
**Méthodes horizontales d'analyse
moléculaire de biomarqueurs —
Méthodes d'analyse pour la détection
des organismes génétiquement
modifiés et des produits dérivés —**

Partie 3:

**Méthode PCR en temps réel construit-
spécifique pour la détection de la
séquence P35S-pat pour criblage des
organismes génétiquement modifiés**

<https://standards.iteh.ai/en/standards/iso-ts-21569-3-2020>
ca01354d24e0/iso-ts-21569-3-2020

*Horizontal methods for molecular biomarker analysis — Methods
of analysis for the detection of genetically modified organisms and
derived products —*

*Part 3: Construct-specific real-time PCR method for detection of P35S-
pat-sequence for screening for genetically modified organisms*



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 21569-3:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/31060233-2618-4787-bf96-ca01354d24e0/iso-ts-21569-3-2020)
[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/31060233-2618-4787-bf96-
ca01354d24e0/iso-ts-21569-3-2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/31060233-2618-4787-bf96-ca01354d24e0/iso-ts-21569-3-2020)



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2020

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Réactifs et matériaux	2
5.1 Généralités.....	2
5.2 Réactifs PCR.....	2
6 Appareillage	3
7 Mode opératoire	3
7.1 Mode opératoire applicable à l'échantillon pour essai.....	3
7.2 Préparation des extraits d'ADN.....	3
7.3 Réaction PCR.....	3
7.4 Programme d'amplification.....	4
8 Critères d'acceptation/de rejet	4
8.1 Généralités.....	4
8.2 Identification.....	5
8.3 Calcul du nombre de copies pour la séquence P35S-pat.....	5
9 État de validation et critères de performance	5
9.1 Robustesse de la méthode.....	5
9.2 Essai interlaboratoires pour la détermination de la limite de détection (LOD).....	5
9.3 Essai interlaboratoires pour la quantification du construit P35S-pat dans le colza.....	6
9.4 Sensibilité.....	8
9.5 Spécificité.....	8
10 Rapport d'essai	9
Annexe A (informative) Recherche avec BLASTN dans la base de données GenBank	10
Annexe B (informative) Matrice d'OGM du Centre commun de recherche	12
Bibliographie	15

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 16, *Méthodes horizontales pour l'analyse moléculaire de biomarqueurs*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO/TS 21569-3:2015), qui a fait l'objet d'une révision technique. Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes:

- la section sur la recherche *in silico* a été mise à jour;
- des modifications typographiques mineures ont été apportées tout au long du document.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 21569 se trouve sur le site web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Méthodes horizontales d'analyse moléculaire de biomarqueurs — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés —

Partie 3:

Méthode PCR en temps réel construit-spécifique pour la détection de la séquence P35S-pat pour criblage des organismes génétiquement modifiés

1 Domaine d'application

Le présent document décrit un mode opératoire permettant la détection d'une séquence d'ADN de transition entre le promoteur 35S (*P35S*) du *virus de la mosaïque du chou-fleur* et un gène modifié codant pour l'enzyme phosphinothricine-acétyltransférase (*pat*) et provenant de *Streptomyces viridochromogenes*. Le construit *P35S-pat* est fréquemment observé dans les plantes génétiquement modifiées présentant une tolérance aux herbicides contenant de la phosphinothricine. La méthode spécifique du construit *P35S-pat* est basée sur une méthode par PCR en temps réel et peut être utilisée à des fins de criblage qualitatif et quantitatif. Pour l'identification et la quantification d'un événement spécifique, une analyse complémentaire peut être effectuée.

