait de la technologie de la PCR en temps réel une alternative attrayante à la PCR classique (Navarro *et al.*, 2015).

Afin de produire le signal fluorescent permettant la surveillance de la réaction d'amplification, plusieurs approches ont été développées dont les plus couramment utilisées sont l'utilisation d'une sonde fluorescente spécifique (Taqman) ou de colorants fluorescents de liaison à l'ADN double brin (par exemple: SYBR Green) (Broeders *et al.*, 2012).

Remarque: La PCR en temps réel est principalement utilisée à des fins de quantification, mais elle est de plus en plus utilisée également pour des tests qualitatifs afin de dépister ou d'identifier l'événement génétiquement modifié (Grohmann, 2010).

➤ **SYBR Green I :** Il s'agit d'un colorant asymétrique de cyanine (2-[N-(3-diméthylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-méthyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-méthylidène]-1-phényl-quinolinium), avec deux charges positives dans des conditions de réaction PCR standard lui permettant d'avoir une forte affinité de liaison à l'ADN double brin.

Lors d'une réaction d'amplification par PCR, le colorant libre en solution exhibe peu de fluorescence. Durant l'étape d'extension, une augmentation du signal de fluorescence associée à la quantité de colorant se fixant au sillon mineur d'ADN double brin naissant est observée. Vu que l'émission fluorescente décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante, le signal fluorescent est mesuré à la fin de chaque étape d'extension pour chacun des cycles de PCR. Le complexe ADN double brin/SYBR green I absorbe la

lumière bleue ($\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$) et émet de la lumière verte ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$) (Poitras et Houde, 2002 ; Navarro *et al.*, 2015).

La technologie basée sur le SYBR Green I représente le moyen le plus simple et le plus économique pour réaliser une PCR en temps réel. Cependant, cette méthode manque de spécificité, car elle permet de détecter toute double liaison provenant d'une contamination éventuelle, ce qui peut conduire à une augmentation des résultats faux positifs. D'autre part, la possibilité d'obtenir des courbes de dénaturation thermique comme moyen de confirmer l'identité de l'amplicon constitue un avantage de cette méthode. Ainsi, il est possible de vérifier si l'amplification ne concerne que le fragment cible, en obtenant une seule valeur de température de dénaturation qui se différencie facilement des dimères d'amorces possibles, car ils ont des températures de dénaturation très faibles (Mafra et Oliveira, 2005 ; Corbisier *et al.*, 2010).

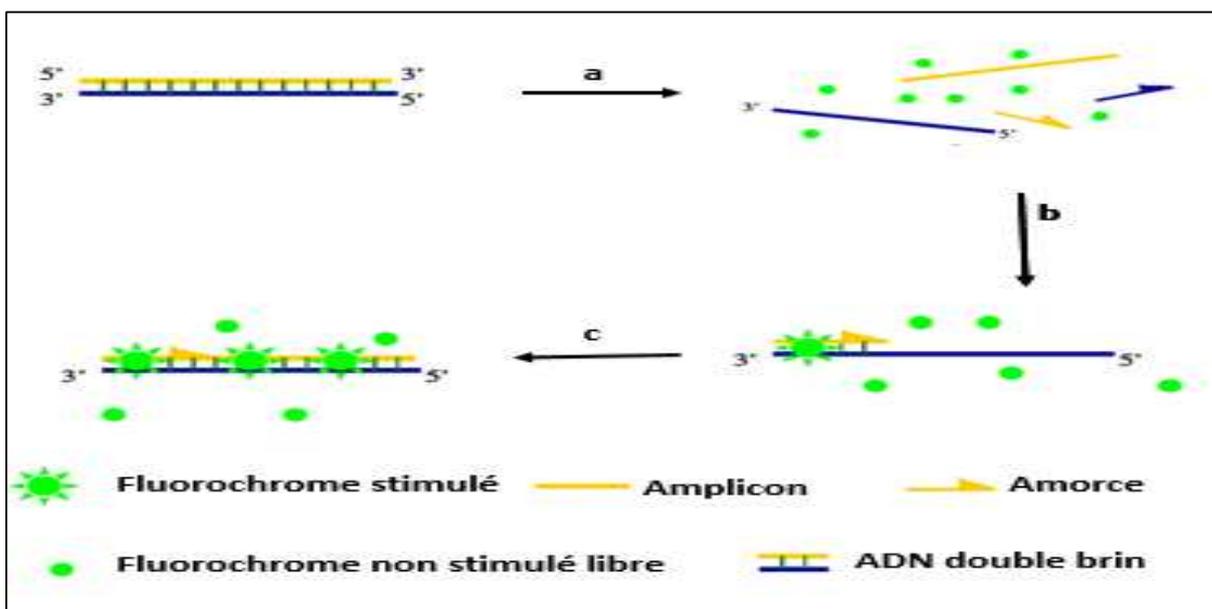


Figure 7 : Agents se lient à l'ADN double brin (Double-stranded DNA binding dyes: Lightcycler assay). (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel (Poitras et Houde, 2002).

➤ Les sondes TaqMan

Décrites en 1991 par Holland *et al.*, Ces sondes sont des oligonucléotides portant un fragment fluorescent émetteur (reporter) sur leur extrémité 5' et un second fragment fluorescent suppresseur (quencher) à l'extrémité 3'. Lorsque le reporter et le quencher sont physiquement proches, l'émission de fluorescence du reporter est inhibée et aucun signal ne peut être détecté (Conceição *et al.*, 2006 ; Navarro *et al.*, 2015). Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. A l'étape

suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. Le reporter est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde (Poitras et Houde, 2002) (**Figure 8**).

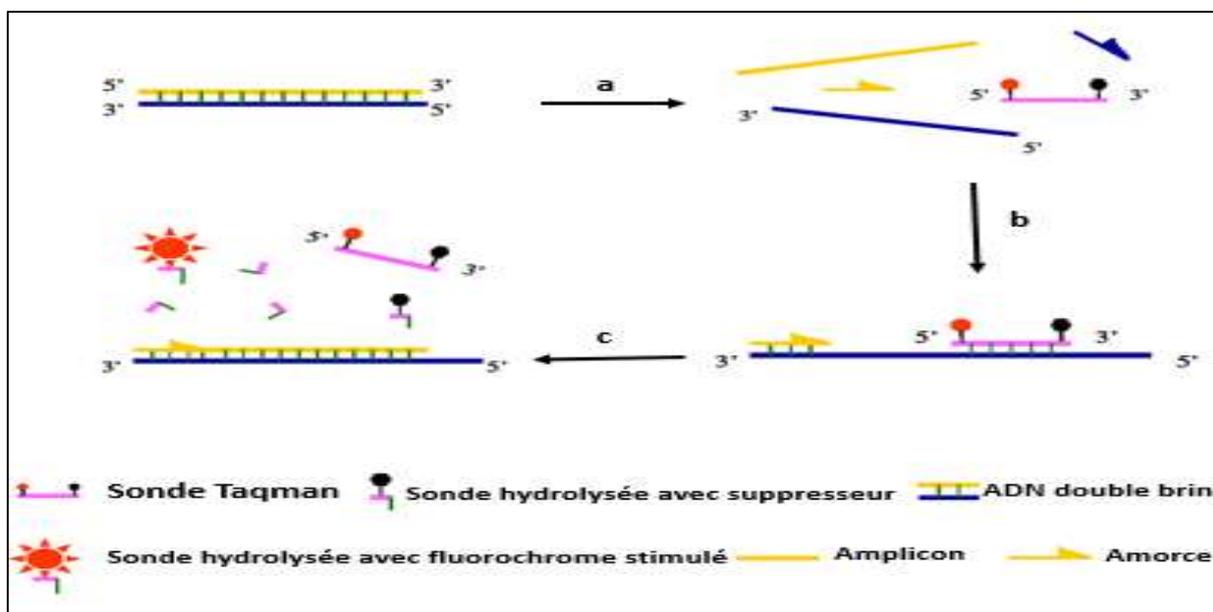


Figure 8 : Essai Taqman (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

Comme la Taq polymérase hydrolysera la sonde seulement lorsque celle-ci est hybridée à sa séquence complémentaire, les conditions de température de l'étape de polymérisation doivent être ajustées de façon à permettre à la sonde de rester hybridée durant cette étape. La majorité des sondes ont une température de dissociation (T_m) autour de 70°C ou de 5 à 10°C plus élevée que les amorces. Par conséquent, la technologie Taqman utilise une étape combinée d'hybridation et de polymérisation à $60\text{-}62^\circ\text{C}$ assurant l'hybridation et la stabilité de la sonde durant l'extension. Ceci permet aussi une activité 5'-exonucléasique maximale de la Taq polymérase mais, l'efficacité de l'activité de polymérisation de l'enzyme sera légèrement réduite à cette température sub-optimale. Pour de longs amplicons, une étape d'hybridation/polymérisation plus longue ou encore une augmentation de la concentration en Mn^{2+} ou Mg^{2+} pourrait s'avérer nécessaire pour stabiliser l'hybridation de la sonde à sa séquence cible.

Les sondes fluorescentes possèdent comme avantage par rapport aux agents se liant à l'ADN une spécificité accrue et une meilleure capacité de multiplexage. La spécificité d'hybridation

entre la sonde fluorescente et sa séquence d'ADN cible réduit significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mauvais appariements ou des dimères d'amorces (primer-dimers). Des réactions multiplexes peuvent être élaborées en utilisant des fluorochromes émetteurs distincts liés à des sondes différentes dans une même réaction de PCR. La technologie Taqman est toutefois moins efficace et moins flexible que d'autres technologies en temps réel pour la détection de mutations spécifiques (Bustin, 2000; Mackay *et al.*, 2002).

4.2.5 Stratégie de détection et de quantification des OGM par PCR.

En analyse de routine des OGM, trois étapes principales sont typiquement suivies, à savoir : l'étape de dépistage, d'identification et éventuellement de quantification (Fraiture *et al.*, 2015).

Tout d'abord, la présence potentielle d'OGM est évaluée au moyen d'une approche de dépistage ciblant les éléments transgéniques le plus communément trouvés dans les OGM, tels que le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur et le terminateur NOS de nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*. En outre, certains marqueurs plus discriminatoires comme par exemple : Cry3Bb, gat-tpinII, et t35S pCAMBIA, et des marqueurs particuliers aux taxons, pourraient également être utilisés. Cette étape permet d'établir une liste des OGM potentiellement présents dans les échantillons testés et prévenir d'autres essais inutiles dans les étapes suivantes.

Selon les signaux positifs et négatifs observés pour les marqueurs de dépistage testés, les OGM potentiellement détectés sont, dans un second temps, identifiés en utilisant des marqueurs spécifiques aux constructions - ou évènements- ciblant, respectivement, la jonction entre deux éléments à l'intérieur de la cassette transgénique ou la jonction entre la cassette transgénique et le génome de la plante.

Enfin, la quantité d'évènements OGM identifiés dans les échantillons testés est déterminée. A l'aide de marqueurs spécifiques à l'évènement et au taxon, cette étape de quantification est effectuée en fonction du nombre de copies appartenant au transgène et à l'endogène.

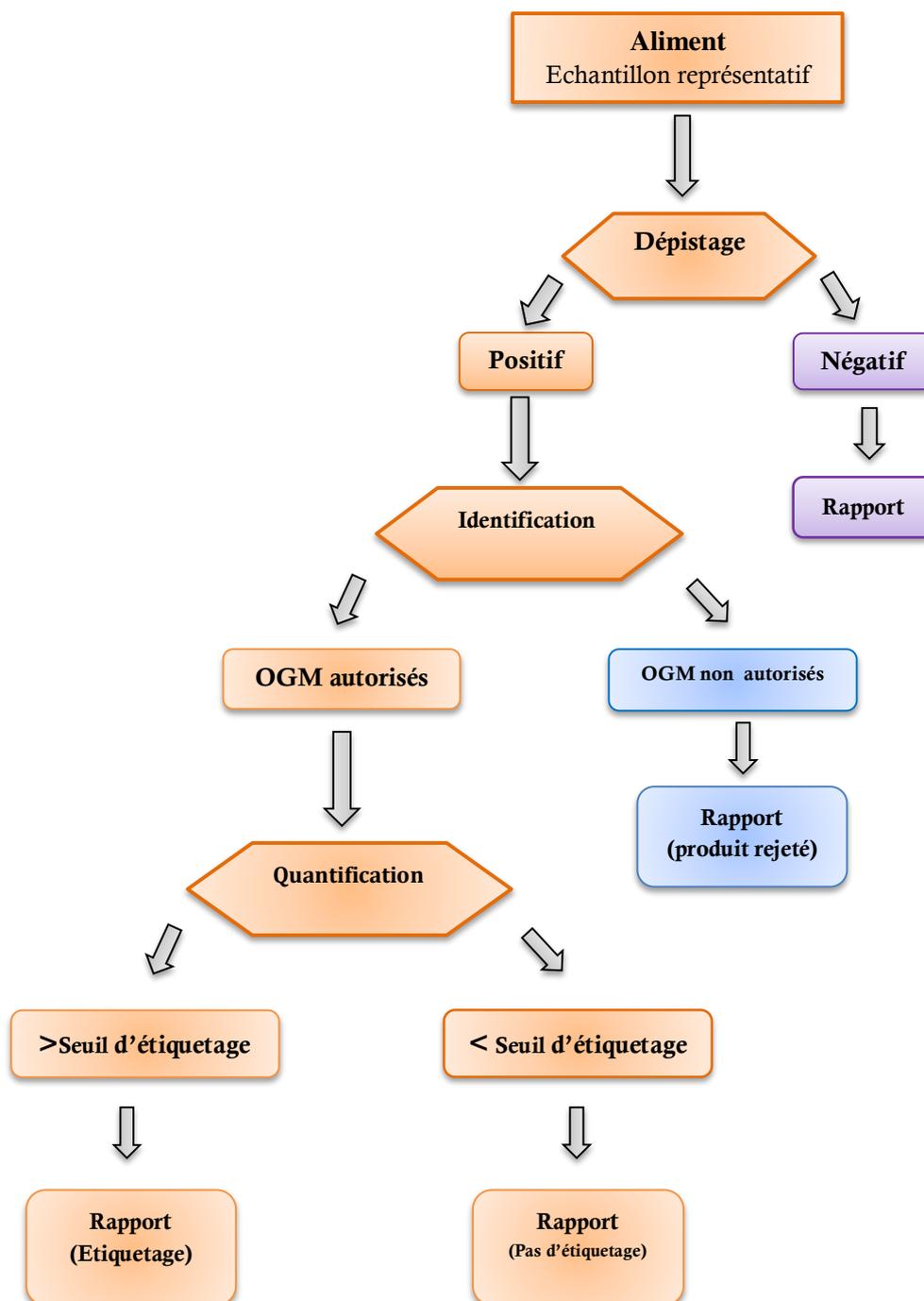


Figure 9 : Procédure de détection des OGM.

5. Les Méthodes alternatives de détection des OGM

5.1 La spectroscopie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique puissante utilisée pour identifier et quantifier des composés inconnus, ainsi que pour élucider les propriétés chimiques et structurales des molécules. C'est une technique très sensible capable de détecter des composés en quantités aussi petites que 10^{-15} g. Cela signifie que les OGM peuvent être identifiés dans des concentrations à l'échelle phénoménale (une partie sur 10^{12}) (Conceição *et al.*, 2006). Dans une série d'études, Ocaña *et al.* (2007, 2009) ont démontré le potentiel de deux approches différentes basées sur la spectrométrie de masse pour détecter et caractériser la protéine transgénique CP4 EPSPS dans plusieurs cultures. Cependant, un fractionnement hors ligne par filtration sur gel et électrophorèse sur gel unidimensionnelle a été nécessaire avant la digestion à la trypsine et la détection ultérieure du CP4 EPSPS par LC/MS/MS. D'autres groupes de recherche ont démontré l'utilisation de méthodes de LC/MS/MS ciblées et non ciblées pour la détection et la quantification de protéines transgéniques directement dans des extraits de feuilles de maïs. De plus, Devi *et al.* (2019) ont montré que la surveillance par réactions multiples peut être utilisée pour détecter de faibles niveaux du CP4 EPSPS dans des mélanges de soja GM/non-GM, mais seulement après enrichissement et purification du CP4 EPSPS avant l'analyse LC/MS/MS. Plus récemment, Swatkoski et Croley (2020) ont démontré la faisabilité de l'utilisation de la spectrométrie de masse (MS) ciblée pour détecter l'enzyme 5-enolpyruvulshikimate-3-phosphate synthase de la souche CP4 d'*Agrobacterium sp.* en développant un test de surveillance par réactions parallèles programmées pour la détection de cinq peptides de substitution du CP4 EPSPS. Le test a été utilisé pour cribler 9 préparations alimentaires à base de soja ou de maïs et les résultats ont montré qu'au moins quatre des cinq peptides de substitution sélectionnés ont été détectés dans les produits analysés, ce qui suggère que la SM ciblée peut servir de méthode analytique complémentaire aux méthodes basées sur l'ADN pour la détection de matériel provenant de plantes génétiquement modifiées dans les aliments transformés.

5.2 Les Biocapteurs

Les biocapteurs à ADN (ou génocapteurs) sont des dispositifs analytiques qui résultent de l'intégration d'une sonde spécifique à une séquence (généralement un court oligonucléotide synthétique) et d'un transducteur de signal (Plácido *et al.*, 2016). La sonde, immobilisée à la surface du transducteur, agit comme une molécule cible de reconnaissance d'ADN, tandis que

le transducteur est chargé de convertir la reconnaissance visée en un signal mesurable (Mafra, 2011) . Les biocapteurs appliqués à la détection des OGM ont été principalement basés sur des dispositifs électrochimiques, des dispositifs optiques RPS (résonance plasmonique de surface), des dispositifs piézoélectriques et, plus récemment, sur les nanotechnologies (Kamle et Ali, 2013). Les biocapteurs SPR sont basés sur la reconnaissance d'une cible qui induit la modification de l'indice de réfraction à l'interface métal/liquide, mesurée optiquement. Ce type de capteurs permet de suivre l'hybridation en temps réel sans avoir besoin d'un marquage moléculaire. Les biocapteurs électrochimiques sont les plus utilisés en raison des grandes avancées qui ont permis de bien comprendre les processus de bio-interaction et de détection. Ayant pour base les réactions d'oxydation/réduction, un biocapteur basé sur des électrodes modifiées (avec des oligonucléotides) permet la détection de l'ADN cible, car un signal électrochimique détecté par le dispositif est généré (Mafra, 2011 ; Marmiroli et al, 2008).

5.3 Les Puces à ADN (Microarrays)

Ces dernières années, la technologie des puces à ADN a été proposée pour diverses applications dans l'analyse de l'ADN pour la détection de différentes cibles simultanément. Les puces à ADN consistent en un assemblage de plusieurs biocapteurs sur une seule plateforme de détection. La technologie repose sur le principe classique de l'hybridation de l'ADN, avec la particularité que des milliers de sondes sont attachées à une surface solide, ce qui permet d'analyser un échantillon pour un nombre équivalent de cibles en une seule analyse. Un dispositif de puces à ADN est constitué de rangées de points/emplacements microscopiques spécifiquement recouverts d'oligonucléotides qui agissent comme des sondes, et qui s'hybrident ensuite avec de l'ADN provenant de différents OGM (Von Götz, 2010; Mafra & Oliveira, 2005; Mafra, 2011). Plusieurs plateformes de puces à ADN ont été proposées pour l'analyse des OGM, avec la possibilité de détecter simultanément plusieurs éléments régulateurs (par exemple, P-35S, T-NOS) et/ou des gènes spécifiques (par exemple, nptII, cp4epsps, cry1A(b)), ce qui permet de récupérer une grande quantité d'informations en un seul essai (Plácido et al., 2016).

Chapitre III

L'encadrement
des organismes
génétiquement
modifiés

1. Introduction

Le développement et l'utilisation dynamiques des OGM et des aliments génétiquement modifiés ont évoqué une grande controverse dans la société, qui a été associée à la nécessité d'introduire des règlements et des lignes directrices juridiques appropriées (Lech, 2016). A cet effet, plusieurs instruments juridiques sont utilisés : réglementation, étiquetage, traçabilité, coexistence, principe de précaution... etc.

2. Réglementation

L'élaboration d'un cadre réglementaire général sur les OGM a commencé en 1975, peu après la première application de la nouvelle technologie de l'ADN recombinant (ADNr). La nécessité d'une réglementation est née de la conviction que cette nouvelle technologie pouvait présenter certains risques en plus des avantages identifiés. Étant donné que la technologie des OGM était alors utilisée pour produire différents types d'aliments, identifiés sous forme d'aliments GM, il était nécessaire de réglementer cette catégorie d'aliments. Le principal objectif du règlement sur les aliments GM a été l'évaluation de leur sécurité (Mahgoub, 2016).

2.1 L'évaluation de la sécurité des aliments GM

Les préoccupations associées aux produits GM sont fortement liées à la santé humaine et à l'environnement et découlent principalement du fait que les sélectionneurs ont maintenant accès à l'information génétique de tout organisme vivant ou même à des séquences d'ADN synthétiques (Atherton, 2002). Par conséquent, chaque nouvel OGM devrait être évalué selon un processus rigoureux visant à assurer sa salubrité en tant que denrée alimentaire et partie intégrante de l'environnement (Kulikov, 2005; Singh *et al.*, 2006). Les données sur l'innocuité sont recueillies dans des dossiers qui sont soumis aux organismes de réglementation du monde entier en fonction d'une stratégie prudente qui guide la portée et le calendrier de chaque présentation (Prado, 2014).

Le processus d'évaluation de l'innocuité des aliments génétiquement modifiés comprend (König *et al.*, 2004) :

- Une évaluation de l'innocuité des produits génétiques associés au gène introduit (protéines et métabolites) par le moyen de tests de toxicologie et d'allergénicité.
- Une évaluation de l'innocuité des aliments entiers issus de cultures GM par des analyses de la composition et des essais d'alimentation animale.

Cette évaluation considère, en effet, deux catégories principales de dangers, à savoir ceux qui sont liés aux propriétés intrinsèques prévues et à la fonction du ou des caractères introduits,

Chapitre III: L'encadrement des organismes génétiquement modifiés

et ceux résultant de l'insertion du ou des gènes introduits dans le génome de la plante qui pourraient causer des effets inattendus (EFSA, 2008).

L'évaluation de l'innocuité des cultures génétiquement modifiées est fondée sur le concept d'équivalence substantielle, mis en place par l'OCDE et élaboré par la FAO/OMS. Le concept adopte une approche comparative pour identifier les différences possibles entre les aliments génétiquement modifiés et leur comparateur traditionnel, qui est considéré comme étant sûr (Kuiper *et al.*, 2002). Les développeurs de nouvelles variétés végétales utilisant le génie génétique ont alors la responsabilité d'établir que les variétés nouvellement introduites, et les produits alimentaires développés à partir de ceux-ci présentent le même niveau de sécurité que celui qui est accepté pour les aliments traditionnels. Le critère n'est donc pas d'établir une sécurité absolue mais relative (EFSA, 2008 ; Pötting *et al.*, 2014).

Il est à souligner que l'application du concept n'est pas une évaluation de la sécurité en soi, mais elle aide à identifier les similitudes et les différences potentielles entre l'aliment existant et le nouveau produit, qui est ensuite soumis à d'autres investigations toxicologiques. Trois scénarios sont envisagés (Kuiper *et al.*, 2001 ; Schilter et Constable, 2002) :

- L'OGM est équivalent dans les limites de la diversité naturelle à un aliment traditionnel. Dans cette situation, aucun autre test de sécurité n'est nécessaire, l'OGM est considéré comme aussi sûr que son homologue traditionnel. Par définition, seuls les produits dérivés d'OGM (par exemple l'huile) peuvent entrer dans cette catégorie mais pas l'OGM lui-même.
- L'OGM est équivalent à la contrepartie traditionnelle, à l'exception de certaines différences bien définies. Dans ce cas, l'évaluation de la sécurité peut cibler les différences identifiées. Les OGM actuellement sur le marché appartiennent à cette catégorie. La principale différence avec leurs comparateurs respectifs consistent généralement en les protéines transférées sur lesquelles sont concentrés les tests de sécurité (tests de toxicité, tests d'allergénicité).
- L'OGM diffère de l'aliment traditionnel sous des aspects multiples et complexes, ou il n'existe pas d'homologues traditionnels. Un tel produit nécessiterait une évaluation de la sécurité très poussée.

2.2 Les instruments de réglementation à l'échelle internationale

Malgré qu'il n'existe pas de système réglementaire international spécifique, plusieurs organismes internationaux participent à l'élaboration de protocoles pour les cultures génétiquement modifiées. Il existe trois principaux éléments de réglementation internationale

Chapitre III: L'encadrement des organismes génétiquement modifiés

concernant la recherche, le commerce et l'utilisation des cultures génétiquement modifiées, à savoir : le Codex Alimentarius, les documents de consensus de l'OCDE et le PCB.

2.2.1 Le PCB

Le Protocole de Cartagena sur la biosécurité de 2001 est le principal traité réglementant les OGM au niveau mondial et offre un cadre de protection contre les risques biotechnologiques à l'échelle internationale (Haugen et Bohn, 2016). Il entend ainsi «contribuer à assurer un degré adéquat de protection pour le transfert, la manipulation et l'utilisation sans danger des organismes vivants modifiés résultant de la biotechnologie moderne qui peuvent avoir des effets défavorables sur la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique, compte tenu également des risques pour la santé humaine, en mettant plus précisément l'accent sur les mouvements transfrontières »¹ (Secrétariat de la Convention sur la diversité biologique, 2000). Le Protocole ne parle pas d'OGM mais d'OVM, c'est-à-dire : « tout organisme vivant possédant une combinaison de matériel génétique inédite obtenue par recours à la biotechnologie moderne ». Cette définition est plus restrictive que celle d'OGM et permet d'exclure tout ce qui relève du produit dérivé ou manufacturé (par exemple le maïs transgénique est concerné mais pas la farine de maïs) (Inf'OGM, 2016).

Entré en vigueur le 11 septembre 2003, le protocole de Carthagène a, à ce jour (02/04/2020), recueilli 172 ratifications (CBD, 2020).

2.2.2 Le comité du codex Alimentarius

Le CCA est l'organe conjoint FAO/OMS chargé de rassembler les normes, codes d'usages, directives et recommandations qui constituent le Codex Alimentarius. Les objectifs du CCA en ce qui concerne les OGM est de protéger la santé des consommateurs, de garantir des pratiques équitables dans le commerce alimentaire et de promouvoir la coordination de tous les travaux sur les normes alimentaires entrepris par les organisations internationales gouvernementales et non gouvernementales. En ce qui concerne les OGM, Les objectifs du Codex comprennent l'examen de normes, de directives ou d'autres recommandations appropriées pour les aliments dérivés de la biotechnologie ou les caractéristiques introduites dans les aliments par la biotechnologie sur la base de preuves scientifiques et d'une analyse des risques. Le Codex a élaboré des principes pour l'analyse des risques pour la santé humaine des aliments génétiquement modifiés. Ces principes comprennent une évaluation scientifique des

¹ Article 1 du protocole

Chapitre III: L'encadrement des organismes génétiquement modifiés

risques avant la mise sur le marché, effectuée au cas par cas, ainsi qu'une évaluation des effets directs de l'introduction de et les effets non intentionnels qui peuvent résulter de l'insertion du nouveau gène (Kim, 2014). Les normes fixées par le Codex ont été largement utilisées comme référence dans les litiges commerciaux internationaux. Trois normes relatives aux cultures génétiquement modifiées sont :

(1) Guidelines for the conduct of food safety assessment of foods derived from rDNA plants (FAO/WHO Codex Alimentarius, 2003(a));

(2) Principles for the risk analysis of foods derived from modern biotechnology (FAO/WHO Codex Alimentarius, 2003(b)) et

(3) Working principles for risk analysis for food safety for application by governments (FAO/WHO, 2007).

2.2.3 L'OCDE

Pour répondre aux problèmes et préoccupations liés à l'utilisation de la biotechnologie moderne, l'OCDE a publié le guide sur les « Recombinant DNA (rDNA) safety considerations: Safety considerations for industrial, agricultural and environmental applications of organisms derived by recombinant DNA techniques». Ce livre connu a servi de point de départ aux pays qui doivent mettre en place leur propre réglementation en matière de biosécurité des cultures génétiquement modifiées. L'une des principales activités de l'OCDE est le développement de documents de consensus sur l'évaluation de la sécurité des cultures GM, la diffusion d'informations via BioTrack online, et la facilitation de l'harmonisation réglementaire. Ces documents de consensus sont largement utilisés par de nombreux scientifiques dans le monde entier comme un matériel de référence important lorsqu'ils procèdent à l'évaluation des risques liés aux cultures génétiquement modifiées (Kim, 2014).

2.3 Les différentes approches réglementaires à l'échelle internationale

Les approches réglementaires gouvernementales en matière d'OGM varient sur plusieurs points essentiels. Etant donné que les décisions doivent refléter les traditions culturelles et la tolérance au risque de leurs citoyens, les décideurs prennent en compte les contributions de divers groupes, qui peuvent inclure des organisations environnementales et de sécurité alimentaire, des agriculteurs de cultures biologiques, des agriculteurs à grande échelle, des producteurs d'animaux, des consommateurs, des sociétés agricoles multinationales et de nombreuses entités qui sont impliquées dans la chaîne mondiale complexe de production et de

Chapitre III: L'encadrement des organismes génétiquement modifiés

distribution alimentaire. Par conséquent, les choix des pays en matière de politique réglementaire reflètent différents compromis politiques (NCBI, 2016).

Les différences de réglementation les plus prononcées sont celles qui se trouvent entre les approches européenne et américaine. Alors que l'Union européenne (UE) a ratifié le Protocole de Cartagena avec ses règles spécifiques pour les OGM, le Protocole n'a pas été ratifié par les États-Unis, le Canada et la plupart des autres pays des Amériques (Qaim, 2016).

Les OGM doivent recevoir une autorisation avant d'entrer sur le marché, tant dans l'UE qu'aux États-Unis. Toutefois, le processus d'autorisation est traité différemment dans ces deux domaines, ce qui crée un cadre disparate pour la mise sur le marché des OGM.

Dans l'UE, le processus d'autorisation comprend une évaluation approfondie et au cas par cas de la sécurité par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA). Cette évaluation est basée sur le processus (process-based) où le processus de génie génétique végétal est distingué par des règles et des normes qui ne s'appliquent à aucune autre méthode de sélection. L'EFSA soumet son avis à la Commission européenne (CE), qui prépare un projet de décision. Au cours de l'étape suivante, le Comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale approuve ou rejette le projet à la majorité qualifiée. En cas d'approbation, la proposition est adoptée par la CE et l'autorisation doit être valable dans toute l'UE. Cependant, en vertu du principe de précaution, même en l'absence de toute preuve de risque, les régulateurs de l'UE peuvent refuser d'approuver les cultures génétiquement modifiées pour la seule raison de l'incertitude.

Aux États-Unis, trois agences fédérales réglementent différents aspects des OGM : le service d'inspection sanitaire des animaux et des plantes du ministère américain de l'agriculture (USDA), qui délivre les permis de dissémination commerciale et d'essais sur le terrain ; la FDA, qui est chargée de garantir la sécurité des aliments nationaux et importés ; et l'agence de protection de l'environnement (EPA), qui réglemente les pesticides utilisés dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. Selon les caractéristiques d'un produit, il peut être soumis à la juridiction d'un ou de plusieurs de ces organismes. Aux États-Unis, contrairement à l'UE, une approche par produit est suivie et la législation se concentre sur les risques du produit GM portant un nouveau caractère spécifique et non sur la méthode de sélection (le génie génétique n'est pas considéré comme intrinsèquement plus risqué que les méthodes conventionnelles). Le principe de précaution n'étant pas appliqué, la preuve de l'équivalence en substance permet donc la culture et la commercialisation des OGM dans le cadre des réglementations conventionnelles sur la sécurité alimentaire. En outre, le délai moyen

requis pour l'approbation d'un produit génétiquement modifié (environ 25 mois) est inférieur de 1,5 à 2 ans à celui de l'UE (Twardowski et Małycka, 2015).

3. L'étiquetage

La question de l'étiquetage des produits alimentaires contenant des ingrédients GM a été longuement débattue par les gouvernements et les organismes internationaux de normalisation pendant de nombreuses années (Kim, 2014). Ainsi, Plusieurs pays ont introduit ou envisagé d'introduire un système d'étiquetage des aliments pour les OGM, qui est également directement lié aux attitudes du public et aux préoccupations des consommateurs. En général, l'étiquetage est utilisé pour informer les consommateurs sur les ingrédients, les valeurs nutritives, les normes de qualité, les effets sur la santé et l'environnement et d'autres attributs non visibles des produits ou des procédés de fabrication des aliments et autres biens de consommation (Qaim, 2016). Selon le type d'effet, l'étiquetage peut être obligatoire ou volontaire. L'étiquetage obligatoire est souvent utilisé pour avertir les consommateurs de risques spécifiques pour la santé (par exemple, cigarettes, potentiel allergène), tandis que l'étiquetage volontaire est plus courant pour différencier les produits présentant des caractéristiques souhaitables à des fins de commercialisation (par exemple, produits biologiques, bien-être animal).

3.1 L'étiquetage volontaire

Dans le cas des OGM, Les directives de l'étiquetage volontaire dictent les règles qui définissent quels aliments peuvent être appelés OGM ou non OGM, et laissent les entreprises alimentaires décider si elles veulent utiliser de tels signaux d'information sur leurs produits. L'étiquetage volontaire ne peut être appliqué que dans le cas des produits qui sont considérés comme substantiellement équivalents à leurs homologues conventionnels, qui comprennent les produits dérivés de toutes les cultures transgéniques présentant des caractéristiques liées aux intrants (c.-à-d. pratiquement tous les produits GM aujourd'hui). Parmi les pays adoptant l'étiquetage volontaire, on distingue notamment le Canada, Hong Kong ou l'Afrique du Sud (Gruère et Rao, 2007).

3.2 L'étiquetage obligatoire

L'étiquetage obligatoire est quasi généralisé parmi les pays disposant de lois sur l'étiquetage lorsqu'il s'agit de cultures génétiquement modifiées qui ne sont pas substantiellement équivalentes à leurs homologues conventionnels. Cette exigence d'étiquetage pour ces produits est due au fait qu'ils présentent des caractéristiques nouvelles, comme le canola à forte teneur en acide oléique ou le riz à valeur nutritive élevée (par exemple, le riz

doré). Les pays dotés d'une réglementation reconnaissent que les consommateurs doivent être informés des nouveaux traits et propriétés que ces produits alimentaires ont acquis, afin de pouvoir prendre des décisions en connaissance de cause. En revanche, pour les produits qui sont considérés comme substantiellement équivalents à leurs homologues conventionnels, il existe une hétérogénéité internationale dans la réglementation. Les pays peuvent alors adopter un étiquetage obligatoire (par exemple le cas d'Australie, de l'UE, du Japon, du Brésil ou de la Chine) ou volontaire comme on l'avait précisé dans la section précédente (Gruère et Rao, 2007).

Remarque : Parallèlement à l'étiquetage obligatoire des ingrédients GM, certains pays ont des directives volontaires pour l'étiquetage des aliments non génétiquement modifiés. Ce système mixte obligatoire/volontaire est en place dans ces pays où les consommateurs sont prêts à payer une prime pour éviter complètement les ingrédients génétiquement modifiés, même à un niveau résiduel. Parmi les pays qui disposent d'un tel système, on distingue notamment l'UE qui a l'un des régimes d'étiquetage obligatoires les plus stricts au monde et le Japon.

Les différences d'étiquetage entre les pays ne se résument pas uniquement aux caractères obligatoire et volontaire de ce dernier. En effet même entre les pays ayant des directives obligatoires, on distingue de nombreuses différences qui sont liées notamment à l'orientation de l'étiquetage (étiquetage orienté sur le produit final ou sur le processus de production) et son champ d'application (Gruère et Rao, 2007).

En ce qui concerne l'orientation de l'étiquetage, la réglementation peut cibler la présence d'OGM dans le produit fini (comme en Australie, en Nouvelle-Zélande et au Japon) ou bien la technologie des OGM en tant que processus de production (comme dans l'UE, le Brésil et la Chine). Dans le premier cas, seuls les produits présentant des traces détectables et quantifiables de matières ou d'ingrédients génétiquement modifiés sont tenus de porter un label. En revanche, dans ce dernier cas, tout aliment dérivé d'une culture GM devra être étiqueté, que la modification génétique soit ou non traçable dans le produit final.

Concernant le champ d'application de la réglementation, ce dernier diffère largement entre les pays où l'étiquetage est obligatoire en fonction des principales caractéristiques suivantes :

a. La Couverture : les pays peuvent exiger un étiquetage pour:

- Une liste d'ingrédients alimentaires particuliers ou de tous les ingrédients des produits alimentaires emballés qui comprennent une protéine ou un ADN transgénique détectable ;
- Les produits hautement transformés dérivés d'ingrédients, même sans présence quantifiable d'ingrédients GM;
- Les aliments pour animaux;

- Les additifs et les arômes;
- La viande et les produits issus d'animaux nourris avec des aliments GM;
- Les aliments vendus par les traiteurs et les restaurants;
- Les aliments non emballés.

b. Le Niveau seuil pour l'étiquetage des ingrédients GM : peut :

- Etre appliqué à chaque ingrédient ou seulement aux 3 ou 5 principaux ingrédients;
- Aller de 0,9 % à 5 %, sauf en Chine où il n'y a pas de seuil.

La carte suivante a pour vocation de donner une vue d'ensemble des lois sur l'étiquetage des OGM dans le monde.

La classification retenue repose sur le seuil de présence d'OGM dans les produits à partir duquel l'étiquetage devient obligatoire. Ainsi, les réglementations qualifiées de strictes retiennent un seuil de présence d'OGM dans les produits de 0,1% à 0,9%. Les réglementations qualifiées de souples retiennent des seuils de 1% à 5%, et les réglementations qualifiées de floues n'établissent aucun seuil. À côté de l'obligation d'étiquetage des produits contenant des OGM, certains États ont créé des labels « sans OGM » ou « sans recours au génie génétique ». D'autres États ne disposent pas d'une réglementation relative à l'étiquetage des OGM. Ils sont colorés en gris sur la carte. C'est aussi le cas pour les États à propos desquels les informations quant à la législation sur l'étiquetage ne sont pas disponibles (Krinke et Verriere, 2017).

