

**Guide introductif aux biotechnologies et à la biosécurité:  
cas des Organisme Génétiquement Modifiés (OGMs)**



## 1. Qu'est-ce que l'ADN ? Une molécule universelle

L'**acide désoxyribonucléique**, ou **ADN**, est une molécule, présente dans toutes les cellules vivantes (molécule universelle). Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est contenu dans le noyau et une petite partie dans les mitochondries et les chloroplastes. Dans les cellules procaryotes, l'ADN est contenu dans le cytoplasme. Certains virus possèdent également de l'ADN dans leur capsid.

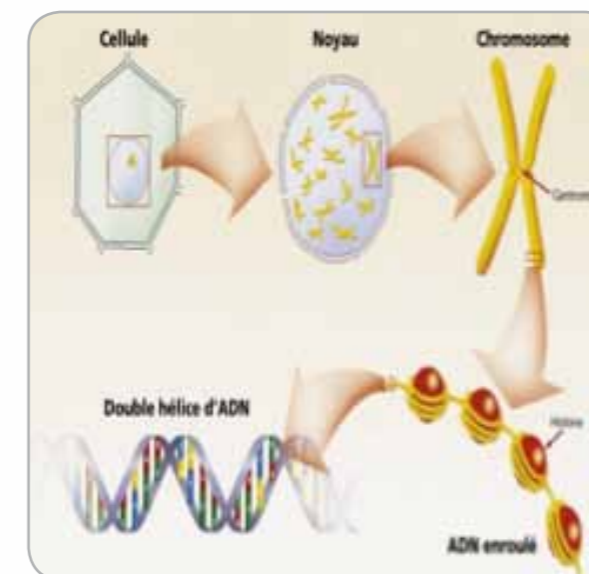


Figure 1: Emplacement de la Molécule d'ADN

L'ADN est une macromolécule, polymère de nucléotides (dAMP, dTMP, dGMP, dCMP) dont la structure et les propriétés chimiques lui permettent de remplir les fonctions suivantes :

- Sa fonction principale est de stocker l'information génétique, information qui détermine le développement et le fonctionnement d'un organisme. Cette information est contenue dans l'enchaînement non-aléatoire des nucléotides.
- Une autre fonction essentielle de l'ADN est la transmission de cette information de génération en génération (l'hérédité).
- L'information portée par l'ADN peut être modifiée au cours du temps. Cela aboutit à une diversité des individus et à une évolution possible des espèces. Cela est dû à des mutations causées principalement par des erreurs lors de la réplication des séquences de l'ADN (ajout, délétion ou substitution de nucléotides), ou bien à des recombinaisons génétiques.

L'ADN est donc le support de l'information génétique mais aussi le support de ses variations. En subissant les effets de la sélection naturelle, l'ADN permet l'évolution biologique des espèces.

## 2. Qu'est ce qu'un gène? C'est l'unité structurale et Fonctionnelle du vivant

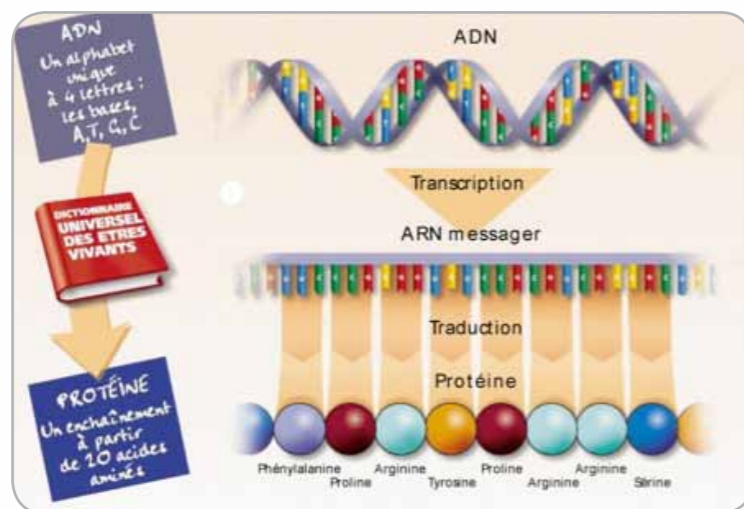


Figure 2: Unité Structurale et Fonctionnelle d'un gène

Un gène se définit comme une chaîne de désoxyribonucléotides (éléments de la séquence d'ADN) destinée à être transcrite en acides ribonucléiques (ARN).

La plupart du temps, un gène commence par une séquence de nucléotides appelée promoteur, dont le rôle est de permettre l'initiation mais surtout la régulation de la transcription de l'ADN en ARN, et se termine par une séquence terminatrice, qui marque la fin de la transcription.

La molécule d'ARN ainsi produite peut soit être traduite en protéine (elle est dans ce cas appelée ARN messager), soit être directement fonctionnelle (c'est le cas pour les ARN ribosomiaux ou les ARN de transfert).

Il y a environ 13 000 gènes dans l'ADN des cellules de la mouche de vinaigre, 25000 gènes chez *Arabidopsis thaliana* et 21 000 gènes chez l'Homme.

## 3. Transfert naturel de gènes dans la nature

Des systèmes de transfert naturel d'ADN existent et conduisent également à l'apparition d'organismes dont le matériel génétique est transformé. Les exemples les plus connus, sont les suivants :

- **Les rétrovirus:** ce sont des virus capables de faire intégrer leur matériel génétique dans le génome de leur hôte. Grâce à des séquences présentes de part et d'autre de l'ADN viral, ce dernier est reconnu et intégré dans le génome hôte.
- **Les plasmides:** il s'agit de petites molécules circulaires d'ADN, mobiles et pouvant passer d'une cellule à une autre. Certains plasmides peuvent alors s'intégrer au génome de la cellule hôte. Cette forme de transfert d'ADN est observée pour les bactéries, notamment pour des gènes de résistance aux antibiotiques. L'intégration de plasmides (ou de fragments d'ADN plasmidique) au génome d'un organisme supérieur est limitée à des bactéries spécifiques comme *Agrobacterium tumefaciens* qui possède un plasmide appelé Ti dont un fragment (l'ADN-T) est capable de pénétrer dans une cellule végétale et de s'intégrer dans son génome.



Le filament d'ADN s'intègre au chromosome bactérien et dirige le fonctionnement de la bactérie.

L'ADN du virus se recopie en nombreux exemplaires et parfois certaines copies contiennent un morceau d'ADN bactérien. Les copies s'entourent d'une enveloppe et sortent de la bactérie pour former de nouveaux virus. Ceux qui



ont incorporé un morceau de l'ADN bactérien seront des virus génétiquement modifiés et iront parasiter d'autres bactéries, transférant de l'ADN d'une bactérie à l'autre.

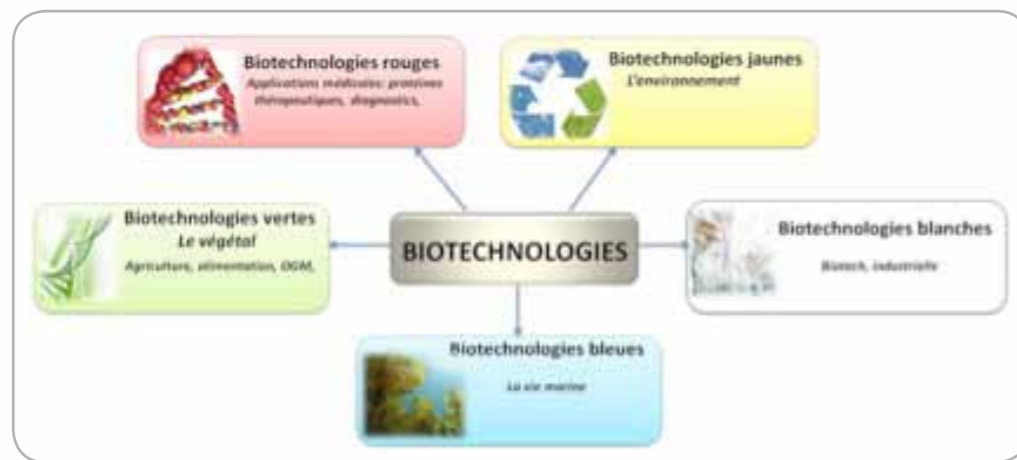
- **La reproduction** avec des individus interféconds permet l'échange d'ADN, entre deux individus de deux variétés, sous-espèces, espèces ou genres différents. L'hybride ainsi produit présente un mélange des caractéristiques génétiques des deux parents.
- **Les mutations:** elles se font par changement d'un nucléotide par un autre, insertion ou délétion de séquences de nucléotides. Ces modifications naturelles peuvent alors induire l'apparition de maladies génétiques ou de cancers. Mais les mutations constituent aussi l'un des moteurs de l'évolution des espèces.

## 4. Les Biotechnologies et domaines d'applications

Les sciences du vivant soulèvent d'importantes questions politiques et sociétales et donnent lieu à un vaste débat public. Une révolution profonde est en train de se produire dans le domaine de connaissances de la biotechnologie, ouvrant la voie à de nouvelles applications dans les soins de santé, l'agriculture, la production alimentaire et la protection de l'environnement.

Tel que définie dans le Protocole de Cartagena, la « Biotechnologie moderne » s'entend :

- De l'application de techniques in vitro aux acides nucléiques, y compris l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'introduction directe d'acides nucléiques dans des cellules ou organites.
- De la fusion cellulaire d'organismes n'appartenant pas à une même famille taxonomique, qui surmontent les barrières naturelles de la physiologie de la reproduction ou de la recombinaison et qui ne sont pas des techniques utilisées pour la reproduction et la sélection de type classique.



On distingue différentes catégories de biotechnologies codées par des couleurs selon leur domaine d'application (Figure ci-dessus).

**Les biotechnologies blanches (biotechnologies industrielles):** regroupent les applications industrielles, par l'emploi de systèmes biologiques comme alternative aux procédés chimiques classiques. Les premières utilisations sont dans les secteurs des polymères, des carburants, des dissolvants, de la construction, du textile, et de tous les produits à dominante chimique.

Dans le secteur non alimentaire, la biotechnologie contribue à améliorer l'utilisation de matières premières industrielles pour l'industrie de transformation énergétique et pharmaceutique. Les modifications en cours concernent notamment les hydrates de carbone, les huiles, les graisses, les protéines et les fibres.

**Les biotechnologies vertes ( biotechnologies agricoles):** concernent l'agro-alimentaire et regroupent une série de technologies utilisant l'organisme des plantes et leurs cellules pour produire et transformer des produits alimentaires, des biomatériaux et de l'énergie.

Dans le secteur agroalimentaire, la biotechnologie permet d'améliorer la qualité des denrées alimentaires et des aliments pour animaux afin de contribuer à la prévention des maladies et à la réduction des risques pour la santé. La recherche sur le génome végétal est un élément clé. À cet égard, la superficie consacrée dans le monde aux cultures génétiquement modifiées est en constante progression.

**Les biotechnologies jaunes (biotechnologies environnementales):** rassemblent toutes les biotechnologies se rapportant à la protection de l'environnement et au traitement ou à l'élimination des pollutions.

