

La PCR quantitative en temps réel : application à la quantification des OGM

Quantitative PCR in real time: Application to quantification of GMO

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 9, Numéro 6, 468-73, Novembre - Décembre 2002, Fondamental

Auteur(s) : Rémi ALARY, Marie-Françoise GAUTIER, Philippe JOUDRIER, INRA, UMR Génomique Appliquée aux Caractères Agronomiques, 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 01, France.

Author(s) : Rémi ALARY, Marie-Françoise GAUTIER, Philippe JOUDRIER

Résumé : Suite à l'obligation d'étiquetage, au seuil de 1 %, des aliments contenant des OGM autorisés, il est nécessaire de disposer de méthodes fiables de quantification. Pour répondre à cette obligation, la technique de PCR quantitative en temps réel semble actuellement la mieux adaptée. Son principe, ses avantages et sa mise en œuvre pour la détermination de la teneur en OGM de farines de soja sont présentés. Les PCR simplex et duplex sont comparées.

Summary : Because of the GMO food labelling requirement at the threshold of 1%, the availability of reliable quantitative analytical methods is necessary. The real-time quantitative PCR seems to be the most accurate method for GMO quantification. Its principle, advantages and application to the determination of GMO content of soybean flour samples are presented. Simplex and duplex PCRs are compared.

Mots-clés : OGM, soja, PCR quantitative en temps réel, ADN, étiquetage.

Keywords : GMO labelling, GMO quantification, real-time quantitative PCR, soybean, DNA.

ARTICLE

Introduction

Les surfaces cultivées en espèces génétiquement modifiées ont été multipliées par 30 (1,7 à 52,6 millions ha) entre 1996 et 2001 et ont augmenté de 19 % entre 2000 et 2001. La quasi-totalité (99 %) est cultivée dans 4 pays (USA, Argentine, Canada et Chine), dont 68 % aux USA, et concerne essentiellement 4 espèces : le soja (33,3 millions ha), le maïs (9,8 millions ha), le coton (6,8 millions ha) et le colza (2,7 millions ha) [1]. En Europe, la culture des plantes transgéniques est soumise à la directive CE 220/90 [2] et, depuis le 17 octobre 2002, à la directive CE 18/2001 [3]. Moins de 25 000 ha de plantes transgéniques (maïs Bt) y ont été cultivés en 2001.

Suite au règlement relatif aux nouveaux aliments (CE 258/97) [4], les denrées alimentaires contenant des organismes génétiquement modifiés (OGM) ou constituées d'OGM autorisés doivent être

étiquetées comme telles. Le règlement CE 1139/98 [5], qui sert actuellement de guide en matière d'étiquetage dans l'Union européenne, repose sur la présence d'ADN ou de protéines résultant d'une modification génétique. Ces règles d'étiquetage ont été modifiées au début de l'année 2000 par le règlement CE 49/2000 [6] qui fixe un seuil de tolérance de 1 % en cas de présence « fortuite » de matériel issu d'OGM. Les aliments et les ingrédients alimentaires, issus de maïs ou de soja, contenant moins de 1 % de matériel génétiquement modifié (ADN ou protéine) ne sont pas soumis à cet étiquetage. Le règlement CE 50/2000 [7] prévoit en outre des exigences d'étiquetage pour les denrées et ingrédients alimentaires contenant des additifs et des arômes issus d'OGM. Ces deux règlements étaient applicables à partir du 10 avril 2000.

La plupart des méthodes de détection des OGM sont basées sur l'amplification d'une partie spécifique de la construction génique par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les méthodes basées uniquement sur la détection ou l'identification des OGM par PCR ne permettent pas de déterminer le pourcentage de matériel génétiquement modifié dans le produit. Elles ne peuvent donc pas être utilisées pour répondre aux exigences d'étiquetage fixées par les deux règlements précédemment cités. Différentes méthodes ont été développées pour quantifier le pourcentage d'OGM dans les grains, graines et produits dérivés. Certaines sont basées sur l'analyse immunochimique (ELISA) et nécessitent l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de la protéine codée par le transgène [8, 9]. D'autres reposent sur la PCR quantitative compétitive [10] ou la PCR quantitative en temps réel [11-13].

Principe et avantages de la PCR quantitative en temps réel

La technique PCR consiste en une succession de cycles comprenant chacun une étape de dénaturation de l'ADN, une étape d'hybridation de deux amorces spécifiques de la séquence à amplifier, et une étape d'élongation de l'ADN par une ADN polymérase (*figure 1*). En théorie, la production des produits d'amplification (amplicons) est exponentielle (production de 2^n molécules d'ADN après n cycles de PCR). En pratique, on atteint un plateau entre 30 et 40 cycles de PCR parce que certains éléments de la réaction deviennent limitants ou inhibiteurs [14]. Il n'y a donc pas nécessairement proportionnalité entre la quantité d'amplicons produits à l'issue de la PCR et la quantité d'ADN cible de départ, ce qui rend la quantification peu fiable par PCR dite « en point final ».