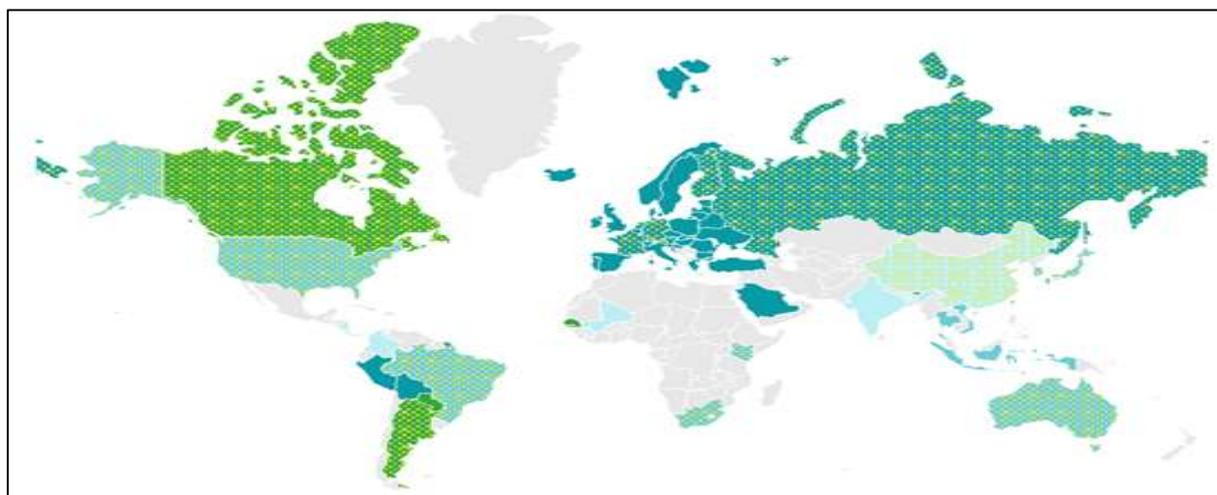
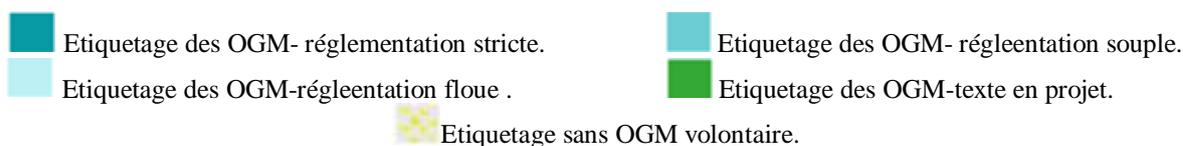


Figure 10 : Carte représentant la réglementation d'étiquetage à travers le monde (Krinke et Verriere, 2017).



4. La coexistence

La possibilité d'une opposition continue des consommateurs aux aliments génétiquement modifiés a des implications importantes pour la production et la commercialisation des produits agricoles. Les préférences hétérogènes des consommateurs rendent nécessaire la coexistence de systèmes de production génétiquement modifiés et non génétiquement modifiés dont l'objectif est de garantir aux consommateurs et aux agriculteurs la possibilité de choisir entre les produits génétiquement modifiés, traditionnels et biologiques. La coexistence repose sur la séparation des cultures, de sorte qu'il n'est pas possible de cultiver des champs contigus de cultures génétiquement modifiées et non génétiquement modifiées, ni de gérer ces cultures dans le cadre de courtes rotations. En outre, la coexistence peut nécessiter des mécanismes empêchant le flux de pollen (tels que des distances ou des barrières à pollen), ainsi que des zones de refuge et des machines spécialisées. La coopération entre agriculteurs voisins et les régimes d'indemnisation et de responsabilité sont de la plus haute importance (Vigani et Olper, 2013).

La coexistence peut être compromise par la possibilité de présence fortuite d'OGM : la probabilité que du matériel génétiquement modifié se mélange par inadvertance avec des cultures non génétiquement modifiées, empêchant les producteurs non génétiquement modifiés de commercialiser leur culture comme étant sans OGM. Si les produits sans OGM commandent une majoration de prix, la présence fortuite d'OGM (ci-après, présence fortuite) et la perte d'identité sans OGM qui en résulte (et la majoration de prix correspondante) peuvent constituer une externalité spatiale négative (Gray *et al.*, 2011).

Les coûts de production dans un scénario de coexistence augmentent en raison de l'isolement, de la surveillance, des tests de pureté et de l'équipement dédié et /ou de son nettoyage. L'abordabilité de la coexistence est liée au niveau de développement du pays. Dans les pays en développement, certains décideurs politiques reconnaissent que la coexistence n'est pas possible ou ne peut se faire qu'en faisant face à des coûts prohibitifs (Vigani *et al.*, 2009).

5. La traçabilité

La traçabilité est un instrument utilisé par certains pays pour garantir le retrait efficace des produits OGM du marché des denrées alimentaires et des aliments pour animaux si un effet inattendu se produit sur la santé et l'environnement. Elle implique tous les acteurs de la chaîne alimentaire, en retraçant l'historique, l'utilisation et la localisation d'un produit au moyen d'une identification enregistrée (Vigani et Olper, 2013).

Chapitre III: L'encadrement des organismes génétiquement modifiés

Les pays disposant d'une réglementation complète en matière de traçabilité doivent créer des procédures pour l'identification des acteurs de la chaîne industrielle qui fournissent et demandent des produits. Les acteurs de la chaîne alimentaire doivent transmettre des informations sur l'identité du produit et sur la présence ou non d'OGM, conserver ces informations pendant une longue période (surveillance post-commercialisation), c'est-à-dire 5 ans, et garantir leur disponibilité pour les demandeurs (Wilson *et al.*, 2008). La participation à un système de traçabilité peut être également volontaire, en fonction de l'endroit où se trouve le participant dans la chaîne d'approvisionnement. Plus le participant est proche du début de la chaîne d'approvisionnement, plus il est probable que sa participation soit volontaire (Phillips, 2003).

Les systèmes de traçabilité font circuler l'information dans deux sens, car ces systèmes sont conçus pour réagir rapidement aux préoccupations en matière de salubrité des aliments. Si l'on découvre qu'un produit dépasse un niveau de tolérance défini à un point quelconque de la chaîne d'approvisionnement, la traçabilité sera utilisée pour identifier la source du problème et pour localiser tous les produits de détail susceptibles d'être concernés. L'information sur la salubrité des aliments circule en amont tandis que l'information sur des produits spécifiques circule en aval (Phillips, 2003).

Au niveau du producteur, les agriculteurs doivent être certains de l'absence de pollinisation croisée entre cultures voisines, et doivent se conformer à un stockage et une récolte certifiés. Les transformateurs et les détaillants doivent conserver des informations sur l'identité des produits et transmettre ces informations par numéros de lot et résultats de tests (Vigani *et al.*, 2009).

La mise en œuvre de ces systèmes s'accompagne d'exigences techniques spécifiques pour chaque étape particulière de la chaîne de transformation des aliments. En outre, la faisabilité des systèmes de traçabilité dépend d'un certain nombre de facteurs, y compris les identificateurs uniques pour chaque produit GM, les méthodes de détection, les niveaux de contamination admissibles et les coûts financiers (Vigani et Olper, 2013).

6. Le Principe de précaution

L'adoption d'une attitude précautionneuse est une réponse aux présomptions de risque dont l'existence n'est pas encore prouvée par la démarche scientifique. Cette formulation traduit une situation de prudence. Toutefois, la précaution ne prévoit pas les mesures à adopter qui relèvent de l'action publique. Son existence oblige seulement à prendre en compte un risque qui ne peut être écarté à défaut de preuves scientifiques (Goudjil, 2008).

La mise en œuvre du principe de précaution peut être différente. Lorsqu'il est déclaré fermement, le principe de précaution interdit toute technologie impliquant des risques graves, même si la probabilité de préjudice est inconnue. Lorsqu'il est déclaré modérément, il note que la réglementation d'une technologie peut être raisonnable même en l'absence de preuve que le règlement permettra d'éviter les préjudices.

C'est en Allemagne, à la fin des années 1960 sous le nom de Vorsorgeprinzip, à propos de problèmes d'environnement que le principe de précaution était pour la première fois formulé. Son accession à la notoriété internationale coïncide avec la déclaration de Rio au Sommet de la Terre en juin 1992 (Futura-sciences, 2015). A cette époque le principe stipulait ceci : "En cas de dommages graves ou irréversibles, l'absence de certitudes scientifiques absolues ne doit pas servir de prétexte pour remettre à plus tard l'adoption de mesures visant à prévenir la dégradation de l'environnement"² (Déclaration de Rio sur l'environnement et le développement, 1992).

Le Protocole de Cartagena reprend ce principe à l'égard de la gestion des organismes vivants modifiés (OVM) : « L'absence de certitude scientifique due à l'insuffisance des informations et connaissances scientifiques pertinentes concernant l'étendue des effets défavorables potentiels d'un OVM sur la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique dans la Partie importatrice, y compris les risques qu'il comporte pour la santé humaine, n'empêche pas cette Partie de prendre, comme il convient, une décision concernant l'importation de l'OVM en question afin d'éviter ou réduire au minimum ces effets défavorables potentiels »³ (Secrétariat de la Convention sur la diversité biologique, 2000). Cet article du protocole vise la situation où, ayant effectué une évaluation des risques, la partie importatrice conclut à des incertitudes sur l'importance des effets défavorables potentiels des OVM pour la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique, compte tenu également des risques pour la santé humaine. Ces dispositions s'appliquent également à des situations où les informations ne suffisent pas pour effectuer une évaluation des risques. L'article tel qu'adopté représente l'un des exemples les plus explicites d'application de l'approche de précaution dans un traité environnemental multilatéral. Si les conditions établies par cet article sont réunies, une partie importatrice a le droit, au titre du protocole de fonder sa décision sur l'approche de précaution (Mackenzie, 2003).

² Principe 15 de la déclaration de Rio.

³ Article 10(6) du protocole de Carthagène.

7. La participation du public dans l'encadrement des OGM

Les aliments génétiquement modifiés (GM) constituent un exemple classique des défis auxquels la société et les individus sont confrontés dans l'évaluation des nouvelles technologies qui peuvent devenir une partie invisible mais omniprésente de la vie. Ces technologies génèrent un ensemble d'avantages potentiels (par exemple, coûts de production moins élevés, améliorations des attributs alimentaires) mais aussi des coûts possibles (par exemple, réponses allergiques involontaires, effets à long terme sur la santé et l'environnement, questions éthiques ou morales). La perception qu'ont les consommateurs de ces avantages et coûts potentiels façonne les réactions du marché aux nouvelles technologies et déterminent la politique et la réglementation gouvernementales relatives à leur développement, leur production et leur distribution. Il est donc important de comprendre les attitudes du public à l'égard des aliments génétiquement modifiés afin de pouvoir mettre en place des mécanismes de gouvernance acceptables qui généreront la confiance et, en fin de compte, la consommation (Roe et Teisl, 2007; Marques *et al.*, 2015).

Les aliments GM sont souvent accueillis avec scepticisme, parfois décrits comme une « néophobie alimentaire ». La recherche sur les fondements de l'attitude des profanes à l'égard des aliments génétiquement modifiés s'est fortement concentrée sur les prédictors rationnels de l'opposition aux aliments génétiquement modifiés, notamment les risques et avantages perçus, le (manque de) connaissance, le (manque de) confiance dans la science et le (manque de) confiance dans les institutions (Carpenter, 2013 ; Lucht, 2015 ; Scott *et al.*, 2018).

8. Réglementation en Algérie

A l'heure actuelle l'Algérie possède un seul texte promulgué se rapportant directement aux organismes génétiquement modifiés sous forme d'arrêté du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. Il s'agit de l'arrêté ministériel n°910 du 24 décembre 2000 interdisant l'importation, la production, la distribution, la commercialisation et l'utilisation du matériel végétal génétiquement modifié. Celui-ci stipule que «l'importation, la distribution, la commercialisation et l'utilisation de matériel végétal ayant fait l'objet d'un transfert artificiel de gènes en provenance d'un autre individu appartenant à une espèce différente, voire d'un gène bactérien est interdite ».

Par référence à l'article 13 de la loi 87-17 du 1^{er} août 1987, il est entendu par matériel végétal «les plantes vivantes ou parties vivantes de plantes y compris les yeux, greffes, greffons, tubercules, rhizomes, boutures, pousses et semences, destinés à la multiplication ou à la reproduction».

Chapitre III: L'encadrement des organismes génétiquement modifiés

Les institutions scientifiques et certains organismes de recherche pourront, à des fins d'analyse et de recherche et sur demande, être autorisées par l'autorité phytosanitaire représentée par la Direction de la protection des végétaux et des contrôles techniques du ministère de l'Agriculture et du Développement rural à «introduire, détenir, transporter et utiliser, sous des conditions préalablement définies, du matériel végétal génétiquement modifié».

Cet arrêté vise à titre conservatoire à éviter tout risque d'érosion génétique du patrimoine phytogénétique lié aux effets du flux génétique associé à l'utilisation d'un matériel végétal transgénique et à réunir les conditions techniques préalables à une production agricole naturelle (agriculture biologique) (Louanchi *et al.*, 2005).

L'Algérie possède également un grand nombre de lois, d'ordonnances, de décrets et d'arrêtés se rapportant à la protection et la conservation de l'environnement en général et de la diversité biologique en particulier parmi lesquels on distingue le Décret présidentiel n°04-170 du 08 juin 2004 portant Ratification du Protocole de Cartagena sur la Prévention des Risques Biotechnologiques relatifs à la Convention sur la Diversité Biologique, adopté à Montréal le 29 janvier 2000.

Par ailleurs, l'Algérie a bénéficié, dans le cadre des projets conjoints entre le PNUE et le FEM, d'un financement et d'une assistance qui lui a permis l'institution d'un cadre national de biosécurité associant un ensemble d'instruments administratifs, réglementaires et techniques nécessaires pour évaluer et mettre en place un niveau adéquat de protection pour le transfert, la manipulation et l'utilisation d'OGM.

En ce qui concerne les moyens techniques et humains disponibles, l'Algérie a mis en place depuis 2013 un laboratoire de référence pour la détection d'OGM. Ce laboratoire hébergé par le centre nationale de recherche en biotechnologies (CRBT) de Constantine aura pour mission principale d'effectuer des contrôles et analyses sur une vingtaine d'échantillon de denrées alimentaires par mois en attendant le renforcement de ses capacités au fur et à mesure l'ancrage de cette pratique scientifique dans le processus du contrôle alimentaire du pays, a souligné le directeur de CRBT dans un article de presse.

Il est à noter que jusqu'à l'heure actuelle aucune réglementation spécifique pour contrôler la présence ou l'utilisation d'OGM dans les aliments et aucune réglementation pour l'étiquetage n'a été établie.



**Chapitre
IV**

**La controverse
autour des OGM**

1. Introduction

Il est parfaitement établi que les biotechnologies recèlent de nombreuses promesses et ont considérablement contribué à l'apparition de nombreuses applications industrielles auparavant impossibles à mettre en place, notamment dans les domaines de la pharmacutique et de la médecine, à l'instar de l'insuline humaine qui représente une source d'espoir pour des millions d'individus. Cependant, lorsqu'il s'agit d'alimentation, les biotechnologies sont plutôt porteuses d'angoisse au sein de la population comme en témoignent les scandales alimentaires comme "la vache folle", le "bœuf aux hormones" et le "poulet à la dioxine". Les OGM destinés à l'alimentation constituent l'exemple typique du "manque d'information, d'abus du productivisme et de la mal nutrition ou « mal bouffe »". Leur apparition sur le marché dans les années 90 a abouti à l'amorçage d'un débat intense et attisé l'opposition de nombreux groupes sociaux. Les OGM sont considérés comme l'un des problèmes les plus controversés et les plus débattus de la période récente.

2. Les fondements du débat sur les OGM

Le débat sur les OGM tient essentiellement à des conceptions divergentes de cette nouvelle innovation et au changement considérable de paradigme. En effet, si l'accès direct aux gènes et leur transfert d'un organisme vivant à un autre indépendamment des barrières spécifiques, constitue du point de vue d'un généticien une évolution qui pouvait apparaître comme naturelle et découlant du raffinement des technologies sans changement de paradigme, il n'en a pas été de même pour une partie de la société (Gachet, 2003). On distingue ainsi un premier terme du débat qui considère les OGM comme étant fondamentalement différents des produits issus de l'agriculture traditionnelle et comportant donc des risques nouveaux, en plus de faire l'objet d'abus du productivisme de l'industrie agroalimentaire et un second terme du débat qui estime, en revanche, que les aliments contenant des OGM ne sont pas plus nocifs que ceux issus de l'agriculture traditionnelle.

Il faut reconnaître que la transgénèse, à l'image de toute avancée technologique, comporte, en plus de la néophobie, des risques a priori non négligeables. Que ces risques soient faibles ou élevés, le progrès technologique ne sera accepté par la population que s'il apporte en parallèle des bénéfices. Cependant, et dans le cas des plantes GM, seuls les risques sont mis en avant sans laisser au public la possibilité de s'interroger sur les bénéfices. Cela est dû notamment à l'orientation exclusivement économique des plantes transgéniques. Ces plantes existant actuellement sur le marché sont créées dans un but de faciliter la tâche et réduire les coûts de

Chapitre IV : La controverse autour des OGM

production des agriculteurs mais aussi pour permettre un profit élevé pour les firmes commercialisant ces variétés végétales. A cet égard, et dans une telle situation, le consommateur ne trouve pas son compte et ignore ce que peuvent lui apporter d'intéressant les OGM, hormis des risques sur sa santé et son environnement. En d'autres termes, il n'envisage pas les OGM en termes de bénéfices/risques mais uniquement en termes de risques ou de problèmes (Goudjil, 2008).

Les principaux problèmes des OGM sont centrés autour de plusieurs axes tel que les questions d'ordre scientifique (risques sanitaires et environnementaux, pollution génétique), d'ordre éthique (modification du vivant) ou encore d'ordre agro-économique (brevet sur le vivant, monopoles).

3. Les risques associés aux OGM

Les principaux problèmes des OGM sont centrés autour de plusieurs axes tel que les questions d'ordre scientifique (risques sanitaires et environnementaux, pollution génétique), d'ordre éthique (modification du vivant) ou encore d'ordre agro-économique (brevet sur le vivant, monopoles).

3.1 Les risques sanitaires

3.1.1 Le flux horizontal des gènes

Le transfert horizontal de gènes (THG), ou transfert latéral de gènes (TLG), est tout processus par lequel un organisme transfère du matériel génétique à un autre organisme autre que sa descendance, suivi par l'intégration et l'expression du matériel génétique.

L'une des préoccupations associées aux OGM réside dans la possibilité que les gènes de résistance aux antibiotiques utilisés comme marqueurs dans les cultures transgéniques puissent être transférés horizontalement à des bactéries intestinales pathogènes, réduisant l'efficacité des antibiotiques dans le traitement des maladies chez l'homme et chez les animaux (Dona et Arvanitoyannis, 2009 ; Mahgoub, 2016).

La possibilité que les gènes introduits dans la plante soient absorbés par l'intestin et intégrés dans la constitution génétique du consommateur représente également un sujet de préoccupation majeur dans le cas des OGM (Dona et Arvanitoyannis, 2009). Il y a encore quelques années, on supposait que l'ADN ingéré est complètement dégradé dans le tube digestif des humains et des animaux (Rizzi *et al.*, 2012). Cependant, avec la commercialisation mondiale des denrées alimentaires et aliments pour animaux génétiquement modifiés, il y a eu un regain d'intérêt pour le sort et les effets de l'ADN extracellulaire dérivé des OGM dans le

Chapitre IV : La controverse autour des OGM

corps du consommateur (Nawaz *et al.*, 2019). Le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV P-35S) largement utilisé dans le développement des OGM pour sa capacité de diriger l'expression constitutive de gènes hétérologues dans une variété de plantes, est l'une des séquences d'ADN qui a suscité beaucoup d'inquiétudes. Kohli *et al.* (1999) ont montré que P-35S contient une séquence palindromique de 19pb, y compris la boîte TATA du CaMV P-35S, qui peut servir de point chaud pour la recombinaison (recombination hotspot). Par conséquent, il a été suggéré que l'utilisation généralisée d'un promoteur tel que le CaMV P-35S, qui est très efficace et peut fonctionner dans un large éventail d'organismes, pourrait conduire à une surexpression inappropriée des gènes dans les espèces auxquelles il est transféré et promouvoir le transfert horizontal et la recombinaison. En outre, il a été suggéré qu'il pourrait même se recombiner avec des virus endogènes dormants, conduisant à de nouveaux virus infectieux (Ho *et al.*, 1999).

3.1.2 La Toxicité

Parmi les problèmes liés aux effets des OGM sur la santé et la vie des consommateurs on distingue notamment le potentiel de synthèse dans leurs cellules et tissus de produits anti-alimentaires ou toxiques qui augmentent le risque d'activation des processus néoplastiques (Kramkowska *et al.*, 2013).

Tsatsaki *et al.* (2017) ont examiné les rapports sur les études qui ont eu pour but l'étude de la toxicité de plusieurs types d'aliments GM sur différents types d'animaux et ont conclu que les preuves accumulées jusqu'à présent n'indiquent pas la nécessité d'imposer des restrictions directes à l'utilisation des aliments génétiquement modifiés. Cependant, lorsque les résultats expérimentaux détaillés de tous les rapports examinés sont pris en compte, certains effets toxiques mineurs peuvent être observés, ce qui suggère qu'il existe certaines implications pour la santé.

Parmi les études effectuées sur la toxicité des OGM, deux études célèbres ont fait l'objet de sévères critiques de la part de scientifiques, de sociétés, de médias et d'hommes politiques, à savoir « l'affaire Pusztai » et « l'affaire Séralini ».

L'affaire pusztai : une controverse féroce s'est développée lorsque Arpad Pusztai a annoncé dans l'émission de télévision britannique "World in Action" que ses expériences ont montré que les rats nourris avec un régime de pommes de terre GM hébergeant le gène GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*) qui code pour une lectine de perce-neige aux propriétés insecticides bien connues, présentaient un retard de croissance et une fonction immunitaire réduite (AgBioWorld, 2011). Il a été suggéré que les anomalies survenues étaient liées non

seulement à la présence du transgène, mais également à d'autres éléments de la construction génétique et au processus de transformation de l'information génétique (Kramkowska *et al.*, 2013). Une énorme pression publique, médiatique, politique et industrielle a été exercée sur les auteurs ainsi que sur l'institut, ce qui a conduit à la suspension du scientifique. Par la suite, les travaux ont fait l'objet d'un audit par le Rowett Institute et d'un examen par les pairs par la Royal Society, qui ont conclu que les expériences étaient mal menées, qu'elles comportaient de nombreuses incertitudes et qu'elles manquaient de méthodes et de modèles statistiques appropriés. Cependant, les données ont été publiées sous forme de lettre dans la revue *The Lancet* en 1999 avec pour conclusion qu'aucune différence significative n'a été observée entre les rats traités et les rats témoins, bien qu'elles aient été fortement critiquées jusqu'à ce jour (Tsatsakis *et al.*, 2017(a)).

L'affaire Séralini: Il s'agit de l'étude menée par le chercheur français Gilles-Eric Séralini et publiée dans le journal «*Food and Chemical Toxicology*» sous le titre «*Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize*» dans laquelle des groupes de rats de laboratoire ont été nourris avec différentes doses de maïs modifié NK603 (à partir de 11% dans le régime), cultivé avec ou sans l'utilisation de l'herbicide général Roundup ou par un régime à base d'aliments sans OGM mais contenant de l'eau à laquelle on a ajouté des quantités variables de Roundup (à partir de) et cela en comparaison avec un groupe qui a reçu des aliments sans OGM et sans herbicide (contrôle). Les résultats de l'expérience de deux ans suggèrent une manifestation de troubles de la fonction hépatique et rénale, une mortalité plus élevée des animaux et une manifestation de tumeurs palpables dans les groupes expérimentaux (en particulier ceux exposés au Roundup), par rapport au témoin (Séralini, 2012).

Dès sa publication, le rapport a été critiqué par la communauté scientifique et publique, entraînant la rétractation de l'article. La critique la plus importante était que la fréquence d'apparition des tumeurs était plus élevée dans la souche de rats utilisée dans l'étude. L'étude était qualifiée par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESA) comme étant d'une «*qualité scientifique insuffisante*» pour être considérée valide pour l'évaluation des risques. Les auteurs n'étant pas d'accord avec la rétractation, ont organisé une conférence de presse au cours de laquelle ils ont publié un livre et une vidéo documentaire pour soutenir leurs recherches. De nombreuses institutions, dont le King's College London, le Washington Post, l'université de New York, l'université de Calgary, les organismes de réglementation canadiens, l'Agence nationale de sécurité sanitaire des aliments (France) et l'université technique du Danemark, ont affirmé que les expériences avaient été menées de manière adéquate et ont signalé que les

travaux avaient été republiés dans *Environmental Sciences Europe* en 2014 avec des commentaires positifs, bien qu'ils restent controversés.

3.1.3 L'Allergénicité

Une attention particulière est accordée aux cas d'allergie consécutifs à la consommation antérieure d'un aliment transgénique. L'exemple très médiatisé sur les effets défavorables des OGM concerne le cas du maïs StarLink du producteur américain Aventis qui comprend deux modifications: un gène de résistance au glufosinate et une variante de la protéine de *Bacillus thuringiensis* (Bt) appelée Cry9C, manifestant de fortes propriétés allergisantes. Le maïs StarLink a été autorisé à entrer sur le marché commercial exclusivement en tant que fourrage pour animaux. Cependant, ce dernier a été détecté dans des produits alimentaires généralement accessibles sur les marchés de consommation (par exemple dans les tacos). La diffusion de l'information dans les médias de masse a été suivie de nombreux rapports de consommateurs concernant des symptômes d'allergie alimentaire sous forme de maux de tête, de diarrhées, de nausées et de vomissements, qui étaient censés se développer suite à la consommation de produits contenant du maïs génétiquement modifié. Le StarLink a fait l'objet d'un rappel alimentaire en automne 2000 (Kramkowska *et al.*, 2013).

L'introduction de nouvelles protéines dans des aliments comme dans le cas de la variété de soja GM exprimant la méthionine de la noix du Brésil (Nordlee *et al.*, 1996) et la variété de maïs GM modifiée pour produire une endotoxine Bt, Cry9C (Bernstein *et al.*, 2003) peuvent provoquer des réponses immunologiques potentiellement nocives, y compris l'hypersensibilité allergique (Conner *et al.*, 2003; Taylor et Hefle, 2002). En outre, selon Prescott *et al.* (2005), l'introduction d'un gène exprimant une protéine non allergène comme le pois fourrager génétiquement modifié, exprimant l'inhibiteur d'alpha-amylase 1, ne permet pas toujours d'obtenir un produit sans allergénicité. Cette étude souligne la nécessité d'évaluer au cas par cas les nouvelles cultures génétiquement modifiées et d'améliorer les exigences de sélection des plantes génétiquement modifiées.

Brassica juncea, une autre plante génétiquement modifiée, exprimant le gène de la choline oxydase, a provoqué une faible réponse IgE chez les souris et une recherche d'épitope à réaction croisée a montré un allongement similaire au Hev b 6 ayant certaines propriétés antigéniques bien que, selon Singh *et al.* (2006), il n'ait pas d'allergénicité. Ces résultats devraient être interprétés plus attentivement et répétés dans d'autres séries animales afin d'élucider si la réponse IgE peut jouer un rôle dans la toxicité.

3.2 Les impacts sur l'environnement des OGM

3.2.1 Le Flux génique

Le déplacement de gamètes, d'individus ou de groupes d'individus d'un endroit à un autre provoque des modifications de la fréquence des gènes, appelée flux de gènes (FG) (Ford *et al.*, 2006). Ce mouvement des gamètes ou des gènes dépend de nombreux facteurs liés à l'environnement ainsi qu'aux espèces. Outre la compatibilité sexuelle croisée, d'autres facteurs importants sont pertinents, en particulier dans le cas des plantes, tels que la morphologie florale, la synchronisation de la période de reproduction et l'écologie des espèces donneuses et receveuses (Lu et Snow, 2005).

Les transgènes dans les plantes génétiquement modifiées présentent certaines caractéristiques qui favorisent une introgression réussie dans des espèces compatibles entre elles, notamment la dominance, l'emplacement sur les chromosomes et la non association avec des allèles létaux (Yan *et al.*, 2015). Les transgènes contrôlant des caractéristiques uniques et ayant un avantage sélectif fort peuvent s'échapper dans des espèces apparentées et compatibles entre elles et pourraient conduire à modifier les politiques commerciales internationales sur les marchés agricoles (Dong *et al.*, 2016). Les voies possibles du FG des plantes génétiquement modifiées vers les plantes non génétiquement modifiées sont le FG à médiation pollinique, le FG à médiation par les semences et le FG à médiation végétative. On a signalé la présence de FG à médiation pollinique à différents niveaux dans la plupart des cultures GM, telles que le maïs, le colza, le riz, l'orge, le coton et les haricots (Ford *et al.*, 2006 ; Han *et al.*, 2015 ; Yan *et al.*, 2015).

3.2.2 Evolution de la résistance aux herbicides

Les herbicides de part leur capacité à éliminer de manière sélective les plantes adventices des champs cultivés sont largement utilisés dans le monde entier. Cependant, l'utilisation récurrente et persistante d'herbicides a entraîné l'évolution de la résistance chez de nombreuses espèces de mauvaises herbes (Busi *et al.*, 2013). L'apparition de mauvaises herbes résistantes est inévitable du fait que les espèces de mauvaises herbes possèdent une capacité remarquable à développer la tolérance aux herbicides à partir du pool de gènes de mauvaises herbes (Tsatsakis *et al.*, 2017 (b)).

Les plantes peuvent développer divers mécanismes de résistance aux herbicides, telles que l'insensibilité au site cible, la surproduction de site cible, la désintoxication des herbicides, la

réduction de l'entrée des herbicides, la réduction de la translocation des herbicides et les modifications du compartimentage intracellulaire des herbicides.

3.2.3 Evolution de la résistance aux insecticides et aux pesticides

La lutte contre les ravageurs au moyen des techniques conventionnelles et chimiques s'est avérée être un véritable défi car l'évolution de la résistance aux insecticides et aux pesticides a été observée dans de nombreux cas. Plus précisément, la possibilité d'évolution d'insectes nuisibles résistants au Bt ne peut pas être écartée en raison de l'expression constitutive des toxines Bt dans tous les tissus végétaux, ce qui exerce une pression de sélection plus élevée sur les espèces cibles (Tsatsakis *et al.*, 2017 (b)). Cette capacité remarquable des insectes à s'adapter aux insecticides et à d'autres tactiques de lutte confirme la conclusion selon laquelle l'évolution de la résistance des parasites est la principale menace pour le succès continu des cultures Bt (Tabashnik *et al.*, 2013).

La résistance chez les insectes nuisibles pourrait impliquer des mécanismes tels que la réduction ou l'absence de toxine se liant à l'intestin, la modification du complexe de toxine-récepteur, l'hyper expression de la toxine, les activités modifiées des enzymes intestinales telles que la protéase. Ces mécanismes reposent en grande partie sur l'intensité de la sélection ainsi que sur le comportement d'accouplement des insectes nuisibles, les changements saisonniers dans l'habitat, la disponibilité ou la non-disponibilité des cultures refuge et la pression globale de sélection du caractère (Nawaz *et al.*, 2018).

3.2.4 Perturbation de la biodiversité et des écosystèmes

Les écosystèmes sont des unités complexes d'écologie qui fonctionnent à grande échelle et contiennent de nombreuses chaînes alimentaires et des réseaux alimentaires complexes. L'interruption dans une seule unité d'un écosystème pourrait entraîner la création de complexité, de diversification, de destruction et/ou de modification à divers niveaux (Lövei *et al.*, 2007). La culture mondiale de plantes résistantes aux herbicides a entraîné une utilisation accrue d'herbicides à large spectre qui menacent gravement les écosystèmes. Le principal inconvénient des cultures RH est la réduction de la diversité des mauvaises herbes dans le paysage agricole, ce qui entraîne à terme une réduction de la diversité des insectes utiles (Tappeser *et al.*, 2014). A titre d'exemple, Une réduction significative dans les populations du papillon monarque a été observée aux États-Unis et au Mexique en réponse à la culture de plantes RH et la diminution de la disponibilité de l'asclépiade comme habitat et principale plante hôte des larves de monarques (Brower *et al.*, 2012). Ce changement dans l'accessibilité

Chapitre IV : La controverse autour des OGM

aux ressources a, dans la plupart des cas, des répercussions sur les niveaux trophiques supérieurs. Le comportement de recherche de nourriture peut également être modifié par l'application fréquente d'herbicides, comme dans le cas de l'application de glyphosate, où les araignées ont adopté un comportement superflu de chasse au grillon. D'autres conséquences impliquent un déplacement dans le réseau trophique (par exemple d'herbivore à détritivore).

3.3 Les considérations d'ordre éthique des OGM

Les préoccupations morales exprimées au sujet des cultures GM couvrent un large éventail, mais peuvent, pour plus de commodité, être divisées en deux catégories de base, à savoir « intrinsèques » et « extrinsèques ». Les modifications génétiques en général et les cultures génétiquement modifiées en particulier peuvent alors être considérées comme intrinsèquement mauvaises en elles-mêmes ou extrinsèquement mauvaises en raison de leurs conséquences. Dans le cas où les cultures génétiquement modifiées sont considérées comme intrinsèquement mauvaises, aucune autre considération n'est acceptée comme moralement pertinente parce que rien ne peut inverser cette erreur intrinsèque.

4. Les préoccupations « Intrinsèques »

➤ Le caractère non-naturel des OGM

L'une des préoccupations éthiques les plus soulevées à propos des aliments GM (et dans certains cas de l'utilisation des OGM en général) est le caractère non naturel du processus de la transgénèse dans le sens où il représente une altération non éthique de la nature (Ankeny, et Bray, 2018). Plusieurs études ont suggéré que c'est cette préoccupation qui est à l'origine d'une grande partie du malaise du public à l'égard des cultures génétiquement modifiées (Chadwick, 2017). Les nouvelles technologies alimentaires sont évaluées de manière plus négative, lorsque les consommateurs ont une préférence marquée pour les aliments biologiques et une production alimentaire "naturelle" (Siegrist, 2008). Les valeurs culturelles comme l'aversion à être envahi ou dominé par la culture alimentaire étrangère et les conflits avec le système de croyances religieuses ou morales, ou l'ordre naturel perçu des choses sont également des facteurs influençant la façon dont les OGM sont perçus par les consommateurs (Finucane et Holupg, 2005 ; Lusk *et al.*, 2014). Cependant, il n'est pas facile d'identifier et de s'entendre sur ce qui doit être considéré comme " naturel " et " non naturel ". Selon Siipi (2015), l'allégation « les aliments génétiquement modifiés ne sont pas naturels » peut être justifiée et acceptable. En même temps, l'auteur a considéré que les termes «naturel» et «non naturel» sont ambigus et que les aliments génétiquement modifiés ne sont pas contre nature dans tous

Chapitre IV : La controverse autour des OGM

les sens du terme et que l'acceptabilité de l'allégation dépend du sens du terme «non naturel» utilisé.

Une accusation plus spécifique du " caractère non naturel " des OGM met en évidence que Le processus de fabrication des aliments génétiquement modifiés implique de traverser illégalement les frontières des espèces. Le matériel génétique étant transféré d'un organisme à un autre, cela signifie que différentes espèces sont assemblées de manière non-naturelle, pour créer des formes de vie uniques très éloignées de la culture naturelle créée par Dieu. (Nicolaidis ; 2013 ; Bhumiratana et Kongsawat, 2008).

➤ Se prendre pour DIEU

Plutôt que d'utiliser la terminologie de la « contre-nature », les critiques des nouvelles technologies prétendent parfois qu'elles sont un exemple de "se prendre pour Dieu", ce qui est inacceptable parce que cela implique de l'orgueil ou de l'arrogance humaine. Le message étant que les humains ne doivent pas essayer d'imiter Dieu en sa qualité de créateur.

Bien entendu, ces préoccupations qui reposent sur des considérations théologiques n'auront de poids moral que pour ceux qui ont certaines croyances religieuses fondées sur certaines hypothèses religieuses. Cependant, tous les croyants religieux ne partageraient en aucun cas ces préoccupations (Chadwick, 2017).

4.1.1 Les préoccupations extrinsèques

Les objections extrinsèques concernant les cultures GM se concentrent sur les dommages potentiels consécutifs à leur adoption et relèvent de deux domaines principaux, à savoir la sécurité et les effets socio-économiques et tous deux impliquent de faire des prédictions sur des événements futurs, ce qui est très problématique. Les préoccupations extrinsèques représentent une position moins intransigeante que la variété intrinsèque, car elles invitent à la discussion sur les conséquences les plus probables et à des suggestions sur la façon de les éviter ou de les modifier (Comstock, 2010 ; Chadwick, 2017).

4.2 Les considérations socioéconomique

4.2.1 Le brevetage du patrimoine végétal

La mise sur le marché d'un aliment génétiquement modifié étant un processus long et coûteux, les entreprises agro-biotechnologiques souhaitent s'assurer un retour sur investissement rentable. Ainsi, de nombreuses nouvelles technologies de génie génétique ont été brevetées. La prolifération des brevets sur les organismes vivants induite par les firmes

Chapitre IV : La controverse autour des OGM

biotechnologiques pose le problème de la propriété commune ou privatisable du patrimoine génétique mondial. Alors que le brevetage est synonyme de rentabilité pour ces sociétés, les agriculteurs dans les pays du sud (car victimes principales) craignent de devoir être obligés de payer pour se procurer les variétés issues du matériel génétique provenant de leurs propres champs lorsqu'ils achètent des semences à des sociétés détenant des brevets (FAO, 2003 ; Goudjil, 2008).

Certains maintiennent que l'Organisation mondiale du commerce encourage ce processus avec son Accord sur les aspects des droits de propriété intellectuelle qui touchent au commerce (ADPIC), mais cet accord prévoit des options pour protéger les pratiques traditionnelles agricoles. Par ailleurs, le nouveau Traité international sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture reconnaît les contributions des agriculteurs à la conservation et l'utilisation des ressources phytogénétiques pour les générations futures. Il fournit un cadre international pour réglementer l'accès aux ressources phytogénétiques et établit un mécanisme de partage des avantages tirés de leur utilisation (FAO, 2003).

