
**Produits alimentaires — Méthodes
d'analyse pour la détection
des organismes génétiquement modifiés
et des produits dérivés — Méthodes
quantitatives basées sur l'utilisation
des acides nucléiques**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically
modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid
based methods*

ISO 21570:2005

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-
c7af4ed48713/iso-21570-2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005)



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21570:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005>

© ISO 2005

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Version française parue en 2006

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	v
Introduction	vi
1 Domaine d'application.....	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions.....	1
4 Principe.....	2
4.1 Généralités	2
4.2 Amplification, détection et confirmation des produits PCR.....	2
4.3 Quantification des produits PCR	2
5 Réactifs	2
6 Appareillage et équipements.....	2
7 Lignes directrices relatives au mode opératoire.....	3
7.1 Généralités	3
7.2 Stabilité de la séquence cible.....	3
7.3 Étalonnage de l'analyse.....	3
7.4 Considérations relatives à la quantification	3
7.5 Exigences relatives à l'assurance qualité.....	4
8 Interprétation.....	4
9 Expression des résultats.....	5
10 Rapport d'essai	5
Annexe A (informative) Méthodes spécifiques du taxon cible	6
A.1 Méthode spécifique du taxon cible pour la quantification absolue de l'ADN du gène <i>adh1</i> du maïs par PCR en temps réel.....	6
Annexe B (informative) Méthodes de criblage	13
B.1 Méthode de criblage pour la quantification relative de l'ADN du promoteur 35S de la lignée de soja GTS 40-3-2 par PCR en temps réel.....	13
Annexe C (informative) Méthodes construit-spécifiques du gène.....	21
C.1 Méthode construit-spécifique du gène pour la quantification de l'ADN de la lignée de soja GTS 40-3-2 par PCR en temps réel (Méthode 1)	21
C.2 Méthode construit-spécifique du gène pour la quantification de l'ADN de la lignée de soja GTS 40-3-2 par PCR en temps réel (Méthode 2)	28
C.3 Méthode construit-spécifique du gène pour la quantification de l'ADN de maïs Événement176 par PCR en temps réel	36
C.4 Méthode construit-spécifique du gène pour la quantification de l'ADN de la lignée de soja GTS 40-3-2 par PCR en temps réel.....	43
C.5 Méthode construit-spécifique du gène pour la quantification de l'ADN de la lignée de maïs MON 810 par PCR en temps réel.....	52
C.6 Méthode construit-spécifique du gène pour la quantification de l'ADN de la lignée de maïs Événement176 par PCR en temps réel	60
C.7 Méthode construit-spécifique du gène pour la quantification de l'ADN de la lignée de maïs Bt11 par PCR en temps réel.....	68
C.8 Méthode construit-spécifique du gène pour la quantification de l'ADN de la lignée de maïs GA21 par PCR en temps réel	76
C.9 Méthode construit-spécifique du gène pour la quantification de l'ADN de la lignée de maïs T25 par PCR en temps réel	84

Annexe D (informative) Méthodes événement-spécifiques.....	93
D.1 Méthode événement-spécifique pour la quantification absolue et relative de l'ADN de la lignée de maïs Bt11 par PCR en temps réel.....	93
D.2 Méthode événement-spécifique pour la quantification relative de l'ADN de la lignée de maïs MON 810 par PCR en temps réel.....	100
Bibliographie	107

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21570:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005>

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 21570 a été élaborée par le Comité européen de normalisation (CEN), le comité technique CEN/TC 275, *Analyse des produits alimentaires — Méthodes horizontales*, en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, conformément à l'Accord sur la coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

[ISO 21570:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005>

Introduction

La recherche d'ingrédients d'origine génétiquement modifiée est réalisée au moyen des étapes successives (ou simultanées) suivantes. Après la collecte d'échantillons, des acides nucléiques sont extraits de la prise d'essai. Les acides nucléiques extraits peuvent faire l'objet d'une purification plus poussée au cours du processus d'extraction ou une fois ce dernier achevé. Ensuite, ils sont quantifiés (si besoin est), dilués (si besoin est) et soumis à des modes opératoires analytiques (comme la PCR). Ces étapes sont décrites en détail dans la présente Norme internationale et dans les Normes internationales suivantes:

ISO 21569, *Produits alimentaires — Méthode d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Méthodes qualitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques*

ISO 21570, *Produits alimentaires — Méthode d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Méthodes quantitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques*

D'autres informations concernant les définitions et les aspects généraux évoqués dans les étapes ci-avant sont réunies dans:

ISO 24276, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Exigences générales et définitions*

L'Organisation internationale de normalisation (ISO) attire l'attention sur le fait que la conformité avec le présent document peut impliquer l'utilisation d'un brevet relatif à la technologie PCR.