Principe de la PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel repose sur le même principe que la PCR classique, excepté qu'elle nécessite l'utilisation d'une sonde en plus des deux amorces. La *figure 2* présente le principe de la PCR quantitative en temps réel avec utilisation d'une sonde TaqMan. Une sonde TaqMan est un oligonucléotide complémentaire de l'un des brins de la séquence cible, à laquelle elle s'hybride pendant la phase d'hybridation, de même que les amorces (*figure 2*). Elle porte à son extrémité 5' une molécule fluorescente (fluorochrome) dite « reporter », et à son extrémité 3' un deuxième fluorochrome dit « quencher ». Le « reporter » est une molécule qui, après excitation par un faisceau laser, émet un signal de fluorescence à une longueur d'onde spécifique qui est mesuré à la fin de chaque cycle de PCR. En absence d'amplification, la sonde reste intacte, le fluorochrome « quencher » inhibe en grande partie la fluorescence du « reporter », et seule une fluorescence résiduelle est émise [15]. En revanche, s'il y a amplification, la sonde TaqMan est hydrolysée lors de l'étape d'élongation de l'ADN (activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase, *figure 2*) [16, 17]. Le «

reporter » est alors libéré et sa fluorescence n'est plus inhibée par celle du « quencher ». Pour chaque échantillon, l'émission de fluorescence enregistrée à la fin de chaque cycle de PCR permet de définir une valeur de Ct (cycle threshold ou cycle seuil) correspondant au nombre de cycles de PCR à partir duquel la valeur de l'intensité de fluorescence est significativement différente du bruit de fond. La valeur du Ct est d'autant plus faible que le nombre initial de copies de la séquence cible est grand : elle est inversement proportionnelle au logarithme du nombre initial de copies de la séquence cible dans l'échantillon d'ADN [18].

Avantages de la PCR quantitative en temps réel

Par rapport à la PCR en point final, la PCR quantitative en temps réel présente plusieurs avantages. Le principal est que la détermination des Ct est effectuée à la même intensité de fluorescence, pendant la phase exponentielle, ce qui permet une précision identique pour une gamme dynamique de mesure qui s'étend jusqu'à six ordres de magnitude. Par ailleurs, l'efficacité de la PCR quantitative en temps réel est d'autant meilleure que la taille des amplicons est petite (50-150 pb). Cela permet d'amplifier l'ADN extrait de produits transformés, qui est souvent dégradé (c'est-à-dire composé de fragments de petite taille). Enfin, l'utilisation d'une sonde TaqMan en plus des deux amorces augmente fortement la spécificité des amplicons générés. Les autres avantages de la PCR quantitative en temps réel sont sa rapidité de mise en œuvre (elle ne nécessite pas l'utilisation de standards internes clonés comme la PCR quantitative compétitive) et un risque nul de contaminations post-PCR du fait que les tubes ne sont pas ouverts après amplification. Les risques de contamination pré-PCR par de l'ADN étranger lors des étapes d'extraction et de purification de l'ADN et/ou de préparation des réactions de PCR sont cependant les mêmes que pour la PCR en point final. En revanche, la PCR quantitative en temps réel est très sensible à la présence d'inhibiteurs (polysaccharides, protéines, solvants organiques... co-extraits avec l'ADN) de l'ADN polymérase, ce qui nécessite de veiller à la pureté des ADN extraits.

Application de la PCR quantitative en temps réel à la quantification du soja Roundup-Ready® dans des farines de soja

Cette étude a été réalisée sur deux séries d'échantillons, contenant de 0 à 5 % (p/p farine) de soja transgénique Roundup-Ready® (RR). D'une part, des échantillons, préparés par l'Institute of Reference Materials and Measurements (IRMM) du Joint Research Center à Geel (Belgique), provenaient d'un ring-test (essais inter-laboratoires organisé par le Joint Research Center d'Ispra (Italie) [19, 20]. D'autre part, des échantillons préparés dans notre laboratoire par mélange de farines de soja transgénique et non transgénique directement dans le tube d'extraction de l'ADN. Les PCR ont été réalisées avec un appareil de PCR quantitative ABI Prism® 7700 (Applied Biosystems). Pour le détail des conditions de PCR et l'ensemble des résultats voir Alary et *al.* [13].

Choix des gènes cibles

Pour quantifier l'ADN total de soja, il est nécessaire d'amplifier un gène de référence caractéristique de l'espèce : nous avons choisi d'amplifier un fragment (80 pb) d'un gène codant une lectine [21]. Pour quantifier l'ADN provenant uniquement du soja RR, nous avons utilisé un fragment (79 pb) du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur [22] (promoteur utilisé dans la construction génétique du soja RR et présent dans la plupart des OGM autorisés).