4.3 La Technologie terminator

Il s'agit d'un procédé de stérilisation des végétaux développée sous le brevet dénommé « Terminator » dont le principe consiste à transférer aux organismes des gènes qui vont induire une stérilité ou une fertilité conditionnelle. En pratique, l'OGM contient, en plus des gènes d'intérêt étrangers, un ensemble de gènes qui le rendent stérile dans les conditions normales de culture. Toutefois, ce n'est pas une stérilité permanente car elle peut être enlevée mais dans des conditions bien définies. En effet, contrairement à certains saumons stérilisés et auxquels il est possible de rendre la fertilité en leur injectant une hormone de reproduction, le cas du gène « Terminator » est plus compliqué puisqu'il y a, a priori, irréversibilité. C'est à partir de là que commence le débat sur les inconvénients et les avantages que recèle le système Terminator. Pour les opposants, c'est un procédé qui permet d'inféoder totalement les agriculteurs à l'industrie semencière en les obligeant à acheter chaque année de nouvelles semences. Le point le plus sombre et le plus redouté dans cette histoire concerne le pouvoir excessif que peut avoir le sélectionneur en détenant un monopole de la vente des graines d'OGM à fertilité conditionnelle (Goudjil, 2008).



Chapitre
V

**Matériel et
méthodes**

Chapitre V : Matériel et méthodes

Les travaux de cette thèse ont été initiés au laboratoire LRGB (Ecole Nationale Supérieure Agronomique) où ont été réalisées les tâches suivantes :

- Réception et stockage des échantillons de laboratoire ainsi que leur identification.
- Toutes les opérations consistant à obtenir un échantillon représentatif à partir de l'échantillon de laboratoire.

D'autre part, une initiation à la technique PCR a été réalisée au niveau du laboratoire de Biologie Moléculaire (Centre de recherche en biotechnologie de Constantine)

Les travaux ont été ensuite poursuivis de manière très intensive au niveau du laboratoire REQUIMTE-LAQV, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal, où ont été effectuées :

- Les opérations d'extraction d'ADN ;
- La PCR conventionnelle ;
- La PCR en temps-réel.

1. Description des échantillons

1.1 Les échantillons de produits alimentaires à base de maïs

105 échantillons de produits alimentaires ont été prélevés sur le marché algérien, de façon aléatoire, à partir de mai 2016 jusqu'en septembre 2017. 03 wilayas ont été impliquées dans l'échantillonnage, à savoir, Alger, Boumerdes et Constantine.

Des efforts ont été fait afin de couvrir une grande variété de produits à base de maïs et surtout de marques différentes, en passant par des aliments non transformés, tels que le maïs destiné au popcorn et d'autres soumis à un degré très élevé de transformation comme les chips.

Pour chaque échantillon a été attribué un code qui permet son identification, et une prise de note sur toutes les informations présentées sur l'emballage de chaque produit a été faite, une attention particulière a été attribuée à la mention « sans OGM ».

Les produits ont été divisés en 6 groupes pour une meilleure organisation du travail, à savoir :

- Le groupe des maïs doux en conserve (ou Sweet corn), avec le code SC, il contient 31 échantillons dont 9 échantillons sont étiquetés « sans OGM » ou « GMO free » et deux autres échantillons sont étiquetés « premium ».
- Le groupe des Flocons de maïs (ou Cornflakes), avec le code CF, il contient 26 échantillons.

Chapitre V : Matériel et méthodes

- Le groupe des Produits de régime sans gluten (Diet products), avec le code DP. Dans ce groupe on a regroupé tous les produits qui contiennent sur leur emballage la mention 'sans gluten'. Les produits de ce groupe sont destinés aux personnes souffrant de la maladie cœliaque et sont de nature variée : semoules, farines, pâtes, biscuits et sont en nombre de 26 échantillons.
- Le groupe des chips (Corn crisps), avec le code CC, il contient 9 échantillons.
- Le groupe des Céréales pour bébés (baby cereals), avec le code IC, il contient 6 échantillons.
- Le groupe des maïs pop-corn (popcorn), avec le code PC, il contient 8 échantillons.

Les informations détaillées (la marque du produit, sa dénomination de vente, la date de son achat et de trituration ainsi que la liste des ingrédients) concernant chaque échantillon sont présentées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Liste des produits alimentaires consistant en / ou contenant le maïs.

Code	Dénomination de vente	Marque commerciale		Pays d'origine	Date d'achat	Date de trituration	Mention sans OGM
SC1	Maïs doux en grains	Princesse Anne	Maïs doux en grains sans ogm, eau, sucre, sel	Hongrie	23-05-2016	04-06-2017	Oui
SC2	Maïs doux en grains	Maingourd	Maïs doux en grains, eau, sucre, sel	France	23-05-2016	04-06-2017	
SC3	Maïs doux en grains	Prince	Maïs doux, eau, sucre, sel	Chine	23-05-2016	04-06-2017	
SC4	Maïs doux	Dylia	Maïs, sel, sucre, eau	Thaïlande	23-05-2016	04-06-2017	Oui
SC5	Maïs doux <small>extra</small>	Royal Garden		Chine	23-05-2016	04-06-2017	
SC6	Maïs ultra croquant	D'aucy	Maïs en grains, eau, sel	U.E.	23-05-2016	04-06-2017	
SC7	Maïs doux	Le Goût	Maïs en grains, sucre, eau, sel	Chine	23-05-2016	05-06-2017	
SC8	Maïs doux original	Géant Vert	Maïs doux, eau, sel	France	23-05-2016	05-06-2017	Oui
SC9	Sweet corn	Gold Food	Maïs doux, eau, sucre, sel	Chine	23-05-2016	05-06-2017	
SC10	Maïs doux	Gula		Chine	23-05-2016	05-06-2017	
SC11	Super sweet whole kernel corn	Libby's	Corn, water, sugar syrup, modified corn starch and salt	États-Unis	11-05-2017	05-06-2017	
SC12	Maïs doux	Albertino	Corn, water, sugar, salt	Pologne	18-03-2017	06-06-2017	Oui
SC13	Maïs doux	Mister	Maïs doux en grains, eau, sucre, sel	Thaïlande	18-03-2017	06-06-2017	
SC14	Golden sweet corn	Del Monte		Thaïlande	18-03-2017	06-06-2017	
SC15	Maïs doux	Solaïs	Maïs, eau, sucre, sel	Chine	18-03-2017	06-06-2017	Oui
SC16	Maïs	Volfruta		Italie	17-05-2017	16-09-2017	
SC17	Maïs doux	Flèche D'or	Grains de maïs, eau, sucre, sel	Chine	08-07-2017	16-09-2017	
SC18	Maïs doux	Kingtom		Chine	13-07-2017	16-09-2017	
SC19	Maïs doux	Golden Land		Chine	03-09-2017	16-09-2017	Premium
SC20	Maïs	Bonduelle	Maïs doux e grains, eau, sel	France	03-09-2017	16-09-2017	Oui
SC21	Maïs doux	Baity	Maïs, eau, sel, sucre	Thaïlande	07-09-2017	16-09-2017	
SC22	Maïs doux	Fondelice	Maïs doux en grains sans ogm, eau, sucre	Chine	07-09-2017	18-09-2017	Oui
SC23	Maïs doux	Rio Garden	Sugar, salt, water, sweet corn	Chine	07-09-2017	18-09-2017	
SC24	Maïs doux en grains sous vide	Militou	Corn , sugar, water, salt	Chine	07-09-2017	18-09-2017	Oui
SC25	Kukurydza słodka	Dawtona	Corn, water, sugar, salt	Pologne	03-10-2017	17-10-2017	
SC26	Kukurydza	Jamar	Corn, water, sugar, salt	Pologne	10-10-2017	23-10-2017	

Chapitre V : Matériel et méthodes

SC27	Natural sweet corn	Topline		Chine	10-10-2017	23-10-2017	Premium
SC28	Maïs doux	Anna	Water, corn ,sugar, salt	Chine	10-10-2017	23-10-2017	
SC29	Maïs doux en grains sous vide	Keema	Corn, water, sugar, sin330 citric acid	Thaïlande	12-10-2017	23-10-2017	Oui
SC30	Maïs doux en grains sous vide	Yonti	Maïs doux, eau, sucre	Chine	12-10-2017	23-10-2017	
SC31*	Au cœur du Mexique	Petit Navire	Harricot rouges, maïs, poivrons, sauce épices douces	France	18-03-2017	23-10-2017	
CF1	Nesquik	Nestlé	Céréales (farine de blé complet(contient du gluten), semoule de maïs, farine de riz), sucre, sirop de glucose, poudre de cacao 6.1%, huile végétale, poudre de cacao maigre 0.5%, sel, dextrose, arôme : vanilineet arôme cannelle, régulateur d'acidité :phosphate trisodique	France	23-05-2016	08-06-2017	
CF2	Chocapic	Nestlé	Cereal grains(61%)(whole grain wheat (contains gluten)(31.8%), wheat flour(contains gluten) (15.8%), maize semolina(14.3%)), sugar, cocoa powder(7.1%), glucose syrup, barely malt extract (contains gluten), palm oil, émulsifiant from plant origin : sunflowerlecethin, salt , artificial flavourings : vanilin and cinnamon	France	23-05-2016	08-06-2017	
CF3	Corn flakes	Kelloggs'	Maize, sugar, barely Malt flavouring, salt,	Allemagne	23-05-2016	08-06-2017	
CF4	Electro choc	Carrefour	Cereals 68%(rice flour, wholewheat flour16%, corn semolina, wheat flour), sugar, powdered chocolate9% (sugar, cocoa powder), milk chocolate4%(sugar, cocoa paste, whole mil powder, cocoa butter, skimmed milk powder), caramelised sugar powder, sunflower oil, salt, low fat cocoa powder, flavouring, vitamins: niacin (PP), B6, riboflavin (B2), thiamin (B1), folic acid (B9), B12, iron.	France	04-06-2016	08-06-2017	
CF5	Crispy	Foufou	Milled corn, wheat flour, sugar, cocoa powder, skimmed milk powder, full cream milk powder, malt extract, salt, artificial flavor (vanillin), vitamins(B1, B2, B3, B6), food additives (Emulsifier SIN322i)	Egypte	23-05-2016	08-06-2017	
CF6	Corn flakes	Foufou	Milled corn, malt flou, sugar, salt, honey, glucose syrop, hydrogenated vegetable oil, artificial flavor (honey)	Egypte	23-05-2016	19-06-2017	
CF7	Cocoa balls	Mr Breakfast	Farine 43.8%(blé, riz, maïs), semoule de maïs, son de blé, cacao 4.1%, cacao maigre 1.3%, matière grasse végétale de palme totalement hydrogénée, lait écrémé en poudre, sel, arôme de chocolat, émulsifiant : lécithine.	Pologne	23-05-2016	19-06-2017	
CF8	Popper's	Gepro's	Corn semolina 68%, sugar(28%), barley flour (3%), honey, glucose syrup, salt, citric acid (antioxydant), nature identical flavors (vanilla, honey), vitamins (C, E, B1, B2, B5, B6, B12, PP) iron and calcium, food additives	Tunisie	23-05-2016	19-06-2017	
CF9	Popped rice	Cérégral	Farine de riz, farine de maïs, semoule fine, sucre, glucose, graisse de palme, sel, cacao, arôme chocolat (identique au naturel, vitamins (A, C, D, E, B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12), fer, lécithine (additif alimentaire 322i à des fins alimentaires, selon BPF, antioxydant et émulsifiant), palmitate d'ascorbyle (additif alimentaire 304 à des fins alimentaires 2mg/kg, antioxydant)	Algérie	23-05-2016	19-06-2017	
CF10	Corn flakes	Delliciano		Brésil	26-03-2017	20-06-2017	
CF11	Honey balls	Delliciano		Brésil	26-03-2017	20-06-2017	
CF12	Honey balls	Monte Blanco	Maize flour, sugar, glucose syrup, honey(2%), salt, flavourings	Italie	26-03-2017	20-06-2017	

Chapitre V : Matériel et méthodes

CF13	Craco kids	Craco	Rice powder, corn powder, cacao powder, wheat flower, sugar, salt, milk powder, vegetable fat , lecythine soy , vegetable oil (sunflower), whey	Algérie	04-06-2016	20-06-2017	
CF14	Craco extra	Craco	Rice powder, corn powder, cacao powder, wheat flower, sugar, salt, milk powder, vegetable fat , lecythine soy , vegetable oil (sunflower), whey, coconut flavour	Algérie	04-06-2016	20-06-2017	
CF15	Magictiger	Torto	Snack : Corn grit, ground rice, artificial flavour (chocolate), cocoa powder, sugar, palm oil, food additives : Anticaking (sin553ii°), colour (sin150d) Coating: sugar, milk powder, artificial flavor(chocolate), cocoa powder, wheat molasses, salt	Malaisie	27-04-2017	02-07-2017	
CF16	Bolitas galleta	Esgir	Corn flour 66%, sugar, vegetable palm fat, emulsifier: soya lecithin and flavourings	Espagne	27-04-2017	02-07-2017	
CF17	Corn flakes	Emco	Corn semolina 91%, sugar, edible salt with iodine (edible salt, potassium iodate), barley malt extract, minerals: calcium carbonate	République tchèque	27-04-2017	02-07-2017	
CF18	Corn flakes	Geo Space	Farine de maïs, 89%, sucre, extrait de malt d'orge, sel	Italie	27-04-2017	02-07-2017	
CF19	Whoop'z	Nacional	Flours (whole wheat (gluten) (24%), Corn, rice, and oats(gluten) (63%), sugar, honey(4.5%), corn starch, glucose-fructose syrup, salt, raising agent(calcium carbonate), colour(beta-carotene and annatto), vitamins (thiamin (B1), riboflavin(B2), niacin(B3), pantothenic acid(B5), B6, Biotin (B8), folic acid (B9)? B12, C and D and iron	Portugal	22-07-2017	20-09-2017	
CF20	Snow flakes	Carrefour Kids	Maïs 70%, sucre28% etrait de malt d'orge, sel	France	22-07-2017	20-09-2017	
CF21	Choco balls	London	Farine de céréales 61%, (riz, maïs, blé), sucre, chocolat au lait de couverture 4.2%(sucre, beurre de cacao, lait entier en poudre, pâte de cacao, émulsifiant : lécithine de soja, arôme naturel vanille), amidon de blé, cacao maigre en poudre(3.5%), sirop de glucose, extrait de malt d'orge, lécithine de soja, poudre de cacao, sel, vanilline, arôme.	Italie	22-07-2017	20-09-2017	
CF22	Céréales aux chocolat	Mister	Flour 60%, (wheat, corn, semolina), sugar, glucose-fructose syrup, cocoa powder 5.5%, caramelized sugar, palm fat, white salt, emulsifier-soya lecithin, barley malt extract, flavorings (vanillin, chocolate)	Lithuania	22-07-2017	20-09-2017	
CF23	Boules au miel	Ceregral	Farine de maïs, semoule fine, sucre, glucose, graisse de palme, huile de soja, sucre inverti, sel, arôme miel(identique au naturel), vitamines (A, C, D, E, B1, B3, B5, B6, B8, B9, B12), fer, lécithine (additif alimentaire 322i à des fins alimentaires, selon BPF, antioxydant et émulsifiant), palmitate d'ascorbyle (additif alimentaire304 à des fins alimentaires 2mg/kg, antioxydant)	Algérie	22-07-2017	20-09-2017	
CF24	Kids cornflakes	Mister	Maize flour 39%, wheat flour(contains gluten), rice flour, sugar, glucose-fructose syrup, malt extract(contains gluten), rapeseed oil, salt, emulsifier (rapeseed lecithin), vitamin mix (E, C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12)	Lithuania	07-09-2017	23-09-2017	
CF25	Choco corn	Monte Blanco	Cereal flours(maize, wheat), sugar, milk chocolate%(sugar, cocoa butter, whole milk powder, cocoa mass, emulsifier soya lecithin, natural vanilla flavouring), wheat starch, fat-reduced cocoa powder(3.5%), glucose syrup, barely malt extract, soya lecithin, cocoa powder, salt, vanillin flavourings	Italie	11-09-2017	23-09-2017	
CF26	Fenky	Flash	Corn meal, salt, wheat flour, rice flour, sugar, cocoa powder, food additives: (Acide citric SIN330 Acidity Regulator), (colorant SIN122, SIN124), chocolate flavor(artificial flavor)	Algérie	11-09-2017	23-09-2017	
DP1	Corn flakes	Bjorg	Corn(93.5%), raw cane sugar, salt, mulsifier : sunflower lecithin	Suisse	17-05-2017	03-07-2017	Agriculture biologique

Chapitre V : Matériel et méthodes

DP2	Galettes de maïs	Bjorg	Corn 99,7%, salt	Belgique	17-05-2017	03-07-2017	Agriculture biologique
DP3	Farine	Réginat Diététique	Farine et amidon de maïs, farine de riz, fécule de pomme de terre, sel, dextrose, additif alimentaire : SIN 415 (épaisissant max 20g/kg)	Algérie	23-05-2016	12-06-2017	
DP4	Couscous	Réginat Diététique	Semoule et farine de maïs, semoule et farine de riz, sel , eau	Algérie	23-05-2016	12-06-2017	
DP5	Cookies	Réginat Diététique	Farine et amidon de maïs, farine de riz, sucre, margarine végétale, œufs, sel, arôme vanille artificiel, amandes grillées additifs alimentaires : sin415 (épaisissant max 20g /kg) , sin 202 (conservateur max 2g /kg), sin330 (régulateur d'acidité BPF), sin 322i(emulsifiant BPF), sin 500i (agent levant BPF), sin 450i (agent levant max 2.2g /kg)	Algérie	14-02-2017	12-06-2017	
DP6	Macaroni	Nid D'or	Farine de riz, farine de maïs, eau	Algérie	23-05-2016	12-06-2017	
DP7	Semoule de maïs	Manseur	Maïs complet	Algérie	23-05-2016	13-06-2017	
DP8	Couscous de maïs	Maison Lahlou	Farine de maïs, eau, sel	Algérie	23-05-2016	13-06-2017	
DP9	Cookies	Gullón	Corn starch, , corn flour, vegetable oil(high oleic sunflower oil) 18%, sugar, glucose and fructose corn syrup, rice flour, raising agents(sodium and ammonium bicarbonates), salt, emulsifier (soya lecithin), vanilla flavour	Espagne	23-05-2016	13-06-2017	
DP10	Tortitas maíz	Gullón	Corn 99%, salt, emulsifier : soya lecithin)	Espagne	23-05-2016	13-06-2017	
DP11	Biscuits fourrés a la crème de cacao	Vida	Rice flour, sugar, corn flour, vegetable fat, cornstarch, glucose syrup, eggs, food additive (sodium pyrophosphateSIN450(i)), milk powder, sodium bicarbonate SIN500(ii) raising agents, (potassium sorbate SIN202, calcium propionateSIN282 preserving agents), salt, cocoa powder, (citric acid SIN330 acidity regulator) Chocolate cream: vegetable fat, sugar, cocoa powder, milkpowder26%, fat, hazelnut paste, food additive: soya lecithin SIN322 antioxydant), salt, vanilla aroma	Algérie	18-03-2017	10-07-2017	
DP12	Semoule de maïs sans gluten	El Assil	Semoule de maïs	Algérie	18-03-2017	10-07-2017	
DP13	Semoule de maïs	Bio Aglut	Semoule de maïs	Algérie	21-05-2017	10-07-2017	
DP14	Gluten free pasta	Zéropiù	Corn flour, rice flour	Slovénie	21-05-2017	10-07-2017	Oui
DP15	Pates diététiques sans gluten	Freeglut	Farine de maïs, farine de riz, E471	Italie	07-09-2017	23-09-2017	
DP16	Gluten free pasta	Pasta Berruto	70% corn flour, 29.5% rice flour, water, 0.5% emulsifier : mono and diglyceride of fatty acides	Italie	07-09-2017	23-09-2017	
DP17	Esparguete Isento de gluten	Mailaneza Natura	Corn flour	Portugal	07-09-2017	24-09-2017	
DP18	Pates sans gluten chakhchoukha	Miny Maïs	Farine de maïs, farine de riz, fecules de pomme de terre, emulsifiant CMC (SIN466)	Algérie	07-09-2017	24-09-2017	
DP19	Semoule de maïs	Meunerie Diafi	Semoule de maïs, farine de guar, sin 412 1000mg /1Kg, sel	Algérie	07-09-2017	24-09-2017	
DP20	Corn semolina	Ryam	Corn semolina	Algérie	07-09-2017	24-09-2017	
DP21	Semoule de maïs moyenne	Dalal	Semoule de maïs moyenne	Algérie	07-09-2017	24-09-2017	

Chapitre V : Matériel et méthodes

DP22	Semoule de maïs	Hidhab Chahia	Semoule de maïs	Algérie	07-09-2017	27-09-2017
DP23	Pates sans gluten	Hidhab Chahia	Amidon de maïs, farine de maïs, farine de riz, sin466, émulsifiant, sel	Algérie	07-09-2017	27-09-2017
DP24	Orange diegestive biscuits gluten free	Noglut	Corn starch, whole cane brown suga, vegetable oils(sunflower, olive)(11.9%), corn flour, rice flour, orange (5.6%), potatomaltodextrin, gelling agents(Acetylated distarch phosphate), isolated soya protein, citric fibre, raising agents (ammonium bicarbonate, sodium bicarbonate), salt, émulsifier (sunflower lecithin), flavourings, antioxidant tocopherol-rich extract, folic acid(pteroylmonoglutamic acid)	Espagne	07-09-2017	27-09-2017
DP25	Choco chip cookies	Schär	Corn starch, palm fat, cor flour, chocolate chips 12%(sugar, cocoa mass33%, cocoa butter, émulsifier :soy lecithin E322, natural Flavour, sugar, maltodextrin, soy flour, coconut flakes, modiflicated manioc starch, raising agents: ammonium bicarbonate, sodium bicarbonat , salt, vanilla natural arome	Italie	10-09-2017	27-09-2017
DP26	Mix patisserie	Schär	Maize starch, maize flour, thickner, locust bean gum,	Italie	10-09-2017	27-09-2017
IC1	Cereline Lait et miel	Celia	Farine de céréales (42%) (blé, maïs), lait infantile30%(lait écrémé, matières grasses végétales) (palme, colza, soja), lactose, lactosérum déminéralisé, maltodextrine, lactosérum, minéraux (carbonate de calcium, sulfate de magnésium, hydroxyde de potassium, phosphatetrcalcique, sulfate de fer, sulfate de zinc, sélérite de sodium, iodure de potassium, sulfate de manganèse), vitamines (C, PP, E, B5, A, K, B1, B6, D, B2, B9, H, B12) , taurine, chlorure de choline, inositol, L-carnitine, sucre, maltodextrine, poudre de miel(3%), concentré de protéines sériques, arôme naturel), minéraux(phosphate tricalcique, carbonate de calcium), caramel, vitamines (C, E, PP, A, D, B12, B2, B6, B1, H) Additifs a des fins alimentaires : SIN(322<10000mg/kg) , émulsifiant, SIN (304<100mg/kg) , SIN (306, 307)<<100mg/kg) antioxydants	France	23-05-2016	15-06-2017
IC2	Cereline multicéréales	Celia	Farines de céréales (65%) (blé(46%) , maïs (15%), riz(4%)), maltodextrine, sucre, caramel, minéraux(carbonate de calcium, sulfate furreux), vaniline, vitamines(C, A,B1,B12, B6), additifs à des fins alimentaires : SIN(322<10000mg/kg) , émulsifiant	France	23-05-2016	15-06-2017
IC3	Céréales	Biomil	Céréales(farine de maïs, farine de riz hydrolysée), saccharose, fruits(pomme, pruneau)(9%), huile végétale, minéraux(pyrophosphate de fer, carbonate de calcium), vitamines (acétate de tocophérol, phylloquinone, mononitrate de thiamine, riboflavine, pyridoxine, cobalamine, acide ascorbique, acide folique, acide pantothénique, biotine, niacine), maltodextrine, arôme de vanille et additif alimentaire : palmitate de L- ascorbyle (antioxydant)	Belgique	23-05-2016	15-06-2017
IC4	Cerelac	Nestlé	Farine de blé, lait écrémé (25.7%) , sucre, matières grasses laitières, flocons de dattes(5.1%), flocons de maïs, poudre de dattes(4.6%°, sucre caramélisé, huile de tournesol, sels minéraux : carbonate de calcium, fumarate de fer , sulfate de zinc, lodure de potassium, stabilisants : phosphate de potassium, phosphate disodique, vitamines(C,B3, E, B6, B1, B5, A, B2, B9, D, biotine, B12) , culture de bifidus, arome vailline	Maroc	23-05-2016	15-06-2017
IC5	Ma 1 ^{ère} blédine	Blédina	Céréales 62,8%, (farine de riz 32,8%, farine de maïs), sucre, carottes déshydratées en poudre 12% , maltodextrines, vitamines A, D, E, C, B1, B3, B6, B8, B5, minéraux :diphosphate de fer, sulfate de zinc	France	14-06-2017	28-09-2017

Chapitre V : Matériel et méthodes

IC6	Céréales sans gluten	Vigor	Céréales 61%, (farine de maïs, farine de riz), sucre, maltodextrine, gras végétal, sels minéraux (calcium, phosphore), additifs à des fins alimentaires, émulsifiant (lécithin de soja), vitamines (C, niacin, E, acide panthoténique, A, B6, B1, acide folique, K, Biotin, D3 , arôme vanille	Espagne	13-08-2017	28-09-2017	
CC1	Original	Bugles	Corn , vegetable oil, salt	Algérie	03-07-2016	12-07-2017	
CC2	Smokin BBQ	Bugles	Corn, vegetable oil, salt, smokin barbecue flavouring	Algérie	03-07-2016	12-07-2017	
CC3	Master chips gout fromage cheddar	Master Chips	Semoule de maïs, huile végétale, goût fromage cheddar	Algérie	03-07-2016	12-07-2017	
CC4	Fritos	Mahboul	Semoule de maïs, farine de pomme de terre, huile végétale, arôme ketchup, colorant rouge(SIN122) ,salt	Algérie	17-04-2017	12-07-2017	
CC5	Popped chips	Snatt's	Corn flour (42%), potato starch, (13%), dehydrated potato (13%), sunflower oil,(12%)? Soybeans (3%), salt, sugar, onion powder,	Espagne	17-04-2017	12-07-2017	
CC6	Chipsou	Maravilla	Farine de maïs, amidon de pomme de terre, sel, agent levant,- carbonate aacide de sodium (E500ii°, sucre, huile végétale, arôme artificiel ketchup	Algérie	13-08-2017	28-09-2017	
CC7	Master chips gout Nacho cheese	Master Chips	Maïs, huile végétale, arôme fromage (nacho)	Algérie	13-08-2017	28-09-2017	
CC8	Corn crisps	Ciko	Farine de maïs, huile végétale, arôme de poulet, sel	Algérie	25-09-2017	01-10-2017	
CC9	Chips	Dalidou	Semoule le de maïs, huile végétale alimentaire, arôme de pizza artificiel, selalimentaire iodé	Algérie	25-09-2017	01-10-2017	
PC1	Popcorn	Popar Classic	Ingrédient unique= maïs	Argentine	20-05-2016	08-06-2017	
PC2	Popcorn	Ar Gensun	Ingrédient unique= maïs	Argentine	20-05-2016	08-06-2017	
PC3	Gourmet popcorn	Snack	Ingrédient unique= maïs	Argentine	20-05-2016	08-06-2017	Oui
PC4	Popcorn	Pereda	Ingrédient unique= maïs	Argentine	20-05-2016	08-06-2017	Oui
PC5	Popcorn	Crown	Ingrédient unique= maïs	USA	20-05-2016	08-06-2017	
PC6	Popcorn	Argen Crops	Ingrédient unique= maïs	Argentine	08-07-2016	08-06-2017	
PC7	Maiz popcorn	Garido	Ingrédient unique= maïs	Emballé en Algérie	13-08-2017	28-09-2017	
PC8	Popcorn	Omy Pop	Ingrédient unique= maïs	Malaisie	13-08-2017	28-09-2017	

1.2 Les Matériaux de Référence Certifiés

Des matériaux de référence certifiés pour la teneur en OGM, produits par l'Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Geel, Belgique) et commercialisés par Fluka (Chemie GmbH, Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) ont été utilisés durant cette étude. Les matériaux de référence comprennent un ensemble de 4 farines pour chaque évènement de maïs génétiquement modifié, avec 0%, 0,1%, 1% (ou 2% dans le cas de de l'évènement transgénique Mon810) et 05 ou 10% de matériel GM (**Tableau 3**). Les matériaux de référence sont particulièrement importants dans l'optimisation et la validation des méthodes de détection d'OGM, utilisés comme contrôles positifs dans les réactions de PCR, tant qualitativement que quantitativement.

Tableau 3 : Matériaux de référence certifiés utilisés pour les différents événements testés.

Evènement transgénique	Code	% Nominal	Valeur certifiée g/ Kg	Incertitude g/kg
Bt176	Bf 411a	0	<0,14	-
	Bf 411b	0,1	1,00	0,29
	Bf 411d	1	10,0	0,8
	Bf 411f	5	50,0	1,8
Bt11	Bf 412a	0	<0,12	-
	Bf 412b	0,1	0,98	0,29
	Bf 412d	1	9,8	0,9
	Bf 4112f	5	48,9	2,1
Mon 810	Bf413ak	0	< 0,9	-
	Bf413ck	0,5	4,9	1,0
	Bf413ek	2	19,8	1,5
	Bf413gk	10	99	5
GA21	Bf 414a	0	<0,8	-
	Bf 414b	0,1	1,0	0,8
	Bf 414d	1	9,9	1,1
	Bf 414f	5	42,9	1,7
NK603	Bf415a	0	<0,4	-
	Bf415b	0,1	1,0	0,4
	Bf415d	1	9,8	0,7
	Bf415f	5	49,1	1,3
MON863	Bf416 a	0	<0,1	-
	Bf416b	0,1	1,0	-0,3 ; + 1,0
	Bf416c	1	9,8	-0,7 ; + 1,2
	Bf416d	10	98,5	-2,2; + 2,5
TC1507	Bf418a	0	<0,5	-
	Bf418b	0,1	1,0	- 0,2 ; + 0,6
	Bf418c	1	9,9	- 0,6 ; + 0,8
	Bf418d	10	98,6	- 1,7 ; + 2,0
MIR604	Bf423a	0	< 0,9	-
	Bf423b	0,1	1,0	-0,3 ; + 1,0

	Bf423c	1	9,8	-0,9 ; + 1,3
	Bf423d	10	98,5	-2,6 ; + 2,9
DAS59122	Bf424a	0	< 1,2	-
	Bf424b	0,1	1,0	-0,2 ; + 1,2
	Bf424c	1	9,9	-0,8 ; + 1,4
	Bf424d	10	98,7	-5,8 ; + 5,9
DAS-40278-9	BF433a	0	<0,3	-
	BF433b	0,5	5,0	0,6
	BF433c	1	10,0	0,9
	BF433d	10	100	8
3272	Bf420a	0	<1,3	-
	Bf420b	1	9,8	1,2
	Bf420c	10	98	8

2. Préparation des échantillons

Un échantillon représentatif de chaque produit a été préparé suivant un certain nombre d'opérations de broyage et de divisions selon les instructions du rapport technique de ENGL-Guidelines for sample preparation procedures in GMO analysis (ENGL, 2014).

3. Extraction d'ADN

3.1 Extraction d'ADN à partir des matériaux de référence certifiés (NucleoSpin food kit)

Le kit NucleoSpin® food de MACHEREY-NAGEL (GmbH & Co. KG, Düren, Allemagne) a été utilisé pour l'extraction d'ADN à partir de 100 mg de Matériel, suivant les instructions du fabricant, quelques modifications ont été apportées afin d'améliorer l'extraction.

Plus ou moins 100 mg du matériel de chaque fraction des MRCs ont été pesés par une balance de précision KERN ABJ-NM /ABS-N ABS 220-4N (Kern & Sohn, Albstadt, Allemagne) dans un tube eppendorf stérile de 2ml. A chaque fraction MRC, on ajoute 550 µl de la solution CF qui provoque la lyse cellulaire, préalablement chauffée à 65°C et 10 µl de protéinase k. Après avoir vortexé vigoureusement, les tubes sont placés dans un incubateur-agitateur Eppendorf Thermomixer R Mixer, 2.0 ml ThermoBlock (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) à 65°C et à 900rpm pendant 1h. Pendant cette période, chaque tube de réaction subit une agitation périodique vigoureuse, afin d'augmenter le rendement d'extraction de l'ADN.

Par la suite, 2µl d'ARNase (2mg/ml) sont ajoutés, et les MRCs sont incubés pendant 5min à 37°C. Les tubes sont ensuite centrifugés à l'aide de Heraeus™ Fresco™ 17 Microcentrifuge, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) à 10.000xg, à 4°C pendant 10 minutes. Après centrifugation, environ 500 µl (1v) de surnageant sont prélevés dans un

Chapitre V : Matériel et méthodes

nouveau tube stérile de 1,5 ml, en centrifugeant à nouveau pendant 5 minutes dans les conditions mentionnées ci-dessus.

Après la deuxième centrifugation, 1v de surnageant est recueilli dans un nouveau tube de 2 ml, auquel on ajoute 1v de la solution C4 et 1v d'éthanol pur. Le tout est homogénéisé doucement par inversion. Le mélange est ensuite chargé dans la colonne par étape, en ne dépassant pas 750µl de volume (capacité maximale de la colonne) et en centrifugeant à chaque fois à 11.000xg pendant 1 minute, cette opération permet à l'ADN d'être retenu dans la colonne pendant que le liquide passe.

L'ADN retenu sur la colonne est ensuite lavé à l'aide de 400µl de la solution CQW, suivie d'une centrifugation à 11.000xg pendant 1 minute. 2 autres lavages par 700 µl de la solution C5 puis par 200µl de la même solution suivis de centrifugations à 11.000xg pendant 1 et 2 minutes, respectivement ont été effectués.

Enfin L'ADN est élué à l'aide de 100 µl de la solution CE, préchauffée à 70°C, pendant 5 min à température ambiante, suivie d'une centrifugation à 11.000xg pendant 1min.

3.2 Extraction d'ADN des échantillons de produits alimentaires

L'ADN des échantillons a été extrait par la méthode Wizard, selon la méthode décrite par Lipp *et al.* (1999) avec quelques changements selon Mafra *et al.* (2008 (b)) qui Consiste en l'utilisation partielle du kit d'extraction Wizard® Plus Minipreps (Promega, Madison, WI, États-Unis).

Ainsi, environ 100 mg (dans certains cas jusqu'à 150 mg) de chaque échantillon ont été pesés dans un tube de réaction stérile de 2 ml. À l'échantillon a été ajouté 860 µl de Tampon d'extraction TNE (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM et 1% de SDS) responsable de la lyse cellulaire et de la précipitation des protéines ; 100 µl de Chlorhydrate de guanidine 5M, qui permet la dénaturation des protéines et 40 µl de la Solution de protéinase K (20mg/ml) (BIORON, GmbH, Ludwigshafen, Allemagne) utilisée dans la digestion enzymatique. Après avoir secoué vigoureusement par vortex, le mélange a été placé dans l'incubateur- agitateur à 65°C et 900 rpm, pendant 3 heures. Pendant cette période, chaque tube de réaction a subi une agitation périodique vigoureuse, dans le but d'augmenter le rendement de l'extraction de l'ADN. Par la suite, une centrifugation à 17.000xg et à 4°C pendant 15 minutes a été réalisée. Après centrifugation, environ 700 µl de surnageant ont été prélevés dans un nouveau tube stérile de 1,5 ml, puis centrifugés pendant 5 minutes dans les conditions déjà mentionnées. Après la

deuxième centrifugation, environ 600 µl de surnageant ont été recueillis dans un nouveau tube de 2 ml, en ajoutant 1 ml de résine de purification d'ADN Wizard® (Promega, Madison, WI, USA) et homogénéisés doucement par inversion. Le mélange était élué à travers une colonne en utilisant un piston d'une seringue. La partie éluée était mise au rebut tandis que l'ADN retenu sur la colonne a été lavé avec 2 ml d'isopropanol (80% v / v).

Après centrifugation pendant 2 minutes à 10 000 xg, pour éliminer les résidus d'OI, les colonnes ont été séchées à température ambiante pendant 5 minutes. Ensuite, la colonne a été transférée dans un nouveau tube stérile de 1,5 ml, en éluant l'ADN retenu sur la colonne avec 100 µl de tampon TE 0,1 x (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) préalablement chauffé à 70°C. Le mélange a été laissé à température ambiante pendant 1 minute et centrifugé pendant 1 minute à 10 000 xg, obtenant ainsi l'extrait d'ADN final.

Tous les extraits d'ADN ont été stockés à -25 ° C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

4. Qualité et intégrité d'ADN :

L'intégrité et la qualité de l'ADN extrait est évaluée en observant le profil électrophorétique sur un gel d'agarose à 1% additionné du colorant pour acides nucléiques GelRed. Pour cela, 0.80g d'agarose (GRISP, porto, Portugal) sont dissous dans 80ml de tampon SGBT (GRISP) et le mélange est chauffé jusqu'à ébullition dans un four à microondes permettant ainsi la dissolution complète de l'agarose, une fois retiré du four, le mélange est additionné de 5µl de GelRed 1x (Biotium, Hayward, CA, USA) et le tout est versé dans un support dont les deux extrémités ont été soigneusement fermées et dans lequel un peigne a été placé permettant la formation des puits.

A chaque électrophorèse, 5µl de marqueur moléculaire HyperLadder (14 bandes, 200-10 000 pb) (Bioline, london, UK) ont été appliqués à l'un des puits du gel. D'un autre côté, les extraits d'ADN ont été mélangés au tampon de charge (6x) à raison de 5µl d'ADN et 4µl de tampon. 9µl de chaque mélange sont ensuite déposés 1 à 1 dans les autres puits du gel et sont mis à migrer pendant 15 minutes à 200v.

La visualisation du profil électrophorétique a été effectuée à l'aide du logiciel Image Lab™ Software version 5.2.1, associé au système d'imagerie Gel Doc™ EZ imager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Le même logiciel a été utilisé pour l'analyse de la taille et la forme et l'acquisition de l'intensité de chaque bande sur le gel.