D'un point de vue environnemental, la biotechnologie offre de nouveaux moyens pour protéger et améliorer l'environnement, notamment l'air, les sols, l'eau et les déchets. La recherche est axée sur le développement de produits et procédés industriels plus propres, ainsi que sur des pratiques agricoles plus durables.

**Les biotechnologies rouges (biotechnologies médicales):** touchent le domaine de la santé, en particulier l'industrie pharmaceutique dont une grande partie de la recherche actuelle repose sur les biotechnologies

Dans le secteur de la santé, la biotechnologie permet déjà la production d'un nombre croissant de médicaments et de services médicaux. Dans ce contexte, la recherche sur les cellules souches ouvre la voie au remplacement de tissus et d'organes pour traiter les maladies dégénératives, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, etc.

Aujourd'hui, la biotechnologie dans ses multiples facettes s'impose comme un outil incontournable pour le développement en apportant des réponses aux problèmes de la faim, de la santé et au maintien d'un équilibre environnemental et écologique durable. La question la plus controversée concerne les techniques de recombinaison de l'ADN pour produire des Organismes Génétiquement Modifiés.

## 5. Les Biotechnologies entre promesses et risques

Le XXe siècle fut celui de l'atome. Le XXIe siècle pourrait être celui du gène et du vivant.

Les Biotechnologies sont porteuses de changements culturels et sociaux au moins aussi décisifs: changements dans notre façon de donner la vie, de nous soigner et d'aborder la vieillesse, changements dans les méthodes de production agricoles et industrielles, dans notre conception de la protection de notre environnement, et évolution de notre alimentation.

Les Biotechnologies soulèvent des problèmes éthiques particuliers dans la mesure où elles confèrent à l'homme des pouvoirs sans précédent sur le vivant, qu'il doit savoir maîtriser. De plus, à une époque où l'exigence de sécurité est de plus en plus importante, le droit à la sécurité sanitaire et à un environnement sain doit être rangé parmi les droits de l'homme, au sens moderne du terme. Là aussi, les biotechnologies soulèvent des interrogations spécifiques, entre promesses et menaces, entre espoir et risque.

Comme tout progrès, les avancées des Biotechnologies sont ambivalentes. Dresser ce constat ne doit pas inviter à l'inaction. Il faut au contraire relever le défi des biotechnologies, en leur faisant tenir leurs promesses et en dominant les risques dont elles peuvent être porteuses. Principe de progrès et procédures de précaution doivent donc aller de pair dans le cadre d'un humanisme éclairé.

### 5.1. Les promesses des Biotechnologies

En matière de santé, le déchiffrement du génome humain, en conjonction avec celui d'autres espèces, ouvre des perspectives médicales d'une ampleur encore récemment insoupçonnée. Diagnostic et prévention des maladies, mise au point de thérapies nouvelles, découverte de nouvelles familles de médicaments et thérapie génique et cellulaire. La pharmacogénomique, qui utilisera les informations issues des recherches sur le génome humain pour concevoir de nouveaux médicaments, accélérera cette évolution.

- Les traitements et les médicaments de demain seront plus efficaces et plus sûrs.
- Les applications agro-industrielles des Biotechnologies ont permis d'améliorer les plantes d'intérêt agronomique et la sélection d'espèces animales d'élevage.
- La biomasse générée pourrait fournir des énergies de substitution telles que le biodiesel et le bioéthanol. La science des matériaux bénéficiera pour sa part des propriétés étonnantes de certaines macromolécules comme l'exemple de la soie d'araignée plus résistante que l'acier.

Les Biotechnologies offrent de nouveaux moyens pour protéger et améliorer l'environnement: Les pistes de recherche actuellement explorées sont celles de la bioremédiation de l'air, des sols, de l'eau et le traitement des déchets pollués.

Les nouvelles méthodes biotechnologiques facilitent, en effet, le développement de produits et de procédés industriels plus propres. Dans un proche avenir, une véritable éco-industrie biotechnologique apparaîtra dans les pays industrialisés et constituera l'une des solutions à la pollution causée par le développement industriel et par l'urbanisation.

Les technologies de biosurveillance ont un avenir industriel certain; il s'agit d'un service économiquement rentable et socialement utile, qui sera l'un des outils du développement durable.

## 5.2. Les risques potentiels des Biotechnologies

Les biotechnologies peuvent comporter des risques, connus ou inconnus, supposés ou avérés.

L'exercice est d'autant plus délicat que les Biotechnologies suscitent à la fois fascination et inquiétude. Maîtriser le risque aujourd'hui, c'est d'abord gérer l'incertitude et éclairer les choix des concitoyens par une information aussi exacte et exhaustive que possible.

Des incertitudes sanitaires et environnementales pèsent sur les OGM dans l'agriculture et l'alimentation. Les opposants aux OGM insistent sur l'absence de recul et l'insuffisance des connaissances sur les effets à long terme de ces aliments.

Le risque environnemental des OGM végétaux est mieux appréhendé. Il est lié à la dissémination involontaire des gènes de cultures génétiquement modifiées vers les autres cultures et surtout vers la biosphère. Il est pourtant loin d'être démontré que les biotechnologies portent en elles-mêmes atteinte à la biodiversité. Elles peuvent au contraire aider à la conservation d'espèces ou de variétés en voie de disparition.

- Les interrogations éthiques suscitées par la génétique et la biologie humaine mettent en jeu des valeurs fondamentales: clonage humain, modification de la lignée germinale au stade de l'embryon, diagnostic pré-implantatoire pour choisir le sexe du futur enfant,... Au regard de tels enjeux, il est compréhensible que les biotechnologies appliquées à l'homme provoquent autant de débats philosophiques et de controverses politiques.
- La génétique humaine concerne l'avenir même de notre espèce. Pour la première fois l'homme se fait ingénieur de l'homme. Il est nécessaire de déterminer aujourd'hui jusqu'où il est possible d'aller. L'absence de véritables repères ne permet pas de donner de réponse définitive, mais le droit fournit déjà certains garde-fous. Le débat bioéthique est désormais un débat citoyen. De l'Europe à l'Asie en passant par l'Amérique du Nord, peu nombreux sont les dirigeants politiques qui n'ont pas pris position sur telle ou telle pratique recouvrant des enjeux non seulement économiques mais moraux. Il appartient à la collectivité dans son ensemble de préciser jusqu'où aller et quelles limites ne pas franchir.

## 6. Le rôle des Biotechnologies dans le développement durable : cas des OGM

Selon l'ISAAA, Les Plantes Génétiquement Modifiées (PGM) contribuent à la pérennité de cinq manières différentes :

### 6.1. Contribution à la sécurité alimentaire humaine et animale et en fibres ainsi qu'autosuffisance, y compris des aliments plus abordables, en augmentant la productivité et les bénéfices économiques pérennes au niveau de la ferme.

Des gains économiques au niveau de la ferme de ~ 116,9 milliards de \$ US ont été générés par les cultures GM lors de la période de 17 ans, de 1996 à 2012. 58% de ces bénéfices sont dus à la diminution des coûts de production (moins de labourage, moins de traitements pesticides et moins de travail) et 42% proviennent d'importantes augmentations de rendement (377 millions de tonnes).

### 6.2. Conserver la biodiversité - les cultures GM sont une technologie préservant des terres

Les cultures GM sont une technologie préservant des terres, capable d'augmenter la productivité sur les 1,5 milliards d'hectares de terres arables. Elles peuvent ainsi aider à empêcher la déforestation et à protéger la biodiversité dans les forêts et autres sanctuaires de biodiversité – une stratégie d'intensification durable. Environ 13 millions d'hectares de biodiversité, forêts tropicales riches, sont perdus chaque année dans les pays en voie de développement. Si les 377 tonnes supplémentaires d'aliments pour les hommes et les animaux et de fibres produites par les plantes GM durant la période 1996 - 2012 n'avaient pas été produites par les cultures GM, 123 millions d'hectares supplémentaires de cultures traditionnelles auraient été nécessaires pour produire le même tonnage.

### 6.3. Contribution à la diminution de la pauvreté et de la faim

A ce jour, le coton GM dans les pays en voie de développement comme la Chine, l'Inde, le Pakistan, la Birmanie, le Burkina Faso et l'Afrique du Sud ont déjà apporté une importante contribution aux revenus des petits fermiers pauvres s'élevant à >16,5 millions en 2013. Ceci peut être amélioré dans les 2 dernières années de la seconde décennie de commercialisation, 2014 – 2015, principalement avec le coton et le maïs GM.

### 6.4. Réduction de l'empreinte environnementale de l'agriculture

L'agriculture traditionnelle a eu un impact important sur l'environnement. La biotechnologie peut être utilisée pour réduire l'empreinte environnementale de l'agriculture. Les progrès réalisés à ce jour comprennent : une diminution importante des pesticides ; des économies sur les fiouls fossiles ; une diminution des émissions de CO2 via une absence ou une diminution du labourage ainsi qu'une conservation des sols et de leur humidité en optimisant la pratique de non labourage par l'utilisation de la tolérance aux herbicides.

Une augmentation de l'efficacité de l'utilisation de l'eau aura un impact important sur la conservation et la disponibilité de l'eau dans le monde. Dix-sept pourcent de l'eau fraîche sont actuellement utilisés par l'agriculture mondiale et cela n'est évidemment pas durable dans le futur car la population devrait augmenter d'environ 30% pour atteindre plus de 9 milliards d'ici 2050. Le premier maïs hybride GM possédant une certaine tolérance à la sécheresse sera commercialisé aux USA en 2013. Le premier maïs tropical tolérant à la sécheresse est attendu d'ici ~2017 en Afrique sub-saharienne. La tolérance à la sécheresse devrait avoir un impact considérable sur les systèmes de culture plus pérennes dans le monde, en particulier dans les pays en voie de développement, où la sécheresse est susceptible d'être plus répandue et sévère que dans les pays industrialisés.

### 6.5. Aider à atténuer le changement climatique et à réduire les gaz à effet de serre

Les préoccupations importantes et urgentes concernant l'environnement ont des implications pour les plantes GM, ce qui contribue à la réduction des gaz à effet de serre et aide à atténuer le changement climatique de deux manières principales. Premièrement, des économies permanentes sur les émissions de dioxyde de carbone (CO2) via une diminution de l'utilisation des fiouls fossiles, associée à une diminution du nombre de traitements insecticides et herbicides.

Sécheresse, inondation et changement de température devraient devenir plus fréquents et plus graves alors que nous sommes confrontés aux nouveaux défis associés au changement climatique. Donc, il sera nécessaire d'avoir des programmes de sélection végétale plus rapides afin de développer des variétés et des hybrides bien adaptés aux changements plus rapides des conditions climatiques. Plusieurs outils et techniques de plantes GM, dont la culture de

tissus, le diagnostic, la génomique, la sélection assistée par marqueur moléculaire (SAM) doigts de zinc et les plantes GM, peuvent être utilisés collectivement pour 'accélérer la sélection' et aider à atténuer les effets du changement climatique. Les plantes GM contribuent déjà à réduire les émissions de CO2 en empêchant le besoin de labourage d'une portion

importante de terres cultivées, conservant le sol, en particulier l'humidité, et en diminuant les traitements pesticides ainsi qu'en séquestrant le CO2.