L'ISO ne prend pas position en ce qui concerne la preuve, la validité et le domaine d'application du droit de propriété industrielle concerné.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-7a8fed48713/iso-21570-2005>

L'ISO a été informée qu'Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc. et Hoffman-La Roche détiennent des droits de propriété industrielle relatifs à la technologie PCR. Ces sociétés ont garanti à l'ISO qu'elles souhaitent négocier des licences à des conditions raisonnables et non discriminatoires avec les demandeurs du monde entier. À cet égard, les déclarations des détenteurs de ces droits de propriété industrielle sont enregistrées auprès de l'ISO. Il est possible d'obtenir des informations aux adresses suivantes:

Licensing Department
Applied Biosystems
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404,
États-Unis

et

Roche Molecular Systems, Inc.
Licensing Department
1145 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501,
États-Unis

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété industrielle ou de droits analogues autres que ceux identifiés ci-avant. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Méthodes quantitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale fournit un cadre général auquel doit satisfaire toute méthode quantitative de détection des organismes génétiquement modifiés (OGM) dans les produits alimentaires utilisant la PCR (réaction de polymérisation en chaîne).

Elle définit les exigences générales relatives à l'amplification spécifique de séquences cibles d'ADN, afin de quantifier la teneur relative en ADN dérivé d'OGM et de confirmer l'identité de la séquence d'ADN amplifiée.

Les lignes directrices, les exigences minimales et les critères de performance exposés dans la présente Norme internationale ont pour but de garantir l'obtention de résultats comparables, exacts et reproductibles, dans différents laboratoires.

La présente Norme internationale a été élaborée pour les matrices de produits alimentaires, mais elle est aussi applicable à d'autres matrices, par exemple des aliments pour animaux et des échantillons de plantes issus de l'environnement.

ISO 21570:2005

Des exemples de méthodes spécifiques figurent dans les Annexes A à D.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence (y compris les éventuels amendements) s'applique.

ISO 21569:2005, *Produits alimentaires — Méthode d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Méthodes qualitatives basées sur l'utilisation des acides nucléiques*

ISO 21571, *Produits alimentaires — Méthode d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Extraction des acides nucléiques*

ISO 24276:—¹⁾, *Produits alimentaires — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Exigences générales et définitions*

ISO Guide 32, *Étalonnage en chimie analytique et utilisation de matériaux de référence certifiés*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 24276 s'appliquent.

1) Paru depuis la publication de la version anglaise du présent document.

4 Principe

4.1 Généralités

Une analyse quantitative consiste à dénombrer les séquences d'ADN cibles dans les échantillons pour essai. Chaque méthode spécifie la ou les séquence(s) cible(s).

Cette quantification peut être réalisée en utilisant une PCR compétitive [1], [2] ou en temps réel [3], [4].

Il convient qu'une analyse quantitative indique clairement la quantité de l'élément génétique cible, rapportée à la quantité d'une référence spécifique, de matériaux pour l'étalonnage et de témoins appropriés et qu'elle soit comprise dans les limites de la plage dynamique de la méthode analytique utilisée et de la prise d'essai analysée.

L'analyse comprend généralement

- l'amplification d'une ou de plusieurs séquences cibles spécifiques,
- la détection et la confirmation de la spécificité du ou des produit(s) PCR et
- la quantification des fragments amplifiés par rapport aux matériaux pour l'étalonnage.

NOTE Dans les analyses par PCR en temps réel, l'amplification, la détection et la confirmation sont simultanées.

4.2 Amplification, détection et confirmation des produits PCR

Pour les principes d'amplification, de détection et de confirmation des séquences d'ADN, se référer à l'ISO 21569.