5. Concentration d'ADN

La détermination de la concentration en ADN a été effectuée au moyen du lecteur de microplaques à absorbance Synergy™ HTMulti-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, États-Unis) en utilisant la méthode de mesures d'échantillon à très faible volume qui fait appel à Take3 Micro-Volume Plate, composée de 16 microspots de 2 mm de diamètre arrangés dans une géométrie de 2*8.

Avant chaque lecture, une calibration de l'appareil, en effectuant une lecture à blanc, est nécessaire. Pour cela, 4µl d'eau BPC grade (sigma life science) sont prélevés à l'aide d'une micropipette et déposés sur chaque microspot de la plaque.

Une fois l'appareil est calibré, la lecture de la concentration en ADN des échantillons est effectuées en déposant 4µl de chaque échantillon sur deux microspots opposés (lecture en double pour chaque échantillon)

La lecture est possible grâce au logiciel Gen5 Take3 software module (BioTek Instruments, Winooski, VT, États-Unis) qui contient des protocoles préprogrammés pour la quantification des acides nucléiques. Le module Gen5 Take3 effectue les calculs et exporte les résultats à une feuille de calcul Microsoft Excel. Les résultats incluent les absorbances à 230 nm (A230), à 260 nm (A260), à 280 nm (A280) et à 320 nm (A320) ainsi que les ratios A260/A280 permettant l'évaluation de la contamination par les protéines et A260/A230 qui évalue la contamination par les glucides, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques).

Les calculs pour les dilutions nécessaires sont effectués par Excel 10.

6. PCR qualitative

L'évaluation de la capacité d'amplification de l'ADN de chaque extrait a été réalisée par une PCR spécifique à l'espèce qui consiste à utiliser les paires d'amorces IVR1-F/IVR1-R ou Mz-F/Mz-R, ciblant les gènes invertase et zéine de *Zea mays* L, respectivement. Si l'ADN ciblé est présent, intact et amplifiable une bande de 226 ou 139pb est obtenue selon le gène ciblé. Cette étape est particulièrement importante vu la nature des échantillons analysés qui sont pour la plupart des produits alimentaires transformés qui ont été soumis à des traitements contribuant à la dégradation de l'ADN.

Dans les échantillons où il était possible de détecter le gène de référence de maïs, l'étape suivante consistait en la détection des séquences régulatrices les plus utilisées pour les OGM.

Chapitre V : Matériel et méthodes

Il s'agit des séquences spécifiques du promoteur 35S qui dérive du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV P-35S) et du terminateur Nos (T-NOS) qui dérive de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* et ce, par le biais des couples d'amorces P35S-cf3/P35S-cf4 et HA-nos118-f/HA-nos118-r, respectivement. La détection de l'une ou les deux de ces séquences indique la présence du matériel GM dans l'échantillon analysé.

Les échantillons positifs aux séquences régulatrices, ont été testés pour la présence des évènements OGM suivants, Bt11, Bt176, MON810, MON863, NK603, GA21, TC1507, MIR604, DAS5912, DAS40278 et 3272. Les principales caractéristiques des paires d'amorces utilisées et optimisées pour chaque séquence cible sont décrites dans le **Tableau 4**.

Les réactions PCR ont été effectuées dans des tubes PCR de 0.2ml, en utilisant un volume réactionnel total de 25µl contenant 2µl de l'extrait d'ADN dilué à 50ng/µl. La composition et le volume de chaque réaction PCR ainsi que les programmes (temps / température) qui ont été appliqués pour chaque cible sont résumés dans le **Tableau 5**. Les réactions PCR ont été réalisées en utilisant le thermocycleur MJ Mini (Bio-Rad Laboratoires, Hercules, CA, USA) ou iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Les fragments d'ADN obtenus par PCR ont été séparés par électrophorèse en utilisant un gel d'agarose à 1.5% dans du tampon SGBT 1x (GRISP, Porto, Portugal) additionné du GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) pendant 20-25 min à 200V. Dans l'un des puits de gel, 4 µl de colorant de charge (6x) ont été couplés avec 2,0 µl de marqueur de poids moléculaire avec 10 bandes de 100-1000 pb et dans les puits restants, 4 µl de colorant de charge ont été appliqués avec 20 µl de produit de PCR. Le gel d'agarose a été visualisé grâce au logiciel Image Lab™ version 5.2.1 lié au système d'imagerie (Gel Doc™ EZ imager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Tableau 4 : Les amorces utilisées dans la PCR qualitative

PCR	Cible	Amorces	Séquence 5'-3'	Taille Amplicon bp	Référence
Spécifique à l'espèce	Invertase de maïs	IVR1-F	CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC	226	ISO21569 (2005)
		IVR1-R	GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC		
	Zéine de maïs	Mz-f	CGC CAG AAA TCG TTT TTC AT	139	Germini <i>et al.</i> (2004)
		Mz-r	GGT GGT GTC CTT GCT TCC TA		
Spécifique aux éléments régulateurs	Promoteur 35S	35S-cf3	CCA CGT CTT CAA AGC AAG TGG	123	ISO21569 (2005)
		35S-cf4	TCC TCT CCA AAT GAA ATG AAC TTC		
	Termineur NOS	HA-NOS118-F	CGA TGA CGT TAT TTA TGA GAT GGG	118	ISO21569 (2005)
		HA-NOS118-R	GAC ACC GCG CGC GAT AAT TTA TCC		
Spécifique aux évènements transgéniques	Bt176	CRY03	CTC TCG CCG TTC ATG TCC GT	211	ISO21569 (2005)
		CRY04	GGT CAG GCT CAG GCT GAT GT		
	Bt11	Bt11 3-5'	AAAAGACCACAACAAGCCGC	127	ISO21570 (2005)
		Bt11 3-3'	CAATGCGTTCTCCACCAAGTACT		
	MON810	VW01	TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CG	178	ISO21569 (2005)
		VW03	TCC ATC TTT GGG ACC ACT GTC G		
	MON863	P863-3F	GGC GAT GAA TAA AYG AGA AAT A	200	Pan <i>et al.</i> (2006)
		P863-4R	TAG CCA GTT CAT TGC GAG TA		
	NK603	NK-F	CGG CCA GCA AGC CTT GTA	113	Huang <i>et al.</i> (2004)
		NK-R	CGC CCA GCA AGC CTT GTA		
	GA21	GA21 F	TCT CCT TGA TGG GCT GCA	270	Germini <i>et al.</i> (2004)
		GA21 R	ACG GTG GAA GAG TTC AAT GTA TG		
	MIR604	MIR604-AF	CGC TCT GCG CAC GCA ATT CA	132	Kim <i>et al.</i> (2010)
		MIR604-AR	GGT TCT GTC AGT TCC AAA CG		
	TC1507	TC-F	GAC GTC TCA ATG TAA TGG TTA ACG A	190	La Paz <i>et al.</i> (2006)
		TC-R	GGG TAA CCG CTC TTC CAG TTG T		
DAS59122	DAS-AF	CGC ACC TGT GAT TGG CTC AT	116	Kim <i>et al.</i> (2010)	
	DAS-AR	GAT TGT CGT TTC CCG CCT TC			

Chapitre V : Matériel et méthodes

DAS40278	DAS40-f1	CACGAACCATTGAGTTACAATC	98	Savini <i>et al.</i> (2012)
	DAS40-r3	TGGTTCATTGTATTCTGGCTTTG		
3272	E3272-F	TCATCAGACCAGATTCTCTTTTATGG	95	Delobel <i>et al.</i> (2010)
	E3272-R1	TGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTTA		

Tableau 5 : Composition des mix des PCR qualitatives et leurs programmes de température.

CIBLE	Composition du mix PCR μ l									Programme		
	H2O	Tampon 10x	MgCl2 25mM	DNTP 2.5mM chacune	Amorces F/R 10 μ M Chacune	AmpliIT aq	5U/ μ l ADN	Volume totale	Température	Temps	Nombre de cycles	
Gène zéine de maïs	15,3	2,5	2	1	1	0,2	2	25	95°C	5min	1	
									95°C } 60°C } 72°C }	30S	35	
									72°C	5min	1	
Gene invertase de maïs	14,8	2,5	1,5	2	1	0,2	2	25	95°C	5min	1	
									95°C } 64°C } 72°C }	30S 30S 1min	35	
									72°C	5min	1	
Promoteur 35s	15,3	2,5	2	1	1	0,2	2	25	94°C	5min	1	
									94°C } 60°C } 72°C }	30S	38	
									72°C	5min	1	
Termineur Nos	15,3	2,5	2	1	1	0,2	2	25	94°C	5min	1	
									94°C } 60°C } 72°C }	30S	38	
									72°C	5min	1	

Chapitre V : Matériel et méthodes

									95°C	5min	1
Bt 176	15,7	2,5	1,5	1	1	0,3	2	25	95°C 63°C 72°C	30s	40
									72°C	5min	1
									95°C	5min	1
Bt11	13,3	2,5	3	2	1	0,2	2	25	95°C 60°C 72°C	30S	40
									72°C	5min	1
									95°C	5min	1
Mon 810	15,8	2,5	1,5	1	1	0,2	2	25	95°C 65°C 72°C	30S	40
									72°C	5min	1
									95°C	5min	1
Mon 863	14,8	2,5	2	1	1,25	0,2	2	25	95°C 58°C 72°C	30S	40
									72°C	5min	1
									95°C	5min	1
NK603	15,3	2,5	1,5	1	1,25	0,2	2	25	95°C 62°C 72°C	30S	40
									72°C	5min	1
									95°C	5min	1
GA21	14,3	2,5	2	2	1	0,2	2	25	95°C 58°C 72°C	40S	40
									72°C	5min	1

Chapitre V : Matériel et méthodes

									94°C	5min	1
TC1507	14,8	2,5	2	1	1,25	0,2	2	25	94°C 62°C 72°C	30S	38
									72°C	5min	1
DAS59122	14,8	2,5	1,5	2	1	0,2	2	25	94°C 61°C 72°C	30S	40
									72°C	5min	1
MIR604	14,3	2,5	2	2	1	0,2	2	25	94°C 59°C 72°C	30S	40
									72°C	5min	1
DAS-40278-9	13,8	2,5	2,5	2	1	0,2	2	25	94°C 61°C 72°C	30S	40
									72°C	5min	1
3272	13,3	2,5	3	2	1	0,2	2	25	94°C 63°C 72°C	30S	40
									72°C	5min	1

7. PCR en temps réel

L'amplification PCR en temps réel visait à obtenir, dans une première phase, la confirmation des événements détectés par la PCR qualitative. Dans une seconde phase, chaque événement de maïs trouvé a été quantifié. La technique était basée sur la méthodologie décrite dans la norme ISO 21570 (2005) pour la détection quantitative de maïs génétiquement modifié par PCR en temps réel, avec quelques modifications. Elle consistait en l'utilisation de sondes d'hydrolyse de type Taqman™ dont les séquences sont indiquées dans le **Tableau 6**, ainsi que les séquences des amorces respectives. Les amorces et les sondes SSIib et Adh1 ont été utilisées pour la détection et la quantification de gènes de maïs endogènes. Dans ce cas, les gènes de référence.

Tableau 6 : Amorces et sondes utilisées dans la PCR en temps réel.

Cible	Amorce/ sonde	Sequence (5'- 3')	Amplicon (bp)	Référence
SSIib	SSIib 1-5'	CTCCCAATCCTTTGACATCTGC	151	ISO 21570 (2005)
	SSIib 1-3'	TCGATTCTCTCTTGGTGACAGG		
	SSIib Taq	FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCA-BHQ2		
Adh1	Adh1-F	CCAGCCTCATGGCCAAAG	70	Mazzara <i>et al.</i> (2005)
	Adh1-R	CCTTCTTGGCGGCTTATCTG		
	Adh1-P	FAM-CTTAGGGGCAGACTCCCGTGTCCCT-BHQ2		
MON810	MON810 2-5'	GATGCCTTCTCCCTAGTGTGA	113	ISO 21570 (2005)
	MON810 2-3'	GGATGCACTCGTTGATGTTG		
	MON810 p	FAM-AGATACCAAGCGGCCATGGACAACAA-BHQ2		
Bt11	Bt11 3-5'	AAAAGACCACAACAAGCCGC	127	ISO 21570 (2005)
	Bt11 3- 3'	CAATGCGTCTCCACCAAGTACT		
	Bt11-2-Taq	FAM-CGACCATGGACAACAACCCAAACATCA-BHQ2		
GA21	GA21 F	TCTCCTTGATGGGCTGCA	270	Germini <i>et al.</i> (2004)
	GA21 R	ACGGTGAAGAGTTCAATGTATG		
	GA21 P	FAM-AAGGATCCGGTGCATGGCCG -BHQ2		
NK603	NK-F	CGGCCAGCAAGCCTTGTA	113	Huang <i>et al.</i> (2004)
	NK-R	TCCCGACTCTTCTCAAGCA		
	NK-P	FAM-ATCACAACCGAGAGAAGAGGGATCTCGA-BHQ2		
TC1507	TC-F	GACGTCTCAATGTAATGGTTAACGA	190	La Paz <i>et al.</i> (2006)
	TC-R	GGGTAACCGCTCTTCCAGTTGT		
	TC-P	FAM-CCGCGTTAAACAAGTTACTCGAGGTCGAGGTCATTC-BHQ2		
DAS59122	DAS-F	GGGATAAGCAAGTAAAAGCGCTC	86	Mazzara <i>et al.</i> (2006)
	DAS-R	CCTTAATTCTCCGCTCATGATCAG		
	DAS-P	FAM-TTTAAACTGAAGGCGGAAACGACAA-BHQ2		

Chapitre V : Matériel et méthodes

Les amplifications PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant 20 µl de volume réactionnel total constitué de 2 µl d'ADN matrice (50ng/µl), de 10 µl de SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix 2X (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), d'amorces et de sondes selon les concentrations présentées dans le **Tableau 7**. Les tests ont été effectués en utilisant le système de détection par PCR en temps réel CFX96™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), le même profil d'amplification de [95 ° C pendant 5 min; 50 cycles à 95 ° C pendant 30 secondes et à 60 ° C pendant 1 minute] a été appliqué pour toutes les réactions. Les données ont été collectées et traitées par Bio-Rad CFX Manager 2.0 (Laboratoires Bio-Rad, Hercules, Californie, États-Unis).

Pour chaque test, la méthode de la courbe de double calibration a été utilisée à partir de la dilution en série du matériau de référence respectif. Les standards ont été amplifiés en double et les échantillons en triple par au moins deux essais indépendants.

Tableau 7 : composition des PCR en temps réel.

Cible	Composants (µl)					
	H2O ultrapure	SsoAdvanced™ Supermix 2X	Amorces	Sondes	ADN Matrice	Volume total
SSIb	6,2	10	0,75 (500 nM)	0,3 (200 nM)	2	20
Adh1	7,3	10	0,3 (150 nM)	0,1 (50 nM)	2	20
MON810	5,6	10	1,0 (500 nM)	0,4 (200 nM)	2	20
NK603	6,4	10	0,6 (300 nM)	0,4 (200 nM)	2	20
TC1507	6,5	10	0,6 (300 nM)	0,3 (150 nM)	2	20
GA21	7,3	10	0,3 (150 nM)	0,1 (50 nM)	2	20
Bt11	6,1	10	0,75 (375 nM)	0,4 (200 nM)	2	20
DAS59122	6,8	10	0,5 (250 nM)	0,2 (100 nM)	2	20



**Chapitre
VI**

**Résultats et
discussion**

1. Introduction

Plus de cent produits alimentaires à base de maïs, disponibles dans le commerce de détail algérien ont été analysés au cours de notre travail dans le but de chercher la présence du matériel génétiquement modifié. Les produits ont été acquis de manière aléatoire sur différents marchés durant l'année 2016 et l'année 2017 et ont été regroupés en : produits de maïs doux en conserve, produits de flocons de maïs (cornflakes), produits sans gluten (farines sans gluten, pâtes et couscous sans gluten, cookies sans gluten) , produits de céréales pour bébés, produits de chips et produits de popcorn.

Étant donné que nos échantillons consistaient principalement en aliments hautement transformés, un choix critique concernant le protocole d'extraction de l'ADN pour obtenir des rendements adéquats et un ADN amplifiable a été réalisé. Après avoir vérifié l'amplificabilité de l'ADN extrait au moyen de PCR spécifique aux gènes endogènes de maïs, les échantillons qui ont montré leur aptitude à l'amplification ont été soumis à un criblage ciblant les séquences les plus couramment utilisées pour contrôler les cassettes d'OGM, à savoir le promoteur 35S et le terminateur NOS. Les échantillons positifs pour au moins un de ces deux éléments ont été ensuite testés pour l'identification des événements spécifiques suivants : Bt176, Bt11, GA21, Nk603, Mon810, Mon863, TC1507, MIR604, DAS59122 et 3272. Comme DAS40278, ne contient aucun de ces deux éléments dans sa cassette, il a été testé avec tous les échantillons amplifiables. Après l'obtention des résultats qualitatifs, nous avons ensuite procédé à la PCR en temps réel qui nous a permis à la fois de confirmer la présence des événements transgéniques précédemment détectés ainsi que d'évaluer leurs teneurs parmi les produits GM positifs .

2. Evaluation de l'ADN des échantillons alimentaires

Pour longtemps, l'acide désoxyribonucléique (ADN) a été d'un intérêt mineur dans l'analyse des denrées alimentaires et l'authentification des aliments impliquait couramment la détection de protéines spécifiques à l'espèce, lorsqu'il s'agissait de discerner l'origine des matières destinées à la consommation humaine (Lockley et Bardsley, 2000). Après l'approbation et la culture de diverses cultures génétiquement modifiées aux États-Unis et en Europe ces dernières années, les acides nucléiques sont devenus un outil important dans l'analyse des aliments. La raison en est, dans la plupart des cas, la discrimination entre les denrées alimentaires génétiquement modifiées ou non modifiées, qui peuvent être mieux analysées directement au niveau de l'ADN (Peano *et al.*, 2004).

L'extraction d'un ADN de quantité et de qualité suffisantes est la première étape d'un dépistage fiable des OGM dans les aliments car la qualité et la quantité d'ADN sont des facteurs fondamentaux dans une réaction de PCR (Al-Salameen *et al.*, 2012). Lorsqu'il s'agit de produits alimentaires transformés, L'isolement d'un ADN amplifiable peut représenter une tâche pénible, parce que la fabrication des denrées alimentaires implique un certain nombre d'opérations qui contribuent à la dégradation de l'ADN affectant profondément l'efficacité des amplifications PCR. Par conséquent, le choix d'une méthode appropriée et efficace pour l'extraction d'ADN s'impose (Bauer *et al.*, 2003 ; Vijayakumar *et al.*, 2009).

Au cours de ce travail, l'extraction d'ADN à partir de tous les échantillons de produits alimentaires a été effectuée selon la méthode de wizard qui s'est révélée être la méthode d'extraction la plus performante à partir des produits transformés, y compris les produits dérivés du maïs (Peano *et al.*, 2004; Smith et Maxwell, 2007; Mafra *et al.*, 2008(b)).

La pertinence de l'ADN isolé en tant qu'analyte pour la détection des OGM par PCR dépend de sa qualité, de sa pureté et de sa quantité (rendement). L'évaluation de ces paramètres est généralement la première étape de post-extraction dans l'analyse d'un aliment OGM.

2.1 La concentration en ADN

Les concentrations en ADN de nos échantillons de produits alimentaires sont présentées dans les **Tableaux (8-13)** relatifs aux différents groupes de produits alimentaires.

Tableau 8: Concentration et pureté des extraits d'ADN d'échantillons de maïs doux extraits par la Méthode de wizard.

#	260/280	Concentration ng/µl
SC1	1,92	162,8
SC2	1,95	145,9
SC3	1,92	162,6
SC4	1,91	202,8
SC5	1,92	286,0
SC6	2,02	305,5
SC7	1,92	223,9
SC8	1,85	202,2
SC9	2,01	429,3
SC10	2,07	386,4
SC11	1,95	341,6
SC12	1,82	171,9
SC13	1,88	200,0
SC14	1,84	187,4
SC15	1,94	212,3
SC16	1,92	483,9
SC17	2,13	476,1
SC18	1,81	232,0
SC19	1,90	186,8
SC20	1,82	274,1
SC21	1,66	270,3
SC22	1,98	407,3
SC23	1,87	321,5
SC24	1,86	162,9
SC25	1,75	371,0
SC26	1,84	180,9
SC27	1,88	241,0
SC28	1,90	219,3
SC29	1,80	259,9
SC30	1,80	237,1
SC31	2,03	502,5

Tableau 9: Concentration et pureté des extraits d'ADN d'échantillons de produits sans gluten extraits par la Méthode de wizard.

#	260/280	Concentration ng/µl
DP4	2,15	97,3
DP6	2,11	191,4
DP8	2,17	178,6
DP14	2,03	246,2
DP15	2,20	218,4
DP16	2,04	52,2
DP17	1,91	55,6
DP18	1,93	79,7
DP23	1,93	83,7
DP7	2,18	371,6
DP12	2,17	329,0
DP13	2,14	327,3
DP19	2,13	361,1
DP20	2,19	151,8
DP21	2,10	158,4
DP22	1,98	71,6
DP26	1,95	53,8
DP1	1,70	42,6
DP2	1,58	38,6
DP5	1,43	72,2
DP9	1,60	68,7
DP10	1,74	39,7
DP11	1,96	228,7
DP24	1,86	391,4
DP25	1,92	227,6
DP3	/	/

Chapitre VI: Résultats et discussion

Tableau 10 : Concentration et pureté des extraits d'ADN d'échantillons de cornflakes extraits par la Méthode de wizard.

#	260/280	Concentration ng/µl
CF1	1,89	225,1
CF2	1,80	228,4
CF3	1,47	42,7
CF4	1,94	215,8
CF5	2,00	225,2
CF6	2,09	188,2
CF7	2,00	470,8
CF8	1,94	170,8
CF9	1,98	269,8
CF10	2,07	198,2
CF11	2,00	122,9
CF12	1,99	110,5
CF13	1,50	102,0
CF14	1,76	93,1
CF15	2,08	174,3
CF16	2,11	160,1
CF17	1,88	61,1
CF18	1,53	37,4
CF19	2,01	304,5
CF20	1,77	25,8
CF21	1,97	142,3
CF22	1,88	130,5
CF23	2,08	371,7
CF24	2,06	155,9
CF25	1,65	35,7
CF26	1,91	97,6

Tableau 11 : Concentration et pureté des extraits d'ADN d'échantillons de chips extraits par la Méthode de wizard.

#	260/280	Concentration ng/µl
CC1	1,95	40,2
CC2	1,85	55,5
CC3	2,02	131,4
CC4	2,01	146,8
CC5	2,04	146,9
CC6	2,11	37,8
CC7	1,85	54,3
CC8	1,87	41,9
CC9	2,02	93,2

Tableau 12 : Concentration et pureté des extraits d'ADN d'échantillons de céréales pour bébé extraits par la Méthode de wizard.

#	260/280	Concentration ng/µl
IC1	1,74	72,1
IC2	1,85	204,5
IC3	2,21	279,7
IC4	1,66	100,0
IC5	2,12	116,1
IC6	2,21	157,6

Tableau 13 : Concentration et pureté des extraits d'ADN d'échantillons de cornflakes extraits par la Méthode de wizard.

#	260/280	Concentration ng/µl
PC2	2,15	185,2
PC1*	1,93	67,5
PC3*	1,90	65,7
PC4*	1,88	57,0
PC5*	1,91	67,5
PC6*	1,94	57,5
PC7*	1,95	81,5
PC8*	1,83	36,2

Chapitre VI: Résultats et discussion

De façon générale, Les résultats enregistrés ont mis l'accent sur l'efficacité de l'extraction de l'ADN à partir des aliments échantillonnés du moment que des quantités appropriées d'ADN ont été obtenues à partir de la majorité des produits.

Ce que nous remarquons est que les concentrations sont très différentes d'un groupe de produits à l'autre mais aussi pour des produits appartenant au même groupe et qui sont censés subir plus au moins le même processus de fabrication. Par exemple, en ce qui concerne les échantillons de maïs doux qui sont en nombre de 31 produits, les concentrations enregistrées étaient très satisfaisantes et oscillaient entre 145,9ng/μl et 502,5ng/μl avec une concentration moyenne de 272 ng/μl. La même observation peut être également faite sur la majorité des échantillons de cornflakes et des produits sans gluten, où on a également enregistré des quantités en ADN allant jusqu'à 470 ng/mg et 391,4 ng/mg, respectivement malgré que certains échantillons dans ces deux groupes de produits (3 échantillons dans chaque groupe) n'ont pas donné les concentrations souhaitées. L'extraction à partir des céréales pour bébés a également permis d'avoir des quantités d'ADN satisfaisantes allant de 72,1ng/μ à 279,7ng/μl, alors que les concentrations en ADN étaient en général moins élevées dans les autres groupes de produits, à savoir les popcorn et les chips, mais qui restent pour la plupart des échantillons dans les niveaux acceptables tenant compte de la nature de nos échantillons qui sont hautement transformés.

Remarque : Les concentrations faibles en ADN enregistrées pour les produits de popcorn est due à l'utilisation de l'ARNase dans le cas des échantillons de popcorn (PC1 ; PC3-PC8) et qui a considérablement réduit la quantité d'ADN extraite par rapport à l'échantillon (PC2) qui a été extrait sans ajout d'ARNase.

Malgré les tentatives répétées, L'extraction de l'ADN a été impossible à partir de l'échantillon (DP3) dont l'ingrédient principal consiste en l'amidon de maïs. Une situation similaire a été signalée par Arun *et al.* (2013) qui ont indiqué que l'extraction d'AND a été impossible à partir de deux échantillons d'amidon de maïs. De même (Kuiper, 1999) a montré la difficulté d'extraire l'ADN à partir des dérivés d'amidon.

2.2 La pureté

La pureté de l'ADN extrait peut être évaluée en mesurant les rapports d'absorption UV A260 / A280 et A260 / A230 avec un spectrophotomètre. Lorsque le rapport d'absorption à 260/280 nm est compris entre 1,5 et 2,0 et que le rapport d'absorption à 260/230 nm est supérieur à 1,7, l'ADN extrait devrait convenir à l'analyse par PCR (Gryson, 2010).

L'observation des valeurs relatives à la pureté de nos extraits ADN révèle que la plupart sont comprises entre 1,5 et 2 ce qui indique alors leur convenance à l'analyse par PCR.

On peut constater qu'en règle générale, des concentrations élevées d'ADN correspondent à des degrés de pureté plus élevés. Le cas des échantillons avec de faibles concentrations d'ADN (moins de 50 g / μ L) ont des puretés moins satisfaisantes (**Tableau 8-13**, valeurs en vert).

La pureté de l'ADN peut être gravement affectée par divers contaminants dans les matrices alimentaires. Par conséquent, Le choix et l'optimisation des procédures d'extraction de l'ADN qui éliminent les composants inhibiteurs potentiels et les substances interférentes peuvent être d'une importance cruciale pour le succès d'une méthode de détection à base d'ADN donnée (Gryson, 2010). Les additifs alimentaires, les polysaccharides, les protéines, les composés phénoliques et d'autres métabolites secondaires végétaux non caractérisés peuvent tous jouer un rôle inhibiteur dans une réaction de PCR. Par exemple, les polysaccharides sont connus pour co-précipiter avec l'ADN après l'ajout d'éthanol, formant ainsi une solution visqueuse. Certains produits chimiques, tels que les détergents ou les alcools (par exemple, le bromure de cétyleméthylammonium (CTAB), l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), le chloroforme, le dodécylsulfate de sodium, l'éthanol et l'isopropanol) utilisés pendant l'extraction de l'ADN peuvent affecter les performances de la PCR en inhibant la Taq polymérase. En outre, les sels et autres composés normalement présents dans les solutions tampons des kits d'extraction d'ADN réduisent également les performances de la PCR (Rizzi *et al.*, 2003; Lipp *et al.*, 2005 ; Corbisier *et al.*, 2007; Gryson, 2010;). Pour minimiser la présence/effet des inhibiteurs dans l'extrait d'ADN final, certaines approches ont été proposées visant à améliorer le protocole d'extraction de l'ADN, ainsi qu'à diluer simplement les extraits d'ADN ou à optimiser les conditions de PCR (Fagan, 2004).

2.3 La qualité des extraits d'ADN

La qualité et l'intégrité de l'ADN extrait par la méthode Wizard a été également évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les **Figures (11-16)** représentent les profils électrophorétiques de l'ADN génomique relatifs aux différents groupes de produits analysés au cours de ce travail.



Figure 11 : Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique des échantillons de maïs conserve suivants : SC1 SC2, SC3, SC4, SC5, SC6, SC7, SC8, SC9, SC10, SC11, SC12, SC13, SC14, SC15, SC16, Blanc.

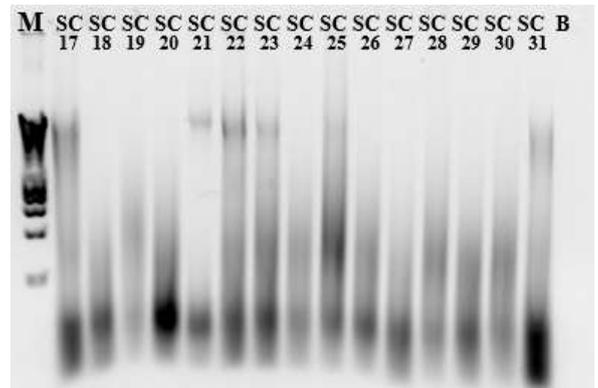


Figure 12 : Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique des échantillons de maïs conserve suivants : SC17, SC18, SC19, SC20, SC21, SC22, SC23, SC24, SC25, SC26, SC27, SC28, SC29, SC30, SC31, Blanc.

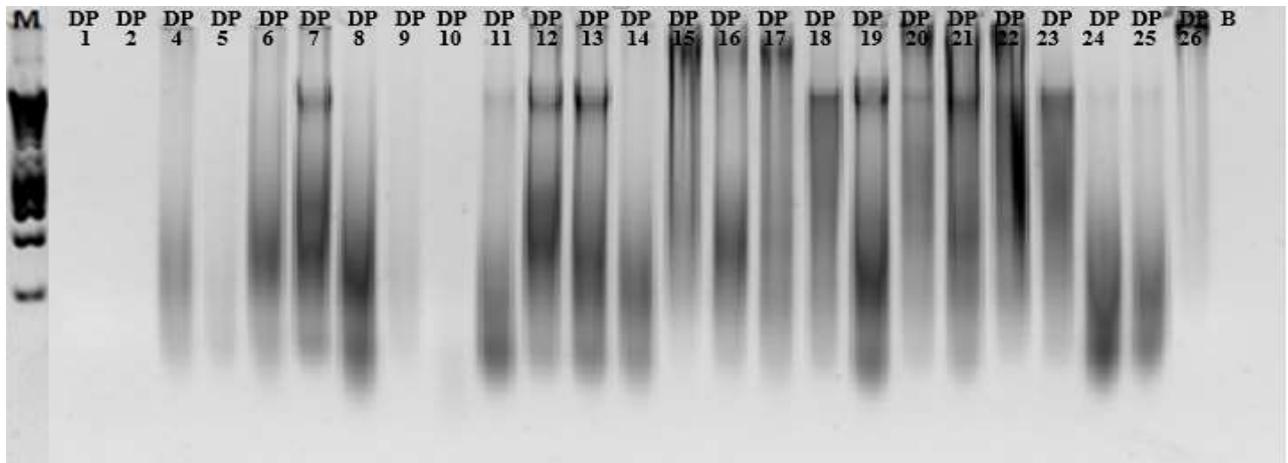


Figure 13 : Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique des échantillons de cornflakes : DP1, DP2, DP4, DP5, DP6, DP7, DP8, DP9, DP10, DP11, DP12, DP13, DP14, DP15, DP16, DP17, DP18, DP19, DP20, DP21, DP22, DP23, DP24, DP25, DP26, Blanc.

Chapitre VI: Résultats et discussion

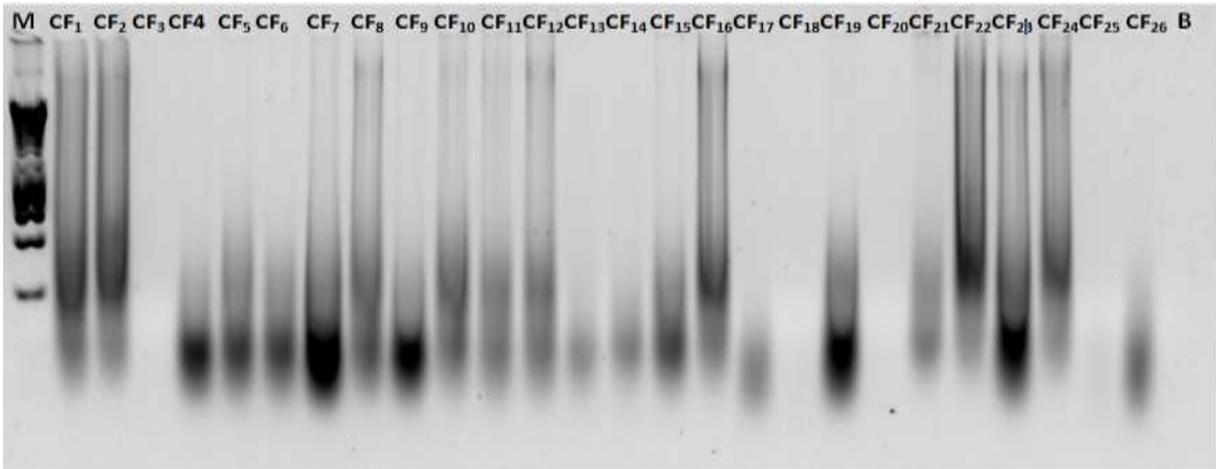


Figure 14 : Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique des échantillons de cornflakes CF1, CF2, CF3, CF4, CF5, CF6, CF7, CF8, CF9, CF10, CF11, CF12, CF13, CF14, CF15, CF16, CF17, CF18, CF19, CF20, CF21, CF22, CF23, CF24, CF25, CF26, Blanc.

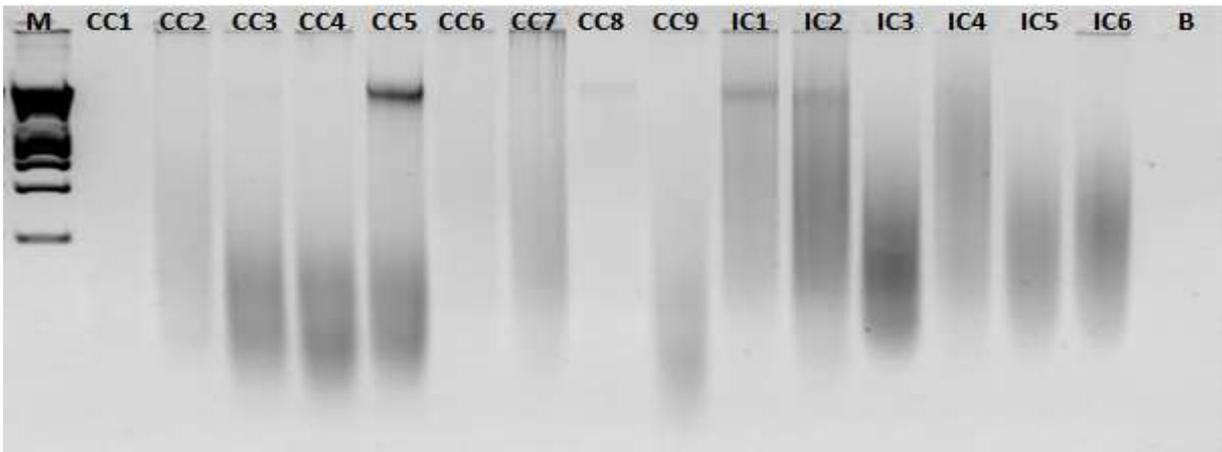


Figure 15 : Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique des échantillons de Chips et céréales pour bébés CC1, CC2, CC3, CC4, CC5, CC6, CC7, CC8, CC9, IC1, IC2, IC3, IC4, IC5, IC6.

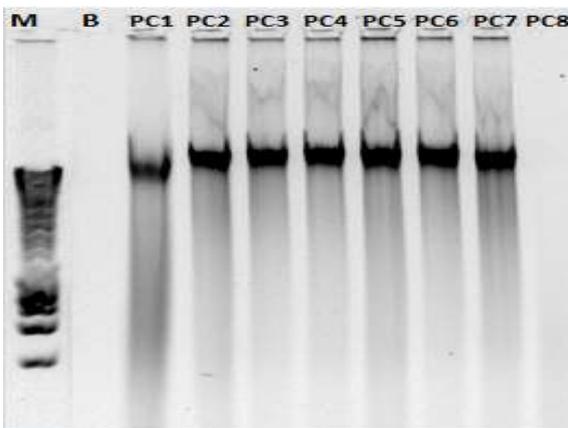


Figure 16 : Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN génomique des échantillons de Popcorn: Blanc, PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, PC7, PC8.

Chapitre VI: Résultats et discussion

La visualisation des extraits d'ADN génomique de nos échantillons sur gel d'agarose nous a permis d'avoir une idée sur la taille des fragments d'ADN de ces derniers. Pour cela, un marqueur de 14 bandes correspondant à des fragments de tailles allant de 200 à 10000 pb a été utilisé afin d'estimer la taille des fragments de notre ADN.

Comme on peut le constater à travers les différents profils électrophorétiques relatifs à nos échantillons, lorsqu'il s'agit de produits alimentaires qui ont subis une transformation, une partie importante de l'ADN se trouve cisailée. Par exemple, La plupart des échantillons de maïs conserve (**Figures 11 et 12**), montrent des bandes de couleur foncée ce qui concorde avec les concentrations en ADN élevées enregistrées pour ce groupe de produits. Toutefois, la couleur foncée étant principalement concentrée au niveau inférieur des frotis, cela signifie que l'ADN est de faible taille. Le constat reste le même pour les produits sans gluten (**Figure 13**) et les cornflakes (**Figure 14**) car la couleur foncée se concentre le plus sur les parties inférieures des bandes. De plus, certaines bandes dans ces deux groupes de produits sont presque vides (bandes correspondant aux échantillons ayant enregistré des concentrations en ADN très faibles). Les concentrations moins importantes enregistrées pour les chips et les céréales pour bébés (**Figure 15**) ont également donné des bandes moins foncées par rapport aux autres groupes de produits avec également une majorité de l'ADN concentrée au niveau bas des frotis.