Le présent document est applicable à l'analyse de l'ADN extrait de produits alimentaires. Il peut être également utilisé pour analyser l'ADN extrait d'autres produits tels que des aliments pour animaux et des semences. L'application de cette méthode exige qu'une quantité adéquate d'ADN amplifiable de qualité appropriée soit extraite de la matrice étudiée.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 16577, *Analyse moléculaire de biomarqueurs — Termes et définitions*

ISO 21569, *Produits alimentaires — Méthodes 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 — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés — Extraction des acides nucléiques*

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

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 16577 s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

4 Principe

L'ADN est extrait de la prise d'essai en appliquant une méthode appropriée. L'analyse de l'ADN se divise en deux parties, à savoir:

- a) vérification de la quantité et de l'amplificabilité de l'ADN extrait, par exemple par PCR en temps réel spécifique pour le taxon cible (voir l'ISO 21570^[1]);
- b) détection du construit *P35S-pat* par PCR en temps réel ^{[2][3]}.

5 Réactifs et matériaux

5.1 Généralités

En règle générale, des substances chimiques de qualité analytique reconnue, appropriées pour la biologie moléculaire, doivent être utilisées. L'eau utilisée doit être bidistillée ou de qualité PCR (c'est-à-dire exempte de nucléases et d'acides nucléiques). Pour toutes les opérations nécessitant le port de gants, il convient de s'assurer que ceux-ci ne sont pas poudrés. Pour éviter toute contamination croisée, il est recommandé d'utiliser des embouts de pipette protégés contre les aérosols.

5.2 Réactifs PCR

ISO/TS 21569-3:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/31060233-2618-4787-bf96->

5.2.1 ADN polymérase thermostable pour PCR à démarrage à chaud (hot start PCR).

5.2.2 Solution tampon pour PCR, contenant du chlorure de magnésium et des désoxyribonucléosides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dUTP).

Il est possible d'utiliser des mélanges de réactifs ou des préparations de composants individuels prêts à l'emploi. Des réactifs et des polymérases conduisant à des résultats équivalents ou meilleurs peuvent également être utilisés.

5.2.3 Oligonucléotides (voir [Tableau 1](#)).

Tableau 1 — Oligonucléotides

Nom	Séquence d'ADN de l'oligonucléotide	Concentration finale dans la PCR
Construit <i>P35S-pat</i> comme séquence cible ^{[2][3]} :		
Amorce 35SP03.f	5'-AAG TTC ATT TCA TTT ggA gAg gAC A-3'	200 nmol/l
Amorce pat-7.r	5'-Cgg CCA TAT CAG CTg CTg TAG-3'	200 nmol/l
Sonde GSS01.s	5'-(FAM)-CCg gAg Agg AgA CCA gTT gAg ATT Agg C-(TAMRA)-3' ^a	100 nmol/l
^a FAM: carboxy-6-fluorescéine, TAMRA: carboxy-6-tétraméthylrhodamine.		

NOTE Des fluorophores rapporteurs et/ou des fluorophores extincteurs équivalents peuvent être utilisés pour la sonde s'il peut être démontré qu'ils donnent des résultats similaires ou meilleurs.

5.2.4 ADN étalon pour l'étalonnage

Une solution d'ADN étalon ayant une concentration connue (ng/μl) peut être utilisée pour calculer le nombre de copies de la séquence cible *P35S-pat*.

Lorsque l'ADN génomique d'une plante est utilisé comme ADN étalon, il convient de calculer le nombre d'équivalents génome haploïde sur la base de la masse moléculaire du génome haploïde de la plante, en appliquant la [Formule \(1\)](#):

$$n_g = \frac{c_{\text{DNA}} \times 1\ 000}{m_{\text{hg}}} \quad (1)$$

où

n_g est le nombre d'équivalents génome par microlitre;

m_{hg} est la masse du génome haploïde, en picogrammes;

c_{DNA} est la concentration d'ADN, en nanogrammes par millilitre.

Sur la base des équivalents génome, il est possible de calculer le nombre de copies correspondant pour la séquence *P35S-pat*. Pour ce faire, le nombre d'intégrations dans le génome de la plante ainsi que le degré de zygoté de la plante utilisée doivent être pris en compte.

6 Appareillage iTeh STANDARD PREVIEW

Pour l'appareillage et les matériaux, voir l'ISO 21569. Outre le matériel courant de laboratoire, les équipements suivants sont requis.