4.3 Quantification des produits PCR

Le principe de la quantification consiste généralement à déterminer le rapport (exprimé en pourcentage) de deux séquences d'ADN cibles, l'une représentant l'organisme génétiquement modifié visé et l'autre étant spécifique (endogène) du taxon ciblé. Cependant, dans certains cas, la quantification peut également être rapportée à une quantité spécifiée de matrice de produit alimentaire (par exemple lors de la détection de micro-organismes génétiquement modifiés dans les produits alimentaires).

Il convient de relier les matériaux pour l'étalonnage utilisés pour la quantification à des matériaux de référence certifiés (MRC), quand ceux-ci sont disponibles. Si ce n'est pas le cas, il convient d'utiliser d'autres matériaux de référence appropriés. Voir l'exemple fourni dans la Référence [5]. Les informations relatives aux études de validation et à l'incertitude de mesure ont été rassemblées dans le cadre d'études internationales [6], [7], [8], [9].

5 Réactifs

Il convient que tous les réactifs et matériaux utilisés dans l'analyse soient identiques ou équivalents à ceux spécifiés dans la méthode. En l'absence de spécification, il convient que tous les réactifs et matériaux soient de qualité «biologie moléculaire». Ces réactifs doivent être conservés et utilisés selon les recommandations du fournisseur ou conformément aux spécifications d'assurance qualité du laboratoire. Une liste des réactifs est donnée dans une annexe spécifique.

6 Appareillage et équipements

Voir les Annexes A à D et l'ISO 24276.

7 Lignes directrices relatives au mode opératoire

7.1 Généralités

Les principes généraux concernant l'amplification par PCR pour la détection des OGM sont décrits dans l'ISO 21569.

Les Annexes A à D spécifient les méthodes de détection PCR ainsi que les détails de leur domaine d'application. Les caractéristiques de performance démontrées pour chaque méthode sont exposées en détail.

Il convient que la concentration de la séquence d'ADN visée soit comprise dans les limites de la plage dynamique de la méthode.

NOTE Une séquence de surveillance spécifique du taxon cible peut être réalisée pour déterminer si la matrice d'ADN est de qualité (longueur et intégrité structurale), de pureté et de quantité suffisantes pour permettre la détection et la quantification d'un OGM appartenant au taxon cible. Cela peut se révéler particulièrement important lorsque l'ADN est extrait de matrices composites ou très transformées.

Il convient de répéter au moins une fois les analyses de l'ADN extrait de chaque prise d'essai.

Des témoins appropriés doivent être inclus (voir l'ISO 24276, Tableau 1).

7.2 Stabilité de la séquence cible

Si des cultivars d'origines géographiques et phylogénétiques différentes sont utilisés, il convient de prendre en compte l'invariance en nombre de copies et l'invariance allélique des séquences cibles.

7.3 Étalonnage de l'analyse

Pour couvrir la plage de quantification, on doit utiliser un nombre approprié de points d'étalonnage et de répétitions [par exemple quatre points d'étalonnage avec deux répétitions (au total 4×2 valeurs) ou six points d'étalonnage avec un mesurage à chaque point (au total 6 valeurs)]. La qualité de l'étalonnage a un impact direct sur l'incertitude de mesure [9].

Pour remplacer les matériaux de référence pour l'étalonnage d'ADN génomique, il est possible d'utiliser, par exemple, une série de dilutions d'un ADNdb plasmidique ou synthétique contenant la séquence cible, à condition de démontrer que la méthode d'action de la série est équivalente à celle du matériau de référence d'ADN génomique ou de l'ADN génomique prélevé sur l'échantillon.

7.4 Considérations relatives à la quantification

Il convient de concevoir les méthodes PCR de manière à réduire le plus possible la variabilité.

NOTE Selon la méthode utilisée et/ou le matériau analysé, la présence d'un empilage de gènes peut mener à une surévaluation de la teneur réelle en OGM.

Pour la détermination de la limite de quantification (LQ), se référer à l'ISO 24276.

L'homozygosité et l'hétérozygosité de l'espèce étudiée a un impact direct sur le calcul de la teneur en OGM basé sur les nombres de copies des séquences cibles par génome haploïde. Pour plus de détails, voir les Annexes A à D.

L'utilisation de la méthode $\Delta\Delta C_t$ (du cycle seuil) est valable uniquement si les rendements d'amplification du dosage cible spécifique du taxon et du dosage d'OGM spécifique sont fortement similaires.