L'intégrité de l'ADN est influencée par de nombreux facteurs, tels que la qualité du matériau de démarrage, la nature du traitement, l'état de stockage, la période de stockage et la matrice elle-même (Gryson *et al.*, 2004 ; Smith *et al.*, 2005). Au niveau de nos échantillons, L'effet du traitement technologique sur la qualité d'ADN récupéré à partir d'un échantillon peut être mieux illustrée en comparant les profils électrophorétiques des échantillons (PC1-PC7) du groupe des popcorns (**Figure 16**) aux échantillons des autres groupes. Dans ces produits qui n'ont subi aucun traitement technologique (mise à part l'opération de broyage qui a précédé l'extraction de l'ADN), on remarque que tout l'ADN est resté intacte malgré que les quantités récupérées étaient faibles suite à l'utilisation de l'ARNase. En revanche l'échantillon PC8 qui consiste en un popcorn transformé (déjà soufflé et assaisonné), présente une bande presque vide qui reflète un ADN très dégradé.

Au niveau des réactions PCR, Les limitations provoquées par une forte dégradation de l'ADN dans le cas de produits ayant subis des traitements technologiques sont généralement contournée en utilisant une stratégie dans laquelle de petits fragments d'ADN (<120 pb) sont amplifiés.

3. Evaluation de la capacité d'amplification de l'ADN

Afin d'évaluer l'aptitude à l'amplification de nos extraits d'ADN et de tester la présence d'ADN de maïs, ingrédient principal de nos échantillons, La technique de PCR qualitative a été utilisée pour l'amplification des gènes naturels du maïs, à savoir le gène de la zéine et le gène de l'invertase.

Les gènes de l'invertase et de la zéine du maïs sont deux gènes endogènes de l'espèce *Zea mays*, couramment utilisés comme cibles pour l'identification du maïs dans un aliment. Leur amplification par le biais des amorces IVR1-F / IVR1-R et Mz-F / Mz-R, permet de produire des fragments de 226 et 139 paires de bases, respectivement.

Les **Figures (17-24)** montrent les résultats de la capacité de nos extraits d'ADN à amplifier le gène endogène de maïs (zéine ou invertase).

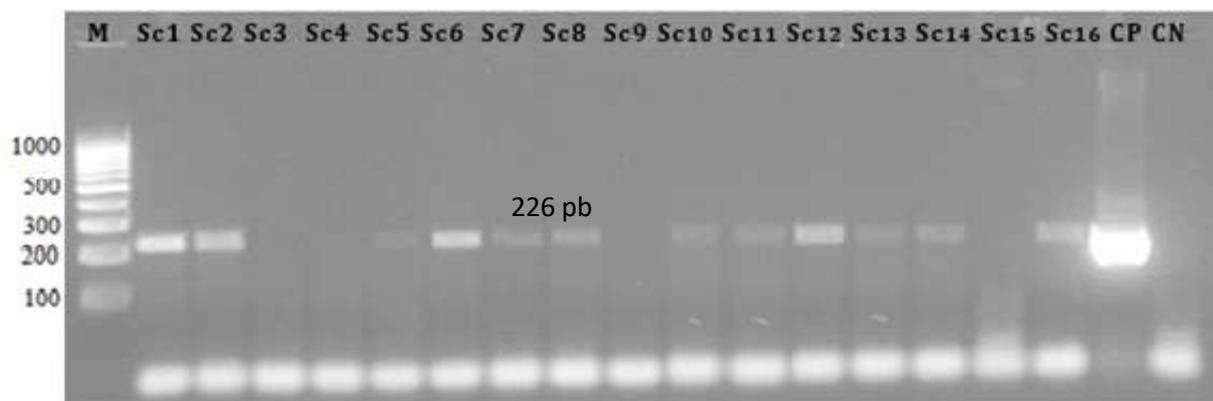


Figure 17 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'invertase de maïs (IVR F / IVR R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, SC1, SC2, SC3, SC4, SC5, SC6, SC7, SC8, SC9, SC10, SC11, SC12, SC13, SC14, SC15, SC16, Contrôle Positif, Contrôle Négatif.

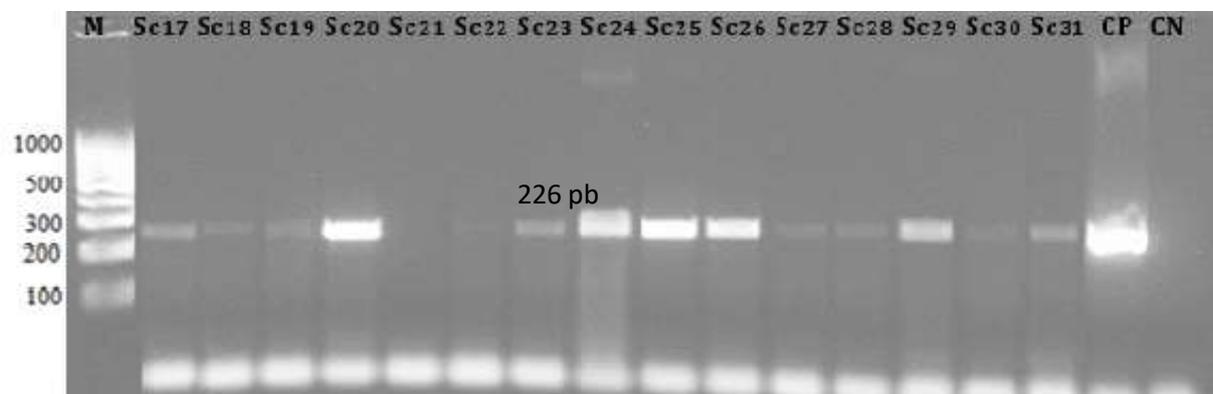


Figure 18 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'invertase de maïs (IVR F / IVR R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, SC17, SC18, SC19, SC20, SC21, SC22, SC23, SC24, SC25, SC26, SC27, SC28, SC29, SC30, SC31, Contrôle Positif, Contrôle Négatif.

Chapitre VI: Résultats et discussion

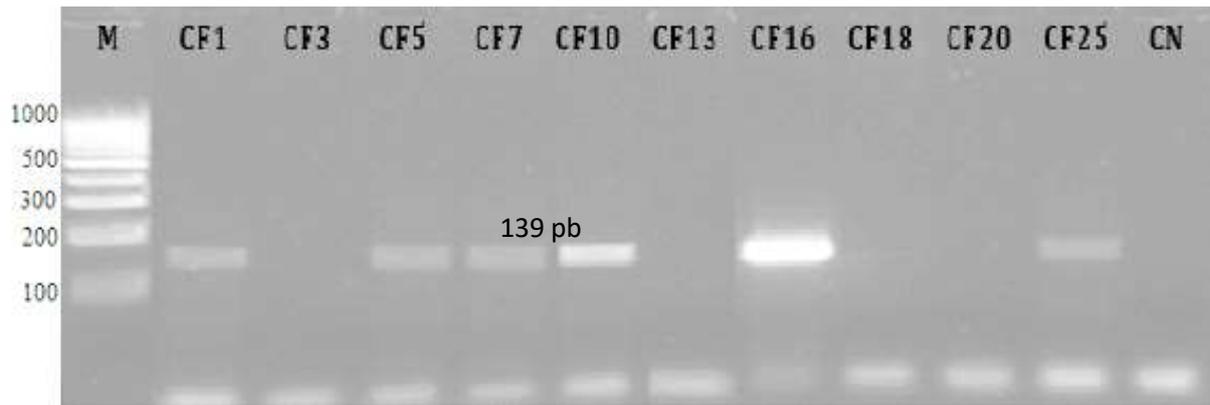


Figure 19 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de La zéine de maïs (Mz F / Mz R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, CF1, CF3, CF5, CF7, CF10, CF13, CF16, CF18, CF20, CF25, Contrôle Négatif.

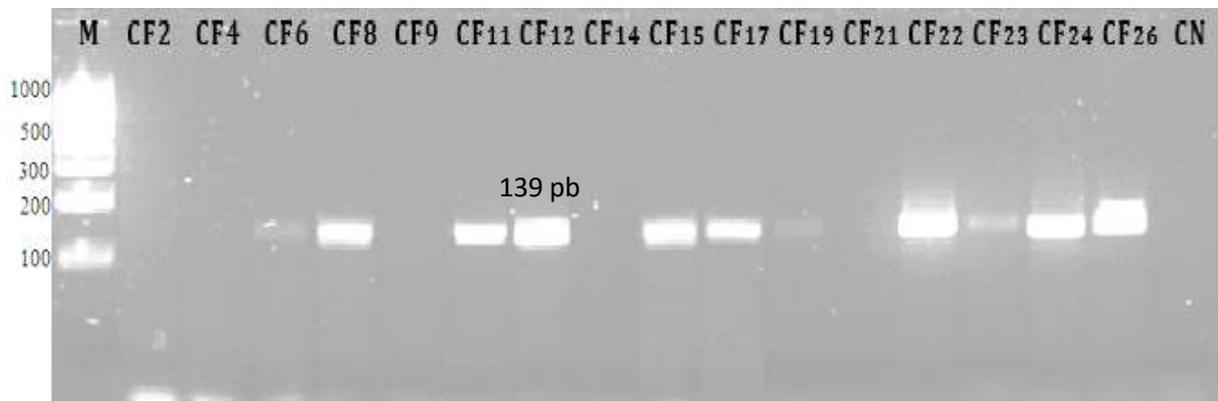


Figure 20 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de La zéine de maïs (Mz F / Mz R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, CF2, CF4, CF6, CF8, CF9, CF11, CF12, CF14, CF15, CF17, CF19, CF21, CF22, CF23, CF24, CF26, Contrôle Négatif.

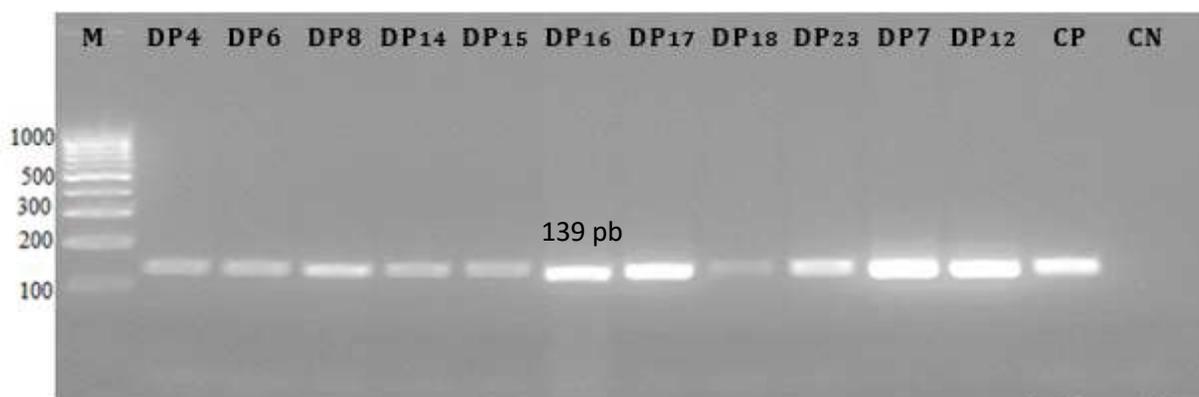


Figure 21 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de La zéine de maïs (Mz F / Mz R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP14, DP15, DP16, DP17, DP18, DP23, DP7, DP12, Contrôle Positif, Contrôle Négatif.

Chapitre VI: Résultats et discussion



Figure 22 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de La zéine de maïs (Mz F / Mz R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : DP13, DP19, DP20, DP21, DP22, DP26, Marqueur moléculaire, DP1, DP2, DP5, DP9, DP10, DP11, DP24, DP25, Contrôle Négatif.

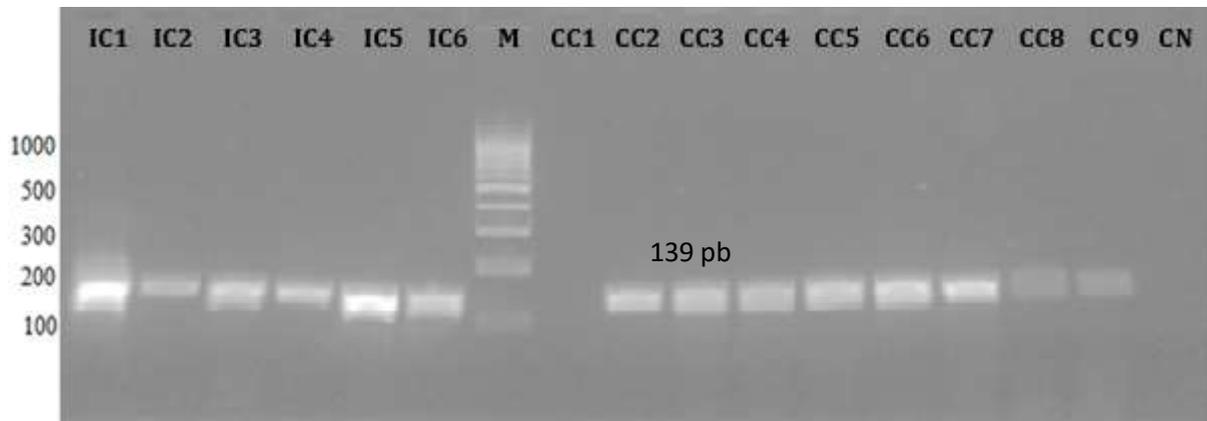


Figure 23: Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de La zéine de maïs (Mz F / Mz R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants: IC1, IC2, IC3, IC4, IC5, IC6, Marqueur moléculaire, M CC1, CC2, CC3, CC4, CC5, CC6, CC7, CC8, CC9, Contrôle Négatif.

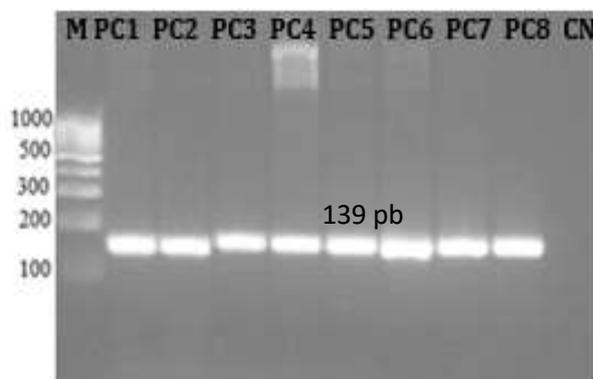


Figure 24 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de la zéine du maïs (Mz-F / Mz-R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, PC7, PC8, Contrôle Négatif.

Chapitre VI: Résultats et discussion

La lecture des profils électrophorétiques représentant les résultats de la PCR spécifique à l'espèce de maïs et durant laquelle 02 gènes endogènes de maïs ont été amplifiés montre que la majorité de nos extraits d'ADN ont été suffisamment intacts pour amplifier le gène endogène à l'espèce de maïs. Malgré cela, dans certains échantillons appartenant principalement au groupe des cornflakes (9 échantillons sur un total de 26) et du maïs doux (5 échantillons sur 31), aucune trace des gènes de maïs n'a pu être détectée suggérant une forte dégradation de l'ADN dans ces échantillons. La difficulté d'obtenir de l'ADN amplifiable à partir de produits de cornflakes a été précédemment signalée par (Fernandes *et al.*, 2014) dans une étude menée sur des produits commercialisés au Portugal où l'amplification des gènes endogènes de maïs a été observée seulement dans 30% des échantillons de cornflakes analysés. De même, Arun *et al.* (2013) ont rencontré le même problème concernant deux échantillons de maïs doux en conserve, sur un total de treize, qui n'ont pas donné d'ADN amplifiable malgré que les Auteurs ont ciblé un amplicon de très petite taille de seulement 68pb. Concernant les chips, un seul échantillon sur neuf n'a pas amplifié le gène endogène de maïs, correspondant à un taux d'amplification d'environ 90%, similaire à celui atteint par Fernandes *et al.* (2014). Concernant les autres groupes d'aliments, des taux d'amplification beaucoup plus élevés ont été observés, atteignant 100 % dans le cas des échantillons de popcorn, des céréales pour bébé, des semoules et farines sans gluten, des biscuits sans gluten et des pâtes et couscous sans gluten (**Tableau 14**)

Chapitre VI: Résultats et discussion

Tableau 14 : Résultats de la PCR qualitative

Articles	Nombre d'échantillons	Gènes endogènes Zéine/ Invertase	Dépistage		Evènements transgéniques du maïs						
			P-35S +	T-NOS+	MON810	Nk603	TC1507	DAS59122	GA21	Bt11	Autres
Maïs doux	30 1*	26	0	0	/	/	/	/	/	/	/
Cornflakes	26	17	2	0	1	1	1	0	0	1	0
Semoules et farines sans gluten	8	8	6	6	6	6	6	1	5	3	0
Pâtes sans gluten	9	9	4	4	4	4	4	0	0	0	0
Cookies et tortillas sans gluten	8	8	3	2	2	1	1	1	1	2	0
Céréales pour bébé	6	6	0	0	/	/	/	/	/	/	/
Chips	9	8	3	2	2	2	1	0	1	0	0
Popcorn	8	8	0	0	/	/	/	/	/	/	/

* : Maïs conserve contenu dans une salade

** : Bt176. MON863 MIR 604. DAS 40278. 3272.

4. Le dépistage P-35S/T-NOS

Le nombre d'organismes génétiquement modifiés (OGM) disponibles dans le commerce et, par conséquent, la diversité des séquences cibles possibles pour les techniques de détection moléculaire ne cessent d'augmenter. L'utilisation d'un dépistage initial de la présence/absence d'espèces candidates et d'éléments communs à plusieurs OGM peut faciliter une discrimination rapide et rentable des échantillons : ceux contenant des OGM et ceux où aucun OGM ne peut être détecté. Par conséquent, Les méthodes de dépistage sont devenues de plus en plus pertinentes pour minimiser l'effort d'analyse et pour effectuer une présélection en vue d'une analyse plus poussée (Dörries *et al.*, 2010 ; Holst-Jensen *et al.*, 2012).

Les tests de dépistage sont spécifiques pour des éléments génétiques largement utilisés comme les promoteurs (par exemple, le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV P-35S)), les terminateurs (par exemple, le terminateur du gène de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (T-NOS)) et les gènes codant pour la résistance aux antibiotiques (par exemple, β -lactamase et néomycine phosphotransférase II). Elles sont les méthodes qui sont les moins spécifiques et elles permettent de donner une réponse de type oui ou non par rapport à la présence du matériel génétique dans un échantillon de produit alimentaire.

Le dépistage représente une étape critique dans l'analyse des OGM, car seuls les échantillons révélés positifs lors de cette procédure sont soumis à une identification et une analyse quantitative plus poussées (Datukishvili *et al.*, 2015).

Les **Figures (25-32)** représentent les résultats relatifs à la détection du promoteur 35S et le terminateur NOS parmi les différents groupes de nos produits.

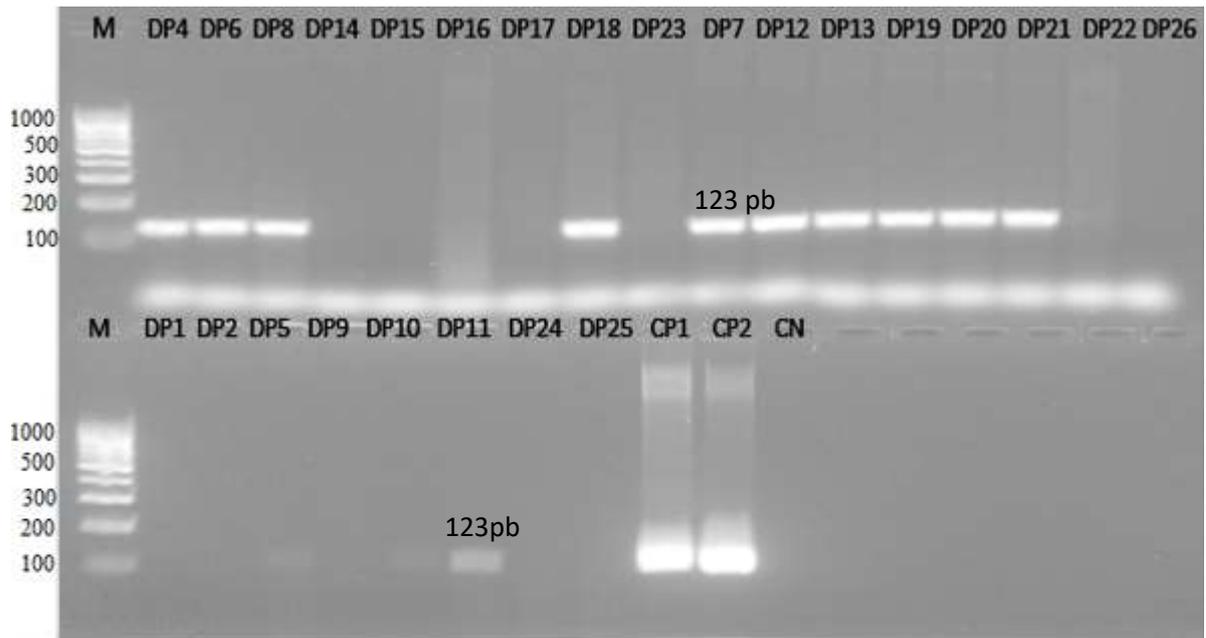


Figure 25 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du promoteur 35S (35S-cf3 / 35S-cr4) à partir des extraits ADN des échantillons suivants :1^{ère} rangée : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP14, DP15, DP16, DP17, DP18, DP23, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP22, DP26/ 2^{ème} rangée : Marqueur moléculaire, DP1, DP2, DP5, DP9, DP10, DP11, DP24, DP25, Contrôle Positif 1 (Bt11, 0.1%), Contrôle Positif 2 (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.

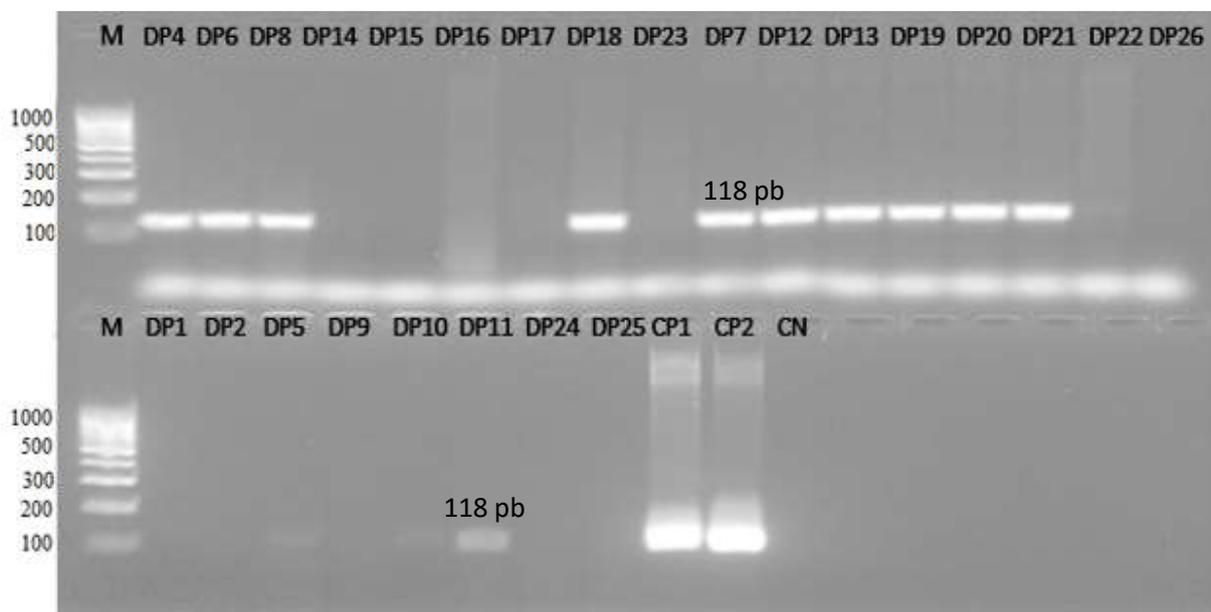


Figure 26 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du terminateur NOS (HA-nos118f / HA-nos118r) à partir des extraits ADN des échantillons suivants :1^{ère} rangée : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP14, DP15, DP16, DP17, DP18, DP23, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP22, DP26/ 2^{ème} rangée : Marqueur moléculaire, DP1, DP2, DP5, DP9, DP10, DP11, DP24, DP25, Contrôle Positif 1 (Bt11, 0.1%), Contrôle Positif 2 (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.

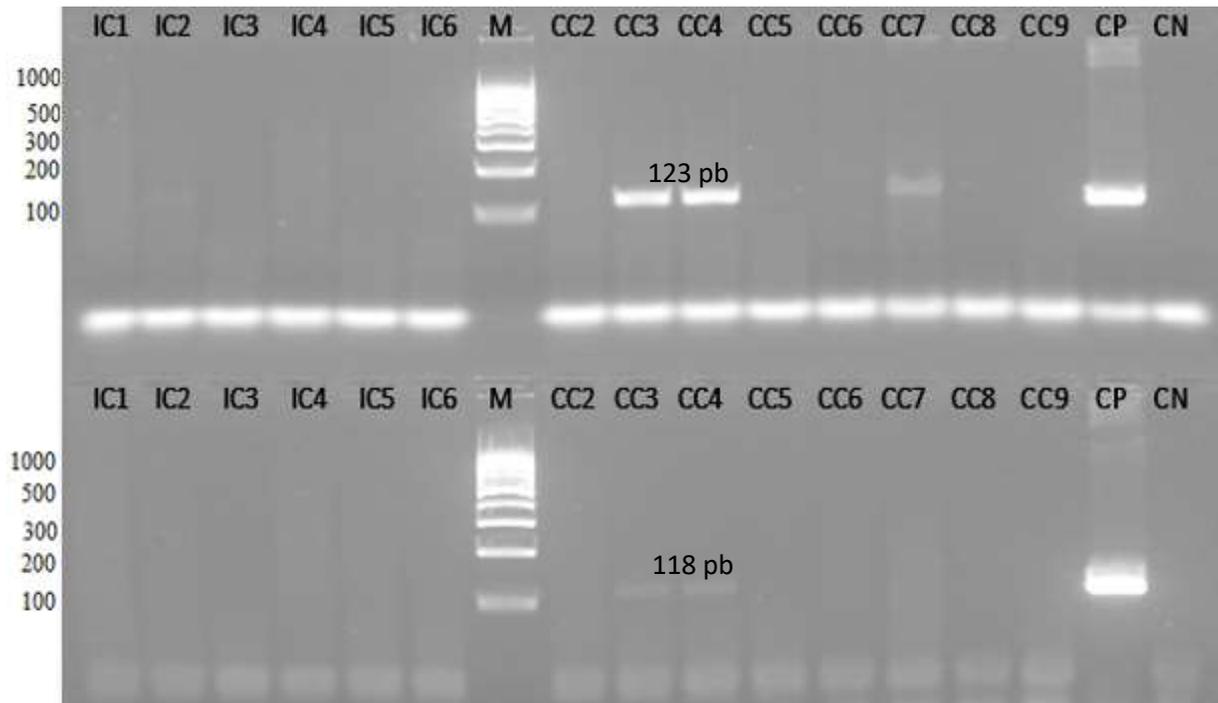


Figure 27 : 1^{ère} rangée : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du promoteur 35S (35S-cf3 / 35S-cr4) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : IC1, IC2, IC3, IC4, IC5, IC6, Marqueur moléculaire, CC2, CC3, CC4, CC5, CC6, CC7, CC8, CC9, Contrôle Positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif / 2^{ème} rangée : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du terminateur NOS (HA-nos118f / HA-nos118r) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : IC1, IC2, IC3, IC4, IC5, IC6, Marqueur moléculaire, CC2, CC3, CC4, CC5, CC6, CC7, CC8, CC9, Contrôle Positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.

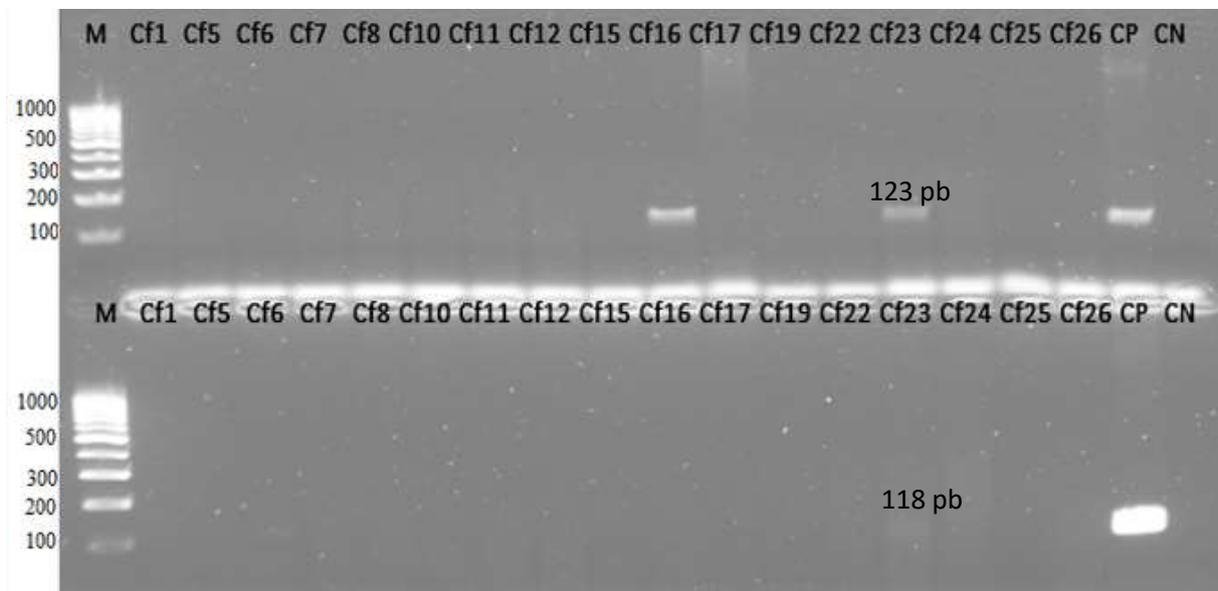


Figure 28 : 1^{ère} rangée : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du promoteur 35S (35S-cf3 / 35S-cr4) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, Cf1, Cf5, Cf6, Cf7, Cf8, Cf10, Cf11, Cf12, Cf15, Cf16, Cf17, Cf19, Cf22, Cf23, Cf24, Cf25, Cf26, Contrôle Positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif / 2^{ème} rangée : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du terminateur NOS (HA-nos118f / HA-nos118r) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, Cf1, Cf5, Cf6, Cf7, Cf8, Cf10, Cf11, Cf12, Cf15, Cf16, Cf17, Cf19, Cf22, Cf23, Cf24, Cf25, Cf26, Contrôle Positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.

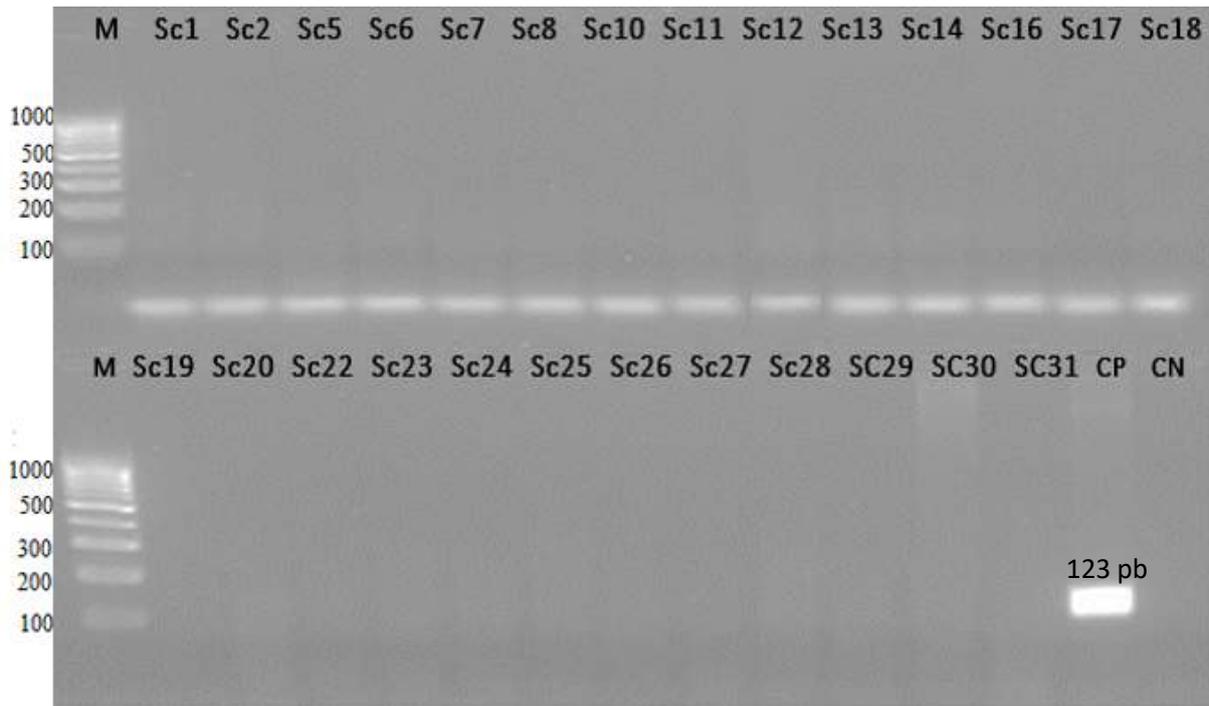


Figure 29 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du promoteur 35S (35S-cf3 / 35S-cr4) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : 1^{ère} rangée : Marqueur moléculaire, SC1, SC2, SC5, SC6, SC7, SC8, SC10, SC11, SC12, SC13, SC14, SC16, SC17, SC18 / 2^{ème} rangée : Marqueur moléculaire, SC19, SC20, SC22, SC23, SC24, SC25, SC26, SC27, SC28, SC29, SC30, SC31, Contrôle positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.

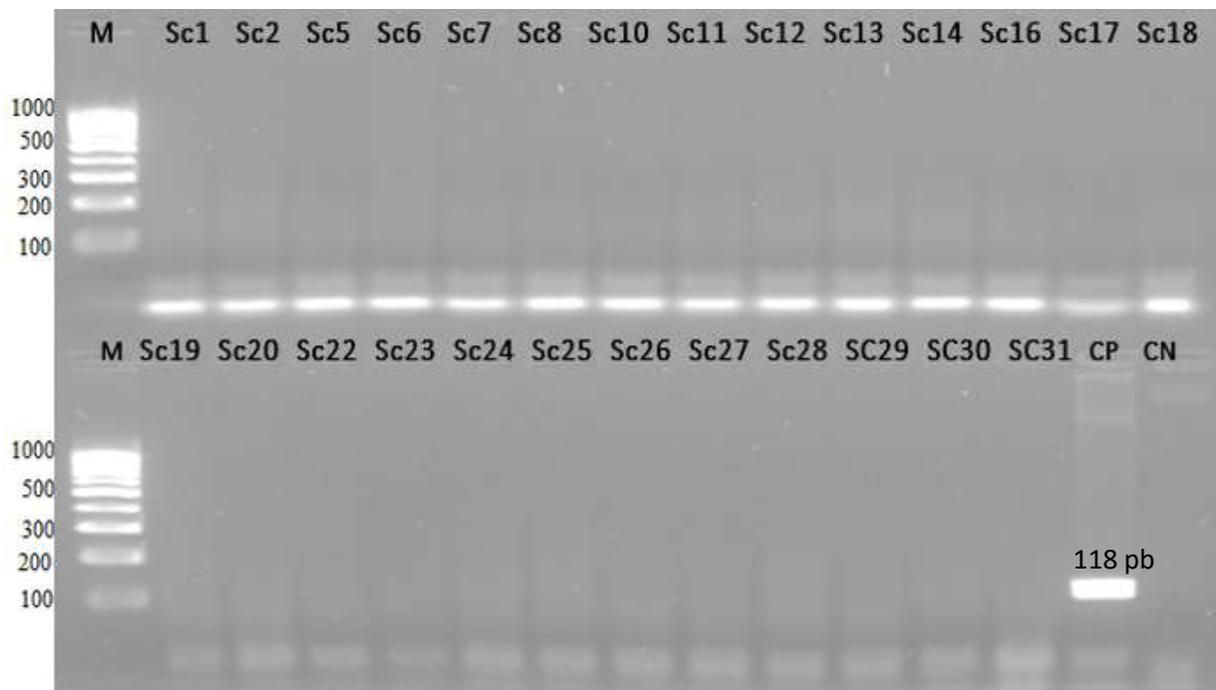


Figure 30 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du terminateur NOS (HA-nos118f / HA-nos118r) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : 1^{ère} rangée : Marqueur moléculaire, SC1, SC2, SC5, SC6, SC7, SC8, SC10, SC11, SC12, SC13, SC14, SC16, SC17, SC18 / 2^{ème} rangée : Marqueur moléculaire, SC19, SC20, SC22, SC23, SC24, SC25, SC26, SC27, SC28, SC29, SC30, SC31, Contrôle positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.

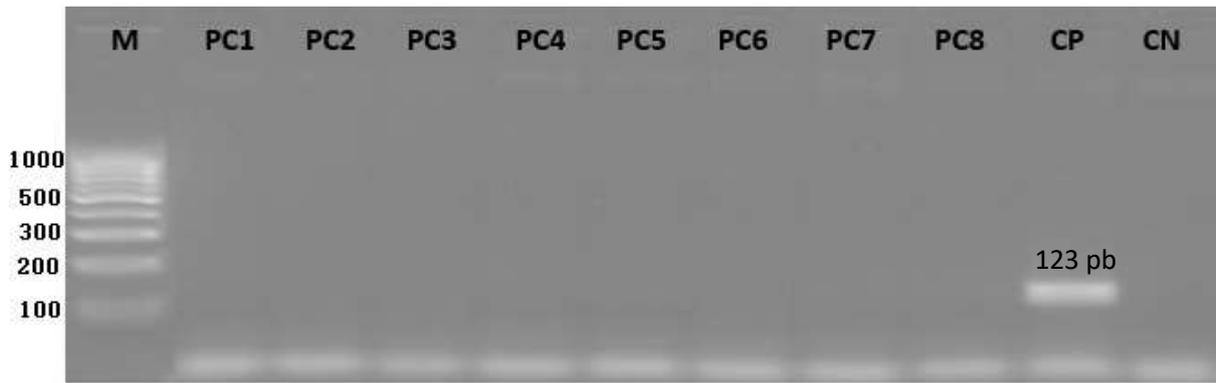


Figure 31 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du promoteur 35S à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, PC7, PC8, Contrôle positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.