PCR simplex versus PCR duplex

La PCR quantitative en temps réel peut être réalisée en simplex (amplification d'une seule cible) ou en duplex (amplification de 2 cibles différentes en une seule réaction PCR). Cette dernière élimine les variations dues aux erreurs de pipetage puisque les 2 PCR ont lieu simultanément dans le même tube. Elle est également plus économique. Cependant, son optimisation est plus délicate car il faut vérifier que l'efficacité des 2 PCR est comparable.

En PCR duplex, les sondes sont marquées avec deux fluorochromes « reporter » différents pour différencier les deux profils d'amplification : la sonde TaqMan spécifique de l'espèce (lectine) est marquée avec le fluorochrome VIC™ (Applied Biosystems), et la sonde spécifique du transgène (35S) avec le fluorochrome FAM (6-carboxy-fluorescein), dont le spectre d'émission est différent de celui de VIC. À leur extrémité 3', les deux sondes sont marquées avec le fluorochrome « quencher » TAMRA (6-carboxyl-tetramethyl-rhodamine).

Qualité de l'ADN

L'amplification de l'ADN par PCR est largement conditionnée par la qualité de ce dernier. La taille moyenne des fragments qui le compose doit être supérieure à celle des fragments que l'on souhaite amplifier. L'ADN extrait des échantillons ring-test est sensiblement plus dégradé que celui extrait à partir des échantillons préparés dans notre laboratoire (*figure 3*). L'ADN des deux séries d'échantillons a été extrait par la même technique (colonne échangeuse d'ions). Ces résultats ont été confirmés en utilisant une autre technique d'extraction (méthode au cethyl trimethyl ammonium bromide ou CTAB) pour les échantillons ring-test, ce qui indique que la dégradation de l'ADN n'est pas due à la technique d'extraction utilisée mais à la préparation du matériel végétal. Les échantillons ring-test ont en effet subi des traitements de congélation/lyophilisation, plusieurs broyages, et ils ont été conservés plusieurs mois à 4 °C [19, 20], alors que les échantillons laboratoire provenaient de farines fraîchement préparées. Cependant, ce critère de taille n'est pas suffisant pour caractériser complètement la qualité de l'ADN extrait : il est nécessaire de vérifier qu'il ne contient pas d'inhibiteurs de l'ADN polymérase. Bien qu'en théorie l'extraction d'ADN à partir de grains ou de graines ne présente pas de difficultés majeures, ce dernier peut contenir des polysaccharides, protéines, polyphénols ou sels qui sont des inhibiteurs potentiels de la PCR.

Détermination du pourcentage d'OGM

La détermination du pourcentage d'OGM d'un échantillon inconnu est réalisée en se référant à une droite d'étalonnage établie à partir de standards de teneur connue en OGM. Pour la PCR simplex, la gamme étalon a été obtenue en faisant des dilutions successives de l'ADN extrait d'un échantillon référence de soja à 2 % d'OGM (IRMM de Geel, Belgique). Pour la PCR duplex, elle a été obtenue par dilution de l'ADN extrait à partir de farine de soja contenant 1 % de soja RR. La concentration en ADN des extraits servant à établir les droites d'étalonnage a été déterminée par spectrofluorimétrie en présence de picogreen (Molecular Probes). À partir des droites d'étalonnage et des valeurs de Ct des échantillons inconnus, le logiciel (S.D.S 1.6.3) détermine le nombre de cibles du gène lectine (fonction de la quantité totale d'ADN de soja) ou le nombre de cibles du promoteur 35S (fonction de la quantité d'ADN de soja RR) qui étaient présentes dans la réaction de PCR. Le pourcentage de soja RR contenu dans l'échantillon est exprimé par le rapport : nombre de cibles du promoteur 35S/nombre de cibles du gène de lectine. Cette correspondance nombre de cibles/quantité d'ADN

n'est vraie que si le nombre de copies du gène de lectine et du promoteur 35S provenant du transgène est identique. Pour cela, nous avons vérifié, pour une même quantité d'ADN de soja RR, que les valeurs de Ct des deux PCR (lectine et 35S) étaient bien identiques et donc le nombre de cibles des deux gènes.