## 7. Qu'est-ce qu'un OGM?

Un 'organisme génétiquement modifié (OGM)' est un organisme dont le matériel génétique a été altéré par un processus qui ne se produit pas dans la nature par croisement ou recombinaison naturelle (Directive 2001/18/EC)

Les OGM peuvent être des végétaux, des animaux ou des micro-organismes tels que des bactéries, des parasites ou encore des champignons.

### Exemple de MGM : production de l'insuline

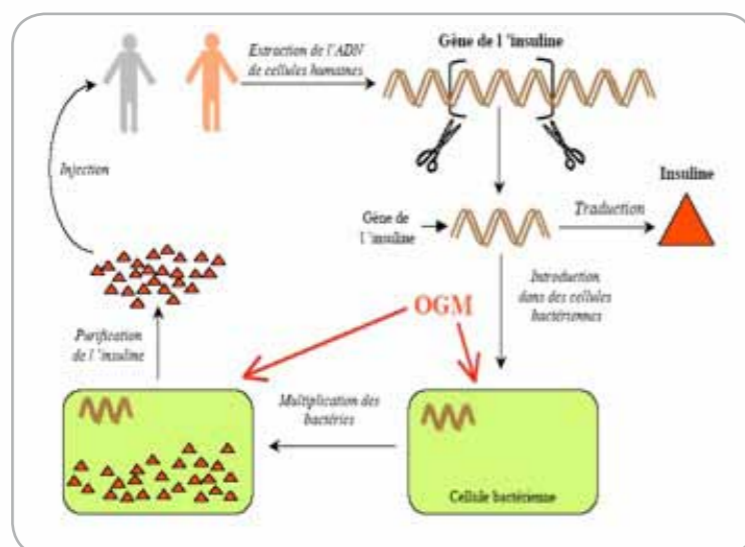


Figure 3: Etapes de la production de l'insuline à partir de Bactéries (Ecoli) Génétiquement Modifiées possédant le gène de l'insuline humaine

Le gène humain codant la fabrication de l'insuline a été isolée et introduit dans des bactéries. Celles-ci sont capables, en raison de l'universalité du code génétique, de traduire ce gène et de produire l'insuline humaine. Elles sont cultivées à grande échelle par l'industrie pharmaceutique pour obtenir de grandes quantités d'insuline. L'hormone est ensuite extraite, purifiée puis injectée aux patients atteints d'une insuffisance en insuline.

### Exemple d'Animal Génétiquement Modifié: Saumon transgénique

Plus de 30 espèces de poissons étaient l'objet de travaux de transformation génétique depuis 1984 avec la production du premier poisson rouge transgénique (*Carassius auratus auratus* L. 1758). Bien que ces améliorations représentent des avantages dans le secteur de l'aquaculture et l'environnement (photo ci dessous), aucun poisson transgénique n'a été commercialisé à des fins alimentaires dans le monde contrairement aux OGM.



Figure 4: Différence entre saumon sauvage et saumon GM obtenue après l'insertion du gène de l'hormone de croissance (Chaouachi et al. 2011)

## 8. Les plantes Génétiquement Modifiées (PGM)

### 8.1. Qu'est ce que la transgénèse?

Technique de transfert et d'intégration d'un ou plusieurs gènes à l'intérieur du patrimoine génétique d'un organisme vivant

### 8.2. Qu'est-ce qu'une plante transgénique ?

Une plante transgénique est une plante dont le génome a été modifié par génie génétique, ie par l'introduction d'un gène provenant d'une autre plante, d'une bactérie ou de tout autre organisme.

### 8.3. Qu'est-ce qu'un évènement de transformation ?

Un évènement = le résultat d'une expérience de transformation réussie. Plusieurs évènements diffèrent par leurs composants génétiques spécifiques et par l'emplacement d'insertion de l'ADN étranger dans leur génome.



## 9. Etapes d'obtentions d'une PGM

### ETAPE 1 - Identification, isolement, intégration et multiplication du gène d'intérêt

La première étape est l'identification d'un caractère que l'on veut introduire dans la plante. Le code génétique étant universel, le gène d'intérêt peut provenir de tout organisme vivant. Après son isolement, il est intégré dans une construction génétique (plasmide par exemple) associant souvent un gène marqueur (comme la résistance à un antibiotique ou à un herbicide).

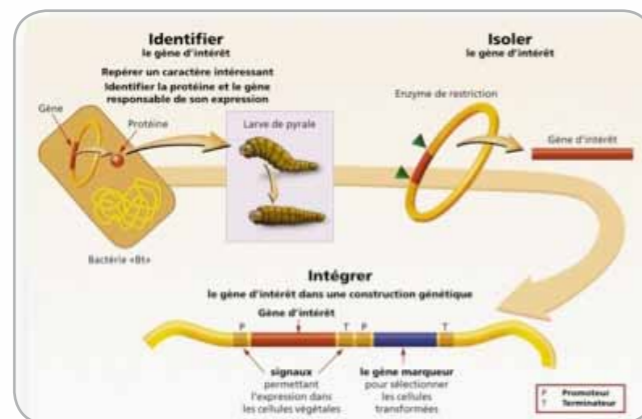


Figure 5: Identification, Isolement, Intégration et Multiplication du gène d'Interêt

### ETAPE 2 - Le transfert du gène

Le transfert du gène dans la cellule hôte peut s'effectuer par plusieurs méthodes (biologique, physique ou chimique).

**La transformation biologique:** utilise une bactérie du sol, *Agrobacterium tumefaciens*, qui a la propriété de réaliser naturellement la transformation génétique d'une plante. Ainsi, la construction génétique introduite dans la bactérie sera transférée dans la plante et intégrée dans son génome. C'est la technique la plus couramment utilisée. Les cellules, tissus, organe ou fragment d'organe de la plante peuvent être employés comme explant cible du transfert. Généralement, c'est le protocole de régénération qui dicte le type d'explant à utiliser.

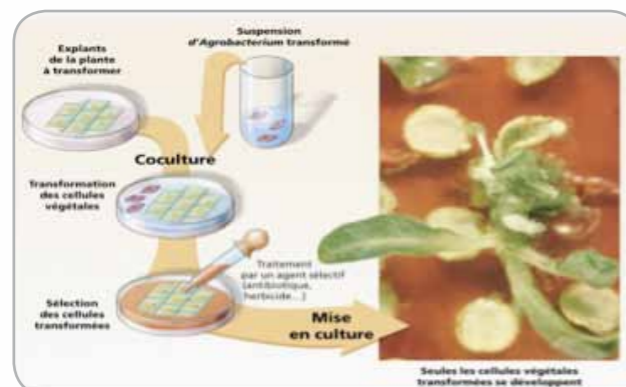


Figure 6: Transfert d'un gène d'Interêt dans la Cellule Hôte

### ETAPE 3 - Régénération, vérification et évaluation des plantes transformées:

Après sélection des cellules transformées, il faut régénérer *in vitro* les nouvelles plantes transgéniques. La durée de ce processus de régénération varie de quelques semaines (plantes herbacées) à plusieurs mois (plantes ligneuses). Quand les racines sont suffisamment développées, les plantules sont repiquées en pot et acclimatées en serre.

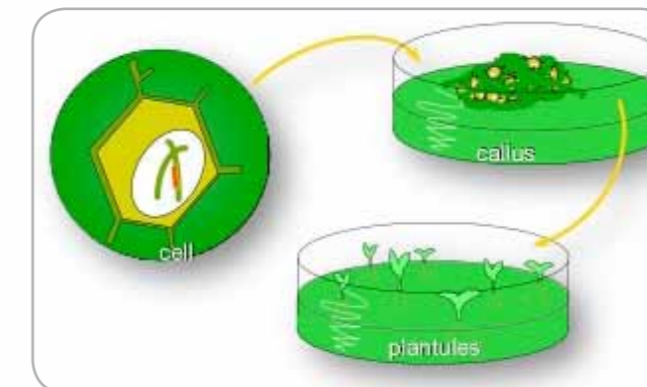
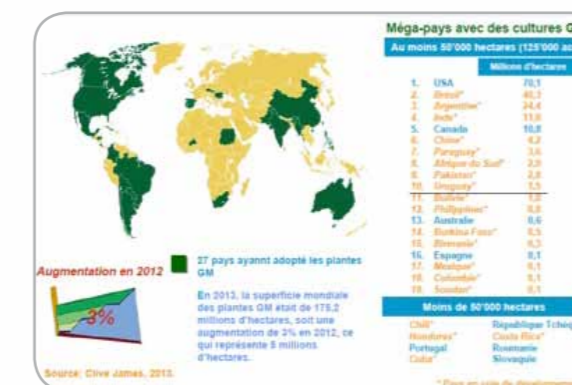


Figure 7: Régénération, vérification et évaluation des plantes transformées

## 10. Superficie mondiale (en millions d'hectares) des cultures GM, 2013 : par pays (ISAAA, 2014)



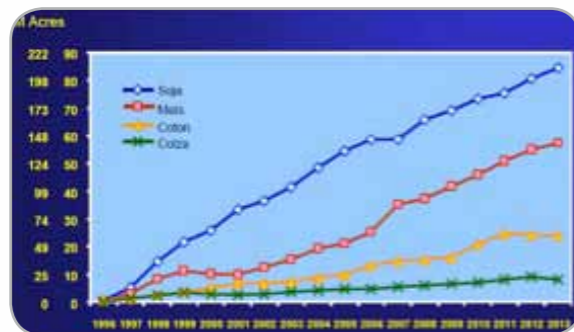
### 10.2. Les cultures de plantes GM ont augmenté en 2013, 18ème année consécutive de commercialisation.

Un record de 175,2 millions d'hectares de plantes GM a été cultivé dans le monde en 2013, avec un taux de croissance annuelle de 3%, soit 5 millions de plus que les 170 millions d'hectares cultivés en 2012. Cette année, 2013, 18ème année de commercialisation, 1996-2013, a montré une croissance continue après une période remarquable de 17 années consécutives de croissance. Fait notable, 12 des 17 années ont connu un taux de croissance à deux chiffres.

### 10.3. Les cultures GM sont la technologie végétale la plus rapidement adoptée.

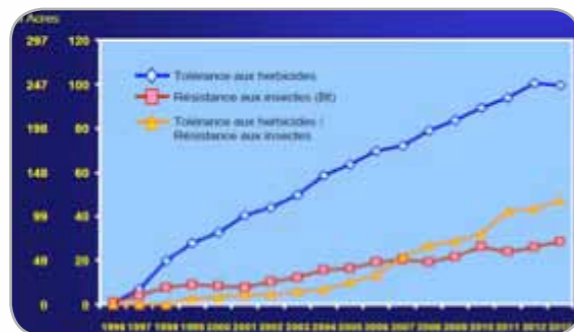
La superficie mondiale de cultures GM a augmenté plus de 100 fois, passant de 1,7 millions d'hectares en 1996 à plus de 175 millions d'hectares en 2013, ce qui fait des plantes GM, la technologie végétale la plus rapidement adoptée dans l'histoire récente. Ce taux d'adoption parle de lui-même en termes de résilience et de bénéfices pour les fermiers et les consommateurs.