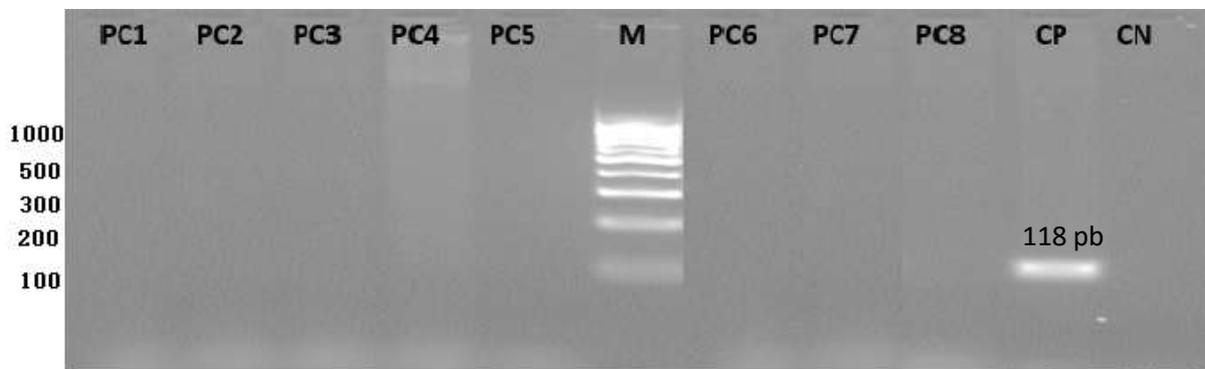


Figure 32 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification du terminateur NOS (HA-nos118f / HA-nos118r) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : Marqueur moléculaire, PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, PC7, PC8, Contrôle positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.

La détection dans un échantillon d'au moins un élément de dépistage parmi le promoteur 35S et le terminateur NOS, indique la présence du matériel d'origine GM dans l'échantillon et peut donc être classé comme positif aux OGM. A ce niveau de notre travail, nous avons pu détecter le promoteur 35S dans 18 échantillons, à partir desquels 15 ont également amplifié le terminateur NOS, représentant 20% du total des échantillons amplifiables (**Tableau 14**). Ce taux est similaire à celui de Rabiei *et al.* (2013) qui, dans une étude ciblant des produits commercialisés sur le marché iranien, ont détecté la présence du promoteur 35S dans 5 produits transformés à base de maïs sur un total de 25 analysés. De même, le rapport sur la surveillance des aliments génétiquement modifiés sur le marché alimentaire tchèque a révélé que 21.9% des produits de maïs (farines) étaient positifs à la présence d'éléments génétiques de criblage. Notre taux se rapproche également de celui déclaré par Fernandes *et al.* (2014) qui ont détecté le promoteur 35S et/ou le terminateur NOS dans 25% des produits à base de maïs commercialisés au Portugal. En revanche, Dans l'étude réalisée par Arun *et al.* (2013) et qui

Chapitre VI: Résultats et discussion

avait pour but de détecter du matériel GM dans des produits à base de maïs et de soja, le taux des échantillons à base de maïs positifs au matériel GM était plus élevé que le nôtre et a atteint 32%. D'autres études ont dévoilé des valeurs beaucoup plus importantes comme dans le cas d'une étude menée en Malaisie où on a signalé que sur les 20 échantillons de maïs non étiquetés testés, 13 (65%) étaient positifs pour le matériel génétiquement modifié (Kaur *et al.*, 2010) et le cas d'une autre étude sur le marché iranien (Safaei *et al.*, 2020) où on a trouvé que 60% et 47% des produits de maïs ont été positifs pour le P-35S et le T-NOS, respectivement. D'autres rapports ont indiqué des valeurs plus faibles. Par exemple, Abdel-Mawgood *et al.* (2010) dans une étude sur le marché saoudien ont déclaré que seulement 3 sur 50 produits dérivés de maïs ont été positifs au criblage.

Une multitude d'autres rapports sont disponibles dans la littérature concernant la détection des OGM, mais ils ne décrivent pas la détection du maïs transgénique ou sont uniquement axés sur les échantillons destinés aux animaux.

Comme nous l'avons remarqué, certains échantillons ont été révélés positifs au promoteur 35S et le terminateur NOS ensemble, alors que d'autres n'ont amplifié que le promoteur 35S. La détection dans un échantillon du promoteur 35S sans le terminateur NOS peut être attribuée à l'identité des événements insérés car il existe beaucoup d'événements GM avec un seul élément de contrôle comme dans le cas de l'évènement MON810 qui contient dans sa cassette le promoteur 35S mais non pas le terminateur NOS, ou en raison de la moindre sensibilité du terminateur NOS. (Lipp *et al.* 1999), dans une étude inter-laboratoires, ont signalé que la détection du terminateur NOS était moins sensible que la détection du promoteur 35S, et que certains résultats faussement négatifs ont été donc rapportés. La comparaison des profils électrophorétiques de nos amplifiats issus de la PCR 35S et NOS, concordent avec le résultat de cette étude car les bandes observées pour la PCR NOS sont beaucoup moins foncées que celles de la PCR 35S pour un même échantillon.

Un autre point important qui pourrait être derrière la détection du promoteur 35S sans le terminateur NOS est que le Promoteur 35S dérive du virus de la mosaïque du chou-fleur ce qui signifie que les plantes de la famille des crucifères comme (chou-fleur, choux, brocolis, colza, moutarde et autres plantes crucifères) peuvent être infectées. Ainsi, un résultat positif pour le P-35S dans des aliments transformés contenant ces légumes dans leur formulation ne confirmera pas la présence d'un matériel génétiquement modifié, mais indiquera une probabilité (Arun *et al.*, 2013).

Chapitre VI: Résultats et discussion

De façon générale, Un criblage du promoteur 35S du CaMV seul n'est pas suffisant pour confirmer la présence d'OGM et la procédure préconise, en plus du promoteur 35S, l'amplification du terminateur NOS pour confirmer la présence du transgène régulé par le P-35S et non pas la présence du CaMV. Wu et al. (2014) déclare que les analyses statistiques préliminaires effectuées sur la présence de P35S et de TNOS dans les cultures GM ont révélé que 65,7% des événements GM commerciaux approuvés contiennent le promoteur P35S et 53,49% contiennent le terminateur NOS tandis que 81,4 contiennent l'un ou les deux dans leurs constructions transgéniques. L'auteur confirme également que, dans les cultures transgéniques commercialement importantes (maïs, soja....etc.), le pourcentage de présence de ces deux composants est plus élevé. De plus, Certains événements transgéniques, tels que le maïs GM Bt11, T25 et le coton GM Mon531 contenaient deux copies de P35S dans leurs constructions de transformation. Par conséquent, le promoteur P35S et le terminateur NOS sont les cibles de criblage d'OGM les plus largement utilisées.

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(nptii) et le gène de la b-lactamase).

La distribution des résultats positifs à l'étape de dépistage parmi nos échantillons , révèle que le nombre le plus important de produits contenant du matériel GM a été enregistré dans le groupe des produits sans gluten où on a détecté la présence du matériel GM dans 13 échantillons sur 25 échantillons amplifiables représentant ce groupe (environ 50%). Il s'agit des produits suivants : le couscous Réginat diététique, le macaroni Nid d'or, le couscous de maïs Maison lahlou, les Pâtes sans gluten Chakhchoukha Miny maïs, la semoule de maïs Manseur, la semoule de maïs sans gluten ElAssil, la semoule de maïs BioAglut, la semoule de maïs Meunerie Diafi, la corn semolina Ryam, la semoule de maïs Dalal, les cookies Réginat diététique, les tortitas de maíz Gullón, les biscuits Vida. Les 5 autres produits positifs au matériel GM consistent en 3 échantillons de chips (Master chips goût fromage cheddar, Master chips goût Nacho cheese, Mahboul Fritos) et 2 échantillons de corneflakes (Bolitas galleta Esgir, Boules au miel Ceregral).

Il est également à signaler que Parmi les dix-huit échantillons positifs pour les OGM, seuls deux échantillons (l'échantillon de corneflakes Bolitas galleta Esgir et les tortitas de maíz Gullón) ont été importés comme produits alimentaires finis de pays européens, tandis que tous

Chapitre VI: Résultats et discussion

les autres échantillons positifs, représentés par différents produits comme le couscous, la semoule, les biscuits et les pâtes, ont été transformés localement.

les produits alimentaire sans gluten (gluten-free products) sont des produits destinés à des personnes atteintes de la maladie cœliaque qui est une entéropathie auto-immune se produisant chez des individus génétiquement prédisposés qui développent une réaction immunitaire au gluten alimentaire, présent dans les céréales, notamment le blé, le seigle et l'orge. La maladie affecte principalement l'intestin grêle ; toutefois, les manifestations cliniques sont larges, avec des symptômes intestinaux et extra-intestinaux (Lebwohl *et al.*, 2018).

Le traitement de la maladie cœliaque repose sur une stricte adhésion à un régime sans gluten tout au long de la vie. Le régime sans gluten est la thérapie documentée pour la maladie cœliaque depuis juste après la seconde guerre mondiale. Il reste l'un des très rares traitements causals en médecine, avec d'excellents résultats dans l'ensemble. L'expression "régime sans gluten" désigne un régime alimentaire dépourvu de peptides de gluten . En pratique, cela signifie qu'il faut éviter toute nourriture à base de ou contenant du blé, du seigle, de l'orge et tous les croisements de ces céréales. Les variétés de blé primitives telles que le kamut, l'engrain et d'autres peuvent être moins toxiques pour les patients atteints de maladie cœliaque, mais cela n'a pas été démontré de manière convaincante lors d'essais appropriés. L'épeautre est une variété de blé que beaucoup croient être un blé "primitif", mais ce n'est pas vrai car il contient de nombreuses séquences peptidiques toxiques et doit donc être évité par les patients. Comme le blé est à la base de la plupart des aliments à base de céréales, y compris le pain, les pâtes, les pâtisseries et de nombreux en-cas, et qu'il est souvent utilisé comme épaississant pour les sauces et les sauces de fruit et comme additif pour stabiliser, aromatiser et d'autres fonctions, il est très difficile de l'éviter complètement. Le maïs représente l'alternative du blé et occupe une place très importante dans les régimes sans gluten (Lindfors *et al.*, 2019).

5. Détection spécifique aux évènements transgéniques :

Un résultat positif au cours du processus de dépistage indique la présence d'une modification génétique dans un aliment sans toutefois permettre la révélation des caractéristiques et le type d'éléments transgéniques insérés. De plus, cela ne révélerait pas le degré de modification et le pourcentage d'ADN génétiquement modifié dans un échantillon alimentaire. Par conséquent, dans les échantillons d'aliments positifs pour les OGM, des enquêtes détaillées doivent être effectuées pour comprendre la nature des évènements transgéniques présents dans les aliments testés (Conceição *et al.*, 2006 ; Al-Salameen *et al.*, 2012). Ainsi, chaque échantillon parmi nos produits qui a été positif pour au moins un élément de dépistage a été analysé pour identifier le ou les évènements transgéniques insérés.

Comme il a été mentionné dans la section Matériel et Méthodes, les évènements ciblés au cours de ce travail ont été en nombre de 11 évènements transgéniques et les profils électrophorétiques relatifs aux différentes PCR ciblant ces différents évènements sont représentés dans les **Figures (33- 45)**.

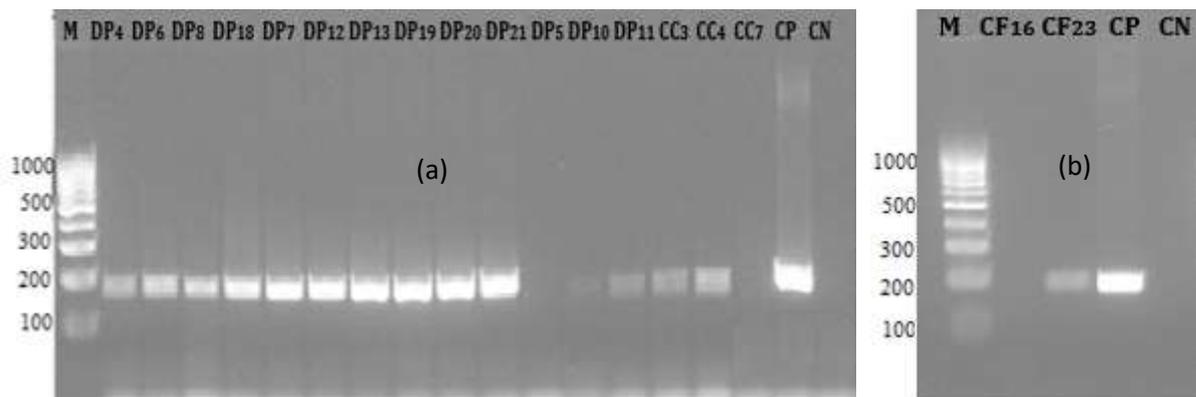


Figure 33 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique MON810 (VW01 / VW03) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (MON810 /2%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (MON810, 2%), Contrôle Négatif.

Chapitre VI: Résultats et discussion

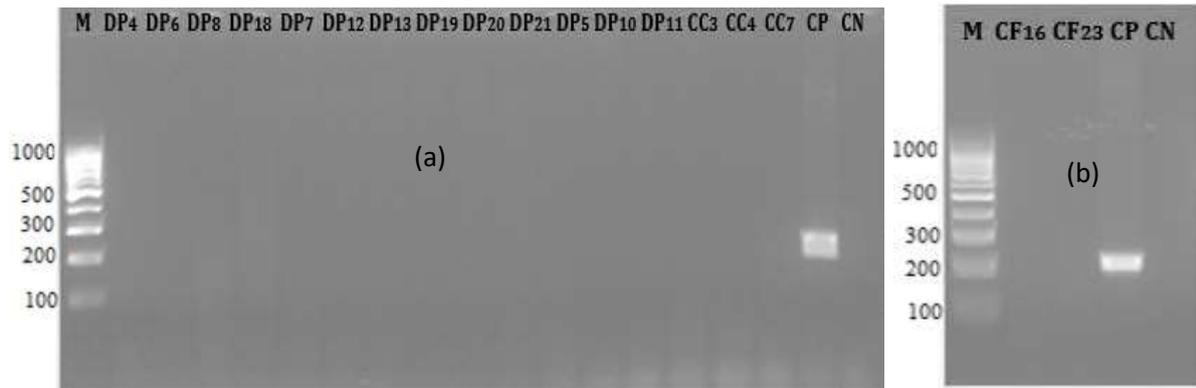


Figure 34 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique MON863 (P863-3F/ P863-4R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (MON863, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (MON863, 1%), Contrôle Négatif.

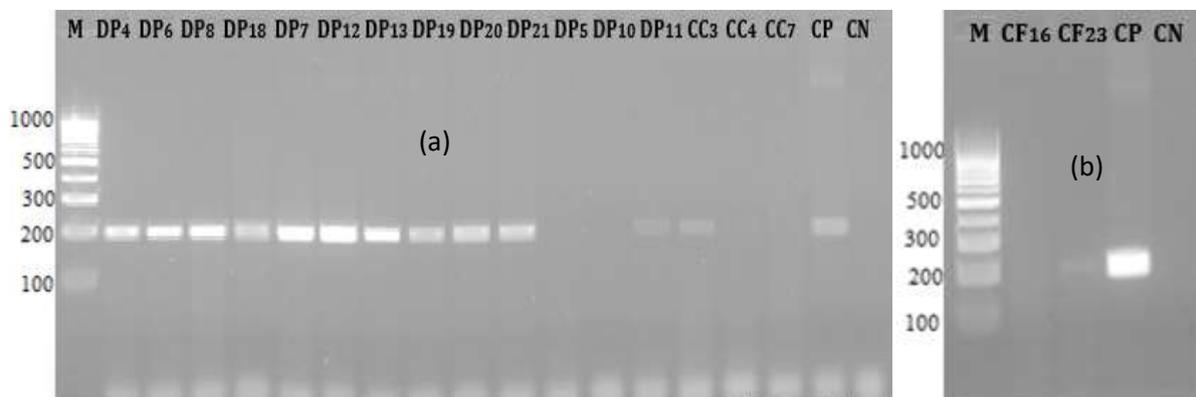


Figure 35 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique TC1507(TC-F/ TC-R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (TC1507, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (TC1507, 1%), Contrôle Négatif.

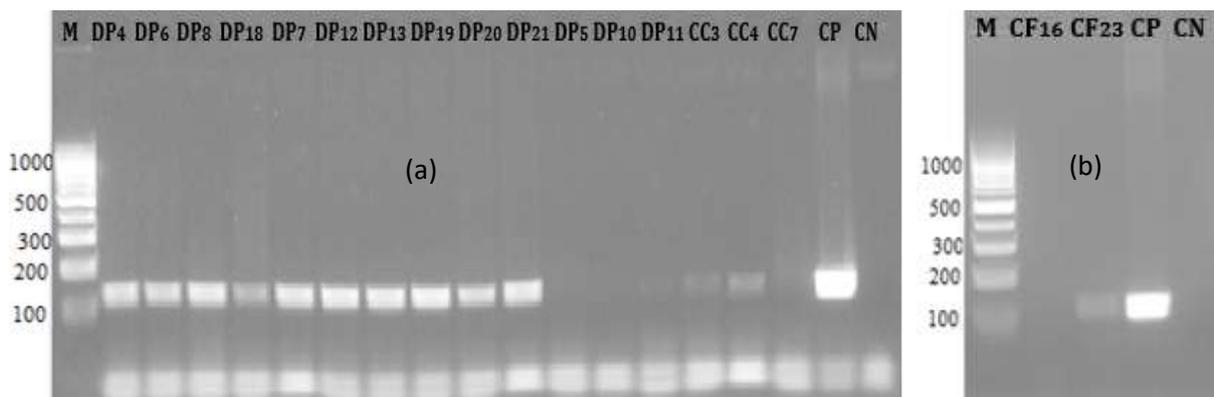


Figure 36 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique NK603(NK-F/ NK-R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (NK603, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (NK603/1%), Contrôle Négatif.

Chapitre VI: Résultats et discussion

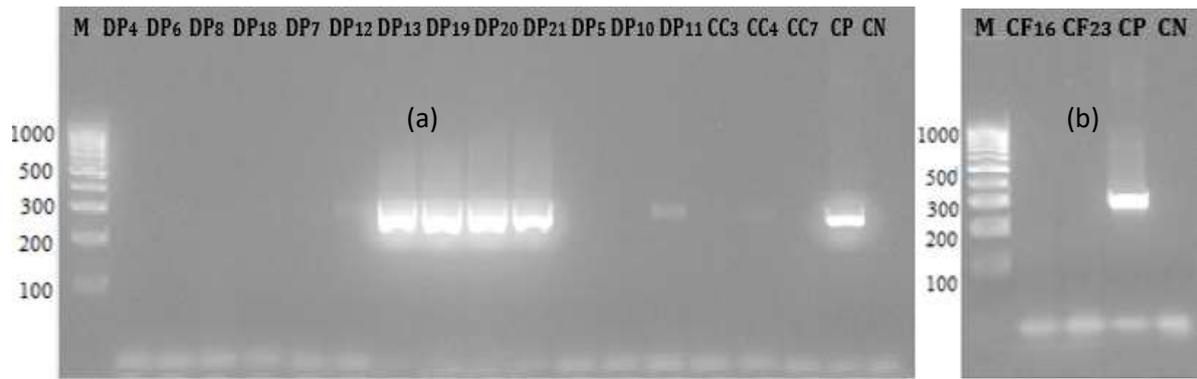


Figure 37 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique GA21(GA-F/ GA-R) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (GA21, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (GA21, 1%), Contrôle Négatif.

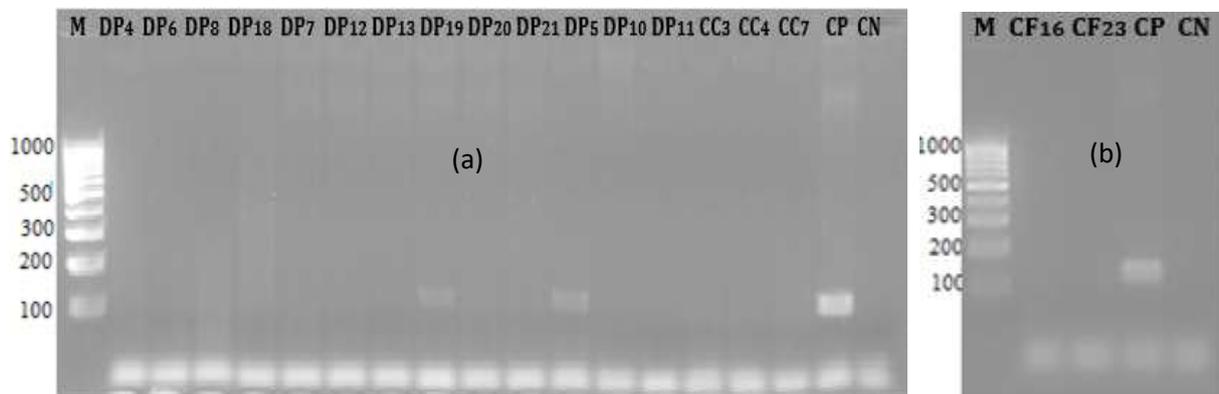


Figure 38 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique DAS59122 (DAS-AF/ DAS-AR) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (DAS59122, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (DAS59122, 1%), Contrôle Négatif.

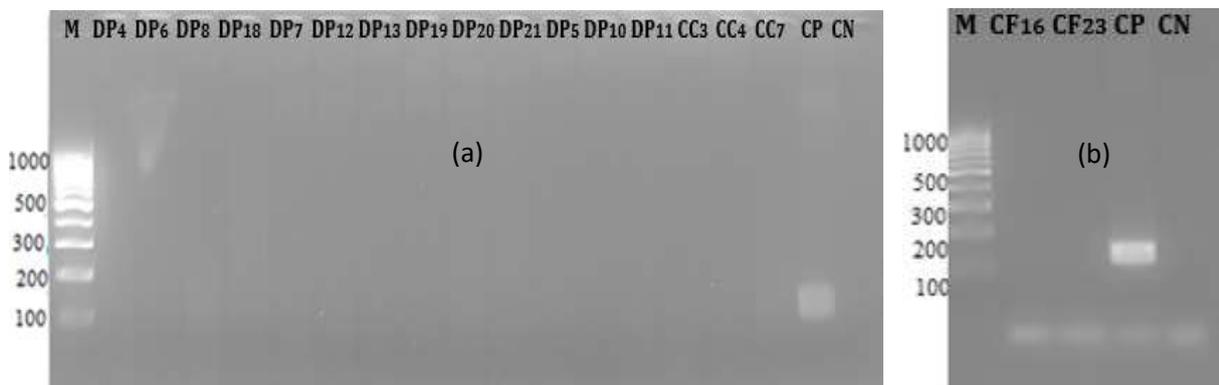


Figure 39 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique MIR604 (MIR604-AF/ MIR604-AR) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (MIR604, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (MIR604, 1%), Contrôle Négatif.

Chapitre VI: Résultats et discussion

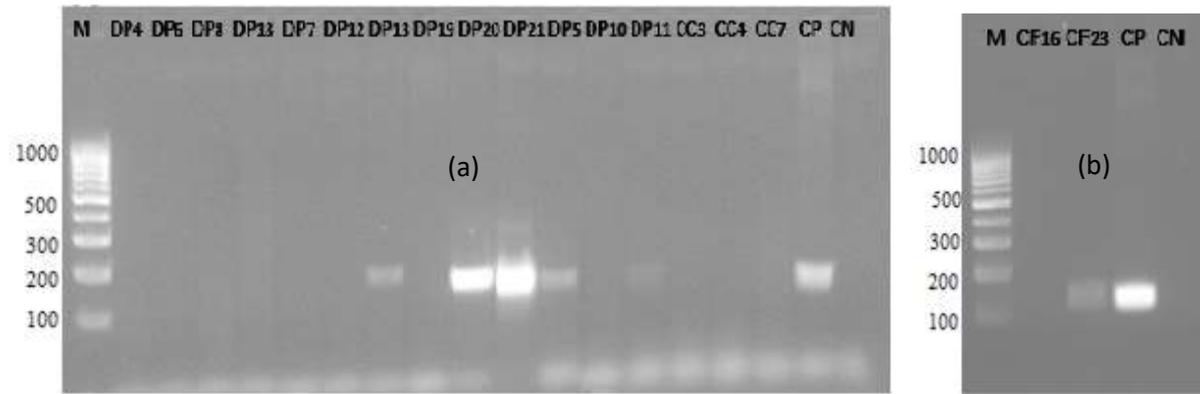


Figure 40 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique Bt11 (Bt11 3-5' / Bt11 3-3') à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (Bt11, 1%), Contrôle Négatif.



Figure 41 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique Bt176 (cry03/ cry04) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4, CC7, Contrôle Positif (Bt176, 1%), Contrôle Négatif. (b) : Marqueur moléculaire, CF16, CF23, Contrôle Positif (Bt176, 1%), Contrôle Négatif.

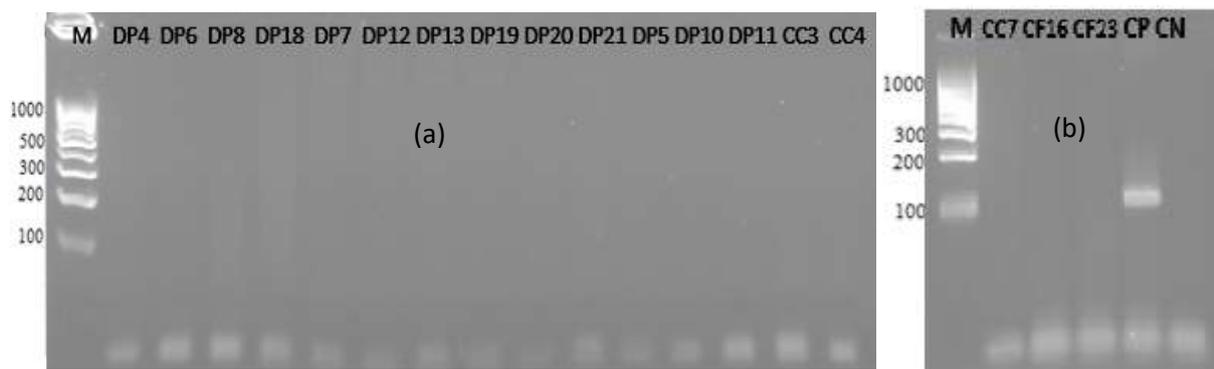


Figure 42 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique 3272 (3272-F/ 3272-R1) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : (a) : Marqueur moléculaire, DP4, DP6, DP8, DP18, DP7, DP12, DP13, DP19, DP20, DP21, DP5, DP10, DP11, CC3, CC4. (b) : Marqueur moléculaire, CC7, CF16, CF23, Contrôle Positif (3272, 1%), Contrôle Négatif.

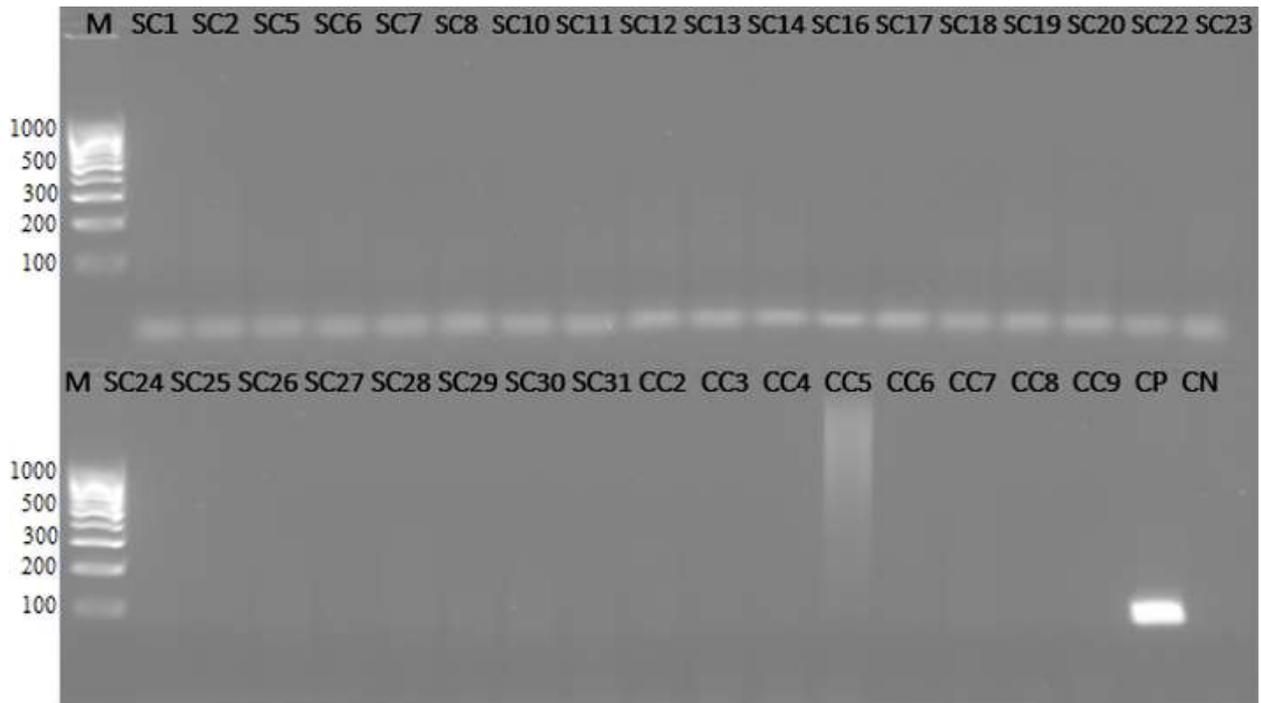


Figure 43 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique DAS40278 (DAS40-F1/ DAS40-R3) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : 1^{ère} rangée : Marqueur moléculaire, SC1, SC2, SC5 SC6, SC7, SC8, SC10, SC11, SC12, SC13 SC14, SC16, SC17, SC18, SC19, SC20, SC22, SC23/ 2^{ème} rangée : Marqueur moléculaire, SC24, SC25, SC26, SC27, SC28, SC29, SC30, SC31, CC2, CC3,CC4, CC5, CC6, CC7, CC8, CC9, Contrôle Positif (DAS40278, 1%), Contrôle Négatif.

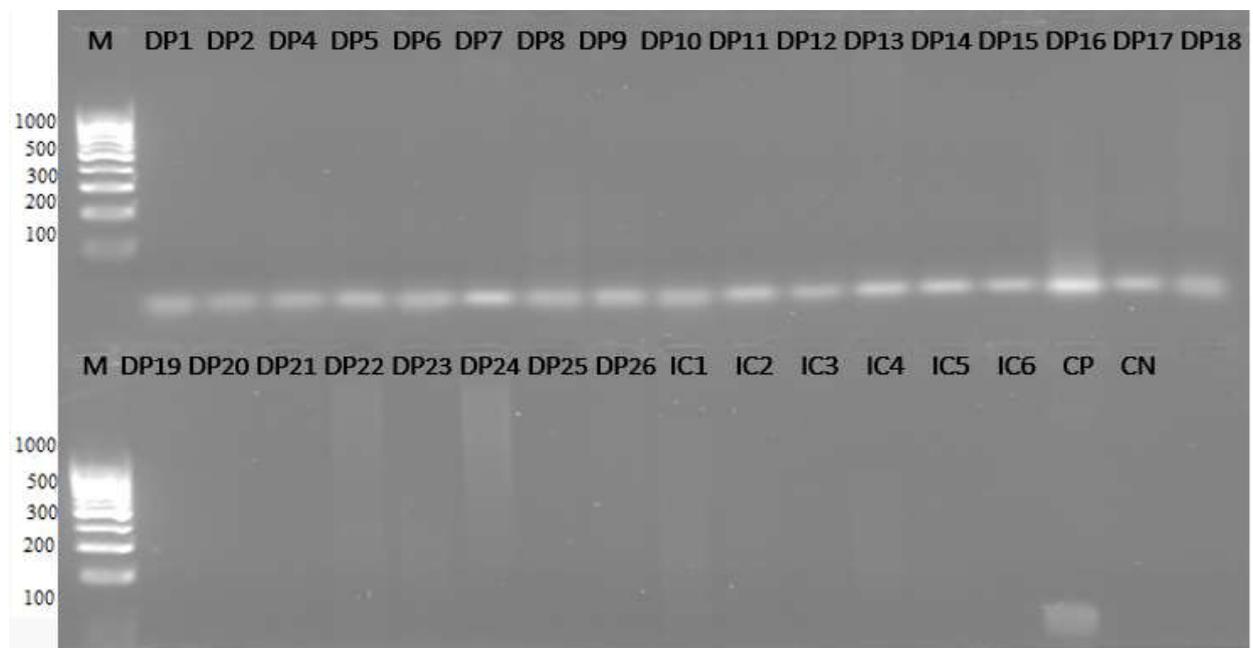


Figure 44 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification DE l'évènement transgénique DAS40278 (DAS40-F1/ DAS40-R3) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : 1^{ère} rangée : Marqueur moléculaire, DP1, DP2, DP4, DP5, DP6, DP7, DP8, DP9, DP10, DP11, DP12, DP13, DP14, DP15, DP16, DP17, DP18 / 2^{ème} rangée : Marqueur moléculaire, DP19, DP20, DP21, DP22, DP23, DP24, DP25, DP26, IC1, IC2, IC3, IC4, IC5, IC6, Contrôle Positif (DAS40278, 1%), Contrôle Négatif.

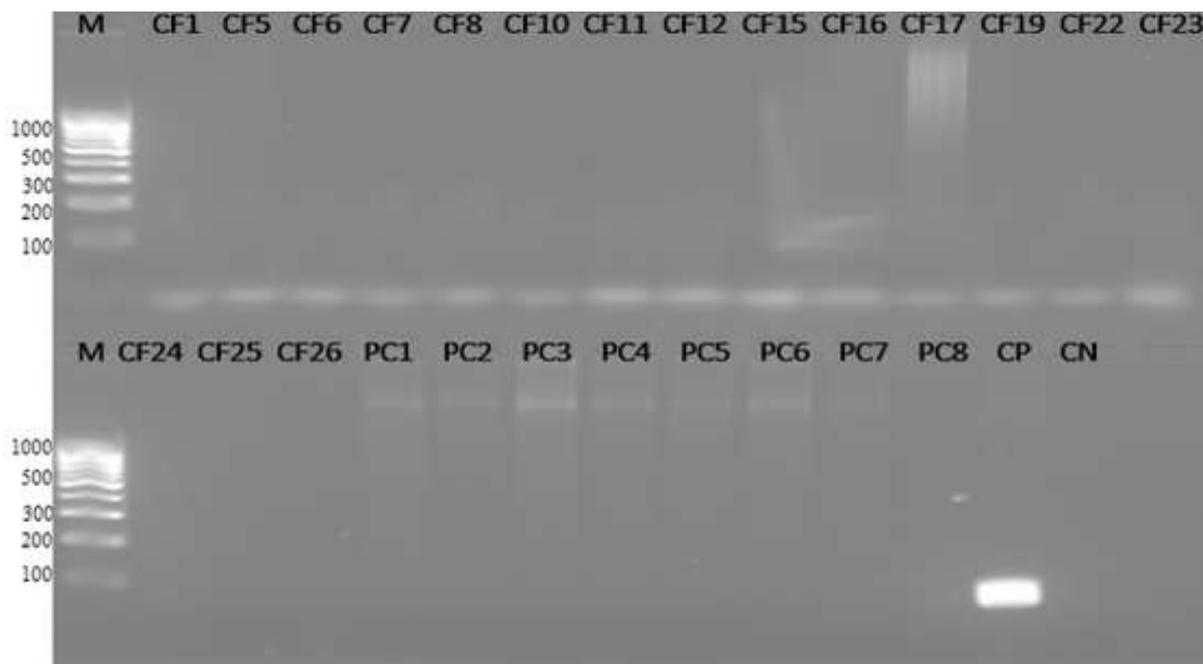


Figure 45 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR résultant de l'amplification de l'évènement transgénique DAS40278 (DAS40-F1/ DAS40-R3) à partir des extraits ADN des échantillons suivants : 1^{ère} rangée : Marqueur moléculaire, CF1, CF5, CF6, CF7, CF8, CF10, CF11, CF12, CF15, CF16, CF17, CF19, CF22, CF23 / 2^{ème} rangée : Marqueur moléculaire, CF24, CF25, CF26, PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, PC7, PC8, Contrôle Positif (DAS40278, 1%), Contrôle Négatif.

Les résultats des réactions PCR spécifiques aux évènements transgéniques ont révélé que sur les 11 évènements que nous avons ciblé dans ce travail et qui consistaient en: Bt176, Bt11, GA 21, Nk603, Mon 810, Mon863, TC 1507, MIR 604, DAS59122, DAS-40278-9 et 3272 , 06 évènements, à savoir MON810, NK603, GA21, TC1507, Bt11 et DAS5912, ont été détectés dans 16 échantillons positifs pour les OGM, tandis que 02 échantillons n'ont donné aucun signal pour les évènements testés. Les évènements MON810, NK603 et TC1507 sont les plus fréquemment identifiés, avec respectivement 15, 14 et 13 échantillons positifs, suivis par GA21 et Bt11 identifiés dans 07 et 06 échantillons, respectivement. Le DAS59122 a été identifié dans deux échantillons, tandis que le MON863, le Bt176, le MIR604, le 3272 et le DAS40278 n'ont été détectés dans aucun des échantillons (**Tableau 14**).