6.1 Appareil de PCR en temps réel, approprié pour l'excitation des molécules fluorescentes et pour la détection des signaux de fluorescence générés pendant la PCR.

7 Mode opératoire

7.1 Mode opératoire applicable à l'échantillon pour essai

Le plan d'essai pour le criblage de *P35S-pat* suppose que l'échantillon pour essai est un échantillon représentatif prélevé sur l'échantillon pour laboratoire. L'échantillonnage représentatif simple implique que chaque échantillon pour essai a une probabilité égale et indépendante d'être prélevé sur l'échantillon pour laboratoire. Les mesures et étapes opératoires à prendre en considération doivent être telles que décrites dans l'ISO 21571 et l'ISO 24276.

7.2 Préparation des extraits d'ADN

Concernant la préparation d'ADN à partir de la prise d'essai, il convient de suivre les instructions générales et les mesures spécifiées dans l'ISO 21571. Il est recommandé de choisir l'une des méthodes d'extraction d'ADN décrites dans l'ISO 21571:2005, Annexe A.

7.3 Réaction PCR

La méthode est décrite pour un volume total de 25 μl par réaction PCR. Le mélange réactionnel est indiqué dans le [Tableau 2](#).

Décongeler totalement les réactifs à température ambiante. Il convient de s'assurer que chaque réactif est soigneusement mélangé et brièvement centrifugé juste avant d'être pipeté. Préparer un mélange de réactifs pour PCR contenant tous les composants, sauf l'ADN échantillon. La quantité nécessaire

de mélange de réactifs pour PCR dépend du nombre de réactions à réaliser, en incluant au moins une réaction supplémentaire comme réserve de pipetage. Ajouter 5 µl d'ADN échantillon à chaque réaction.

Agiter le mélange de réactifs pour PCR, le centrifuger brièvement et introduire à l'aide d'une pipette 20 µl dans chaque tube de réaction. Pour le témoin de réactif pour amplification, ajouter 5 µl d'eau au mélange réactionnel correspondant. À l'aide d'une pipette, ajouter 5 µl d'ADN échantillon ou 5 µl de la solution témoin correspondante (témoin de blanc d'extraction, témoin positif d'ADN cible). Si nécessaire, préparer un témoin d'inhibition de PCR tel que décrit dans l'ISO 24276.

Transférer les mélanges réactionnels dans le thermocycleur et lancer le programme d'amplification.

Tableau 2 — Mélange réactionnel pour l'amplification

Élément	Réaction
Volume réactionnel total	25 µl
ADN échantillon (jusqu'à 200 ng) ou témoins	5 µl
Solution tampon pour PCR ^a (contenant du MgCl ₂ , des dNTP et de l'ADN polymérase à « démarrage à chaud »)	12,5 µl
Amorce 35SP03.f et pat-7.r	voir Tableau 1
Sonde GSS01.s	voir Tableau 1
Eau	complément à 25 µl

^a Lors de l'essai interlaboratoires, en fonction des appareils de PCR en temps réel utilisés, différentes solutions tampons PCR ont été utilisées [TaqMan Universal PCR Mastermix (Life Technologies, Darmstadt), QuantiTect Multiplex PCR NoROX ou QuantiTect Probe PCR Mastermix (Qiagen GmbH, Hilden)]. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats. Si nécessaire, adapter les quantités de réactifs ainsi que le programme d'amplification.

7.4 Programme d'amplification

ISO/TS 21569-3:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/31060233-2618-4787-bf96->

Le programme d'amplification indiqué dans le [Tableau 3](#) a été utilisé pour l'étude de validation. L'utilisation de diverses conditions de réaction et de divers cycleurs pour PCR en temps réel peut nécessiter une optimisation spécifique. Le temps nécessaire pour la dénaturation initiale dépend du mélange maître utilisé.