Superficie mondiale des cultures GM, 1996 – 2013 : Par culture (en millions d'hectares, millions d'acres)



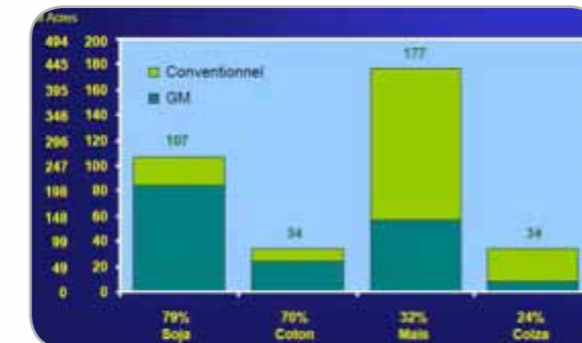
En 2013, au niveau mondial, les principales cultures de plantes génétiquement modifiées sont : le soja tolérant aux herbicides : 84,53 millions d'hectares le maïs : 56,64 millions d'hectares, le coton : 23,8 millions d'hectares, le colza : 8,16 millions d'hectares.(ISAAA, 2014)

Superficie mondiale des cultures GM, 1996 – 2013 Par caractère (en millions d'hectares, millions d'acres)



Entre 1995 et 2013, la tolérance aux herbicides est restée le caractère dominant. Les plantes génétiquement modifiées permettant la tolérance aux herbicides (soja, maïs, colza, coton, betterave sucrière et luzerne) ont occupé 59% ou 93,9 millions d'hectares de la superficie mondiale des cultures génétiquement modifiées. Les plantes intégrant des empilements de 2 ou 3 gènes ont vu leur surface augmenter pour atteindre plus d'un quart de la superficie mondiale des cultures génétiquement modifiées. Un soja résistant aux insectes et tolérant à un herbicide a été planté pour la première fois cette année. (ISAAA,2014)

Taux d'adoption mondiaux (%) des principales cultures GM (en millions d'hectares, millions d'acres), 2013



Soja (conventionnel 21% et GM 79%), Coton (conventionnel 30% et GM 70%), Maïs (conventionnel 68% et 32GM %), Colza (conventionnel 76% et 24%GM)(ISAAA, 2014).

## 11. Coexistence entre cultures conventionnelles, biologiques et biotechnologiques

Tout en préservant l'environnement, les biotechnologies peuvent contribuer à produire mieux, en quantité comme en qualité, et soutiennent in fine la compétitivité de l'agriculture. Ceux qui défendent cette dernière vision souhaitent avancer de façon raisonnée dans le développement de ces nouvelles technologies, en laissant à chacun le choix de ses modes de production et de consommation.

L'objectif est donc de rechercher les conditions d'une coexistence réaliste entre les différentes formes filières d'agriculture. Celles-ci remplissent chacune une fonction spécifique, et, en assurant une véritable diversité de l'offre, préservent la richesse agricole. Il apparaît ainsi essentiel de maintenir une liberté de choix aux agriculteurs entre les modes de production les plus adaptés à leur savoir-faire, leurs débouchés ou leurs convictions.

### 11.1. La notion de filière de production

Une filière de production est généralement caractérisée par un cahier des charges qui permet de produire une qualité spécifique et identifiable. On entend aussi parler de « filières » pour décrire des productions génériques, comme « l'Agriculture Biologique », la « filière maïs » ou « l'agriculture conventionnelle ».

### 11.2 La question de coexistence entre ces filières spécialisées

Les professionnels ont mis en place des cahiers des charges qui tiennent compte à la fois des objectifs de qualité visés par une filière et des coûts induits. La recherche d'un compromis optimal entre une pureté aussi élevée que possible et un surcoût aussi réduit que possible est à la base de l'économie de toutes les filières.



### 11.3 La définition d'un seuil de présence fortuite

La fixation d'un seuil de présence fortuite d'OGM n'a aucunement pour objet de maîtriser un risque pour la santé comme pour l'environnement. Le seuil est utilisé dans le cas d'une présence accidentelle d'OGM ou techniquement inévitable. Les OGM autorisés à l'importation ou à la culture en plein champ ayant fait l'objet d'évaluations qui ont conclu à leur innocuité, le seuil répond uniquement à un souhait d'information de l'utilisateur, agriculteur, industriel ou consommateur.

## 12. La Biosécurité

La Biosécurité désigne les mesures visant à protéger la santé humaine et l'environnement (ce qui comprend la santé animale, la santé végétale et la biodiversité) lors de l'utilisation d'organismes pathogènes (par exemple : virus, bactéries et parasites) et/ou d'organismes génétiquement modifiés (OGM, par exemple: plantes, bactéries et animaux transgéniques).

### 12.1. Qui est concerné par la Biosécurité ?

Toutes les personnes mises en contact avec un organisme pathogène et/ou génétiquement modifié au cours de leurs activités sont concernées par les mesures de biosécurité.



Du fait de la présence «ubiquitaire» des OGM et/ou d'organismes pathogènes au sein de la plupart des laboratoires de recherche, une formation préalable en Biosécurité est imposée à toute personne y travaillant (technicien, chercheur, ingénieur industriel) en formation (étudiant en cours de stage, de mémoire ou de thèse de doctorat).

*Ne pas confondre Biosécurité et Biosureté. Cette dernière désigne l'ensemble des mesures destinées à prévenir l'utilisation ou la dissémination volontaire du matériel biologique (agents biologiques ou toxines) à des fins criminelles ou malveillantes*

## 13. Biosécurité et OGM: Conditions générales de manipulation

Toute expérience réalisée dans un laboratoire ayant un type de confinement donné doit respecter des exigences de travail propres. Les contraintes correspondant à une classe de confinement donnée comprennent automatiquement les contraintes des classes inférieures. Un exemplaire des règles à suivre doit être affiché à l'intérieur des locaux. Lorsqu'il s'agit d'expérimentations impliquant la manipulation d'organismes biologiques pathogènes (génétiquement modifiés ou non), les personnes directement impliquées dans ces expérimentations doivent être soumises à des contrôles réguliers et en cas de nécessité, à un traitement prophylactique approprié (vaccination, médicaments, etc.) en accord avec les autorités médicales compétentes.

Des dispositifs de décontamination et d'inactivation immédiate des organismes biologiques manipulés doivent être disponibles dans chaque laboratoire.

Lorsque des animaux de laboratoire sont délibérément contaminés par un ou plusieurs agents pathogènes, ils doivent être manipulés et hébergés dans des locaux répondant aux conditions de confinement requis. Il est donc important que les responsables de laboratoires, ensemble avec les services de contrôle compétents, s'assurent de l'ensemble des installations et des bonnes pratiques de travail.



A cet égard, Il est recommandé que le responsable ait reçu une formation spécifique sur ces risques et sur leurs gestions en cas d'accident. Les systèmes de sécurité doivent faire l'objet de vérifications techniques régulières pour s'assurer de leur performance.

Par conséquent, seule l'application intégrale et simultanée de toutes les normes de sécurité peut assurer une protection réelle. Etant donné qu'il est difficile de tout prévoir, les autorités compétentes pourront, en cas de besoin, donner des dérogations ou des prescriptions plus ou moins contraignantes.

## 14. Le principe de précaution

Selon le principe 15 de la Déclaration de Rio de 1992 sur l'environnement et le développement qui reste le texte de référence le plus généralement admis:

**« Pour protéger l'environnement, des mesures de précaution doivent être largement appliquées par les Etats selon leurs capacités. En cas de risque de dommages graves ou irréversibles, l'absence de certitude scientifique absolue ne doit pas servir de prétexte pour remettre à plus tard l'adoption de mesures effectives visant à prévenir la dégradation de l'environnement ».**

Il s'agit donc d'une mesure dont l'objectif est la protection de l'environnement et la prévention de sa dégradation. Le cœur de la précaution est la nécessité de prendre des mesures effectives le plus tôt possible, même en cas d'incertitude scientifique.

En termes juridiques cela signifie que des mesures de prévention doivent être prises le plus tôt possible face à des risques de dommages dont on ne sait pas encore s'ils sont susceptibles d'intervenir en portant gravement atteinte à l'environnement.

Aussi doit-on dorénavant clairement distinguer deux types de mesures de prévention: la prévention classique pour éviter la survenance de dommages dont on connaît par avance les conséquences (par exemple en ce qui concerne les explosions ou les incendies liés à l'usage de produits inflammables ou explosifs, ...) et la prévention renforcée pour éviter la survenance de dommages dont on ne connaît pas les conséquences en raison de l'incertitude scientifique ou de la controverse scientifique concernant leurs conséquences réelles (par exemple les effets à long terme de rejets chimiques dans les océans, les effets des faibles doses de radioactivité, les effets des organismes génétiquement modifiés, les effets des pesticides ).

## 15. Le Protocole de Cartagène sur la prévention des risques biotechnologiques relatif à la Convention sur la diversité biologique

- Issu de la convention des Nations Unies sur la diversité biologique du 22 Mai 1992
- La convention de Rio: principal instrument international chargé d'étudier les questions sur la diversité biologique.
- Il a été adopté par consensus à Montréal le 29 Janvier 2000 suite après 4 ans de négociations (démarrées en 1996).
- Il est entré en vigueur en Septembre 2003.
- 156 pays ont ratifié ce protocole (juillet 2009) dont 40 pays d'Afrique, 37 pays d'Asie, 20 pays d'Europe Centrale et Est, 21 pays d'Europe de l'Ouest et 25 pays d'Amérique du sud.

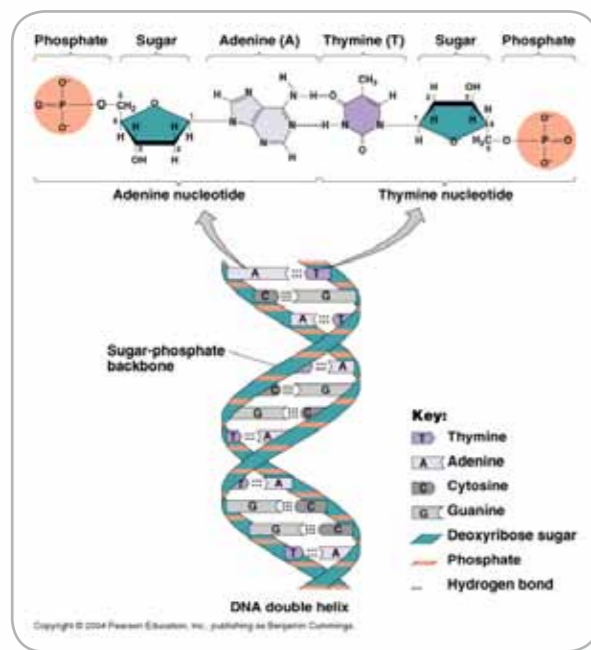
- L'Union européenne et ses États membres ont adhéré au protocole en Mai 2000.
- EN TUNISIE LE PROTOCOLE A ÉTÉ SIGNÉ LE 17 AVRIL 2001 ET RATIFIÉ LE 14 JUIN 2002 PUIS ENTREE EN VIGUEUR LE 11 SEPTEMBRE 2003
- Absents: USA (non membre CBD), Canada (non ratifié), Argentine (non ratifié)
- Objectif: Conformément à l'approche de précaution consacrée par le Principe 15 de la Déclaration de Rio sur l'environnement et le développement, l'objectif du Protocole est de contribuer à assurer un degré adéquat de protection pour le transfert, la manipulation et l'utilisation des organismes vivants modifiés résultant de la technologie moderne qui peuvent avoir des effets défavorables sur la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique, compte tenu également des risques pour la santé humaine, en mettant plus précisément l'accent sur les mouvements transfrontières.
- Cette disposition énoncent l'objectif ayant inspiré l'élaboration du Protocole, en d'autres termes: pourquoi a-t-il été négocié et adopté? A quoi sert-il?
- L'objectif a aussi des effets juridiques. Les Etats signataires sont tenus de ne pas agir à l'encontre de l'objectif, et la mise en œuvre du Protocole doit se conformer à cet objectif. Plusieurs dispositions du texte renvoient à l'objectif, en tant que norme de conduite pour les Parties.