Sur 7 échantillons de semoule, 6 ont été positifs au matériel génétiquement modifié avec un taux de prévalence d'OGM le plus élevé parmi nos échantillons. En outre, et Étonnamment, dans ces 6 produits de semoule, 3 à 5 évènements transgéniques différents ont été identifiés dans chaque échantillon. Les échantillons de pâtes se sont également révélés contenir un nombre élevé d'évènements identifiés, avec 4 échantillons sur 9 positifs pour les évènements MON810, NK603 et TC1507, tous ensemble dans chaque échantillon. Les groupes de produits

Chapitre VI: Résultats et discussion

alimentaires composés de cookies, biscuits et tortillas et de chips ont montré des incidences d'OGM presque similaires, avec 3 échantillons sur 8 et 3 échantillons sur 9 étant positifs à au moins un événement, respectivement. Concernant les échantillons de cornflakes, un seul échantillon a été confirmé positif avec 4 événements identifiés (MON810, NK603, TC1507 et Bt11), tandis qu'un autre échantillon positif au dépistage P-35S n'a pas réussi à amplifier l'un des événements ciblés. Dans les groupes de céréales pour bébés et de popcorn ainsi que les produits de maïs doux, les échantillons ont montré des résultats négatifs dès l'étape de dépistage par le promoteur 35S et le terminateur NOS.

Le maïs Mon810 commercialisé sous le nom YieldGard® MON810 et qui représente l'évènement le plus présent dans nos produits alimentaires à raison de 15 échantillons sur 18, est une lignée de maïs Bt développée par la firme américaine Monsanto par la technique de bombardement de microprojectiles. Il exprime la protéine Cry1Ab, dérivée de *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki, qui lui confère une protection contre la prédation par certains insectes nuisibles de l'ordre des lépidoptères, notamment la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) et la sésamie rose (*Sesamia spp.*) (BCH-CDB, 2021(a)).

Des études moléculaires ont démontré qu'une seule copie tronquée de la séquence codante de Cry1Ab était intégrée dans le génome du maïs avec le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur amélioré (P-e35S) (P-e35S est une séquence longue de 0,61Kb de longueur contenant le promoteur et le leader de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) contenant la région d'amplification dupliquée. Cette modification a été apportée pour renforcer l'activité de ce promoteur dans les plantes) et l'intron hsp 70 (I-Hsp70). Le terminateur nos n'a pas été intégré dans MON810 en raison d'une troncation de l'extrémité 3' de la cassette de gènes. L'analyse de western blot a confirmé qu'une protéine Cry1Ab tronquée d'environ 91 kD (la Cry1Ab native avait un poids moléculaire d'environ 131 kD) a été insérée dans le génome (BCH-CDB, 2021(a)).

La culture du maïs MON810 est autorisée dans les pays suivants : Afrique du Sud, Argentine, Brésil, Canada, Chili, Colombie, Égypte, Honduras, Japon, Paraguay, Philippines, Union européenne (toutefois dans l'Union européenne, chaque État-membre doit également donner son accord), Uruguay. Tous ces pays, à l'exception de l'Afrique du Sud, du Chili et de l'Égypte, autorisent également son utilisation et sa transformation dans les domaines de l'alimentation humaine et animale. En outre, les pays suivants : Australie, Mexique, Nouvelle-Zélande et

Chapitre VI: Résultats et discussion

Taïwan, bien qu'ils n'en autorisent pas la culture, autorisent son utilisation en alimentation humaine, tandis que la Turquie l'autorise uniquement pour l'alimentation des animaux.

NK603 est également l'une des variétés de maïs de Monsanto commercialisée sous le nom Roundup Ready™ 2 Maize. La ligne de maïs NK603 a été développée pour permettre l'utilisation du glyphosate, le principe actif de l'herbicide Roundup®, comme option de lutte contre les mauvaises herbes (BCH-CDB, 2021(b)).

Le maïs NK603 contient deux cassettes d'expression adjacentes du gène CP4 EPSPS codant pour une forme de l'enzyme végétale 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) qui permet à la plante de survivre à l'application de glyphosate, autrement mortelle. Dans la première cassette d'expression (extrémité 5'), le gène CP4 EPSPS (souche CP4 d'*Agrobacterium tumefaciens*) est sous la régulation du promoteur de l'actine du riz (P-Ract1) et de l'intron de l'actine du riz (I-Ract1). La deuxième cassette, qui est fusionnée à l'extrémité 3' de la première, est constituée du gène CP4 EPSPS régulé par le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur amélioré (e35S) et l'intron de la protéine 70 du choc thermique du maïs (HSP70). Les deux cassettes d'expression incorporent la région 3' non traduite du gène de la nopaline synthase (nos 3') pour la polyadénylation du signal (BCH-CDB, 2021(b)).

Le maïs NK603 est autorisé dans plusieurs pays, notamment aux États-Unis, où il est cultivé depuis l'an 2000, au Canada, au Brésil, en Argentine, au Japon, en Uruguay, en Afrique du Sud. Il est également autorisé à transformation et la consommation animale et humaine dans plusieurs autres pays dont le Nigeria depuis 2019. Dans l'Union européenne, le NK603 est autorisé à l'importation et à la transformation ainsi qu'à la consommation animale, depuis 2004, et humaine, depuis 2005, mais pas à la culture.

Tout comme le maïs NK603, La lignée de maïs GA21, du nom commercial Roundup Ready™ Maize, Agrisure™GT, a été conçue pour tolérer les herbicides contenant du glyphosate. Le gène EPSPS du maïs endogène isolé a été modifié par mutagenèse dirigée, de sorte que son enzyme codée soit insensible à l'inactivation par le glyphosate, et inséré dans la variété de maïs AT consanguine. La lignée de maïs modifiée permet aux agriculteurs d'utiliser des herbicides contenant du glyphosate pour lutter contre les mauvaises herbes dans la culture du maïs (BCH-CDB, 2021(c)).

Chapitre VI: Résultats et discussion

Le maïs GA21 est autorisé à la culture dans des pays comme le Brésil, le Canada, le Mexique, l'Uruguay, et les Etats unis mais pas en Argentine où il est autorisé uniquement à la transformation et l'utilisation humaine et animale.

Contrairement au maïs MON810, NK603 et GA21 qui sont tous des maïs transgéniques à trait unique ; le maïs Bt 11 est un Maïs résistant aux insectes et tolérant aux herbicides produit en insérant le gène Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki pour conférer la résistance à la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*), et le gène de la phosphinothricine N-acétyltransférase (PAT) de *Streptomyces viridochromogenes* pour conférer la tolérance à l'herbicide phosphinothricine (PPT), spécifiquement le glufosinate-ammonium (BCH-CDB, 2021(c)).

Le maïs Bt11 a été développé par la société suisse Syngenta par le biais de la méthode d'accélération de particules (biolistique) et commercialisé sous le nom Agrisure™ CB/LL (BCH-CDB, 2021(d)).

Les pays comme le Brésil, le Japon, l'Uruguay autorisent l'utilisation du Bt11 dans la transformation et la consommation humaine et animale ainsi que pour la culture. Dans la république coréenne, le Vietnam et l'union européenne il est par contre interdit à la culture mais autorisé à la consommation humaine et animale et à la transformation.

L'évènement DAS-59122 qui provient de la société américaine Dow AgroSciences LLC est comme le maïs Bt11; un maïs à caractère empilé qui a été génétiquement modifié pour résister aux insectes coléoptères (par exemple la chrysomèle occidentale des racines du maïs, la chrysomèle nordique des racines du maïs et la chrysomèle mexicaine des racines du maïs) et pour tolérer les herbicides contenant du glufosinate-ammonium (BCH-CDB, 2021(e)).

Le maïs DAS59122 est autorisé à la culture dans des pays comme le Canada, le Japon, le Mexique et la Roumanie. Au Nigeria, Philippines, République coréenne, l'Afrique du sud et les USA, il est autorisé à la transformation et à la consommation animale.

Le maïs TC1507, développé également par de la société américaine Dow AgroSciences LLC a été modifié avec l'insertion du gène Cry1F de *Bacillus thuringiensis* pour conférer une résistance à la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*). Une cassette de transformation codant pour la tolérance à l'herbicide phosphinothricine (PPT), plus précisément le glufosinate-ammonium, a également été insérée dans l'organisme (BCH-CDB, 2021(f)).

Chapitre VI: Résultats et discussion

Le maïs TC1507 est autorisé à la culture et à la consommation humaine et animale aux USA, et aussi à la transformation au Brésil. En Argentine et en Union Européenne, Malaisie, Nigeria, Philippines, la République Coréenne, il est autorisé à la transformation et à la consommation animale et uniquement à la culture au Canada et en Roumanie.

Comme nous l'avons expliqué dans la synthèse bibliographique, La détection dans la plupart des échantillons de plusieurs événements transgéniques à la fois peut résulter soit de la présence simultanée de plusieurs événements transgéniques individuels ou de la présence d'événements transgéniques à caractère empilé ou du mélange des deux.

6. PCR en temps réel

La quantification du matériel génétiquement modifié représente un aspect crucial dans la procédure d'analyse des OGM dans les aliments parce qu'elle permet de vérifier la conformité avec les politiques d'étiquetage au sein des pays mais également en terme de commerce international.

Pour ce qui concerne notre travail, Les essais quantitatifs de PCR en temps réel ont été réalisés en utilisant les sondes d'hydrolyse fluorescentes (TaqMan) et la méthode de la courbe de double calibration décrite précédemment. 6 standards ont été préparés à partir de la dilution en série de l'extrait de matériau de référence avec la concentration la plus élevée disponible pour l'événement en question (5 ou 10%) (**Tableau 15**). Les quantités d'ADN en concentration et en masse correspondant aux différents points de la courbe ont été obtenues par dilution en série décroissante 5x, à partir d'un extrait du matériau de référence certifié à 100 ng / μ L d'ADN. L'amplification des motifs pour le gène endogène du maïs et pour une séquence spécifique de l'événement analysé a été réalisée en réactions parallèles, afin de permettre le tracé de 2 courbes d'étalonnage. Le gène endogène du maïs SSIIb a servi de référence pour les systèmes de quantification des événements transgéniques MON810, Bt11 et GA21 tel que proposé par l'ISO 21570 alors que le gène Adh1 a été utilisé comme référence pour le NK603 et le DAS59122, et pour le TC1507.

Le pourcentage d'OGM a été calculé à l'aide de l'expression suivante:

$$\text{OGM}\% = \frac{\text{ADN (GM)}}{\text{ADN (référence = maïs)}} * 100$$

Tableau 15 : Concentration et masse des étalons obtenus par dilution en série pour les événements testés

Point d'étalonnage	Concentration en ADN (ng/µl)	Masse d'ADN de maïs (ng)	Masse d'ADN					
			MON810 (*9,9%)	NK603 (*4,91%)	TC1507 (*9,86%)	Bt11 (*4,89)	GA21 (*4,29)	DAS59122 (*9,87)
1	100	200	19,8	9,82	19,72	9,78	8,58	19,74
2	20	40	3,96	1,964	3,944	1,956	1,716	3,948
3	4	8	0,792	0,392	0,788	0,391	0,343	0,789
4	0,8	1,6	0,1584	0,0785	0,1577	0,0782	0,0686	0,1579
5	0,16	0,32	0,0316	0,0157	0,0315	0,0156	0,0137	0,0315
6	0,032	0,064	0,00633	0,00314	0,00631	0,00312	0,00274	0,00631

Afin d'évaluer les systèmes de PCR en temps réel, Les exigences fixées par le document du Réseau européen de laboratoires de référence pour les OGM intitulé "Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing" (ENGL, 2015), ainsi que les lignes directrices de "Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments" (Bustin *et al.*, 2009) ont été soigneusement examinées.

Sur la base de ces rapports, le coefficient de corrélation (R²) doit être supérieur à 0,98, la pente doit être comprise entre -3,6 et -3,1, l'efficacité de la PCR entre 90% et 110% et la plage dynamique doit inclure au moins 4 ordres de grandeur. La limite de détection (LOD) a été considérée comme la plus faible quantité d'analyte dans un échantillon pouvant être détectée avec un niveau de confiance de 95%, garantissant ≤ 5% de faux négatifs. La limite de quantification (LOQ) doit être inférieure ou égale à la quantité ou à la concentration la plus faible incluse dans la plage dynamique (Bustin *et al.*, 2009; ENGL, 2015). De plus, la justesse mesurée, exprimée en biais, doit être à ± 25% de la valeur réelle (ENGL, 2015).

Le **Tableau 16** présente les résultats résumés des paramètres de performance obtenus par PCR quantitative en temps réel pour estimer chaque événement de maïs GM. Les données de la courbe d'étalonnage montrent que tous les tests développés pour la quantification de l'ADN du maïs et chaque caractère GM présentaient des paramètres acceptables, dans des plages

Chapitre VI: Résultats et discussion

dynamiques de 6 ordres de grandeur, mettant en évidence leurs performances analytiques élevées pour estimer le contenu GM.

L'utilisation de MRC contenant 1 ou 2% de chaque événement de maïs enrichi a confirmé l'exactitude des méthodes d'estimation des caractères de maïs génétiquement modifiés identifiés puisque la justesse mesurée, exprimée en biais, se situait à $\pm 25\%$ de la valeur réelle pour tous les objectifs de quantification (ENGL, 2015). En outre, la précision des méthodes peut être confirmée sur la base de la détermination des coefficients de variation, exprimant l'écart type relatif des résultats dans des conditions de répétabilité, qui étaient bien inférieures à 25%, comme recommandé pour ces dosages (ENGL, 2015).

Tableau 16 : Les performances analytiques des PCR en temps réel

Cible	R ² (moy±SD)	E (moy±SD, %) ^a	Validation avec les MRC (%) ^b		
			Actuel	Estimé (moy±SD)	Bias ^c
SSI1	0,997±0,003	102,7±6,7	-	-	-
Adh1	0,994±0,004	107,4±3,5	-	-	-
Mon810	0,986±0,001	117,7±2,4	1,98	1,57±0,03	-19,5
NK603	0,991±0,001	115,5±3,0	0,98	0,93±0,13	-4,8
TC1507	0,990±0,011	108,8±0,1	0,99	0,81±0,11	-18,2
Bt11	0,993±0,005	96,1±0,8	0,98	1,19±0,06	21,4
DAS59122	0,985±0,012	111,9±0,3	0,99	0,85±0,11	-14,6
GA21	0,977±0,006	96,0±2,8	0,99	1,04±0,06	4,5

^a E – (Efficacité de la PCR ou PCR efficiency, $E = [10(-1/\text{slope}) - 1] \times 100$).

^b MRC – matériel de référence certifié contenant 1% or 2% des événements de maïs testés pour la validation des essais

^c Bias = (valeur estimée– valeur actuelle)/valeur actuelle x 100.

L'application des méthodes PCR en temps réel pour l'analyse des échantillons commerciaux (**Tableau 17**) a permis de confirmer tous les résultats positifs concernant la détection spécifique à l'événement par PCR qualitative (**Tableau 14**), éliminant la possibilité d'obtenir des fragments non spécifiques de longueur attendue identique et donc des résultats faux positifs.

Tableau 17 : Résultats quantitatifs de la PCR en temps réel

Produits alimentaires	#	Evènements GM						Total%
		MON810%	NK603%	TC1507%	DAS59122%	GA21%	Bt11%	
Farines et semoules sans gluten	DP7	8,30 ± 0,62	39,2±3,8	24,2±3,6				71,7
	DP12	9,11 ± 0,68	41,2±7,5	41,2±7,5		2,04±0,25		93,5
	DP13	27,8 ± 0,9	38,8±2,5	13,2±3,2		6,58±0,26	23,6±0,3	109,8
	DP19	31,9 ± 3,8	33,2±2,6	5,06±0,75	0,085±0,007	3,05±0,42	-	73,3
	DP20	25,9 ± 2,9	24,4±3,4	13,2±5,0		0,41±0,06	19,7±2,4	82,3
	DP21	30,1 ± 2,0	26,9±3,6	15,8±2,0		7,47±1,02	45,9±5,6	126,1
Pâtes et couscous sans gluten	DP4	14,2 ± 1,0	27,6±2,8	43,6±5,1				85,4
	DP6	11,8 ± 0,9	31,6±5,5	39,7±3,3				83,1
	DP8	11,2 ± 1,0	48,4±3,5	41,9±5,9				101,5
	DP18	30,7 ± 2,7	29,9±1,7	25,0±2,8		-		85,7
Cookies et tortillas sans gluten	DP5	-	-	-	5,07±0,41	-	31,0±1,0	36,6
	DP10	34,9 ± 7,3	-	-		-	-	34,9
	DP11	46,8 ± 5,6	21,0±1,2	31,1±3,1		2,60±0,65	31,4±7,6	132,8
Chips	CC3	8,6 ± 0,66	7,77±1,07	20,3±3,1				36,6
	CC4	96,1 ± 17,0	15,4±2,8	-		0,13±0,04		111,6
Cornflakes	CF23	86,2 ± 13,0	14,4±2,4	21,9±0,4			100,2±6,5	222,7

Chapitre VI: Résultats et discussion

La lecture des résultats de la PCR en temps réel nous a permis de constater que les événements MON810, NK603 et TC1507 sont les événements les plus représentatifs pas seulement en terme de fréquence (résultats de la PCR qualitative) mais également en terme de teneur en OGM, suivis de Bt 11 de telle façon que tous ces événements ont atteint des teneurs supérieures à 20% dans leurs échantillons respectifs, De l'autre côté, le GA21, détecté dans 7 échantillons et DAS59122 ont enregistré des teneurs inférieures à 10% (traces dans le cas de certains échantillons).

En général, tous nos échantillons comprennent des niveaux très élevés d'événements transgéniques et, à l'exception de l'échantillon DP10, ils contiennent tous plusieurs événements transgéniques, avec 5 échantillons (DP13, DP19-DP21, DP11) ayant chacun 5 événements. Cette présence multiple de plusieurs événements dans certains échantillons a engendré des teneurs en OGM totales dramatiquement élevées, excédant 100 % (cas des échantillons, DP21, DP11 et CF23), supposant la présence d'événements empilés. De plus, certaines valeurs relatives à certains événements laissent suggérer certains empilements tels que les échantillons de semoule (DP7) et de pâtes (DP4, DP6, DP8, DP18) qui pourraient contenir la combinaison de TC1507 × NK603 et MON810, voire TC1507 × MON810 × NK603. Les proportions identiques de NK603 et TC1507 suggèrent la présence de TC1507 x NK603, mélangé avec MON810 et GA21 dans l'échantillon DP12. Les autres échantillons de semoule / farines (DP13, DP19-DP21) suggèrent la présence d'événements empilés mixtes, principalement parce que les événements MON810 et Bt11 ont des traits similaires de résistance aux insectes, étant donc empilés avec d'autres événements tels que NK603 et TC1507. L'échantillon de cornflakes (CF23) montre un résultat particulier avec des proportions extrêmement élevées de MON810 et Bt11, avec NK603 et TC1507, suggérant deux événements empilés, l'un inattendu (MON810 × Bt11) car ils ont des traits similaires (résistance aux insectes) et un probable (TC1507 × NK603).

La combinaison ou l'empilement de différents traits ou gènes dans les plantes gagne rapidement en popularité dans la production de cultures biotechnologiques (Taverniers *et al.*, 2008). Les OGM dits à empilement ont plus d'une construction génétique (ADNr) incorporée dans l'ADN génomique de la plante et peuvent être le résultat de l'introduction intentionnelle de plusieurs constructions au cours du processus de transformation ou du croisement d'OGM individuels (Holst-Jensen *et al.*, 2006). Les événements empilés représentent un véritable problème lorsqu'il s'agit de communiquer des résultats d'ordre quantitatif puisqu'il n'est pas possible de distinguer les produits dérivés de la présence simultanée d'événements

Chapitre VI: Résultats et discussion

transgéniques individuels uniques et d'évènements empilés, sauf lors de l'analyse d'une seule plante ou d'un seul fruit (graine, noyau) (Akiyama *et al.*, 2005; Broeders *et al.*, 2012). La conséquence est que l'analyse d'un échantillon contenant un événement GM empilé peut entraîner un pourcentage plus élevé mesuré de la teneur en OGM en raison de la somme du contenu pour chaque événement individuel. L'exemple présenté par Žel *et al.* (2012), illustre comment l'analyse d'un échantillon contenant 0.8 % du maïs GM empilé MON-00863-5 × MON-00810-6 × MON00603-6 aboutira à la détection de trois OGM individuels (0,8 % du maïs MON-00 863-5 ; 0,8% du maïs MON-00810-6 et 0,8% du maïs MON-00603-6) avec une teneur totale en OGM de 2,4% par rapport à l'ingrédient du maïs , alors que la teneur réelle en maïs GM est de 0,8 % seulement. Lorsque les niveaux d'OGM sont élevés, comme dans le cas de nos échantillons, on peut facilement se retrouver avec des valeurs supérieures à 100%. Il convient également de souligner que si, dans certains cas, la présence d'évènements empilés peut être facilement déduite à partir de certaines valeurs qui sont très proches, dans d'autres, il n'est pas si évident, ce qui suggère la présence d'évènements empilés associés à des événements à trait unique.

Afin de comprendre nos résultats et surtout d'où viennent ces valeurs très élevées de teneur en OGM dans nos échantillons, les statistiques sur les importations algériennes de maïs au cours des années (2015, 2016 et 2017) ont été obtenues auprès du *Centre National des Transmissions et du Système d'Information des Douaniers* (Douanes Algériennes, 2019). L'Algérie a importé plus de 12,6 millions de tonnes de maïs (plus de quatre millions de tonnes chaque année) de treize pays différents, à savoir l'Argentine, le Brésil, les États-Unis, le Paraguay, la Bulgarie, l'Espagne, la France, la Roumanie, Turquie, Ukraine, Fédération de Russie, Serbie-et-Monténégro. Fait intéressant, l'Argentine a été le principal fournisseur puisqu'elle a contribué avec 61,54 %, 61,82 % et 89,71 % des importations de 2015, 2016 et 2017, respectivement, suivie du Brésil avec 22,79 %, 13,65 % et 10,71 % des importations, tandis que les États-Unis ont contribué avec 5,40 %, 16,73 % et 1,82 % des importations. Cela signifie que 90 % (2015) ou plus (2016 et 2017) des importations algériennes de maïs provenaient des trois principaux pays producteurs d'OGM (James, 2017), justifiant ainsi la présence d'une teneur en OGM aussi élevée dans les produits alimentaires que nous avons analysés. L'Argentine, principal fournisseur du maïs, est l'un des six "pays fondateurs des cultures biotechnologiques" ayant commercialisé le soja RR® et le coton Bt en 1996, première année de commercialisation mondiale des cultures biotechnologiques (James, 2016) et son adoption des cultures biotechnologiques a atteint, pour le maïs, 95 % et 97 % en 2015 et 2016,

Chapitre VI: Résultats et discussion

respectivement. À ce jour, l'Argentine a approuvé 44 événements pour le maïs dont 43 événements pour les denrées alimentaires, les aliments pour animaux et la culture et un pour les denrées alimentaires et la culture et les événements empilés représentent 72 % du total des événements, soit 32 événements transgéniques.

Conclusion générale

Conclusion générale

Conclusion générale

En raison de l'adoption croissante des plantes génétiquement modifiées cultivées commercialement, les aliments produits à partir d'organismes génétiquement modifiés (OGM) sont de plus en plus disponibles sur les marchés dans de nombreux pays. En dépit des avantages évoqués par leurs producteurs, les OGM alimentaires ont reçu une forte opposition de la part de nombreux groupes sociaux et représentent aujourd'hui l'un des sujets les plus controversés dans le monde. Les risques de toxicité, notamment des protéines exprimées par les gènes insérés, ou d'allergénicité sont les préoccupations les plus importantes exprimées au sujet des OGM et sont, par conséquent, au centre de l'évaluation des OGM destinés à la consommation humaine et la santé animale par les autorités compétentes, telles que l'AESA.

Pour la première fois en Algérie, nous avons mené une enquête qui a couvert toutes les étapes de détection, d'identification et de quantification d'OGM afin de rendre disponibles des données sur l'introduction du matériel génétiquement modifié en Algérie et cela par le moyen de la technique PCR conventionnelle et de la PCR en temps réel.

Sur la base des résultats de cette étude, nous pouvons conclure que la PCR conventionnelle est une méthode satisfaisante pour la détection des OGM, même dans les produits alimentaires hautement transformés. La méthode de dépistage peut également être utilisée avec succès comme point de départ pour les méthodes d'identification et de quantification spécifiques aux événements transgéniques, permettant une optimisation des coûts et du temps d'analyse. Toutefois, la méthode de dépistage par le moyen du promoteur 35S et le terminateur NOS peuvent détecter de nombreux, mais pas tous les maïs GM. En outre, la détection d'OGM dans certains aliments peut ne pas être évidente en raison de la forte dégradation d'ADN survenue au cours des différents traitements technologiques.

Nos résultats montrent que plusieurs produits alimentaires à base de maïs commercialisés sur le marché algérien contiennent des OGM. Sur un total de 105 produits testés, 91 produits représentant 87% ont permis d'extraire un ADN suffisamment intacte pour être amplifié. De ces échantillons amplifiables 20%, à savoir 18 échantillons, se sont révélés contenir du matériel GM par la méthode de criblage ciblant le promoteur 35S et le terminateur NOS. Parmi les 11 événements transgéniques qu'on a ciblés, nous avons pu détecter 6 événements différents (MON810, NK603, TC1507, Bt11, GA21, DAS5912) dans 16 échantillons de produits alimentaires, représentés principalement par les farines et semoules sans gluten avec étonnamment la plupart des échantillons positifs à plusieurs événements au même temps. Les

Conclusion générale

événements MON810, NK603 et TC1507 sont les plus fréquents de sorte qu'ils ont été détectés dans 15, 14 et 13 échantillons, respectivement, suivis de GA21 et Bt11 présents dans 7 et 6 échantillons, respectivement et enfin le DAS59122, présent dans deux produits seulement.

Les résultats quantitatifs en temps réel de PCR montrent que tous les échantillons contiennent, en général, des niveaux très élevés d'événements de maïs GM résultant de la comptabilité des événements multiples, allant de 34,9 % à 222,7 %. La proportion élevée dépassant largement 100 % suggère la présence d'événements empilés, tels que TC1507 × NK603, TC1507 × MON810 × NK603, ainsi que des événements à un seul trait. Les valeurs GM mesurées étaient plus élevées que tous les seuils d'étiquetage fixés à travers le monde.

Bien que l'Algérie ait participé à de nombreux projets sur la biosécurité, elle n'a toujours pas de réglementation pour retracer et contrôler l'utilisation des OGM dans les aliments et les aliments pour animaux et aucune réglementation pour l'étiquetage n'a été établie. L'Algérie continue d'importer des produits alimentaires et surtout des matières premières destinées à l'industrie agroalimentaire à partir de pays producteurs d'OGM sans que des mesures s'opposant à l'introduction des OGM dans le pays soient appliquées. Nos résultats ont révélé une prévalence et des quantités très élevées des OGM dans les aliments commercialisés sur le marché algérien, soulignant le besoin urgent d'une politique nationale de commercialisation et d'utilisation des OGM dans les aliments et les aliments pour animaux à mettre en œuvre et d'étiqueter avec seuil obligatoire fixe afin d'offrir au consommateur algérien le droit de choisir.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

Abdel-Mawgood, A. L., Gassem, M. A., Alsadon, A. A., Alghamdi, S. S., & Al-Doss, A. A. (2010). Monitoring of genetically modified food in Saudi Arabia. *African Journal of Food Science*, 4(8), 536-540.

AgBioWorld (2011). Pusstai's Potatoes - Is 'Genetic Modification' the Culprit?. [en ligne]. [Consulté le 19.03.2021]. URL : <http://www.agbioworld.org/biotech-info/articles/biotech-art/pusstai-potatoes.html>

Ahmed, F. E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *TRENDS in Biotechnology*, 20(5), 215-223.

Akiyama, H., Watanabe, T., Wakabayashi, K., Nakade, S., Yasui, S., Sakata, K., ... & Maitani, T. (2005). Quantitative detection system for maize sample containing combined-trait genetically modified maize. *Analytical chemistry*, 77(22), 7421-7428.

Al-Salameen, F., Kumar, V., Al-Aqeel, H., Al-Hashash, H., & Hejji, A. B. (2012). Detection of genetically modified DNA in fresh and processed foods sold in Kuwait. *GM crops & food*, 3(4), 283-288.

Ankeny, R. A., & Bray, H. (2018). Genetically Modified Food. In: Barnhill A., Budolfson M., et Doggett T., eds. *The Oxford Handbook of Food Ethics*. Oxford University Press, p.p.1-19.

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*, 214(1), 3-26.

Arrêté ministériel (2001). Arrêté du 24 décembre 2000 interdisant l'importation, la production, la distribution, la commercialisation et l'utilisation du matériel génétiquement modifié [en ligne]. *Journal Officiel de la République Algérienne* N. 2, 68. [Consulté le 18.07.2019]. URL : <http://madrp.gov.dz/telecharger/arrete-du-24-decembre-2000-interdisant-limportation-la-production-la-distribution-la-commercialisation-et-lutilisation-du-materiel-genetiquement-modifie/>

Arun, Ö. Ö., Yılmaz, F., & Muratoğlu, K. (2013). PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly processed foods. *Food Control*, 32(2), 525-531.

Références Bibliographiques

Asensio, L., González, I., García, T., & Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food control*, 19(1), 1-8.

Atherton, K. T. (2002). Safety assessment of genetically modified crops. *Toxicology*, 181, 421-426.

Bauer, T., Weller, P., Hammes, W. P., & Hertel, C. (2003). The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Research and Technology*, 217, 338–343.

BCH-CDB (2021) (a). Modified Organism : MON-ØØ81Ø-6 - YieldGard™ maize . [en ligne]. [Consulté le 07.01.2021]. URL:

<http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14750>

BCH-CDB (2021) (b). Modified Organism: MON-ØØ6Ø3-6 - Roundup Ready™ maize. [en ligne]. [Consulté 08.01.2021]. URL:

<http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14776>

BCH-CDB (2021) (c). Modified Organism: MON-ØØØ21-9 - Roundup Ready™ maize. [en ligne]. [Consulté le 11.01.2021]. URL:

<http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14794>

BCH-CDB (2021) (d). Modified Organism: SYN-BTØ11-1 - YieldGard™ maize. [en ligne]. [Consulté le 11.01.2021]. URL:

<http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14797>

BCH-CDB (2021) (e). Modified Organism: DAS-59122-7 - Herculex™ RW Rootworm Protection maize. [en ligne]. [Consulté le 12.01.2021]. URL:

<http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=15165>

BCH-CDB (2021) (f). Modified Organism: DAS-Ø15Ø7-1 - Herculex™ I maize . [en ligne]. [Consulté le 12.01.2021]. URL:

<http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14841>

Belalia N. (2010). Détection des OGM dans l'agriculture et l'alimentation en Algérie. Mémoire Magister Agronome, El Harrach, ENSA, 93p.

Références Bibliographiques

Bernstein, J. A., Bernstein, I. L., Bucchini, L., Goldman, L. R., Hamilton, R. G., Lehrer, S., ... & Sampson, H. A. (2003). Clinical and laboratory investigation of allergy to genetically modified foods. *Environmental health perspectives*, 111(8), 1114-1121.

Bhumiratana, S., & Kongsawat, C. (2008). Food production and the ethical use of genetically modified organisms. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 1(1), 24-28.

Bram G. (2020). MULLIS KARY BANKS - (1944-2019) [en ligne]. Encyclopædia Universalis. [Consulté le 10 octobre 2020]. URL: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/kary-banks-mullis/>

Broeders, S. R., De Keersmaecker, S. C., & Roosens, N. H. (2012). How to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1-11.

Brower, L. P., Taylor, O. R., Williams, E. H., Slayback, D. A., Zubieta, R. R., & Ramirez, M. I. (2012). Decline of monarch butterflies overwintering in Mexico: is the migratory phenomenon at risk?. *Insect Conservation and Diversity*, 5(2), 95-100.

Busi, R., Neve, P., & Powles, S. (2013). Evolved polygenic herbicide resistance in *L. olium rigidum* by low-dose herbicide selection within standing genetic variation. *Evolutionary Applications*, 6(2), 231-242.

Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25(2), 169-193.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611–622.

Caetano-Anollés, D. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 5(3), 392-395.

Carpenter, J. E. (2013). The socio-economic impacts of currently commercialised genetically engineered crops. *International Journal of Biotechnology*, 12(4), 249-268.

Chadwick, R. (2017). Ethics and Genetically Modified Crops. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 8–12.

Références Bibliographiques

Comstock, G.L., (2010). Genetically Modified Foods. In: Life Science Ethics. Dordrecht, Springer, p.p. 221-238.

Conceição, F. R., Moreira, Â. N., & Binsfeld, P. C. (2006). Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. *Ciência Rural*, 36(1), 315-324.

Conner, A. J., Glare, T. R., & Nap, J. P. (2003). The release of genetically modified crops into the environment: Part II. Overview of ecological risk assessment. *The Plant Journal*, 33(1), 19-46.

Convention on biological diversity (CBD) (2020). [en ligne]. [Consulté le 24.04.2020]. URL <http://bch.cbd.int/protocol/>

Corbisier, P., Bhat, S., Partis, L., Xie, V. R. D., & Emslie, K. R. (2010). Absolute quantification of genetically modified MON810 maize (*Zea mays* L.) by digital polymerase chain reaction. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 2143-2150.

Corbisier, P., Broothaerts, W., Gioria, S., Schimmel, H., Burns, M., Baoutina, A., ... & Wang, J. (2007). Toward metrological traceability for DNA fragment ratios in GM quantification. 1. Effect of DNA extraction methods on the quantitative determination of Bt176 corn by real-time PCR. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(9), 3249-3257.

Datukishvili, N., Kutateladze, T., Gabriadze, I., Bitskinashvili, K., & Vishnepolsky, B. (2015). New multiplex PCR methods for rapid screening of genetically modified organisms in foods. *Frontiers in microbiology*, 6, 757.

Déclaration de Rio sur l'environnement et le développement principes de gestion des forêts, sommet planète terre, Conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement, Rio de Janeiro, Brésil 3-14 juin 1992.

Delobel, C., Foti, N., Mazzara, M., Van Den Eede, G. (2008). "Event-specific Method for the Quantification of Maize Event 3272 Using Real-time PCR - Validation Report and Protocol". <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/entry?db=gmometh&id=QT-EVE-ZM-019>

Références Bibliographiques

Devi, S., Lin, Y. C., & Ho, Y. P. (2019). Quantitative analysis of genetically modified soya using multiple reaction monitoring mass spectrometry with endogenous peptides as internal standards. *European Journal of Mass Spectrometry*, 25(1), 50-57.

Dona, A., & Arvanitoyannis, I. S. (2009). Health risks of genetically modified foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(2), 164-175.

Dong, S., Liu, Y., Yu, C., Zhang, Z., Chen, M., & Wang, C. (2016). Investigating pollen and gene flow of WYMV-resistant transgenic wheat N12-1 using a dwarf male-sterile line as the pollen receptor. *PLoS One*, 11(3), e0151373.

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*, 396(6), 2043-2054.

Douanes Algériennes (2019). Centre National des Transmissions et du Système d'Information des Douanes. [en ligne]. [Consulté le 05.08.2019]. URL: <http://www.douane.gov.dz>.

Engel, K. H., Frenzel, T., & Miller, A. (2002). Current and future benefits from the use of GM technology in food production. *Toxicology letters*, 127(1-3), 329-336.

ENGL (2015). Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. European Network of GMO laboratories, Joint Research Center, 19 p.

European Food Safety Authority (EFSA). (2008). Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. *EFSA Journal*, 6(3), 1057.

Fagan, J. (2004). Detection and Quantification of Genetically Modified Organisms in Food by DNA-Based and Protein-Based Methods. In: Nollet L.M.L., eds. *Handbook of Food Analysis*. 3. Methods and instruments in applied food analysis. New York, Marcel Dekker, p.p. 1999–2030.

FAO (1993). *Le maïs dans la nutrition humaine*. Rome, FAO, 174p. (Collection: FAO: Alimentation et nutrition N° 25).

FAO (2003). *Peser le pour et le contre des OGM: le contre*. [en ligne]. [Consulté le 17.09.2020]. URL: <http://www.fao.org/french/newsroom/focus/2003/gmo8.htm>

Références Bibliographiques

FAO/WHO (2007). CODEX Alimentarius Working Principles for Risk Analysis for Food Safety for Application by Governments. [en ligne]. [Consulté le 25.04.2020]. URL: <http://www.fao.org/3/a1550t/a1550t.pdf>

FAO/WHO CODEX Alimentarius (2003) (a). Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Plants. [en ligne]. [Consulté le 25.04.2020]. URL: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/gmfp/resources/CXG_068e.pdf

FAO/WHO CODEX Alimentarius (2003) (b). Principles for the Risk Analysis of Foods Derived from Modern Biotechnology. [en ligne]. [Consulté le 25.04.2020]. URL: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/gmfp/resources/CXG_044e.pdf

FAOSTAT (2021) (a). Data on maize crop production by country in 2019. [en ligne]. [Consulté le 20.03.2021]. URL : <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

FAOSTAT (2021) (b). Data on maize crop production in Algeria (1961-2019). [en ligne]. [Consulté le 20.03.2021]. URL : <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>

Fernandes, T. J., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P., & Mafra, I. (2014). A survey on genetically modified maize in foods commercialised in Portugal. *Food Control*, 35(1), 338-344.

Finucane, M. L., & Holup, J. L. (2005). Psychosocial and cultural factors affecting the perceived risk of genetically modified food: an overview of the literature. *Social science & medicine*, 60(7), 1603-1612.

Ford, C. S., Allainguillaume, J., Grilli-Chantler, P., Cuccato, G., Allender, C. J., & Wilkinson, M. J. (2006). Spontaneous gene flow from rapeseed (*Brassica napus*) to wild *Brassica oleracea*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1605), 3111-3115.

Fraiture, M. A., Herman, P., Taverniers, I., De Loose, M., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., & Roosens, N. H. (2015). Validation of a sensitive DNA walking strategy to characterise unauthorised GMOs using model food matrices mimicking common rice products. *Food chemistry*, 173, 1259-1265.

Futura-sciences (2015). OGM : le principe de précaution. [en ligne]. [Consulté le 24.04.2020] URL: <https://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/genetique-ogm-tour-horizon-complet-223/page/4/>

Références Bibliographiques

Gachet E., 2003. Détection des organismes génétiquement modifiés. In : Fraudes alimentaires: approche réglementaire et méthodologie analytique. Tec & Doc Lavoisier, p.p. 389-415.

Gadani, F., Bindler, G., Pijenburg, H., Rossi, L., & Zuber, J. (2000). Current PCR methods for the detection, identification and quantification of genetically modified organisms (GMOs): a brief review. *Beiträge zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research*, 19(2), 85-96.