7.5 Exigences relatives à l'assurance qualité

Pour obtenir des estimations fiables des quantités de séquences cibles, il est souhaitable que les mesurages soient cohérents. Cependant, pour déterminer la cohérence des mesurages (pour plus de détails, voir l'ISO 5725), l'écart-type relatif de répétabilité de la méthode doit être connu. Pour calculer l'écart-type relatif de répétabilité, le nombre de mesurages distincts par échantillon de laboratoire peut dépasser ce qui est réalisable dans la pratique en termes de coûts acceptables. En conséquence, si un ADN dérivé d'OGM spécifié doit être consigné (en pour-cent), il convient de prendre en compte les exigences minimales suivantes pour trouver une solution réaliste:

- a) dans la cohérence de la prise d'essai:
 - les mesurages < LQ doivent être rejetés; et
 - l'écart maximal observé entre les dilutions et les mesurages individuels doit être égal à la valeur attendue du facteur de dilution correspondant ± 33 %;
- b) entre la cohérence de la prise d'essai:
 - il convient que les concentrations relatives estimées d'ADN dérivé d'OGM obtenues en a) pour chaque prise d'essai ne présentent pas de valeurs supérieures à -50 % ou à $+100$ % de la quantité estimée (égale à un ΔC_t de 1 dans la PCR en temps réel) (en d'autres termes, pour deux prises d'essai, des mesurages de 1,0 % et de 2,0 % sont acceptables alors que des mesurages de 0,9 % et de 2,1 % ne le sont pas).

Afin de garantir l'exactitude des mesurages, un matériau de référence (MR), de préférence certifié (MRC) pour la quantité de l'événement concerné avec un niveau approprié de fiabilité métrologique et une similarité raisonnable de matrice doit être sélectionné et analysé. En l'absence d'un MRC, il est possible de préparer un MR validé en laboratoire par le biais d'un mode opératoire ayant démontré sa stabilité, son homogénéité et sa traçabilité et garantissant l'absence de biais. L'incertitude quantifiée doit satisfaire l'incertitude requise pour l'étalonnage (voir ISO Guide 32).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005>

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005>

8 Interprétation

Le résultat de la PCR sera

- a) adapté à la quantification de la séquence cible, à condition que
 - le résultat soit positif conformément au paragraphe 8.1 de l'ISO 21569:2005,
 - l'inhibition observable de la réaction soit négligeable,
 - l'analyse produise une valeur de mesurage sans ambiguïté,
 - la teneur de la séquence cible soit comprise dans les limites de la plage dynamique de la méthode, et que
 - l'analyse soit étalonnée de façon acceptable (voir en 7.3), ou
- b) ne sera pas adapté à la quantification de la séquence cible si l'une quelconque des conditions énumérées ci-avant n'est pas satisfaite.

L'incertitude de mesure doit être suffisamment faible pour que le laboratoire puisse tirer les conclusions appropriées.

Le mesurage des quantités d'ADN cibles est décrit dans les Annexes A à D. Ces quantités peuvent être utilisées pour calculer la teneur en OGM. Ces calculs tiennent généralement compte des facteurs biologiques pertinents comme l'homozygoté ou l'hétérozygoté des séquences cibles.

Si la teneur de la séquence cible génétiquement modifiée ou de la séquence cible spécifique du taxon est inférieure à la limite de quantification, les résultats doivent être exprimés uniquement qualitativement.

NOTE Le fait d'indiquer que la teneur en ADN dérivé d'OGM est inférieure à la LQ pratique et de spécifier cette LQ est considéré comme une expression qualitative du résultat.

9 Expression des résultats

Les résultats doivent clairement établir la quantité de la séquence cible génétiquement modifiée rapportée à la séquence spécifique du taxon cible. Il convient également que les résultats fournissent des valeurs pour l'incertitude de mesure telles que l'écart-type ou l'écart-type relatif. En outre, il convient que la limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) de la méthode ainsi que la LD et la LQ pratiques soient documentées.

Les séquences cibles peuvent ou non être détectées, ou la quantité d'au moins l'une d'entre elles peut être inférieure à la limite de quantification. Le Tableau 1 décrit les quatre cas possibles et l'expression du résultat correspondante qui doit être incluse dans le rapport d'essai.

