



# Spécification technique

**ISO/TS 5354-2**

## **Biomarqueurs moléculaires — Détection d'ADN dans le coton utilisé pour la production textile —**

Partie 2:

### **Présentation des séquences cibles à utiliser dans les méthodes de détection reposant sur une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) des événements de coton génétiquement modifié (GM)**

*Molecular biomarkers — Detection of DNA in cotton used for  
textile production —*

*Part 2: Overview of target sequences for use in polymerase chain  
reaction (PCR)-based detection methods for cotton genetically  
modified (GM) events*

**Première édition  
2024-02**

iTeh Standards  
(<https://standards.iteh.ai>)  
Document Preview

[ISO/DTS 5354-2.2](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/8180943d-d7d3-4757-b0bf-3dbe9de03aa3/iso-dts-5354-2-2)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/8180943d-d7d3-4757-b0bf-3dbe9de03aa3/iso-dts-5354-2-2>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2024

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](mailto:copyright@iso.org)  
Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

# Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>v</b>
<b>1 Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3 Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4 Abréviations</b> .....	<b>2</b>
<b>5 Criblage des éléments GM</b> .....	<b>2</b>
5.1 Principe .....	2
5.2 Mode opératoire .....	3
5.3 Amorces et sondes .....	3
5.4 Matériaux de référence .....	6
5.5 Événements du coton GM .....	6
5.6 Validation .....	10
5.7 Interprétation et expression des résultats .....	10
5.8 Résultats .....	10
5.9 Enregistrement .....	10
<b>6 Rapport d'essai</b> .....	<b>10</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>12</b>

iTeh Standards  
(<https://standards.iteh.ai>)  
Document Preview

[ISO/DTS 5354-2.2](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/8180943d-d7d3-4757-b0bf-3dbe9de03aa3/iso-dts-5354-2-2)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/8180943d-d7d3-4757-b0bf-3dbe9de03aa3/iso-dts-5354-2-2>

## 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](http://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 brevet. 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](http://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](http://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 de biomarqueurs moléculaires*.

Cette première édition, conjointement avec l'ISO 5354-1<sup>1)</sup>, annule et remplace l'IWA 32:2019, qui a fait l'objet d'une révision technique.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 5354 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](http://www.iso.org/fr/members.html).

---

1) En cours d'élaboration. Stade au moment de la publication: ISO/DIS 5354-1:2023.

## Introduction

La détection et l'identification de matériaux de coton génétiquement modifié (GM) sont typiquement réalisées à l'aide de méthodes de criblage fondées sur une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) suivies d'analyses plus spécifiques des matériaux basées sur les événements. En fonction des cibles qui sont détectées ou non détectées lors du criblage, la présence ou l'absence d'événements spécifiques du coton GM peut être déterminée et confirmée avec des méthodes événement-spécifiques. Les séquences cibles utilisées avec des méthodes de criblage et basées sur les événements peuvent fournir des données reproductibles à travers un éventail d'équipements, produits chimiques et réactifs. De cette façon, les séquences d'ADN associées à des événements GM peuvent être évaluées afin de déterminer de manière fiable et économique si un matériau GM est présent.

Le présent document fournit des exemples de séquences cibles de criblage et basées sur les événements identifiées au sein de coton GM. Des méthodes PCR qui amplifient ces séquences cibles pour la détection et l'identification peuvent être utilisées pour déterminer la présence d'événements GM dans des graines de coton et certains produits de coton. Six paires d'amorces et de sondes sont recommandées pour déterminer la présence de la plupart des événements de coton GM. Seuls les éléments pour lesquels une méthode de détection est disponible sont répertoriés.

L'ISO 5354-1 décrit des méthodes pour l'extraction d'ADN amplifiable par PCR à partir de matrices de coton pouvant être ensuite analysé à la recherche des séquences cibles décrites dans le présent document ainsi qu'une méthode de détection de référence par PCR spécifique au taxon pour le coton<sup>[1]</sup>.

iTeh Standards  
(<https://standards.iteh.ai>)  
Document Preview

[ISO/DTS 5354-2.2](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/8180943d-d7d3-4757-b0bf-3dbe9de03aa3/iso-dts-5354-2-2)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/8180943d-d7d3-4757-b0bf-3dbe9de03aa3/iso-dts-5354-2-2>



# Biomarqueurs moléculaires — Détection d'ADN dans le coton utilisé pour la production textile —

## Partie 2:

# Présentation des séquences cibles à utiliser dans les méthodes de détection reposant sur une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) des événements de coton génétiquement modifié (GM)

## 1 Domaine d'application

Le présent document fournit une liste de séquences cibles qui peuvent être utilisées dans le cadre d'un criblage visant à déceler la présence de matériau génétiquement modifié (GM) dans du coton et des produits de coton.