**Introductory guide for biotechnology and biosafety:  
case of Genetically Modified Organisms (GMOs)**



## 1. What is DNA? A universal molecule

Deoxyribonucleic acid, or DNA, is a molecule present in all living cells (Universal molecule). In eukaryotic cells, the DNA is contained in the core and a small part in the mitochondria and chloroplasts. In prokaryotic cells, the DNA is contained in the cytoplasm. Some viruses also possess DNA in their capsid.



DNA is a macromolecule polymer of nucleotides (dAMP, dTMP, dGMP, dCMP). Its structure and chemical properties enable it to perform the following functions:

- Its main function is to store genetic information, information which determines the development and functioning of an organism. This information is contained in the non-random sequence of nucleotides.
- Another essential function of DNA is the transmission of this information from generation to generation (heredity).

The information carried by DNA can be modified over time. This results in a diversity of individuals and possible evolution. This is due to mutations caused mainly by errors during replication of DNA sequences (addition, deletion or substitution of nucleotides), or genetic recombination.

DNA is the carrier of genetic information but also the support variations. Undergoing the effects of natural selection, DNA allows biological evolution species.

Figure 1: Double Strand DNA Molecule

## 2. What is a gene? It is the structural and functional unit of the living

A gene is defined as a chain of deoxyribonucleotides, elements of the DNA sequence, to be transcribed into ribonucleic acid (RNA).

In most cases, a gene begins with a sequence of nucleotides called promoter, whose role is to allow initiation but also the regulation of transcription of DNA into RNA, and finishes with a terminator sequence, which marks the termination of transcription.

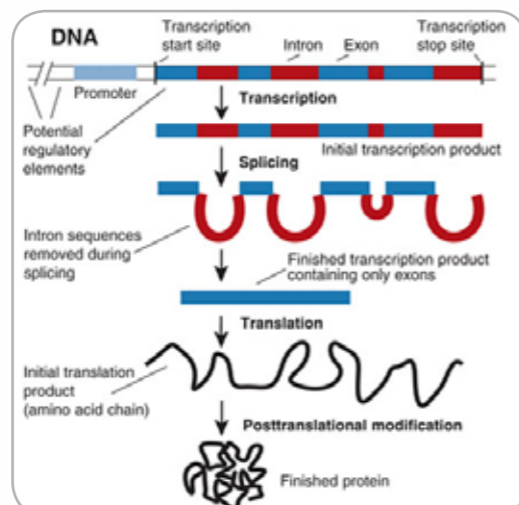


Figure 2: Structural and Functional Unit of Genes

The RNA molecule thus produced can either be translated into a protein, in this case it is called the RNA messenger, or can be directly functional as is the case for ribosomal RNA or transfer RNA.

There are approximately 13000 genes in the DNA of cells in the vinegar fly 25 000 genes in Arabidopsis Thaliana and 21000 genes in humans.

## 3. Natural transfer of genes in nature

Systems of natural DNA transfer exist and also lead to the appearance of organisms whose genetic material has changed. The best known examples are :

The **retroviruses** are viruses able to integrate their genetic material into the genome of the host. Due to sequences present on either side of the viral DNA, it is recognized and integrated into the host genome.

Plasmids are small circular DNA, mobile and movable from one cell to other molecules. Some plasmids can then integrate into the host cell genome. This form of DNA transfer is observed for the bacteria, particularly genes for resistance to antibiotics. Integrating plasmids (or fragments of plasmid DNA) into the genome of a higher organism is limited to specific bacteria such as *Agrobacterium tumefaciens*, which has a known Ti plasmid including a fragment (T-DNA) which is able to enter in a plant cell and integrate into its genome.



DNA filament is integrated into bacterial chromosome and directs the operation of the bacterium.



The virus DNA copies itself in many exemplars and sometimes some copies contain pieces of bacterial DNA. Copies are surrounded by an envelope and get out of the bacterium to form a new virus. Those which have incorporated a piece of bacterial DNA will become genetically modified viruses and go parasitize other bacteria thus transferring DNA from one bacterium to another.

Reproduction of interbreeding individuals allows the exchange of DNA between two individuals of two varieties, subspecies, species or genera. The resulting hybrid has a mixture of genetic characteristics of both parents. Mutations result from changing one nucleotide by another or from deleting or inserting nucleotide sequences. These natural changes can induce the onset of genetic diseases or cancers. But the changes are also one of the drivers of evolution..

## 4. Biotechnologies and domains of application

Life sciences raise important policy and societal issues and are the subject of a large public debate. A profound revolution is happening in the state of knowledge of biotechnology, paving the way for new applications in health care, agriculture, food production and environmental protection:

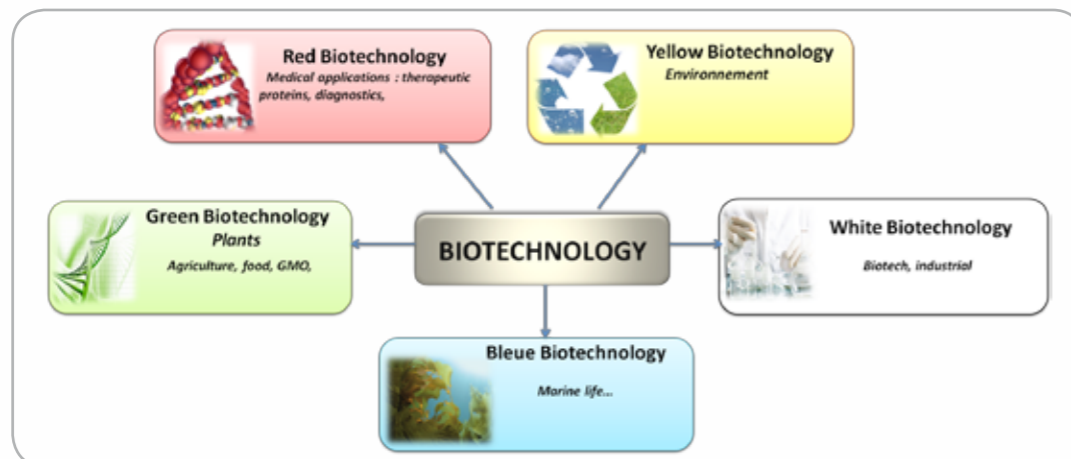
As defined in the Cartagena Protocol, “modern biotechnology” means the application of:

- In vitro nucleic acid techniques, including recombinant deoxyribonucleic acid (DNA) and direct injection of nucleic acid into cells or organelles, or
- Fusion of cells beyond the taxonomic family that overcome natural physiology of the reproductive or recombination barriers and that are not techniques used in traditional breeding and selection of conventional type.

We distinguish different categories of Biotechnologies coded with colors depending on their domain of application (Figure above).

### 4.1. White Biotechnology (industrial Biotechnology):

regroupent les applications industrielles, par l'emploi de systèmes biologiques comme alternative aux procédés chimiques classiques. Les premières utilisations sont dans les secteurs des polymères, des carburants, des dissolvants,



de la construction, du textile, et de tous les produits à dominante chimique. In the non-food sector, biotechnology contributes to improving the use of industrial raw materials for the pharmaceutical industry as well as energy production. The gene modifications under development include carbohydrates, oils, fats, protein and fiber.

### 4.1. Green Biotechnology (Agricultural Biotechnology):

Concerns the food industry and regroups a serie of technopolgies that use plants and their cells for the the production and the transformation of food products, biomaterial and energy. In the food industry, biotechnology improves the quality of animal feed to help prevent disease and reduce health risks. Research on the plant genome is a key element. In this regard, the world acreage devoted to genetically modified crops is steadily increasing.

### 4.3. Yellow Biotechnology (Environmental Biotechnology):

Includes all the Biotechnologies related to environnement protection and the treatment or the elimination of polutions. From an environmental perspective, biotechnology offers new ways of improving the environment by protecting the air, soil, water and waste. The research focuses on the development of cleaner products and industrial processes, as well as more sustainable agricultural practices.

### 4.4. Red Biotechnology (Medical Biotechnology):

Concerns the health domain and particularly the pharmaceutic industry in which a big part of actual research relies on Biotechnology. In the health sector, biotechnology already enables the production of an increasing number of drugs and medical services. In this context, research on stem cells opens the way for replacement of tissues and organs to treat degenerative diseases and other diseases such as Alzheimer and Parkinson.

Today, biotechnology with its multiple facets imposes itself as an essential tool for the development of answers to the problems of hunger, health and the maintaining a sustainable environmental and ecological balance. The most controversial issue concerns the use of recombinant DNA to produce genetically modified organisms

## 5. Biotechnologies between promises and risks

Where the twentieth century was the century of the atom, the twenty-first century could well be that of the gene and the living.

Biotechnologies are decisive agents of cultural and social changes: changes in the way we give life, to heal and to address aging as well as changes in our agricultural and industrial production methods, in our environment protection ways and changes in our diet.

Biotechnologies raise particular ethical issues as they give Man unprecedented power over the living, power he has to master. Moreover, at times when security is vital, the right to health safety and a healthy environment must be ranked among the universal human rights. Again, biotechnologies raise specific questions and promise threats balancing between hope and risk.

As any other progress, advances in biotechnology are ambivalent. Drawing this conclusion should not equal inaction. Instead, we must face the biotechnologies challenges, taking advantage of their promises and manage the risks they may carry. There should be a balance between an enlightened humanism on the one hand and precautionary progress on the other.

## 6. Biotechnologies' promises

Deciphering the human genome as well as other species genomes opens up medical perspectives in previously unimagined directions. The diagnosis and prevention of diseases prevention, the development of new therapeutics, the discovery of new families of drugs, the gene and cell therapy are all new trends in healthcare. Pharmacogenomics, using information from research on the human genome to develop new drugs, has just accelerate this trend.

- Future treatments and medicines will be more effective and safer.
- The agro-industrial applications of biotechnology have improved the targeted agronomic plants as well as the selection of livestock species.
- The generated biomass could provide alternative sources of energy such as biodiesel and bioethanol. Materials science will benefit from the amazing properties of certain macromolecules such as spider silk being stronger than steel.

Biotechnology offers new ways to protect and improve the environment. The research avenues being explored are air, soil, water and waste bioremediation.