Tableau 3 — Programme d'amplification

Étape	Paramètre	Température °C	Durée	Mesurage de la fluorescence	Cycles
1	Activation de l'UNG (facultative)	50	2 min	non	1
2	Dénaturation initiale	95	10 min	non	1
3	Dénaturation	95	15 s	non	45
	Hybridation et élongation	60	60 s	oui	

8 Critères d'acceptation/de rejet

8.1 Généralités

Un programme d'analyse des données spécifique à l'appareil de PCR en temps réel correspondant est utilisé pour l'identification des produits de PCR. Les résultats de l'amplification peuvent être exprimés d'une manière différente, selon l'appareil utilisé. En l'absence de produits de PCR détectables (résultat négatif), le résultat peut être exprimé comme suit: « indéterminé », « pas d'amp. » ou nombre maximal de cycles possibles. Si l'amplification de la séquence cible d'ADN se produit dans un échantillon (par exemple, témoin positif), on peut observer une courbe d'amplification de forme sigmoïde et calculer

le nombre de cycles auquel une valeur seuil de fluorescence prédéterminée est dépassée (valeur C_t ou valeur C_p).

Si, en raison de données de fluorescence mesurée atypiques, l'interprétation automatique ne fournit pas un résultat probant, il peut être nécessaire de fixer manuellement la ligne de base et le seuil avant l'interprétation des données. Dans ce cas, il est nécessaire de suivre les instructions spécifiques à l'appareil données dans le manuel concernant l'utilisation du logiciel d'interprétation.

8.2 Identification

La séquence cible est considérée comme détectée si:

- en utilisant les amorces 35SP03.f et pat-7.r spécifiques au construit *P35S-pat* et la sonde GSS01.s, une courbe d'amplification de forme sigmoïde peut être observée et une valeur seuil de fluorescence prédéterminée est dépassée;
- dans les réactions PCR témoins sans ADN ajouté (témoin de réactif pour PCR, témoin négatif d'extraction), aucune courbe d'amplification de forme sigmoïde ne peut être observée et une valeur seuil de fluorescence prédéterminée n'est pas dépassée;
- dans les réactions pour le témoin d'amplification (témoin positif d'ADN cible, témoin d'inhibition de PCR), les valeurs C_t (ou les valeurs C_p) attendues sont obtenues.

8.3 Calcul du nombre de copies pour la séquence *P35S-pat*

Avec les ADN étalons contenant des quantités définies de nombres de copies pour la séquence *P35S-pat* (voir 5.2.4 et 9.3), une courbe d'étalonnage peut être établie et utilisée pour calculer les nombres de copies pour la séquence *P35S-pat* dans des échantillons inconnus.

9 État de validation et critères de performance

9.1 Robustesse de la méthode

La robustesse de la méthode n'a pas été évaluée par rapport à de faibles modifications de facteurs tels que les concentrations de réactifs (par exemple, amorces, sonde) ou les conditions de réaction (par exemple, températures d'hybridation).

NOTE Lors de l'essai interlaboratoires, la robustesse de la méthode a été vérifiée par rapport à différents appareils de PCR en temps réel et à différentes solutions tampons pour PCR. Les appareils de PCR en temps réel et les solutions tampons pour PCR n'ont eu aucune influence sur les performances de la méthode.

9.2 Essai interlaboratoires pour la détermination de la limite de détection (LOD)

La limite de détection (LOD) de la méthode a été évaluée dans le cadre d'un essai interlaboratoires coordonné, en 2011, par le Bureau fédéral allemand de la protection des consommateurs et de la sécurité alimentaire (BVL), avec un total de 10 participants. Les participants ont reçu quatre échantillons d'ADN provenant de végétaux modifiés génétiquement contenant la séquence cible *P35S-pat*.