Tableau 1 — Expression des résultats

Résultat	Expression du résultat
Séquence spécifique du taxon cible non détectée.	Voir l'ISO 21569. «ADN non détecté pour l'espèce x.»
Séquence spécifique du taxon cible détectée mais séquence cible génétiquement modifiée non détectée.	Conformément à l'ISO 21569. «ADN dérivé d'OGM non détecté pour l'espèce x». De plus, si nécessaire, ajouter: «La limite de détection pratique est X %.» (Spécifier l'unité utilisée.)
La séquence spécifique du taxon cible et la séquence cible génétiquement modifiée sont toutes les deux détectées, mais leur quantité est inférieure à la limite de quantification d'au moins l'une des séquences cibles.	Pour chaque OGM, indiquer: «ADN dérivé d'OGM (spécifier l'OGM) tel que déterminé par la détection de (spécifier la séquence cible) dérivée de (spécifier l'espèce) a été détecté.» De plus, si nécessaire: «La limite de quantification pratique est X %.» (Spécifier l'unité utilisée.)
La séquence spécifique du taxon cible et la séquence cible génétiquement modifiée sont toutes les deux détectées et leur quantité est supérieure à la limite de quantification des deux séquences cibles.	Pour chaque OGM, indiquer: «La teneur en ADN dérivé d'OGM (spécifier l'OGM) telle que déterminée par la détection de (spécifier la séquence cible) dérivée de (spécifier l'espèce) est $X \pm$ incertitude %.» (Spécifier l'unité utilisée.)

La teneur en ADN dérivé d'OGM peut également être déclarée comme étant supérieure ou inférieure à une valeur spécifique, en prenant en compte l'incertitude de mesure.

10 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit être rédigé conformément à l'ISO 24276 et à l'ISO 21569 et doit contenir au moins les informations complémentaires suivantes:

- la LQ de la méthode et la matrice utilisée pour déterminer cette dernière;
- la LQ pratique;
- une référence à la méthode utilisée pour l'extraction de l'ADN;
- le matériau de référence utilisé;
- les résultats exprimés conformément à l'Article 9.

Annexe A (informative)

Méthodes spécifiques du taxon cible

A.1 Méthode spécifique du taxon cible pour la quantification absolue de l'ADN du gène *adh1* du maïs par PCR en temps réel

A.1.1 Introduction

La présente annexe décrit une méthode d'amplification et de quantification spécifiques du gène *adh1* (codant pour l'alcool déshydrogénase 1) du maïs (*Zea mays*) spécifique du taxon (domestique) pour la détermination de la teneur en ADN du maïs ou pour l'analyse visant à déterminer la présence/l'absence d'inhibiteurs de PCR détectables dans les solutions d'ADN extraites des produits contenant un ADN dérivé du maïs, par exemple les produits alimentaires.

Pour les limites, voir en A.1.8.

A.1.2 Statut de la méthode et caractéristiques de performance

A.1.2.1 Généralités

La méthode a été optimisée pour l'ADN extrait de grains de maïs broyés purs, de feuilles de maïs et de matériaux de référence certifiés (MRC) (séries IRMM-411, IRMM-412, IRMM-413^[10])^[11].

La reproductibilité de la méthode décrite a été éprouvée lors d'un essai comparatif interlaboratoires, utilisant des échantillons inconnus (de U1 à U6) consistant en un ADN de maïs de type sauvage dans un nombre différent de copies correspondant de la séquence cible (voir en A.1.2.2), et lors d'autres essais comparatifs interlaboratoires associés à des méthodes spécifiques aux événements de maïs génétiquement modifié tels que le Bt11 (voir en D.1).

Le nombre de copies de la séquence cible par génome haploïde est estimé à 1^[11].

L'invariance allélique de la séquence cible a été établie^[11].

A.1.2.2 Essai comparatif interlaboratoires

La méthode a été validée lors d'un essai comparatif interlaboratoires mis en place par le «Joint Research Centre (EC-JRC)» de la Commission européenne, l'«Institute for Health and Consumer Protection (IHCP)» en accord avec le protocole harmonisé international^[12].