Optimisation de la PCR duplex

Afin d'éviter au maximum une compétition entre l'amplification du gène de référence (lectine) et celle du transgène (35S), il est nécessaire d'optimiser la concentration des deux couples d'amorces utilisés simultanément. L'amplification du gène de référence nécessite une concentration plus faible d'amorces que l'amplification du transgène, pour lequel le nombre de cibles est moindre. La concentration des amorces a été optimisée en déterminant expérimentalement le couple de concentrations pour lequel la valeur du DELTACT = Ct (amplification 35S) - Ct (amplification lectine) est la plus proche du DELTACT théorique (*figure 4*). L'optimisation a été faite à partir de 100 ng d'ADN extrait de l'échantillon de soja à 1 % d'OGM préparé au laboratoire : la quantité d'ADN provenant du soja RR est de 1 ng, et le DELTACT théorique de 6,64. Le couple de concentrations retenu (200 nM pour les amorces 35S et 150 nM pour les amorces lectine) a été validé en déterminant l'efficacité des deux PCR. L'efficacité calculée selon l'équation : efficacité de la PCR = $[10^{1/\text{pente}} - 1] \times 100$, où le terme « pente » correspond à la pente des droites de régression obtenues sur la gamme d'étalonnage (*figure 5*) est de 95,6 % pour l'amplification du gène de lectine et de 93,1 % pour celle du 35S. Comme illustré pour les échantillons de soja à 0,1 % et 1 % d'OGM, préparés au laboratoire, les profils d'amplification se superposent parfaitement lors de la phase exponentielle alors que ce n'est plus le cas lors de la phase plateau (*figure 6*).

Comparaison de la teneur en soja RR mesurée par PCR en temps réel simplex ou duplex

Pour les échantillons du ring-test, les résultats obtenus par PCR simplex sont proches des valeurs théoriques, sauf pour l'échantillon à 1 % d'OGM (*tableau 1*). Les valeurs obtenues en PCR duplex sont également proches des valeurs théoriques, excepté pour les échantillons à 0,5 et 2 % d'OGM. Pour les échantillons préparés dans notre laboratoire, le pourcentage d'OGM déterminé par PCR duplex est conforme à la valeur théorique, dans une plage de variation de ± 25 %, sauf pour l'échantillon à 0,1 % d'OGM, pour lequel la variation est plus importante.

Les résultats différents obtenus entre les PCR simplex et duplex pour les échantillons ring-test sont probablement dus à la qualité de l'ADN extrait. En effet, les PCR simplex ont été réalisées à partir d'ADN extrait par une technique utilisant du cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), alors que pour les PCR duplex, l'ADN a été purifié sur colonne échangeuse d'ions. La purification sur colonne échangeuse d'ions des échantillons de soja semble plus délicate et moins reproductible que la méthode au CTAB. Contrairement au maïs, le soja contient beaucoup de polysaccharides chargés positivement, qui peuvent se fixer sur la résine échangeuse d'anions [23]. Cela perturbe l'écoulement du liquide par gravité et nécessite l'application d'une pression positive au sommet de la colonne pour faciliter l'écoulement. Cette étape est difficile à normaliser. De plus, certains polysaccharides fixés sur la résine sont probablement élués en même temps que l'ADN. La présence éventuelle d'inhibiteurs de l'ADN polymérase dans ces échantillons pourrait affecter préférentiellement l'une ou l'autre des amplifications (35S ou lectine). Les pourcentages déterminés expérimentalement étant le plus souvent inférieurs aux pourcentages théoriques (*tableau*), il semblerait que les inhibiteurs affectent davantage l'amplification du transgène, dont le nombre de cibles est très nettement

inférieur à celui du gène de lectine. L'ADN extrait et purifié par la même technique (colonne échangeuse d'ions) à partir des échantillons préparés dans notre laboratoire ne semble pas contenir d'inhibiteurs de PCR (efficacités proches de 100 %). La différence de préparation des échantillons ring-test et laboratoire explique certainement les différences observées au niveau de la qualité de l'ADN extrait.

Quel que soit le type de PCR (simplex ou duplex) mis en œuvre, les échantillons ne contenant pas d'OGM sont bien évalués comme tels, ce qui est important dans le cadre de transactions commerciales. Pour les échantillons dont la teneur en OGM est de l'ordre de 0,1 %, le faible nombre de cibles provenant du transgène est un paramètre important à prendre en compte. Pour une détermination précise, il est recommandé de disposer d'environ 100 copies et au minimum de 20 copies de la séquence cible dans le milieu réactionnel. En dessous de ce nombre, la probabilité que des répétitions contiennent le même nombre de copies est trop faible, à cause d'un manque de répartition homogène des séquences cibles dans l'extrait d'ADN [24]. Quel que soit l'échantillon, nous avons travaillé à volume constant d'ADN, par conséquent pour les ADN extraits d'échantillons contenant une faible teneur en OGM (0,1 %), le nombre de cibles 35S était seulement de 50 pour la PCR duplex (ADN purifié sur colonne échangeuse d'ions) donc en dessous de la valeur souhaitable de 100 copies alors qu'il était de 150 pour la PCR simplex (ADN extrait au CTAB).