Pour préparer les échantillons, on a utilisé des matériaux de référence certifiés fournis par l'American Oil Chemists' Society (AOCS, Urbana, États-Unis), ainsi que par l'Institut de Matériaux de Référence et de Mesures (IRMM) à Geel, Belgique. Les matériaux utilisés étaient de l'ADN provenant de feuilles de canola T45 (AOCS, 0208-A2), de soja A2704-12 (AOCS, 0707-B2), de maïs T25 (AOCS, 0306-H), et d'ADN extrait de poudre de semences de maïs TC1507 (IRMM, ERM-BF418d). Les concentrations en ADN ont été déterminées par spectrophotométrie. Les nombres d'équivalents génome par microlitre (μ l) ont été calculés en appliquant la [Formule \(1\)](#). Sur la base du nombre d'équivalents génome, le nombre de copies correspondant pour la séquence *P35S-pat* a été calculé en tenant compte du nombre d'intégrations de la séquence *P35S-pat* dans le génome de la plante ainsi que du degré de zygoté de la plante utilisée.

(voir [Tableau 4](#)). Les nombres de copies des ADN échantillons ont été ajustés à environ 100 copies de la séquence *P35S-pat* par microlitre (μ l).

Tableau 4 — Caractéristiques des matériaux de référence utilisés pour la détermination de la limite de détection (LOD)

Événement GM	Source du matériau de référence	Matériau/ % (m/m) GM	Masse (pg) du génome haploïde [4]	Zygosité	Nombre de copies de la séquence <i>P35S-pat</i> par génome haploïde	Longueur du produit de PCR de la séquence <i>P35S-pat</i> (bp)
Canola T45	AOCS	ADN / 99,99 %	1,3	homozygote	1[5]	111
Soja A2704-12	AOCS	ADN / 99,99 %	1,13	homozygote	2[6]	102
Maïs T25	AOCS	ADN / 99,99 %	2,7	homozygote	1[7]	111
Maïs TC1507	IRMM	poudre / 10 %	2,7	hétérozygote	1[8]	102

Sur la base de ces quatre solutions d'ADN étalon, une série de dilutions a été préparée par les participants afin d'obtenir des solutions d'ADN avec des nombres de copies allant respectivement de 50 à 0,1 par 25 μ l de mélange réactionnel pour PCR. Les participants ont analysé chaque solution d'ADN diluée avec la méthode PCR en temps réel pour la détection de la séquence *P35S-pat* lors d'une détermination reproduite six fois dans les conditions décrites dans les [Tableaux 1 à 3](#). Les résultats de l'essai interlaboratoires sont indiqués dans le [Tableau 5](#).

Tableau 5 — Résultats de l'essai interlaboratoires pour la détermination de la limite de détection (LOD)

Nombres de copies de la séquence <i>P35S-pat</i> par PCR	Nombre de résultats positifs ($C_t < 45$) sur 60 résultats			
	Canola T45	Maïs TC1507	Maïs T25	Soja A2704-12
50	60	60	60	60
20	60	60	60	60
10	59	60	60	60
5	46	59	56	55
2	26	52	41	36
1	11	42	21	24
0,1	3	8	3	2

9.3 Essai interlaboratoires pour la quantification du construit *P35S-pat* dans le colza

La méthode a été validée dans le cadre d'un essai interlaboratoires coordonné, en 2004, par le sous-comité pour le développement de la méthode du Comité conjoint national et fédéral allemand sur le génie génétique (LAG) avec un total de 14 participants. Les participants ont reçu cinq échantillons de semences et cinq échantillons d'ADN.

Pour la préparation des échantillons de semences, du colza non génétiquement modifié a été mélangé à du colza GS40/90 génétiquement modifié, dans des rapports de 980 g/20 g (2 % GM), 990 g/10 g (1 % GM), 995 g/5 g (0,5 % GM), 999 g/1 g (0,1 % GM) et 1 000 g/0 g (0 % GM); puis le mélange a été homogénéisé et subdivisé en échantillons de 30 g à l'aide d'un diviseur d'échantillons. Les participants devaient broyer les échantillons de semences et extraire l'ADN qu'ils contenaient. Pour la préparation des échantillons d'ADN fournis aux participants, l'ADN génomique extrait d'un colza oléagineux GS40/90 a été mélangé à l'ADN génomique extrait d'un colza oléagineux non génétiquement modifié pour obtenir des solutions contenant 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % et 0 % d'ADN de colza oléagineux GS40/90. Les concentrations des échantillons d'ADN ont été ajustées à 20 ng/ μ l.