Le présent document est applicable aux graines de coton, aux feuilles de coton, aux fibres de coton et aux matériaux dérivés de fibres de coton à partir desquels une quantité suffisante d'ADN amplifiable par PCR de haute qualité peut être extraite.

Les méthodes d'extraction d'ADN à partir de différents échantillons de coton peuvent être trouvées dans l'ISO 5354-1<sup>[1]</sup>.

NOTE 1 La liste des séquences cibles fournit des recommandations pour le criblage de tous les événements de coton GM actuellement connus et des événements de coton GM qui contiennent les mêmes séquences d'ADN. Des recommandations supplémentaires concernant le criblage des produits alimentaires sont données dans la CEN/TS 16707<sup>[3]</sup>.

NOTE 2 L'échantillonnage ne relève pas du domaine d'application du présent document. Les informations sur l'échantillonnage des produits de coton peuvent être obtenues dans l'ISO 1130:1975<sup>[4]</sup> et dans l'ASTM D1441-12<sup>[5]</sup>.

## 2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils 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 de biomarqueurs moléculaires — Vocabulaire pour les méthodes d'analyse de biomarqueurs moléculaires dans l'agriculture et la production agroalimentaire*

ISO 21569 (toutes les parties), *Méthodes horizontales d'analyse moléculaire de biomarqueurs — Méthodes d'analyse pour la détection des organismes génétiquement modifiés et des produits dérivés*

ISO 21570, *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*

## 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et les définitions de l'ISO 16577 ainsi que les suivants 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 <https://www.electropedia.org/>

### 3.1 graine de coton

graine du cotonnier

### 3.2 bourre de coton

fibres brutes obtenues après égrenage

## 4 Abréviations

Abréviation	Terme
T-nos	terminateur de la nopaline synthase d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
P-35S	séquence de promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur
cry1Ab/Ac	gène de fusion synthétique dérivé de <i>Bacillus thuringiensis</i> qui produit une endotoxine delta Cry1Ab-Ac (protéine de fusion)
pat	forme synthétique de l'enzyme phosphinothricine N-acétyltransférase (PAT) dérivée de la souche Tu494 de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
P-FMV	promoteur du virus de la mosaïque du figuier
otp/mepsps	peptide de transport optimisé/gène modifié de la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (mEPSPS)
cry1Ac	insecticide à delta-endotoxines cristallines produit par le <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) pendant la sporulation
nptII	gène du transposon Tn5 d' <i>Escherichia coli</i> qui code une enzyme pour la néomycine phosphotransférase II
cry-1Ab	insecticide à delta-endotoxines cristallines produit par le <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) pendant la sporulation
T-35S	terminateur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV T-35S) dans le vecteur pCAMBIA
P-Ubi1	promoteur de la polyubiquitine-1 du maïs
cp4-epsps	enzyme bactérienne 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase, EPSPS) de la souche CP4 d' <i>Agrobacterium sp.</i>
cry-2AB2	insecticide à delta-endotoxines cristallines produit par le <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) qui est exprimé dans le coton
cry1C	insecticide à delta-endotoxines cristallines produit par le <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)
tE9	terminateur dérivé du gène ribulose diphosphate carboxylase du pois
cry1F	insecticide à delta-endotoxines cristallines produit par le <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)

## 5 Criblage des éléments GM

### 5.1 Principe

La stratégie de criblage par PCR décrite dans le présent document s'appuie sur une méthode mise au point pour détecter au moins deux événements connus dans le coton GM. Les séquences cibles transgéniques pour analyse peuvent être choisies dans le [Tableau 1](#). Les cibles peuvent également être sélectionnées à partir d'autres références en fonction des événements anticipés ou comme une stratégie pour obtenir le maximum d'informations en utilisant un minimum de ressources. Dans un premier temps, les séquences génétiques (encore appelées éléments) communes présentes dans plusieurs construits GM peuvent être ciblées.



La présence combinée ou l'absence d'éléments individuels peut être utilisée pour déterminer la présence d'un ou plusieurs événements GM.

La base de données européenne sur les OGM est disponible pour faciliter le processus de détermination des cibles anticipées et de leurs amorces PCR respectives à utiliser pour détecter le coton GM<sup>[6]</sup>. Des méthodes de détection événement-spécifiques sont également décrites dans la base de données de CropLife International<sup>[7]</sup> et la base de données GMOMETHODS de l'EURL GMFF<sup>[8]</sup>.