New biotechnological methods facilitate, indeed, cleaner product development and industrial processes. In the near future, a true eco-biotechnology industry will be developed in industrialized countries and will constitute one of the solutions to the industrial and urbanization pollution.

Biomonitoring technologies have certainly some industrial future. They are economically profitable and socially useful and will present a way for sustainable development.

## 7. Potential risks of Biotechnology

Biotechnology may pose known or unknown, suspected or proven risks.

Exercising biotechnology is even more delicate as it encloses both fascination and concern. Today, to control the risk is first to manage uncertainty by provide citizens with as much accurate and comprehensive information as possible to enable them to make informed decisions. Health and environmental uncertainties are still weighing on GMOs in agriculture and food. GMOs opponents insist on the absence of precaution and the lack of knowledge about the long-term effects of these foods.

The environmental risk of GMO plants is now better understood. It is linked to the involuntary release of genetically modified crops genes to other crops and especially to the biosphere. It is far less certain that biotechnologies are themselves harmful to biodiversity. On the contrary, they can help to conserve some endangered species or varieties.

Ethical questions raised by genetics and human biology challenge fundamental values: human cloning, modification of the germ line in the embryonic stage, pre-implantation genetic diagnosis to choose the sex of unborn child. In the light of such issues, it is understandable that biotechnology applied to human cause many provoke philosophical debates and political arguments.

Human genetics concerns the future of our species. For the first time, the man is the engineer of other men. It is now necessary to determine how far he can go. The lack of real guidance does not give a definitive answer, but the law already provides certain safeguards. Bioethical debate is now a public debate. From Europe to Asia to North America, few political leaders have not taken a position on economic and moral issues of biotechnology practice. It is up to the community as a whole to specify how far to go and which boundaries not to cross.

## 8. The role of biotechnologies in sustainable development: case of GMOs

Biotech crops are contributing to sustainability in the following five ways:

### 8.1. According to the ISAAA, Contributing to food, feed and fiber security and self sufficiency, including more affordable food, by increasing productivity and economic benefits sustainably at the farmer level

Economic gains at the farm level of ~US\$116.9 billion were generated globally by biotech crops during the seventeen year period 1996 to 2012, of which 58% were due to reduced production costs (less ploughing, fewer pesticide sprays and less labor) and 42% due to substantial yield gains of 377 million tons. The corresponding figure for 2012 alone was 83% of the total US\$18.7 billion gain due to increased yield (equivalent to 47 million tons), and 17% due to lower cost of production.

### 8.2. Conserving biodiversity, biotech crops are a land saving technology

Biotech crops are a land-saving technology, capable of higher productivity on the current 1.5 billion hectares of arable land, and thereby can help preclude deforestation and protect biodiversity in forests and in other in-situ biodiversity sanctuaries – a sustainable intensification strategy. Approximately 13 million hectares of biodiversity – rich tropical forests, are lost in developing countries annually. If the 377 million tons of additional food, feed and fiber produced by biotech crops during the period 1996 to 2012 had not been produced by biotech crops, an additional 123 million hectares (Brookes and Barfoot, 2014, Forthcoming) of conventional crops would have been required to produce the same tonnage. Some of the additional 123 million hectares would probably have required fragile marginal lands, not suitable for crop production, to be ploughed, and for tropical forest, rich in biodiversity, to be felled to make way for slash and burn agriculture in developing countries, thereby destroying biodiversity.

### 8.3. Contributing to the alleviation of poverty and hunger

To-date, biotech cotton in developing countries such as China, India, Pakistan, Myanmar, Burkina Faso and South Africa have already made a significant contribution to the income of >16.5 million small resource-poor farmers in 2013. This can be enhanced in the remaining 2 years of the second decade of commercialization, 2014 to 2015 principally with biotech cotton and maize.

### 8.4. Reducing agriculture's environmental footprint

Conventional agriculture has impacted significantly on the environment, and biotechnology can be used to reduce the environmental footprint of agriculture. Progress to-date includes: a significant reduction in pesticides; saving on fossil fuels; decreasing CO<sub>2</sub> emissions through no/ less ploughing; and conserving soil and moisture by optimizing the practice of no till through application of herbicide tolerance. The accumulative reduction in pesticides for the period 1996 to 2012 was estimated at 497 million kilograms (kgs) of active ingredient (a.i.), a saving of 8.7% in pesticides, which is equivalent to an 18.5% reduction in the associated environmental impact of pesticide use on these crops, as measured by the Environmental Impact Quotient (EIQ). EIQ is a composite measure based on the various factors contributing to the net environmental impact of an individual active ingredient. The corresponding data for 2012 alone was a reduction of 36 million kgs a.i. (equivalent to a saving of 8% in pesticides) and a reduction of 23.6% in EIQ.

Increasing efficiency of water usage will have a major impact on conservation and availability of water globally. Seventy percent of fresh water is currently used by agriculture globally, and this is obviously not sustainable in the future as the population increases by almost 30% to over 9 billion by 2050. The first biotech maize hybrids with a degree of drought tolerance were commercialized in 2013 in the USA, and the first tropical biotech drought tolerant maize is expected by ~2017 in sub-Saharan Africa. Drought tolerance is expected to have a major impact on more sustainable cropping systems worldwide, particularly in developing countries, where drought will likely be more prevalent and severe than industrial countries.

### 8.5. Helping mitigate climate change and reducing greenhouse gases

The important and urgent concerns about the environment have implications for biotech crops, which contribute to a reduction of greenhouse gases and help mitigate climate change in two principal ways. First, permanent savings in carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) emissions through reduced use of fossil-based fuels, associated with fewer insecticide and herbicide sprays. In 2012, this was an estimated saving of 2.1 billion kg of CO<sub>2</sub>, equivalent to reducing the number of cars on the roads by 0.94 million. Secondly, additional savings from conservation tillage (need for less or no ploughing

facilitated by herbicide tolerant biotech crops) for biotech food, feed and fiber crops, led to an additional soil carbon sequestration equivalent in 2012 to 24.61 billion kg of CO<sub>2</sub>, or

removing 10.9 million cars off the road for one year. Thus in 2012, the combined permanent and additional savings through sequestration was equivalent to a saving of 26.7 billion kg of CO<sub>2</sub> or removing 11.8 million cars from the road (Brookes and Barfoot, 2014, Forthcoming).

Droughts, floods, and temperature changes are predicted to become more prevalent and more severe as we face the new challenges associated with climate change, and hence, there will be a need for faster crop improvement programs to develop varieties and hybrids that are well adapted to more rapid changes in climatic conditions. Several biotech crop tools and techniques, including tissue culture, diagnostics, genomics, molecular marker-assisted selection (MAS) zinc fingers, and biotech crops can be used collectively for 'speeding the breeding' and help mitigate the effects of climate change. Biotech crops are already contributing to reducing CO<sub>2</sub> emissions by precluding the need for ploughing a significant portion of cropped land, conserving soil, particularly moisture, and reducing pesticide spraying as well as sequestering CO<sub>2</sub>.

## 9. What is a GMO?

A Genetically Modified Organism is defined as an organism, in which the genetic material has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination" (Directive 2001/18/EC)

The GMOs can be plants, animals or microorganism such as bacterium parasites or mushrooms

### Example of GMM: Insulin production

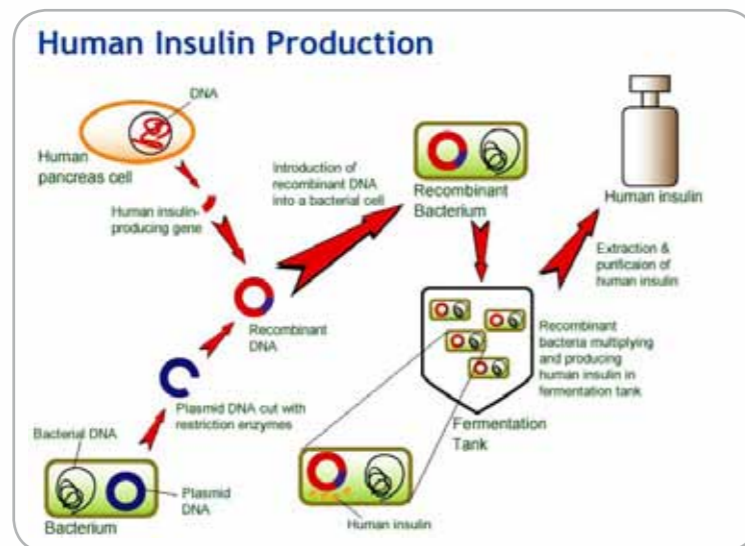


Figure 3: Steps of the insulin production from Genetically Modified Bacteria (Ecoli) using the gene of human insulin

The human gene encoding the insulin was isolated and introduced into bacteria. These later are able because of the universality of genetic code the translation of the gene and the production of the human insulin. They are cultivated on a large scale by the pharmaceutical industry to obtain big quantities of insulin. The hormone is then extracted, purified and injected to patients with insulin deficiency

## Example of Genetically Modified animal : transgenic salmon

More than 30 fish species were the subject of genetic transformation works since 1984 with the production of the first transgenic red fish (*Carassius auratus auratus* L. 1758). While these improvements are advantages in the aquaculture sector and the environment Bien que ces améliorations représentent des avantages dans le secteur de l'aquaculture et l'environnement (photo below), no transgenic fish was commercialised in the world for food purposes unlike genetically modified plants.



Figure 4: Difference between wild salmon and GM salmon obtained after the insertion of the Growth Hormon gene (Chaouachi et al. 2011)

## 10. Genetically Modified Plants

### 10.1. What is the transgenesis?

Technology transfer and integration of one or more genes into the gene pool of a living organism

### 10.2. What is a transgenic plant?

A transgenic plant is a plant whose genome has been altered by genetic engineering, by the introduction of a gene from another plant , a bacterium or other organism .

### 10.3. What is an event of transformation?

An event = the result of a successful transformation experiment. Several events differ in their specific genetic components and the site of insertion of foreign DNA into their genome.



## 10.4. Steps of obtention of GM plants

### STEP 1 - Identification, isolation, integration and multiplication of the targeted gene

The first step is the identification of a character that is to be introduced into the plant. As the genetic code is universal, the targeted gene may arise from any living organism. After its isolation, the targeted gene is incorporated into a gene construct such as plasmid while often involving a marker gene such as resistance to an antibiotic or herbicide

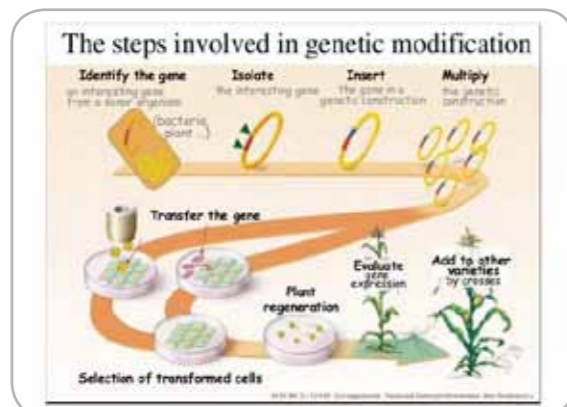


Figure 5: Steps involved in Genetic Modification

### STEP 2 - gene transfer

The transfer of the gene into the host cell can be done using several different biological, chemical or physical methods.