Six échantillons (S1-S6) d'ADN de maïs de type sauvage, extraits d'une feuille^[13] contenant des nombres de copies absolus connus (183 486, 61 162, 20 387, 6 796, 2 265, 755) de génomes de maïs haploïde, ont été utilisés pour établir une courbe d'étalonnage pour la quantification absolue de ces mêmes génomes dans des échantillons inconnus. Les nombres de copies absolus dans les échantillons connus ont été déterminés en divisant la masse d'ADN de l'échantillon (déterminée par la quantification fluorimétrique de l'ADNdb en utilisant PicoGreen, Molecular Probes, numéro de Cat. P-7589) par la valeur moyenne publiée 1C pour les génomes de maïs (2,725 pg)^[14].

Six échantillons (U1-U6) d'ADN de maïs de type sauvage (extrait de la feuille^[13]) ont été utilisés comme échantillons inconnus. Les nombres de copies attendus dans les échantillons inconnus ont été déterminés de la même manière que ceux des échantillons connus.

Le Tableau A.1 récapitule les résultats de la validation de l'essai comparatif interlaboratoires.

La méthode a également été validée en combinaison avec des méthodes événement-spécifiques pour plusieurs OGM de maïs, par exemple pour le maïs doux Bt11. Voir les Références [15] et [16] et en D.1 pour obtenir des détails relatifs à l'essai (de quantification relative) combiné.

Tableau A.1 — Données de validation

	Échantillon					
	U1	U2	U3	U4	U5	U6
Nombre de laboratoires participants	12	12	12	12	12	12
Nombre de laboratoires ayant transmis des résultats	10	10	10	10	10	10
Nombre de laboratoires non valides	1	1	1	1	1	1
Nombre de laboratoires retenus	9	9	9	9	9	9
Nombre d'échantillons par laboratoire	4	4	4	4	4	4
Nombre de valeurs aberrantes lors du test de Cochran	1	1	1	1	—	—
Nombre de valeurs aberrantes lors du test de Grubbs	—	1	1	1	1	1
Nombre d'échantillons acceptés	35	34	34	34	35	35
Valeur du nombre de copies attendue	7 339	18 349	36 697	55 046	91 743	146 788
Valeur du nombre de copies moyenne	9 985	23 885	46 918	75 161	100 541	122 080
Biais de la valeur vraie (%)	36,1	30,2	27,9	36,5	9,6	−16,8
Écart-type de répétabilité s_r ^a	1 318,59	1 463,60	5 796,58	4 539,57	11 306,89	14 843,41
Écart-type relatif de répétabilité (%) ^b	13,21	6,13	12,35	6,04	11,25	12,16
Écart-type de reproductibilité s_R ^a	2 013,12	2 083,57	6 145,39	6 806,85	14 592,04	17 777,70
Écart-type relatif de reproductibilité (%) ^b	20,16	8,72	13,10	9,06	14,51	14,56
^a Exprimé en valeur de nombre de copies. ^b Exprimé en pourcentage de la valeur moyenne.						

A.1.2.3 Spécificité moléculaire

A.1.2.3.1 Généralités

La méthode a été conçue pour détecter un fragment de la séquence décrite dans EMBL/GenBank/DDBJ²⁾ sous la référence X04050. Cette séquence est propre au *Zea mays* (maïs) et au *Zea mays* subsp. *diploperennis* (téosinte) [11].

A.1.2.3.2 Spécificités théoriques

Les spécificités théoriques des amorces et des sondes ont été évaluées grâce à une recherche dans les bases de données GenBank/EMBL/DDBJ²⁾, en utilisant comme séquences de recherche celles des nucléotides avec le logiciel BLASTN²⁾ à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> [9 octobre 2003]. Le résultat de cette recherche a confirmé l'identité complète avec les séquences cibles attendues.

2) Il s'agit d'exemples de produits appropriés disponibles dans le commerce. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne constitue pas une approbation par l'ISO des produits ainsi désignés. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils permettent d'obtenir des résultats similaires.

A.1.2.3.3 Détermination expérimentale de la spécificité

La spécificité de la méthode a été soumise à essai avec une large gamme de taxons non cibles et vingt lignées de maïs différentes, représentant des échantillons divers d'un point de vue géographique et phylogénétique [11]. Aucune réaction croisée n'a été observée dans les taxons non cibles (à l'exception de la téosinte *Zea mays* subsp. *diploperennis*, l'ancêtre sauvage du maïs cultivé) [11], [17]. L'invariance en nombre de copies et l'invariance allélique de la séquence cible dans différentes lignées de maïs ont été déterminées [11].