## 5.2 Mode opératoire

Le criblage avec les six séquences cibles: T-nos, P-35S, cry1Ab/Ac, pat, otp/mepsps et P-FMV peut détecter la plupart des événements de coton GM s'ils sont présents (voir [Tableau 1](#)). Sur la base des informations selon lesquelles un événement GM peut être présent, de la manière dont la méthode sera mise en œuvre (par exemple, des réactions multiplexées, séparées, des microréseaux, etc.), du temps et de la main-d'œuvre exigés, et du coût des matériaux, une méthode utilisant la totalité ou un minimum de deux ou plusieurs de ces séquences cibles peut également être choisie pour l'analyse. Si la cible est détectée en utilisant moins de six séquences cibles, aucun essai supplémentaire ne sera exigé. Si la cible n'est pas détectée, des cibles supplémentaires allant jusqu'aux six suggérées peuvent être ajoutées à la méthode. Il convient respectivement de concevoir et de développer des méthodes PCR qualitatives et quantitatives conformément à la série ISO 21569 et à l'ISO 21570.

## 5.3 Amorces et sondes

### 5.3.1 Généralités

Les amorces et les sondes qui ont été répertoriées dans cette section ont été validées dans le cadre d'un essai interlaboratoires dans au moins une matrice agricole. Dans la plupart des cas, le coton a été pris en compte dans un essai interlaboratoires.

### 5.3.2 T-nos

Le criblage par PCR pour le biomarqueur T-nos à l'aide des amorces et sondes suivantes est décrit dans l'ISO 21569:2005/Amd 1:2013, Annexe B.6<sup>[10]</sup>.

180-F	5'-CATGTAATGCATGACGTTATTTATG - 3'
180-R	5'-TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT - 3'
Tm-180	5'-FAM-ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA - 3'

### 5.3.3 P-35S

Le criblage par PCR quantitative pour le biomarqueur P-35S à l'aide des amorces et sondes suivantes est décrit dans l'ISO 21570:2005 Annexe B.1<sup>[11]</sup>.

35S-F	5'-GCCTCTGCCGACAGTGGT - 3'
35S-R	5'-AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC - 3'
35S-TMP	5'-FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-TAMRA - 3'

### 5.3.4 cry1Ab/Ac

Le criblage par PCR pour le biomarqueur cry1Ac/Ab à l'aide des amorces et sondes suivantes est décrit dans l'ISO/TS 21569-6<sup>[12]</sup>.

## ISO/DTS 5354-2.2:2024(fr)

Bt-F1(mod)	5'-GAGGAAATGCGTATTCAATTCAAC - 3'
Bt-R	5'-TTCTGGACTGCGAACAATGG - 3'
Bt-P	5'-FAM-ACATGAACAGCGCCTTGACCACAGC-TAMRA - 3'

### 5.3.5 pat

Le criblage par PCR pour le biomarqueur pat est décrit à l'aide des amorces et sondes suivantes<sup>[13]</sup> et dans l'ISO/TS 21569-3<sup>[14]</sup> avec différentes amorces et sondes.

pat-F	5'-CGCGGTTTGTGATATCGTTAAC - 3'
pat-R	5'-TCTTGCAACCTCTCTAGATCATCAA - 3'
pat-P	5'-FAM-AGGACAGAGCCACAAACACCACAAGAGTG-TAMRA - 3'

### 5.3.6 P-FMV

Le criblage par PCR pour le biomarqueur P-FMV à l'aide des amorces et sondes suivantes est décrit dans l'ISO/TS 21569-5<sup>[15]</sup>.

pFMV-F	5'-CAAATAACGTGGAAAAGAGCT - 3'
pFMV-R	5'-TCTTTTGTGGTCGTCCTGC - 3'
Sonde pFMV	5'-FAM-CTGACAGCCCACTACTAATGC-BHQ1 - 3'

### 5.3.7 otp/mepsps

La région de jonction entre la séquence de peptide de transport optimisé (otp) et le gène 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase muté ponctuellement (mEPSPS) du maïs sert de biomarqueur pour détecter l'événement GA21 du maïs<sup>[16]</sup>. L'utilisation des amorces et sondes suivantes pour la détermination quantitative est également décrite dans l'ISO 21570<sup>[17]</sup>.

GA21 3-5'	5'-GAAGCCTCGGCAACGTCA - 3'
GA21 3-3'	5'-ATCCGGTTGGAAAGCGACTT - 3'
GA21-2-Taq	5'-FAM-AAGGATCCGGTGCATGGCCG-TAMRA - 3'

### 5.3.8 cry1Ac

Le criblage par PCR pour le biomarqueur cry-1Ac à l'aide des amorces et sondes suivantes est décrit en <sup>[18]</sup>.

Cry1Ac-F(/R)-n4	5'-TTCAGGACCAGGATTCAC - 3'
Cry1AcR-n2	5'-GTGAATAGGGGTCACAGAAGCATA - 3'
Cry1AcP-n3	5'-TCTGGTAGATGTGGATGGGAAGT - 3'

### 5.3.9 nptII

Le criblage par PCR pour le biomarqueur nptII à l'aide des amorces et sondes suivantes est décrit en <sup>[19]</sup>.