**The biological transformation:** Most commonly used, this technique uses *Agrobacterium*, a soil bacterium, which has the property of naturally transforming genetically a plant. Thus, the genetic construct introduced into the bacterium is transferred into the plant and integrated into its genome.

The cells, tissues, organ or fragment of the plant body can be used as other transfer explants target. Generally, the regeneration protocol dictates the type of explant used.

**STEP 3 - Regeneration, verification and evaluation of the transformed plants:** After selecting the transformed cells, the new transgenic plants must be regenerated in vitro. The duration of this recovery process varies from a few weeks for herbs to several months for woody plants. When the roots are sufficiently developed, the seedlings are transplanted in pots and acclimatized in a greenhouse.

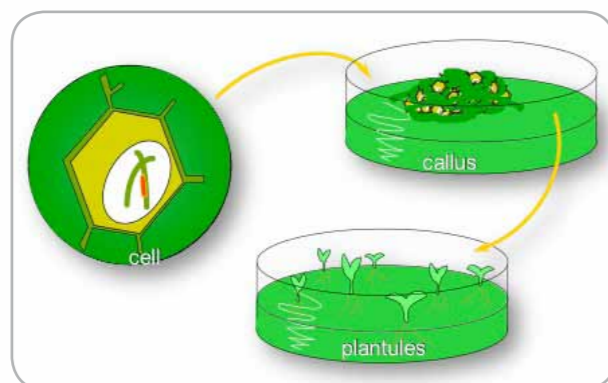
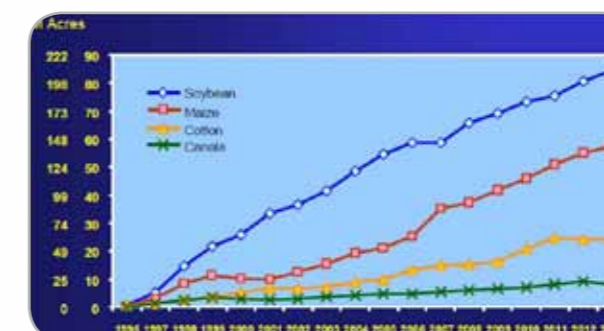


Figure 6: Regeneration, Identification and Evaluation of the Transformed Plants

Global area (Millions Hectare) of Biotech crops, 2013 : by country (ISAAA 2014)

## 10.5. Biotech crops increase in 2013 in their 18th consecutive year of commercialization.

A record 175.2 million hectares of biotech crops were grown globally in 2013, at an annual growth rate of 3%, up 5 million from 170 million hectares in 2012. This year, 2013, was the 18th year of commercialization, 1996-2013, when growth continued after a remarkable 17 consecutive years of increases; notably 12 of the 17 years were double-digit growth rates.

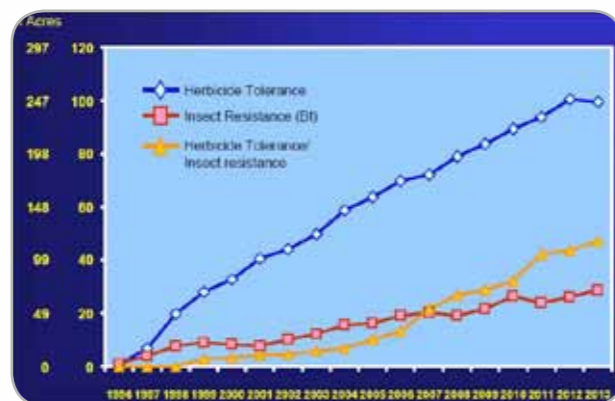


## 10.6. Biotech crops fastest adopted crop technology

The global hectareage of biotech crops have increased more than 100-fold from 1.7 million hectares in 1996 to over 175 million hectares in 2013 – this makes biotech crops the fastest adopted crop technology in recent history. This adoption rate speaks for itself in terms of its resilience and the benefits it delivers to farmers and consumers



Global area of Biotech crops, 1996 – 2013 : by crops (million Hectare, million acres)

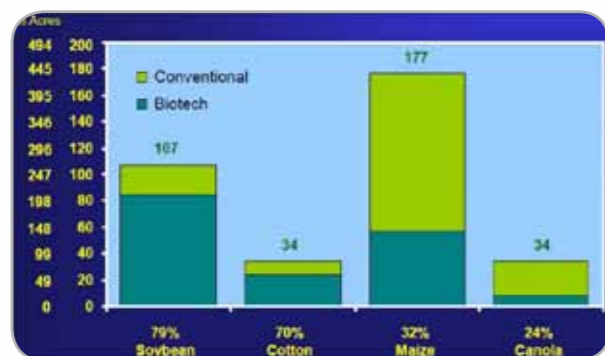


In 2013, worldwide, the principal cultivated genetically modified plants are:

- Tolerant herbicide soybean : 84,53 million Hectare
- Maize: 56,64 million Hectare,
- Cotton : 23,8 million Hectare,
- Canola: 8,16 million Hectare. (ISAAA, 2014)

Global area of Biotech crops, 1996 – 2013 : by trait (million Hectare, million acres)

Between 1995 and 2013, the tolerance to herbicides remained the dominant trait. The GM plants with the tolerance



to herbicides trait (soybean, maize, canola, cotton, sugarbeet and alfalfa) have occupied 59% or 93,9 million Hectare of the global area of Biotech crops. The surface of GM plants with stacked genes have increased to more than a quarter of the global area of Biotech crops. A soybean with resistance to insects and tolerance to herbicides traits have been planted for the first time this year. (ISAAA,2014)

Global adoption rate (%) for principal biotech crops (million Hectare, million acres), 2013

- Soybean (21 % conventional and 79 % GM)
- Cotton (30% conventional and 70% GM )
- Maize (68% conventional and 32% GM )
- Canola (76% conventional and 24% GM ) (ISAAA, 2014)

### Coexistence between conventional, organic and biotech. crops

While preserving the environment, biotechnology can help produce more and better and ultimately support the competitiveness of the agriculture. Those who defend this vision wish to move reasonably forward in the development of these new technologies, leaving everybody free to choose the production and consumption modes he wishes.

The goal is to find conditions for a realistic coexistence between different forms of agriculture that can each perform a specific function, provide a real diversity of supply and conserve agricultural wealth. It thus appears essential that farmers have the freedom to choose the production modes that most suit their know-how, their beliefs and their markets.

### The concept of production chain

Generally, a production chain is generally controlled by terms of reference that help in producing a specific and identifiable quality. We also hear of “channels” to describe generic productions such as “organic farming”, the “maize sector” or “conventional agriculture”.

### The issue of coexistence between these specialized courses

Professionals have established terms of reference that take into account both quality goals and costs. The search for an optimal compromise between the highest possible purity and as low as possible cost is the basis of all sectors economics.

### The definition of a threshold for adventitious presence

Setting a threshold for adventitious presence of GMOs does not aim to control health or environment risks. The threshold is used in the case of accidental presence or technically unavoidable. Studies evaluating GMOs authorized to be imported or cultivated in the open fields have been concluded that they are safe. Thus, the threshold only responds to the need to be informed for the consumer, the farmer, the industrial or any other user.

## 11. Biosafety

Biosafety refers to a set of measures aimed at protecting human health and the environment, including animal health, plant health and biodiversity, on the use of pathogenic organisms such as viruses, bacteria and parasites and / or genetically modified organisms (GMOs) as plants, bacteria and transgenic animals.



### 11.1. Who is concerned with Biosafety?

All persons in contact with a pathogen and / or genetically modified organism during their activities are concerned with biosecurity measures.

Due to the presence of “ubiquitous” GMOs and / or pathogens in most research laboratories, previous training on Biosafety is imposed on any person working there whether technicians, researchers, industrial engineers or students trainees.



**Do not confuse Biosafety and Biosecurity.** The latter refers to all the measures to prevent the use or the voluntary dissemination of biological material (*biological agents or toxins*) for criminal purposes or malicious

## 12. Biosafety and GMOs: General conditions of handling GMOs

Any laboratory experiment within a particular type of containment must meet certain requirements. Constraints for a given class of containment automatically include the constraints of the lower classes. A copy of the rules to follow must be displayed inside the premises. In the case of experiments involving the manipulation of biological pathogens, whether they are genetically modified or not, the people directly involved in these experiments must be regularly checked. If necessary, they should undergo an appropriate prophylaxis treatment and should receive for instance vaccination and/ or drugs in compliance with the competent medical authorities.

Each laboratory should contain decontamination and immediate inactivation of biological organisms devices.



When animals are deliberately infected with one or more pathogens, they must be handled and housed in facilities meeting the required confinement conditions. It is therefore important that laboratory managers, together with the competent control services ensure the respect of good working practices in all facilities.

It is highly recommended that the person in charge has received specific training on managing these risks in case of an accident. Security systems should be regularly audited to ensure their good performance.

Therefore, real protection is possible only by the full and simultaneous implementation of all safety standards. Since it is difficult to predict every possible event, the competent authorities may, where necessary, provide exemptions or more or less restrictive provisions.

## 13. The precautionary principle

According to Principle 15 of the Rio Declaration of 1992 on Environment and Development which remains the reference text most commonly admitted:

**“In order to protect the environment, the precautionary approach shall be widely applied by States according to their capabilities. Where there are threats of serious or irreversible damage, lack of full scientific certainty shall not be used as a reason for postponing cost-effective measures to prevent environmental degradation.”**

This is a measure that aims to protect the environment and prevent its degradation. The necessity to take effective measures as soon as possible, even in cases of scientific uncertainty, is the bear meaning of precaution.

Legally, this implies that preventive measures should be taken as soon as possible to face any damaging threats which we are still fully unaware of their potential damage to the environment.

We should also clearly distinguish between two types of preventive measures. First, the classical prevention that attempts to avoid the consequences of already known damage as is the case of explosions or fires caused by flammable or explosive materials. Second, the reinforced prevention that tries to avoid the consequences of yet to know damages. This lack of knowledge is either caused by scientific uncertainty or scientific controversy about these threats actual consequences. To illustrate, we can give the example of long-term effects of chemical waste dumped in the oceans, the effects of low doses of radiation, the effects of genetically modified organisms or the effects of pesticides.

## 14. The Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity

- Resulting from the United Nations Convention on Biological Diversity 22 May 1992
- The Rio Convention, the main international instrument to discuss issues on biodiversity.
- It was consensually adopted at Montreal on January 29, 2000 following four years of negotiations which started in 1996.
- It entered into force in September 2003.
- By July 2009, 156 countries have ratified the protocol including 40 African countries, 37 Asian countries, 20 countries in Central and Eastern Europe, 21 countries in Western Europe and 25 countries in South America.
- The European Union and its Member States have joined the Protocol in May 2000.
- In Tunisia the protocol has been signed on april 17, 2001 and ratified on juin 14, 2002 and entred into force on septembre 11, 2003
- Absentees: USA (non-member CBD), Canada (not ratified), Argentina (not ratified)
- Objective: In accordance with the precautionary approach contained in Principle 15 of the Rio Declaration on Environment and Development, the objective of this Protocol is to contribute to ensuring an adequate level of protection in the field of the safe transfer, handling and use of living modified organisms resulting from modern biotechnology that may have adverse effects on the conservation and sustainable use of biological diversity, taking also into account risks to human health, and specifically focusing on transboundary movements.
- This provision set out the goal that inspired the development of the Protocol, in other words, why has he been negotiated and adopted? What is it?
- The objective also has legal effects. The signatory states are obliged not to act against the objective and implementation of the Protocol shall comply with this objective. Several provisions in the text refer to the objective, as standard of conduct the Parties.