A.1.2.4 Optimisation

L'optimisation a été effectuée pour le système de détection de séquence (SDS) ABI PRISM 7700®³⁾ et la chimie TaqMan®³⁾. La conception de l'amorce et de la sonde a été effectuée à l'aide du logiciel Primer Express® (Applied Biosystems)³⁾.

A.1.2.5 Limite de détection (LD)

Selon le laboratoire à l'initiative de cette méthode, la LD absolue est de 10 copies de la séquence cible [11].

Le plus petit nombre de copies de la séquence cible inclus dans l'essai comparatif interlaboratoires était de 7 399 copies.

A.1.2.6 Limite de quantification (LQ)

Selon le laboratoire à l'initiative de la méthode, la LQ absolue est de 100 copies de la séquence cible [11].

Le plus petit nombre de copies de la séquence cible inclus dans l'essai comparatif interlaboratoires était de 7 399.

A.1.3 Adaptation

ISO 21570:2005
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c7af4ed48713/iso-21570-2005>

Aucune information spécifique n'est disponible.

A.1.4 Principe

Un fragment de 134 bp issu du gène *adh1* est amplifié en utilisant deux amorces spécifiques de l'*adh1* du maïs (voir le Tableau A.2). L'accumulation des produits PCR est mesurée à la fin de chaque cycle de PCR (en temps réel) au moyen d'une sonde oligonucléotidique spécifique de l'*adh1* (ADH1-MDO, voir le Tableau A.2) marquée par deux fluorochromes; le FAM est utilisé comme rapporteur et le TAMRA est utilisé comme «quencher». À cet effet, la chimie TaqMan®³⁾ a été utilisée.

Le signal de fluorescence mesuré dépasse une valeur seuil définie par l'utilisateur après un certain nombre de cycles. Ce nombre est appelé valeur de C_t . Pour la quantification de la quantité d'ADN du *adh1* du maïs dans un échantillon inconnu, la valeur du C_t est convertie en une valeur du nombre de copies correspondante par comparaison avec une courbe d'étalonnage dont les valeurs de C_t sont directement liées aux nombres de copies connus (analyse de régression).

3) Il s'agit d'exemples de produits appropriés disponibles dans le commerce. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne constitue pas une approbation par l'ISO des produits ainsi désignés. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils permettent d'obtenir des résultats similaires.

A.1.5 Réactifs

A.1.5.1 Généralités

Pour déterminer la qualité des réactifs à utiliser, voir le paragraphe 6.6 de l'ISO 24276.

A.1.5.2 Eau.

A.1.5.3 Tampon PCR (sans $MgCl_2$), 10 fois.

A.1.5.4 Solution de $MgCl_2$, $c(MgCl_2) = 25 \text{ mmol/l}$.

A.1.5.5 Solution de dNTP, $c(dNTP) = 2,5 \text{ mmol/l}$ (chaque).

A.1.5.6 Oligonucléotides

Le Tableau A.2 présente les informations concernant les oligonucléotides.

Tableau A.2 — Oligonucléotides

Nom	Séquence d'ADN oligonucléotidique	Concentration finale en PCR
ADH-FF3	5'-CgT CgT TTC CCA TCT CTT CCT CC-3'	300 nmol/l
ADH-RR4	5'-CCA CTC CgA gAC CCT CAg TC-3'	300 nmol/l
ADH1-MDO	5'-FAM-AAT CAg ggC TCA TTT TCT CgC TCC TCA-TAMRA-3' ^a	200 nmol/l

^a FAM: 6-carboxyfluorescéine; TAMRA: 6-carboxytétraméthylrhodamine.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/20428567-941d-48cf-af67-c728e448713/iso-21570-2005>

La taille de l'amplicon de l'*adh1* est de 134 bp.

A.1.5.7 ADN polymérase thermostable

ADN polymérase⁴⁾ AmpliTaq Gold®

4) Il s'agit d'exemples de produits appropriés disponibles dans le commerce. Cette information est donnée pour la commodité des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne constitue pas une approbation par l'ISO des produits ainsi désignés. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils permettent d'obtenir des résultats similaires.