Reçu le 19/09/02

Accepté le 10/12/02

CONCLUSION

Il ressort de cette étude que la PCR quantitative en temps réel, simplex ou duplex, permet de déterminer le pourcentage d'OGM d'un échantillon inconnu. Le protocole d'extraction et de purification de l'ADN doit être adapté à la nature des échantillons à analyser. De plus, la préparation et la conservation des échantillons utilisés comme standards sont également un point important à prendre en considération.

Malgré ses avantages, la PCR duplex est plus délicate à optimiser, et elle semble être plus sensible à la présence d'inhibiteurs. Pour utiliser cette technique, il faut donc trouver un compromis entre deux paramètres antagonistes : le volume d'ADN, que l'on souhaite aussi faible que possible pour limiter la concentration d'inhibiteurs pouvant affecter l'efficacité de la PCR, et le nombre de cibles du transgène, que l'on souhaite au moins égal à 20. D'une façon générale, plus les produits sont transformés, moins la qualité et la quantité de l'ADN extrait sont bonnes, et plus la présence d'inhibiteurs risque d'être élevée. Ce point peut être crucial pour l'analyse de produits ayant subi des procédés complexes de transformation.

REFERENCES

1. JAMES C (2001). Global review of commercialized transgenic crops: *ISAAA briefs* N° 24, ISAAA Ithaca, NY, 20 pp.
2. DIRECTIVE 90/220/EEC of the Council of the European Communities of 23 April 2000 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms. Official Journal of the European Communities, N° L 117, 8/05/1990, p. 15.

3. DIRECTIVE 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. Official Journal of the European Communities, N° L 106, 17/04/2001, p. 1-38.
4. REGULATION (EC) N° 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. Official Journal of the European Communities, N° L 43, 14/02/1997, p. 1-5.
5. REGULATION (EC) N° 1139/98 of the Council of the European Union of 26 May 1998 concerning the compulsory indication of the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC. Official Journal of the European Communities, N° L 159, 03/06/1998, p. 4-7.
6. REGULATION (EC) N° 49/2000 of the Commission of the European Communities of 10 January 2000 amending Council Regulation (EC) N° 1139/98 concerning the compulsory indication of the labelling of certain foodstuffs produced from genetically modified organisms of particulars other than those provided for in Directive 79/112/EEC. Official Journal of the European Communities, N° L 6, 11/01/2000, p. 13-4.
7. REGULATION (EC) N° 50/2000 of the Commission of the European Communities of 10 January 2000 on the labelling of foodstuffs and food ingredients containing additives and flavourings that have been genetically modified or have been produced from genetically modified organisms. Official Journal of the European Communities, N° L 6, 11/01/2000, p. 15-7.
8. STAVE JW (1999). Detection of the new or modified proteins in novel foods derived from GMO-future needs. *Food Control*, 10 : 367-74.
9. LIPP M, ANKLAM E, STAVE JW (2000). Validation of an immunoassay for detection and quantification of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: interlaboratory study. *J AOAC Int*, 83 : 919-27.
10. STUDER E, RHYNER C, LÜTHY J, HÜBNER P (1998). Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. *Z Lebensm Unters Forsch, A*, 207 : 207-13.
11. WURZ A, BLUTH A, ZELTZ C, PFEIFER C, WILLMUND R (1999). Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. *Food Control*, 10 : 385-9.
12. VAITILINGOM M, PIJNENBURG H, GENDRE F, BRIGNON P (1999). Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods. *J Agric Food Chem*, 47 : 5261-6.
13. ALARY R, SERIN A, MAURY D, *et al.* (2002). Comparison of simplex and duplex real-time PCR for the quantification of GMO in maize and soybean. *Food Control*, 13 : 235-44.
14. AHMED FE (1995). Application of molecular biology to biomedecine and toxicology. *J Environ Sci Health, C11* : 1-51.

15. FÖRSTER VTH (1948). Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annals of Physics* (Leipzig), 2 : 55-75.
16. HOLLAND PM, ABRAMSON RD, WATSON R, GELFAND DH (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 : 7276-80.
17. HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6 : 986-94.
18. HIGUCHI R, FOCKLER C, DOLLINGER G, WATSON R (1993). Kinetic PCR analysis. Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technol*, 11 : 1026-30.
19. 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. *J AOAC Int*, 82 : 923-8.
20. LIPP M, ANKLAM E, STAVE JW (2000). Validation of an immunoassay for detection and quantification of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: interlaboratory study. *J AOAC Int*, 83 : 919-27.
21. VODKIN LO, RHODES PR, GOLDBERG RB (1983). cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. *Cell*, 34 : 1023-31.
22. FRANCK A, GUILLEY H, JONARD G, RICHARDS K, HIRTH L (1980). Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*, 21 : 285-94.
23. BRILLOUET JM, CARRE B (1983). Composition of cell walls from cotyledons of *Pisum sativum*, *Vicia faba* and *Glycine max*. *Phytochemistry*, 22 : 481-7.
24. KAY S, VAN DEN EEDE G (2001). The limits of GMO detection. *Nature Biotech*, 19 : 405.