Chaque échantillon a été analysé par les participants au cours d'une détermination reproduite trois fois avec la méthode PCR en temps réel pour la détection de la séquence *P35S-pat* dans les conditions décrites dans les [Tableaux 1 à 3](#). Pour l'étalonnage, six étalons d'ADN (100, 300, 900, 2 700, 8 100, 100 000 copies fournies) ont été mesurés deux fois au cours de la même analyse par PCR. En outre, le même nombre de mesures a été réalisé en utilisant une méthode de PCR en temps réel spécifique pour le taxon ciblant le gène *pepC* du colza oléagineux^[2]. Les courbes d'étalonnage ont été tracées en reportant les valeurs C_t en fonction du logarithme des nombres de copies de la séquence cible prévus pour les solutions d'étalonnage. Les nombres respectifs de copies pour les échantillons ont été calculés par interpolation par rapport à la courbe d'étalonnage.

Le [Tableau 6](#) présente un résumé des résultats. Le [Tableau 7](#) présente les résultats quantitatifs. Avant le calcul des teneurs moyennes en éléments génétiquement modifiés et des données de fidélité à l'aide de méthodes d'essais statistiques conformément à l'ISO 5725-2^[9], les valeurs aberrantes ont été identifiées et éliminées par l'application du test de Grubbs et du test de Cochran, le cas échéant. Dans la mesure où le nombre d'allèles *pepC* dans les différentes variétés de colza oléagineux n'est pas connu, il n'est pas possible d'utiliser les résultats du PCR spécifique pour le taxon pour calculer le nombre de copies du génome du colza oléagineux. Par conséquent, la justesse de la méthode ne pouvait pas être déterminée. En outre, il est supposé que la teneur en éléments génétiquement modifiés dans les échantillons de semences peut s'écarter de la teneur attendue. L'importance de l'écart ne peut pas être estimée.

Tableau 6 — Résultats de l'essai interlaboratoires pour la quantification du construit *P35S-pat* dans le colza

Année de l'essai interlaboratoires	2004
Nombre de laboratoires	14
Nombre de laboratoires ayant soumis des résultats	14
Nombre d'échantillons de semences par laboratoire	5
Nombre d'échantillons d'ADN par laboratoire	5
Nombre de résultats acceptés	140
Nombre d'échantillons acceptés contenant la séquence cible <i>P35S-pat</i>	112
Nombre d'échantillons acceptés ne contenant pas la séquence cible <i>P35S-pat</i>	28
Faux positifs	0 (0 %)
Faux négatifs	0 (0 %)

Tableau 7 — Résultats quantitatifs obtenus lors de l'essai interlaboratoires concernant le construit *P35S-pat*

Teneurs relatives en éléments GM des échantillons % (m/m)	Teneurs en éléments GM calculées (copies <i>P35S-pat</i> / copies <i>pepC</i>) %	
	Teneur en GM ^a %	$C_{V,R}$ ^b %
0,1 % (colza)	0,19	52,0
0,5 % (colza)	0,88	29,5
1 % (colza)	1,78	42,1
2 % (colza)	3,91	32,5
0,1 % (ADN)	0,14	32,2
0,5 % (ADN)	0,54	34,5
1 % (ADN)	1,08	21,8
2 % (ADN)	2,26	17,3

^a Valeur moyenne après élimination des valeurs aberrantes par application du test de Grubbs et du test de Cochran.

^b Coefficient de variation (dans des conditions de reproductibilité) après élimination des valeurs aberrantes par application du test de Grubbs et du test de Cochran.