García-Cañas, V., & Cifuentes, A. (2012). A particular case of novel food: Genetically modified organisms. In: Picó Y., ed. *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*. Oxford, Academic press, p.p. 575-597.

Germini, A., Zanetti, A., Salati, C., Rossi, S., Forré, C., Schmid, S., & Marchelli, R. (2004). Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(11), 3275-3280.

Glenn, K. C., Alsop, B., Bell, E., Goley, M., Jenkinson, J., Liu, B., ... & Urquhart, W. (2017). Bringing new plant varieties to market: plant breeding and selection practices advance beneficial characteristics while minimizing unintended changes. *Crop Science*, 57(6), 2906-2921.

GNIS (2020). Les étapes de la transgénèse [en ligne]. [Consulté le 22.01.2020]. URL: <https://www.gnis-pedagogie.org/sujet/biotechnologies-etapes-transgenese/>

GNIS (2021) (a). Les débouchés du maïs [en ligne]. [Consulté le 07.02.2021]. URL: <https://www.gnis-pedagogie.org/sujet/mais-debouches/>

GNIS (2021) (b). La culture du maïs. [En ligne]. [Consulté le 13.01.2021]. URL: <https://www.gnis-pedagogie.org/sujet/mais-culture-semis-suivi-recolte/>

Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., ... & Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327(5967), 812-818.

Goudjil S. (2008). L'impact du commerce international des OGM sur les pays en développement (Cas de l'Algérie). Mémoire de Magister, Université de Bejaia. 275p.

Références Bibliographiques

Gray, E., Ancev, T., & Drynan, R. (2011). Coexistence of GM and non-GM crops with endogenously determined separation. *Ecological Economics*, 70(12), 2486-2493.

Grohmann, L. (2010). Detection of genetically modified plants in seeds, food and feed. In *Genetic Modification of Plants* (pp. 117-136). Springer, Berlin, Heidelberg.

Gruère, G. P., & Rao, S. R. (2007). A review of international labeling policies of genetically modified food to evaluate India's proposed rule. *AgBioForum*, 10(1), 51-64.

Gryson, N. (2010). Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 2003-2022.

Gryson, N., Messens, K., & Dewettinck, K. (2004). Evaluation and optimisation of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1357-1363.

Han, S. M., Lee, B., Won, O. J., Hwang, K. S., Suh, S. J., Kim, C. G., & Park, K. W. (2015). Gene flow from herbicide resistant genetically modified rice to conventional rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Journal of Ecology and Environment*, 38(4), 397-403.

Haugen, H. M., & Bohn, T. (2016). Genetically Modified Food Worldwide IP Challenges. [en ligne]. [Consulté le 08.11.2020]. URL: <file:///C:/Users/Slash/AppData/Local/Temp/HaugenandBhn2016IPrightandfoodforsharing.pdf>

Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., & Ferrando, A. (2005). Current methodology for detection, identification and quantification of genetically modified organisms. *Current Analytical Chemistry*, 1(2), 203-221.

Ho, M. W., Ryan, A., & Cummins, J. (1999). Cauliflower mosaic viral promoter-a recipe for disaster?. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11(4), 194-197.

Hokanson, K. E., Dawson, W. O., Handler, A. M., Schetelig, M. F., & Leger, R. S. (2014). Not all GMOs are crop plants: non-plant GMO applications in agriculture. *Transgenic research*, 23(6), 1057-1068.

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7276-7280.

Références Bibliographiques

Holst-Jensen, A. (2009). Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives. *Biotechnology advances*, 27(6), 1071-1082.

Holst-Jensen, A., Bertheau, Y., de Loose, M., Grohmann, L., Hamels, S., Hougs, L., ... & Wulff, D. (2012). Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnology advances*, 30(6), 1318-1335.

Holst-Jensen, A., De Loose, M., & Van den Eede, G. (2006). Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2799-2809.

Holst-Jensen, A., Rønning, S. B., Løvseth, A., & Berdal, K. G. (2003). PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375(8), 985-993.

Huang, H. Y., & Pan, T. M. (2004). Detection of genetically modified maize MON810 and NK603 by multiplex and real-time polymerase chain reaction methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3264-3268.

Huang, J., Ellis, C., Hauge, B., Qi, Y., & Varagona, M. J. (2015). Erratum to: Herbicide Tolerance. In: Azhakanandam K., Silverstone A., Daniell H., Davey M. R., eds. *Recent Advancements in Gene Expression and Enabling Technologies in Crop Plants*. New York, NY, Springer, p.p. 213-237.

Hübner, P., Studer, E., & Lüthy, J. (1999). Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. *Food control*, 10(6), 353-358.

Inf°OGM (2016). le-protocole-de-Cartagena-sur-les-OGM. [en ligne]. [Consulté le 24.04.2020]. URL : <https://www.infogm.org/faq-le-protocole-de-Cartagena-sur-les-OGM>

ISAAA (2021) (a). ISAAA Brief 55-2019: Executive Summary: Biotech Crops Drive Socio-Economic Development and Sustainable Environment in the New Frontier [en ligne]. [Consulté le 03.01.2021]. URL : <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/55/executivesummary/default.asp>

ISAAA (2021) (b). Maize (*Zea mays* L.) GM Events. [en ligne]. [Consulté le 13.04.2021]. URL: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/crop/default.asp?CropID=6&Crop=Maize>

Références Bibliographiques

ISO 21569 (2005). Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative nucleic acid based methods, Switzerland.

ISO 21570 (2005). Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Quantitative nucleic acid based methods, Switzerland.

Iwobi, A., Huber, I., & Busch, U. (2012). The application of PCR-based methods in food control agencies—a review. *Polymerase Chain Reaction*, 173-194.

Jalali, Me., Zaborowska J., & Jalali, Mo. The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. In: Jalali Mo., Saldanha F.Y.L., & Jalali Me., eds. *Basic science methods for clinical researchers*. Boston, MA, Academic Press, p.p. 1-18.

Jalaludin, A., Yu, Q., Zoellner, P., Beffa, R., & Powles, S. B. (2017). Characterisation of glufosinate resistance mechanisms in *Eleusine indica*. *Pest management science*, 73(6), 1091-1100.

James, C. (2016). *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016*. ISAAA Brief No. 52. Ithaca, NY, ISAAA, 125p.

James, C. (2017). *Global status of commercialized biotech/GM crops: 2017*. ISAAA brief No. 53. Ithaca, NY, ISAAA, 143p.

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*, 15(1), 1-25.

Kamle, S., & Ali, S. (2013). Genetically modified crops: detection strategies and biosafety issues. *Gene*, 522(2), 123-132.

Karymullis (2020). Dr Kary Banks Mullis (1944-2019) : Biography. [en ligne]. [Consulté le 13/01/2020]. URL: <http://www.karymullis.com/biography.shtml>

Kaur, J., Radu, S., Ghazali, F. M., & Kqueen, C. Y. (2010). Real-time PCR-based detection and quantification of genetically modified maize in processed feeds commercialised in Malaysia. *Food control*, 21(11), 1536-1544.

Références Bibliographiques

Kim, J. H., Kim, S. Y., Lee, H., Kim, Y. R., & Kim, H. Y. (2010). An event-specific DNA microarray to identify genetically modified organisms in processed foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(10), 6018-6026.

Kim, J. H., Zhang, D., & Kim, H. Y. (2014). Detection of sixteen genetically modified maize events in processed foods using four event-specific pentaplex PCR systems. *Food Control*, 35(1), 345-353.

Kim, T. (2014). Biotechnology: Regulatory Issues. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 153–172.

Kohli, A., Griffiths, S., Palacios, N., Twyman, R. M., Vain, P., Laurie, D. A., & Christou, P. (1999). Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *The Plant Journal*, 17(6), 591-601.

König, A., Cockburn, A., Crevel, R. W. R., Debruyne, E., Grafstroem, R., Hammerling, U., ... & Wal, J. M. (2004). Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food and Chemical Toxicology*, 42(7), 1047-1088.

Kramkowska, M., Grzelak, T., & Czyzewska, K. (2013). Benefits and risks associated with genetically modified food products. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20(3).

Krinke Ch. & Verriere P. (2017). Quels pays ont adopté une réglementation sur l'étiquetage des OGM?. [en ligne]. [Consulté le 24.04.2020]. URL: <https://www.infogm.org/quels-pays-ont-adopte-une-reglementation-sur-l-etiquetage-des-ogm>

Kuiper, H. A. (1999). Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organisms. *Food Control*, 10, 339-349.

Kuiper, H. A., Kleter, G. A., Noteborn, H. P., & Kok, E. J. (2001). Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *The plant journal*, 27(6), 503-528.

Kuiper, H. A., Kleter, G. A., Noteborn, H. P., & Kok, E. J. (2002). Substantial equivalence—an appropriate paradigm for the safety assessment of genetically modified foods?. *Toxicology*, 181, 427-431.

Kulikov, A. M. (2005). Genetically modified organisms and risks of their introduction. *Russian journal of plant physiology*, 52(1), 99-111.

Références Bibliographiques

La Mura, M., Allnutt, T. R., Greenland, A., Mackay, I., & Lee, D. (2011). Application of QUIZ for GM quantification in food. *Food chemistry*, 125(4), 1340-1344.

La Paz, J. L., Garca-Muniz, N., Nadal, A., Esteve, T., PuigdomÉnech, P., & Pla, M. (2006). Interlaboratory transfer of a real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of genetically modified maize event TC-1507. *Journal of AOAC International*, 89(5), 1347-1352.

Lang, C., & Dörnenburg, H. (2000). Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(4), 366-375.

Latati, M., (2015). Modélisation de la dynamique du carbone et de l'azote dans le système d'association légumineuses-céréales: Rôle fonctionnel de la symbiose rhizobienne dans le contrôle de la biodisponibilité du phosphore dans la rhizosphère. Thèse de doctorat en sciences agronomiques, El Harrach, ENSA, 166p.

Lebwohl, B., Sanders, D. S., & Green, P. H. (2018). Coeliac disease. *The Lancet*, 391(10115), 70-81.

Lech, T. (2016). Genetically modified food-regulations, economic aspects and detection strategies. *Towaroznawcze Problemy Jakości*, (3), 54-64.

Lin, C. H., & Pan, T. M. (2016). Perspectives on genetically modified crops and food detection. *Journal of food and drug analysis*, 24(1), 1-8.

Lindfors, K., Ciacci, C., Kurppa, K., Lundin, K. E., Makharia, G. K., Mearin, M. L., ... & Kaukinen, K. (2019). Coeliac disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 1-18.

Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., & Anklam, E. (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International*, 82(4), 923-928.

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*, 88(1), 136-155.

Lockley, A. K., & Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 11(2), 67-77.

Références Bibliographiques

Lombardo, L., Coppola, G., & Zelasco, S. (2016). New technologies for insect-resistant and herbicide-tolerant plants. *Trends in biotechnology*, 34(1), 49-57.

Louanchi M., De la Perrière R. A. B., Bourras S. A, Salhi L. N., Ghazi M., (2006). Prévenir les risques liés à la dissémination des OGM dans l'agriculture et participation du public maghrébin au processus de biosécurité. Synthèse de l'atelier de formation Organisé par l' Association de Réflexion, d'Echange et d'Action pour l'Environnement et le Développement En collaboration avec la Bibliothèque d'Echange de Documentation et d'Expérience (Montpellier, France), Sidi Fredj, Algérie, 14 et 15 janvier 2006.

Louanchi M., De la Perrière R. A. B., Ghazi M., Noisette C, Salhi L. N., Bourras S.A., (2005). Options pour la construction de cadres réglementaires de contrôle des OGM et de protection des ressources génétiques. Synthèse de l'atelier international Organisé par l'Association de Réflexion, d'Echange et d'Action pour l'Environnement et le Développement En collaboration avec la Bibliothèque d'Echange de Documentation et d'Expérience (Montpellier, France), Tipasa, Algérie, 12 et 14 janvier 2005.

Louanchi, M., Belalia, N., Lehad, A., Laala, S., & Salhi, L. N. (2017). Qualitative detection of genetically modified material in crops and food products containing maize and soybean in Algeria. *African Journal of Biotechnology*, 16(7), 322-327.

Loudhaief, R. (2016). Effets des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur la physiologie intestinale de la *Drosophile*. Thèse de doctorat en sciences, Nice, Université Nice Sophia Antipolis UFR Sciences, 209 p.

Lövei, G. L., Bøhn, T., & Hilbeck, A. (2007). Biodiversity, ecosystem services and genetically modified organisms. In: Traavik T., & Ching L. L., eds. *Biosafety First: Holistic Approaches to Risk and Uncertainty in Genetic Engineering and Genetically Modified Organisms*. Trondheim, Tapir Academic Press , 161-180.

Lu, B. R., & Snow, A. A. (2005). Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequences. *BioScience*, 55(8), 669-678.

Lucht, J. M. (2015). Public acceptance of plant biotechnology and GM crops. *Viruses*, 7(8), 4254-4281.

Lusk, J. L., Roosen, J., & Bieberstein, A. (2014). Consumer acceptance of new food technologies: causes and roots of controversies. 6(1), 381-405.

Lusser, M., Parisi, C., Plan, D., & Rodríguez-Cerezo, E. (2011). New plant breeding techniques: state-of-the-art and prospects for commercial development. Luxembourg, Publications Office of the European Union, 218p.

Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 30(6), 1292-1305.

Mackenzie, R. (2003). Guide explicatif du Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques. Cambridge, IUCN, 317p.

Mafra, I. (2011). Current methods for detecting genetically modified organisms in foods. In: Oliveira, M. B. P. P., Mafra, I., & Amaral, J. S., Eds. Current topics on food authenticity. Kerala, Transworld Research Network, p.p. 211-236.

Mafra, I., & Oliveira, M. B. P. P. (2005). Organismos geneticamente modificados e alimentos derivados: II. Métodos de detecção e quantificação. *Alimentação Humana*, 11(2), 71-89.

Mafra, I., Ferreira, I. M., & Oliveira, M. B. P. (2008) (a). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227(3), 649-665.

Mafra, I., Silva, S. A., Moreira, E. J., da Silva, C. S. F., Beatriz, M., & Oliveira, P. P. (2008) (b). Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. *Food Control*, 19(12), 1183-1190.

Mahgoub, S. E. (2016). Genetically modified foods: Basics, applications, and controversy. Boca Raton, FL, CRC Press, 411p.

Manzanares-Palenzuela, C. L., Martín-Fernández, B., López, M. S. P., & López-Ruiz, B. (2015). Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of genetically modified organisms. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 66, 19-31.

Markoulatos, P., Siafakas, N., Papatoma, A., Nerantzis, E., Betzios, B., Dourtoglou, V. and Moncany, M., 2004. Qualitative and quantitative detection of protein and genetic traits in genetically modified food. *Food reviews international*, 20(3), 275-296

Marmiroli, N., Maestri, E., Gulli, M., Malcevschi, A., Peano, C., Bordoni, R., & De Bellis, G. (2008). Methods for detection of GMOs in food and feed. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 392(3), 369.

Références Bibliographiques

Marques, M. D., Critchley, C. R., & Walshe, J. (2015). Attitudes to genetically modified food over time: How trust in organizations and the media cycle predict support. *Public Understanding of Science*, 24(5), 601-618.

Mazzara M., Grazioli E., Larcher S., Savini C., & Van Den Eede G. (2006). "Event-Specific Method for the Quantitation of Maize Line DAS-59122-7 Using Real-Time PCR - Validation Report and Protocol. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/entry?db=gmometh&id=qt-eve-zm-012&rq=ac%3aDAS-59122-7>

Mazzara, M.; Cordeil, S.; van den Eede, G. (2005). Event-Specific Method for the Quantitation of Maize Line MON863 Using Real-Time PCR. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/docs/QT-EVE-ZM-009>.

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*, 392(3), 355-367.

Milavec, M., Dobnik, D., Yang, L., Zhang, D., Gruden, K., & Žel, J. (2014). GMO quantification: valuable experience and insights for the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(26), 6485-6497.

Miraglia, M., Berdal, K. G., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E. J., ... & Zagon, J. (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, 42(7), 1157-1180.

Mumm, R. H. (2013). A look at product development with genetically modified crops: examples from maize. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(35), 8254-8259.

Nandula, V. K. (2019). Herbicide resistance traits in maize and soybean: Current status and future outlook. *Plants*, 8(9), 337.

Narva, K. E., Storer, N. P., & Meade, T. (2014). Discovery and Development of insect-resistant crops using genes from *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Insect Physiology*, 47, 177-247.

Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. J. C. C. A. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta*, 439, 231-250.

Références Bibliographiques

Nawaz, M. A., Mesnage, R., Tsatsakis, A. M., Golokhvast, K. S., Yang, S. H., Antoniou, M. N., & Chung, G. (2019). Addressing concerns over the fate of DNA derived from genetically modified food in the human body: a review. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 423-430.

Nawaz, M. A., Tsatsakis, A. M., Ercisli, S., & Chung, G. (2018). Genetically modified plants: risks to environment. In: *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, Elsevier Inc, p-p. 1-7.

NCBI (2016). *Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects. Regulation of Current and Future Genetically Engineered Crops*. [en ligne]. [Consulté le 09.06.2020]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK424533/>

Nicolaides, A. (2013). Integrating ethical discourse into GM food production. *Asian Journal of Business and Management Sciences*, 3(4), 84-95.

Nordlee, J. A., Taylor, S. L., Townsend, J. A., Thomas, L. A., & Bush, R. K. (1996). Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *New England Journal of Medicine*, 334(11), 688-692.

Ocaña, M. F., Fraser, P. D., Patel, R. K., Halket, J. M., & Bramley, P. M. (2007). Mass spectrometric detection of CP4 EPSPS in genetically modified soya and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 21(3), 319-328.

Ocaña, M. F., Fraser, P. D., Patel, R. K., Halket, J. M., & Bramley, P. M. (2009). Evaluation of stable isotope labelling strategies for the quantitation of CP4 EPSPS in genetically modified soya. *Analytica chimica acta*, 634(1), 75-82.

OMS (2014). *Questions fréquentes sur les aliments génétiquement modifiés*. [en ligne]. [Consulté le 11.11.2019]. URL: https://www.who.int/foodsafety/areas_work/food-technology/faq-genetically-modified-food/fr/

Pan, A., Yang, L., Xu, S., Yin, C., Zhang, K., Wang, Z., & Zhang, D. (2006). Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of MON863 maize based upon the 3'-transgene integration sequence. *Journal of Cereal Science*, 43(2), 250-257.

Peano, C., Samson, M. C., Palmieri, L., Gulli, M., & Marmiroli, N. (2004). Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs

Références Bibliographiques

with four different extraction methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(23), 6962-6968.

Phillips, P.W.B. (2003). Traceability and trade of genetically modified food. In: Eaglesham A., Ristow S., & Hardy R.W.F., eds. *NABC Report 15: Biotechnology: Science and society at a crossroad*. NABC, p.p. 141-154.

Plácido, A., Amaral, J. S., Costa, J., Fernandes, T. J., Oliveira, M. B. P. P., Delerue-Matos, C., & Mafra, I. (2016). Novel strategies for genetically modified organism detection. *Genetically modified organisms in food*, 119-131.

Poitras, E., & Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology*, 2(2), 2-11.

Pöting A., Schauzu M., Niemann B., Schumann R. (2014) Risk Assessment of Novel Food and Genetically Modified Food and Feed. In: Reichl FX., Schwenk M., eds. *Regulatory Toxicology*. Springer Berlin Heidelberg, p.p. 827-848.

Prado, J. R., Segers, G., Voelker, T., Carson, D., Dobert, R., Phillips, J., ... & Reynolds, T. (2014). Genetically engineered crops: from idea to product. *Annual review of plant biology*, 65, 769-790.

Premanandh, J., Maruthamuthu, M., Sabbagh, A., & Al Muhairi, S. (2012). Prevalence of genetically modified foods (GM foods) in the United Arab Emirates. *Food Control*, 25, 10–12.

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*, 111(2), 374-383.

Qaim M (2009). The economics of genetically modified crops. *Annual Review of Resource Economics* 1: 665–693.

Qaim, M. (2016). GM crop regulation. In: *Genetically Modified Crops and Agricultural Development*. New York, Palgrave Macmillan, p.p. 109-134.

Querci M., (2010). Module 2 : Présentation du manuel, méthodes de travail et introduction au cours. In : Querci M., Jermini M., Van den Eede G., eds. *Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés*. Luxembourg, Publications Office of the European Union , p.p. 1-11.

Références Bibliographiques

Querci M., Kagkli D.M., Gatto F., Foti N., Maretti M., Mazzara M., (2020). Session 1: Overview, General Introduction on Genetically Modified Organisms (GMOs), EU Legislation. In: Querci M., ed. *The analysis of food samples for the presence of Genetically Modified Organisms - User Manual*. Luxembourg, Publications Office of the European Union, p.p. 22-30.

Rabiei, M., Mehdizadeh, M., Rastegar, H., Vahidi, H., & Alebouyeh, M. (2013). Detection of genetically modified maize in processed foods sold commercially in Iran by qualitative PCR. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 12(1), 25.

Rao, A. Q., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Shahid, A. A., Husnain, T., & Riazuddin, S. (2009). The myth of plant transformation. *Biotechnology advances*, 27(6), 753-763.

Rizzi, A., Panebianco, L., Giaccu, D., Sorlini, C., & Daffonchio, D. (2003). Stability and recovery of maize DNA during food processing. *Italian journal of food science*, 15(4), 499-510.

Rizzi, A., Raddadi, N., Sorlini, C., Nordgrd, L., Nielsen, K. M., & Daffonchio, D. (2012). The stability and degradation of dietary DNA in the gastrointestinal tract of mammals: implications for horizontal gene transfer and the biosafety of GMOs. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(2), 142-161.

Roe, B., & Teisl, M. F. (2007). Genetically modified food labeling: The impacts of message and messenger on consumer perceptions of labels and products. *Food Policy*, 32(1), 49-66.

Rogan, G. J., Dudin, Y. A., Lee, T. C., Magin, K. M., Astwood, J. D., Bhakta, N. S., ... & Fuchs, R. L. (1999). Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready® soybeans. *Food Control*, 10(6), 407-414.

Ruhland, M., Engelhardt, G., & Pawlizki, K. (2004). Distribution and metabolism of D/L-, L- and D-glufosinate in transgenic, glufosinate-tolerant crops of maize (*Zea mays* L ssp *mays*) and oilseed rape (*Brassica napus* L var *napus*). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 60(7), 691-696.

Safaei, P., Rezaie, S., Alimohammadi, M., Agha Kuchak Afshari, S., Mehdizadeh, M., & Molaee Aghae, E. (2020). Qualitative PCR-based detection of genetically modified soy and maize products in Iran. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 459-469.

Références Bibliographiques

Savini C., Bogni A., Foti N., Mazzara M., Kreysa J.(2012); "Event-specific Method for the Quantification of Maize DAS-40278-9 by Real-time PCR - Validation Report and Protocol - Sampling and DNA Extraction of Maize TC1507". <http://gmocrl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/entry?db=gmometh&id=QT-EVE-ZM-004>

Schilter, B., & Constable, A. (2002). Regulatory control of genetically modified (GM) foods: likely developments. *Toxicology letters*, 127(1-3), 341-349.

Scott, S. E., Inbar, Y., Wirz, C. D., Brossard, D., & Rozin, P. (2018). An overview of attitudes toward genetically engineered food. *Annual Review of Nutrition*. 38(1), 459-479

Secrétariat de la Convention sur la diversité biologique (2000). Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques relatif à la Convention sur la diversité biologique : texte et annexes. Montréal, Secrétariat de la Convention sur la diversité biologique. 30p.

Séralini, G.E., Clair, E., Mesnage, R., Gress, S., Defarge, N., Malatesta, M., Hennequin, D., de Vendomois, J.S., 2012. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup tolerant genetically modified maize. *Food Chem. Toxicol.* 50, 4221-4231. Retraction in: *Food Chem. Toxicol.* 2014; 63:244.

Siegrist, M. (2008). Factors influencing public acceptance of innovative food technologies and products. *Trends in Food Science & Technology*, 19(11), 603-608.

Siipi, H. (2015). Is genetically modified food unnatural?. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 28(5), 807-816.

Singh, O. V., Ghai, S., Paul, D., & Jain, R. K. (2006). Genetically modified crops: success, safety assessment, and public concern. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(5), 598-607.

Smith, D. S., & Maxwell, P. W. (2007). Use of quantitative PCR to evaluate several methods for extracting DNA from corn flour and cornstarch. *Food Control*, 18(3), 236-242.

Smith, D. S., Maxwell, P. W., & De Boer, S. H. (2005). Comparison of several methods for the extraction of DNA from potatoes and potato-derived products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(26), 9848-9859.

Studer, E., Rhyner, C., Lüthy, J., & Hübner, P. (1998). Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-forschung A*, 207(3), 207-213.

Swatkoski, S. J., & Croley, T. R. (2020). Screening of Processed Foods for Transgenic Proteins from Genetically Engineered Plants Using Targeted Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*, 92(4), 3455-3462.

Tabashnik, B. E., Brévault, T., & Carrière, Y. (2013). Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nature biotechnology*, 31(6), 510-521.

Tappeser, B., Reichenbecher, W., & Teichmann, H. (2014). Agronomic and environmental aspects of the cultivation of genetically modified herbicide-resistant plants. A joint paper of BfN (Germany), FOEN (Switzerland) and EAA (Austria). *BfN-Skripten (Bundesamt für Naturschutz)*, (362).

Taverniers, I., Papazova, N., Bertheau, Y., De Loose, M., & Holst-Jensen, A. (2008). Gene stacking in transgenic plants: towards compliance between definitions, terminology, and detection within the EU regulatory framework. *Environmental biosafety research*, 7(4), 197-218.

Taylor, S. L., & Hefle, S. L. (2002). Genetically engineered foods: implications for food allergy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 2(3), 249-252.

Tripathi, L. (2005). Techniques for detecting genetically modified crops and products. *African Journal of Biotechnology*, 4(13).

Tsatsakis, A. M., Nawaz, M. A., Kouretas, D., Balias, G., Savolainen, K., Tutelyan, V. A., ... & Chung, G. (2017) (b). Environmental impacts of genetically modified plants: a review. *Environmental research*, 156, 818-833.

Tsatsakis, A. M., Nawaz, M. A., Tutelyan, V. A., Golokhvast, K. S., Kalantzi, O. I., Chung, D. H., ... & Chung, G. (2017) (a). Impact on environment, ecosystem, diversity and health from culturing and using GMOs as feed and food. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 108-121.

Twardowski, T., & Małyska, A. (2015). Uninformed and disinformed society and the GMO market. *Trends in Biotechnology*, 33(1), 1-3.

Références Bibliographiques

Vigani, M., & Olper, A. (2013). GMO standards, endogenous policy and the market for information. *Food Policy*, 43, 32-43.

Vigani, M., Raimondi, V., & Olper, A. (2009). GMO regulations, international trade and the imperialism of standards. Leuven, LICOS Centre for Institutions and Economic Performance, 29p.

Vijayakumar, K. R., Martin, A., Gowda, L. R., & Prakash, V. (2009). Detection of genetically modified soya and maize: Impact of heat processing. *Food Chemistry*, 117(3), 514-521.

Von Götz, F. (2010). See what you eat—broad GMO screening with microarrays. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 1961-1967.

Weeks, J. T., Ye, J., & Rommens, C. M. (2008). Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic research*, 17(4), 587-597.

Wilson, W. W., DeVuyst, E. A., Taylor, R. D., Koo, W. W., & Dahl, B. L. (2008). Implications of biotech traits with segregation costs and market segments: the case of Roundup Ready® Wheat. *European Review of Agricultural Economics*, 35(1), 51-73.

Wu, Y., Wang, Y., Li, J., Li, W., Zhang, L., Li, Y., ... & Wu, G. (2014). Development of a general method for detection and quantification of the P35S promoter based on assessment of existing methods. *Scientific reports*, 4(1), 1-13.

Yan, S., Zhu, J., Zhu, W., Li, Z., Shelton, A. M., Luo, J., ... & Liu, X. (2015). Pollen-mediated gene flow from transgenic cotton under greenhouse conditions is dependent on different pollinators. *Scientific Reports*, 5(1), 1-9.

Žel, J., Milavec, M., Morisset, D., Plan, D., Van den Eede, G., & Gruden, K. (2012). How to reliably test for GMOs. Boston, MA, Springer, 100 p.

Zhang, D., & Guo, J. (2011). The development and standardization of testing methods for genetically modified organisms and their derived products F. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53(7), 539-551.

Zimmermann, A., Hemmer, W., Liniger, M., Lüthy, J., & Pauli, U. (1998). A sensitive detection method for genetically modified Maisgard™ corn using a nested PCR-system. *LWT-Food Science and Technology*, 31(7-8), 664-667.

Annexes

Annexes

Annexe 1: Les produits alimentaires analysés au cours de ce travail

➤ Les Corneflakes



CF1



CF2



CF3



CF4



CF5



CF6



CF7



CF8



CF9



CF10



CF11



CF12



CF13



CF14



CF15



CF16



CF17



CF18



CF19



CF20



CF21



CF22



CF23



CF24



CF25



CF26

➤ Les Chips :



CC1



CC2



CC3



CC4



CC5



CC6



CC7



CC8



CC9

➤ Les produits Sans gluten



DP1



DP2



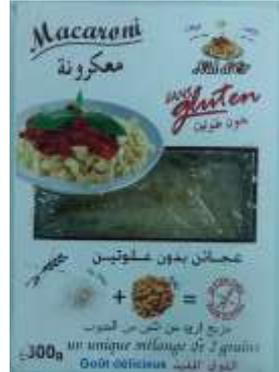
DP3



DP4



DP5



DP6



DP7



DP8



DP9



DP10



DP11



DP12



DP13



DP14



DP15



DP16

Annexes



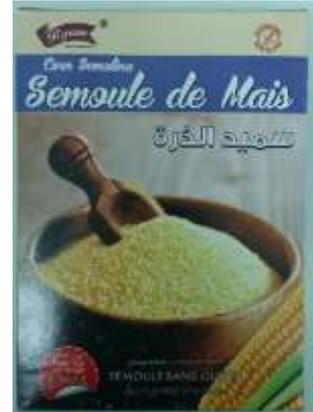
DP17



DP18



DP19



DP20



DP21



DP22



DP23



DP24



DP25



DP26

➤ Les Céréales pour bébés



IC1



IC2



IC3



IC4



IC5



IC6

➤ Les Popcorn



PC1



PC2



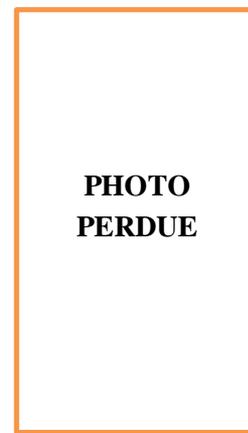
PC3



PC4



PC5



PC6



PC7



PC8

Annexes

➤ Maïs doux



SC1



SC2



SC3



SC4



SC5



SC6



SC7



SC8



SC9



SC10



SC11



SC12



SC13



SC14



SC15



SC16



SC17



SC18



SC19



SC20



SC21



SC22



SC23



SC24



SC25



SC26



SC27



SC28



SC29



SC30



SC31

Annexe 2 : Appareillage

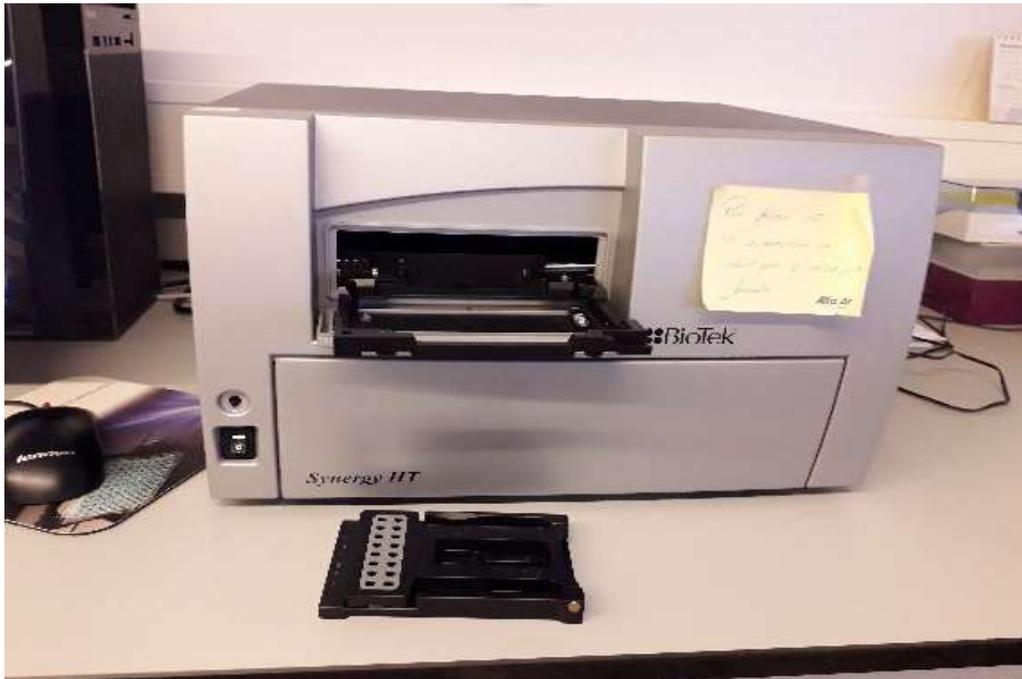


Figure 46 : Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader



Figure 47 : Thermocycleur MJ Mini (Bio-Rad)



Figure 48 : Thermocycleur iCycler (Bio-Rad)



Figure 49 : Système d'imagerie Gel Doc™ EZ imager (Bio-Rad)



Figure 50 : Système de détection par PCR en temps réel CFX96™ (Bio-Rad)

Résumé:

L'objectif de ce travail consistait en l'évaluation de la prévalence d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans les aliments dérivés du maïs commercialisés sur le marché algérien par le moyen de la technique de PCR conventionnelle et de PCR en temps réel et ce à travers trois étapes de base qui sont : le criblage des éléments le plus couramment utilisés dans le processus de transformation génétique, à savoir : le promoteur 35S et le terminateur NOS ; l'identification spécifique ciblant onze événements transgéniques (Bt176, Bt11, MON810, GA21, NK603, MON863, TC1507, MIR604, DAS59122, 3272 et DAS40278) ; et la quantification des événements détectés. Les résultats ont montré que 20% des échantillons amplifiables contiennent du matériel génétiquement modifié. Six différents événements transgéniques ont été identifiés dans 16 échantillons, avec les événements MON810 ; NK603 et TC1507 étant les plus représentés car présents dans 15, 14 et 13 échantillons, respectivement, suivis de GA21 et Bt11 présents dans 7 et 6 échantillons, respectivement et enfin le DAS59122, présent dans deux produits seulement . De plus, la majorité des échantillons se sont révélés contenir plusieurs événements transgéniques à la fois. Les résultats quantitatifs de la PCR en temps réel ont révélé que tous les événements transgéniques détectés sont présents à des niveaux très élevés dans tous les échantillons, avec des teneurs totales en OGM dépassant largement 100% dans le cas de certains échantillons, suggérant la présence d'événements transgéniques à caractères empilés .

Mots clés : OGM, Maïs, PCR , événement transgénique.

Abstract :

The aim of this work was to monitor the prevalence of genetically modified organisms (GMOs) in maize-derived food, commercialised on the Algerian market by means of the conventional PCR and real time-PCR techniques through three basic steps which are: the screening of the most commonly used elements in the genetic transformation process, namely: the 35S promoter and the NOS terminator; event-specific identification targeting eleven transgenic events (Bt176, Bt11, MON810, GA21, NK603, MON863, TC1507, MIR604, DAS59122, 3272 and DAS40278); and the quantification of the detected event. The results showed that 20% of the amplifiable samples contained GM material. The event-specific detection revealed that six different events were identified in 16 samples, with MON810; NK603 and TC1507 being the most frequent as detected in 15, 14 and 13 samples, respectively, followed by GA21 and Bt11 events (present in 7 and 6 products, respectively) and finally DAS59122, present in only in two samples. Moreover, the majority of samples were found to contain multiple transgenic events at the same time. The quantitative real-time PCR showed that all the transgenic events detected are present at very high levels in all the samples, with total GMO contents well exceeding 100% in some samples, suggesting the presence of stacked transgenic events.

Key words: GMO, maize, PCR, transgenic event

ملخص:

يتمثل الهدف من هذه الدراسة في الكشف عن انتشار الكائنات المعدلة وراثيا في الأغذية المشتقة من الذرة المسوقة في الجزائر و ذلك بالاستعانة بوسيلة تفاعل البوليميراز التسلسلي العادي و في الزمن الحقيقي من خلال ثلاث مراحل أساسية و هي الكشف عن العناصر الأكثر استخداما في عملية التحويل الوراثي الا و هي المحفز 35S و المنهي NOS ، الكشف عن إحدى عشر حدثا خاصا للتحويل الجيني (Bt176 و Bt11 و MON810 و GA21 و NK603 و MON863 و TC1507 و MIR604 و DAS59122 و 3272 و DAS40278) و قياس كمية الأحداث المكشوف عنها . أشارت النتائج إلى احتواء 25% من العينات على مواد تعرضت للتعديل الجيني اما في ما يخص الكشف الخاص بأحداث التحويل الجيني فقد تم الكشف عن تواجد ستة أحداث مختلفة في ستة عشر عينة و تعتبر الأحداث MON810 و NK603 و TC1507 الأكثر انتشارا و ذلك لتواجدها في 15 و 14 و 13 منتجا غذائيا على التوالي متبوعا ب GA21 و Bt11 المتواجدين في 7 و 6 منتجات غذائية على التوالي و أخيرا DAS59122 المتواجد في منتجين غذائيين فقط. بالإضافة لذلك فقد اتضح ان اغلبية العينات تحتوي على عدة أحداث للتحويل الجيني في نفس الوقت. اشارت النتائج الكمية لتفاعل البوليميراز في الزمن الحقيقي عن معدلات مرتفعة لجميع أحداث التحويل الجيني المكشوف عنها على مستوى كل العينات حيث تجاوزت القيم الاجمالية الناتجة عن تجميع الأحداث المتعددة 100% في بعض العينات مما يؤدي الى استنتاج وجود أحداث من النوع المرصوص.

الكلمات المفتاح : كائنات معدلة وراثيا ، ذرة ، تفاعل البوليميراز التسلسلي، حدث تحويل جيني.