Illustrations

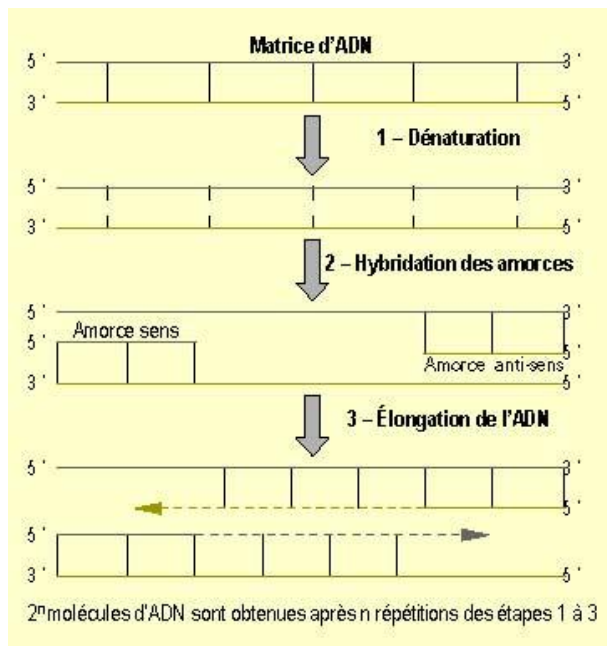


Figure 1. Principe de la PCR (réaction de polymérisation en chaîne).

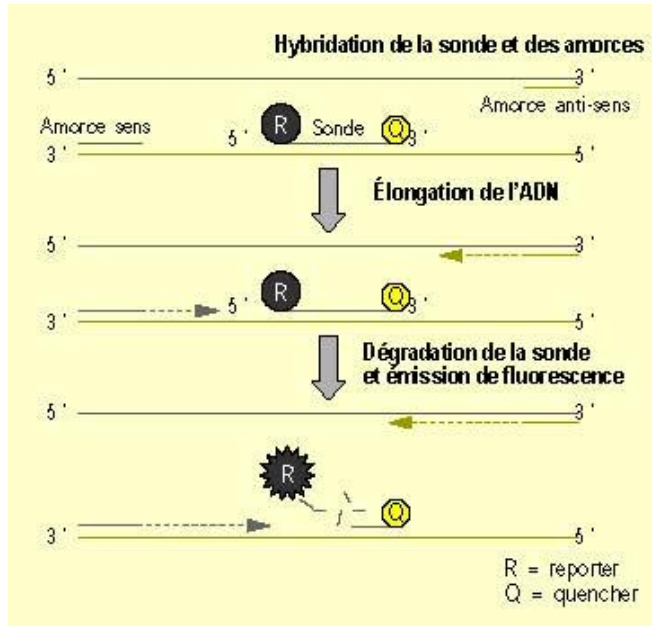


Figure 2. Principe de la PCR quantitative en temps réel avec sonde TaqMan.

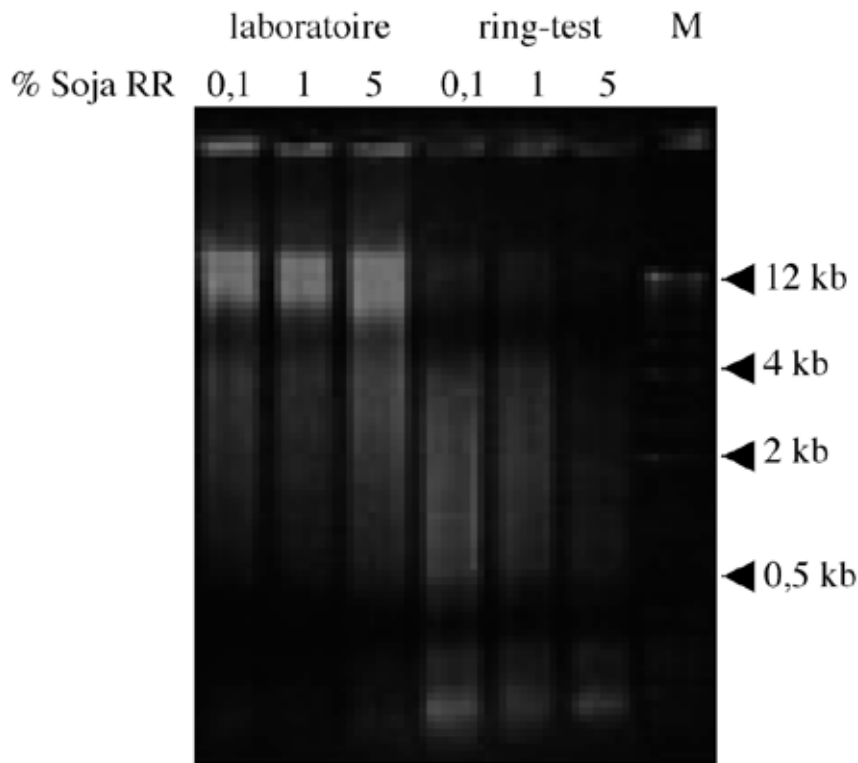


Figure 3. Qualité de l'ADN génomique extrait de farines de soja contenant 0,1, 1 ou 5 % de soja RR. L'ADN des échantillons préparés au laboratoire et des échantillons du ring-test a été extrait sur colonne échangeuse d'ions. M. Marqueurs de taille 1 kb (Life Biotechnologies).

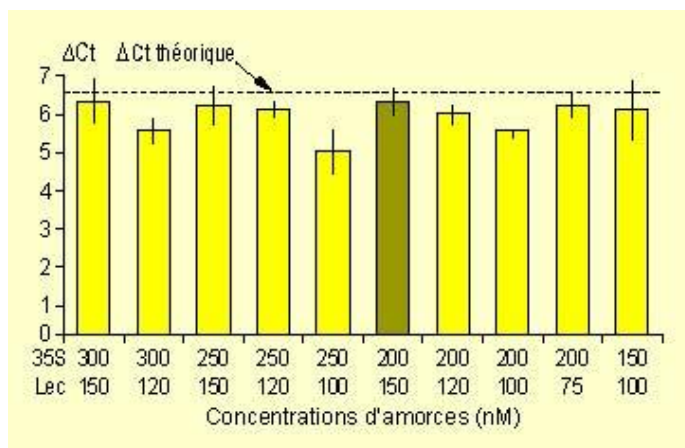


Figure 4. PCR duplex en temps réel : optimisation de la concentration en amorces effectuée sur l'échantillon de soja à 1 % d'OGM préparé au laboratoire. Les données correspondent à la valeur moyenne de trois mesures et les barres verticales représentent l'écart-type.

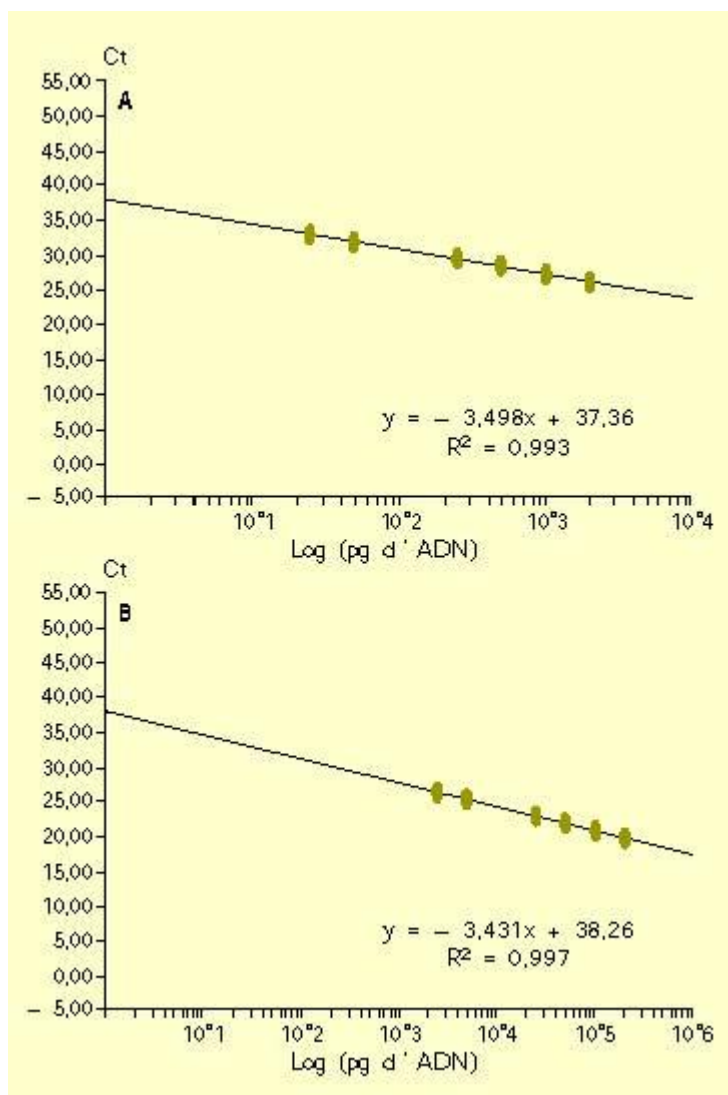


Figure 5. PCR duplex en temps réel : droites d'étalonnage obtenues avec l'échantillon de soja à 1 % d'OGM préparé au laboratoire. A. Amplification du transgène (200 nM amorces 35S, 200 nM sonde 35S). B. Amplification du gène de référence (150 nM amorces lectine, 200 nM sonde lectine). L'ADN transgénique est compris entre 0,025 et 2 ng (A), et l'ADN total entre 2.5 et 200 ng (B). Chaque détermination est effectuée en triplicata.

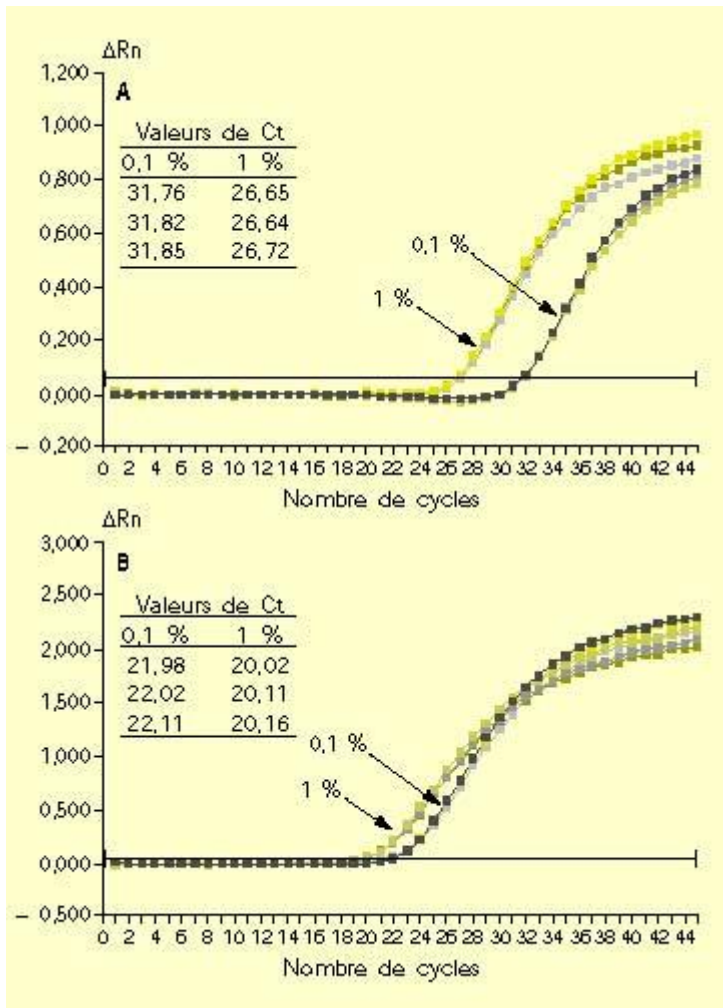


Figure 6. PCR duplex en temps réel : courbes d'amplification obtenues sur l'ADN extrait des échantillons de soja à 0,1 et 1 % d'OGM préparés au laboratoire. A. Amplification du transgène (200 nM amorces 35S, 200 nM sonde 35S). B. Amplification du gène de référence (150 nM amorces lectine, 200 nM sonde lectine). Chaque amplification est réalisée en triplicata. Le deltaRn correspond au signal du « reporter » normalisé soustrait du signal de la ligne de base établie dans les premiers cycles de PCR.

Tableau. Détermination par PCR quantitative en temps réel simplex ou duplex de la teneur en OGM de farines de soja. Les valeurs moyennes ont été déterminées sur trois mesures à partir d'échantillons ring-test et préparés au laboratoire.

OGM	% ring-test		% la boratoire			
	simplex		duplex		duplex	
	moyenne		moyenne		moyenne	
0	0		0,01		0	
	0	0	0,01	0,01	0	0
	0		0,01		0	
0,1	0,100		0,044		0,14	
	0,106	0,1	0,038	0,04	0,19	0,17
	0,094		0,038		0,18	
0,5	0,56		0,15		0,36	
	0,54	0,56	0,20	0,19	0,36	0,36
	0,59		0,23		0,35	
0,8					0,60	
					0,61	0,61
					0,61	
1,0	1,50		0,94		0,93	
	1,60	1,63	0,94	0,96	0,77	0,84
	1,80		1,00		0,83	
1,2					1,10	
					1,04	1,14
					1,28	
1,5					1,45	
					1,66	1,67
					1,91	
2,0	2,10		1,00		1,86	
	1,81	1,87	1,07	1,10	1,75	1,88
	1,70		1,25		2,02	
5,0	5,85		5,44			
	5,45	5,73	5,55	5,25		
	5,90		4,78			