## Guide sur la détection et la quantification des Organisme Génétiquement Modifiés (OGMs)

## 1. L'ÉCHANTILLONNAGE

L'échantillonnage représente une étape clé, qui va conditionner la justesse et la précision de la détection, l'identification et la quantification des OGM dans un échantillon. Il doit être réalisé dans le respect de la loi relative à la biosécurité et conformément aux méthodes internationales d'usage, notamment les normes ISO6644, 13690, ainsi que les normes ISO 5725 (1994), ISO 2859 (1985), ISO 542 (1990) et les normes FAO (normes internationales pour les mesures phytosanitaires), CODEX ALIMENTARUS. Il est effectué par les autorités compétentes en la matière.

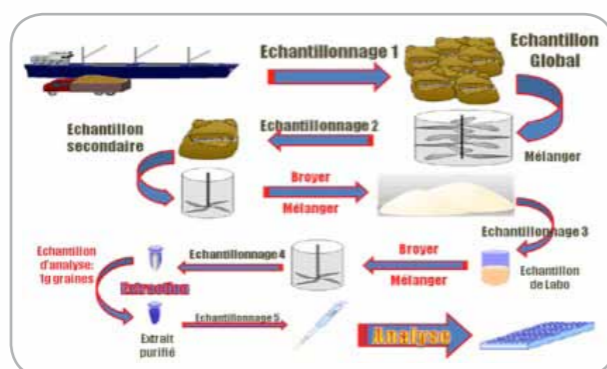


Figure 1: Procédure générale d'échantillonnage

L'échantillonnage 1, 2 et 3 doivent être effectués par des agents compétents. Il est préférable que l'échantillonnage des produits agricoles non transformés (grains, graines oléagineuses) soit réalisé conformément aux normes ISO 6644 et 13690. Dans le cas des grains en mouvement, la période d'échantillonnage doit être définie, conformément à la norme ISO 6644. En cas d'échantillonnage statique, les échantillons élémentaires doivent être prélevés en des points précis. Ces points doivent être uniformément répartis dans le volume total du lot selon les principes décrits dans la norme ISO 13690. Le nombre d'échantillons élémentaires ou de points de prélèvement est défini par la taille du lot, (voir tableau)

Tableau 1: Procédure d'échantillonnage de l'échantillon global

Taille du lot en tonnes	Taille de l'échantillon global en kg	Nbre d'échantillons élémentaires
= 50	5	10
100	10	20
250	25	50
>= 500	50	100

L'échantillonnage de matières plus volumineuses que les grains (fruits, pommes de terre, etc.) doit être réalisé selon la norme ISO 2859 et celui des graines oléagineuses selon la norme ISO 542. Par ailleurs, un contre-échantillon doit être conservé par un service compétent, pour une contre expertise en cas de litige. De même, une copie de l'échantillon global pourrait aussi être effectuée pour les mêmes raisons. L'échantillonnage 4 et 5 s'effectue au niveau des laboratoires de contrôle. Le sous-échantillon de laboratoire est fourni par l'organisme compétent. Il doit être totalement broyé et conservé à une température adaptée au produit en question, ce qui permet de contrôler l'échantillon même plusieurs mois plus tard.

Ensuite, un échantillon d'analyse (échantillonnage 4, Fig.1) doit être prélevé pour en extraire l'ADN (ou les protéines), nécessaires à la détection et la quantification d'OGM. Dans le cas de détection par PCR, la taille de cet échantillon doit être fixée dans le respect de la limite de détection (LOD < ou = à 20 copies équivalents génome) et de la limite de quantification (LOQ=100 copies équivalents génome) conformément à la réglementation sur l'étiquetage (0,9% en UE) et le type de matrice utilisée.

D'une façon générale, 1g est nécessaire lorsqu'il s'agit de produit brut non transformé technologiquement composé à 100% du même produit. Par la suite, plus le produit a subi de transformation, plus il faut augmenter cette quantité. Lorsqu'il s'agit d'un produit complexe composé de plusieurs ingrédients, il faut tenir compte de la proportion du produit à tester pour ajuster la taille de l'échantillon d'analyse.

### Exemple de Matériels d'échantillonnage



Diviseur d'Echantillon



Broyeur Planétaire à Billes

## 2. Méthodes de détection basées sur les protéines: méthodes immunologiques

Les deux principales techniques utilisées en routine sont la méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) sur plaques et les tests sur bandelettes, appelés « strip tests » ou « dip sticks ». Les méthodes immunologiques sont applicables majoritairement à des produits peu ou pas transformés en raison de la sensibilité des protéines aux conditions de transformation des produits.

### 2.1. Détection des protéines transgéniques : ELISA (Enzym Linked Immunosorbent ASSAY)

Cette technique quantitative a été largement utilisée en recherche pour la détermination du taux d'expression des protéines transgéniques.

Dans un certain nombre de cas, des méthodes ELISA appliquées à la détection des OGM ont pu être validées par des tests interlaboratoires, comme celui de la société américaine Strategic Diagnostics Inc. (SDI, Newark, Delaware) qui commercialise un kit d'immuno-diagnostic du soja RRS (*Roundup Ready Soybean*, résistant à l'herbicide glyphosate) produit par Monsanto. Les résultats mettent en évidence un fort impact de la qualité de l'OGM et des variétés cultivées sur la teneur en protéine des plantes. Une teneur en masse de 1% n'est ainsi quasiment pas détectable sur des variétés Bt176. (Chaouachi et al 2007)

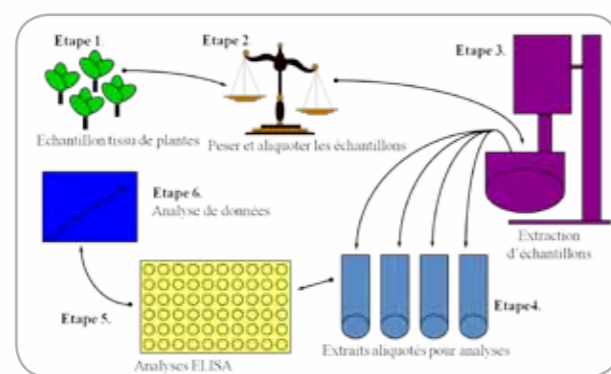


Figure 2: Principe d'ELISA

## 2.2. Détection des protéines transgéniques : Test de Bandelette (Strip test)

Les tests immunologiques sont très largement employés sous la forme de « dip stick » (figure 3). Il s'agit d'une bandelette comprenant, sur un support plastique, une membrane généralement de cellulose encadrée de deux systèmes de papier absorbant. La partie inférieure de la bandelette contenant les anticorps est plongée dans la solution à tester pour la présence de l'antigène et permet de visualiser ultérieurement cette présence par l'apparition d'une bande colorée. Ce test est utilisable en quelques dizaines de minutes, du champ au laboratoire, soit plante par plante dans le cas d'une production de semences OGM ou non OGM, soit par *batch* (assemblage de plusieurs plantes ou de graines). Le système « Strip test » a été particulièrement utilisé pour la détection de la protéine Cry9C Bt issu du gène *Cry9C* lors des retraits de produits contaminés par CBH351 (Starlink) (Chaouachi et al 2007).

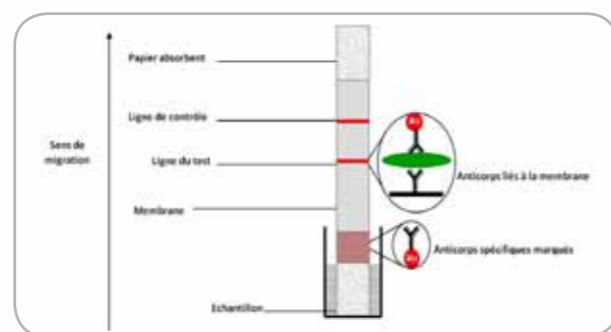


Figure 3: Principe du Test du Bandelette on Strip test

### Désavantages des méthodes immunologiques

- Méthodes spécifiques d'un caractère et pas d'un OGM précis limitées aux produits contenant des protéines (parfois pas de protéines exprimées, ex : dans les graines)
- Sensibilité dépend du niveau d'expression (différent selon les événements, selon les cv issus d'un même événement)
- Possibles réactions croisées des Ac

C'est pour ces raisons qu'aujourd'hui les méthodes basées sur l'ADN sont les méthodes de références en Europe pour la détection et la quantification des OGM.

## 3. Méthodes basées sur la détection de l'ADN

Il est souhaitable d'utiliser des méthodes déjà validées, par exemple en Europe dans le centre de Recherche Commun (Joint Research Center) sinon valider la méthode via des essais inter-laboratoires de référence en Tunisie.

Ce qu'il faut retenir de tous les protocoles validés en Europe, c'est qu'ils commencent toujours avec une méthode d'extraction à base d'un tampon CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) ou SDS (Sodium dodecyl sulfate) et le terminer avec une purification à base de colonnes ou résines. Cette étape de purification est indispensable afin éliminer les inhibiteurs de la PCR qui pourraient fausser les résultats d'analyses.

### 3.1. Principe

Le principe de base de cette méthode d'extraction d'ADN consiste d'abord à libérer l'ADN dans une solution aqueuse puis le purifier. La méthode commence par une étape de lyse sous haute température à l'aide d'un tampon CTAB (genre détergent) suivie d'une extraction au chloroforme ce qui permet de se débarrasser des contaminants (lipides, protéines, sucres). L'ADN est obtenu par précipitation. Il sera alors nettoyé et conservé dans des conditions non dénaturantes. Des kits commerciaux d'extraction et de purification d'ADN sont aussi disponibles. Les procédures sont adaptées selon la nature de l'échantillon.

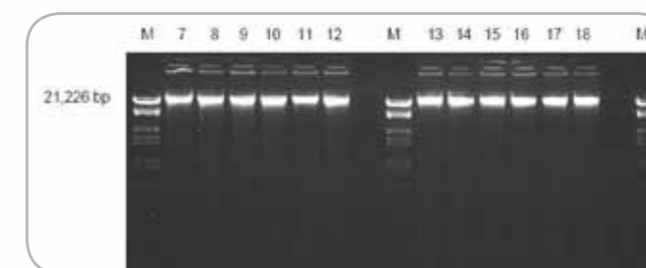


Figure 4: Gel d'électrophorèse de 12 échantillons d'ADN ; La colonne 1 à gauche (puits M) représente le témoin comportant une gamme de fragments d'ADN de tailles connues.

### 3.2. Dosage l'ADN

La concentration de l'ADN extrait est le plus souvent déterminée par des appareils de mesures comme le spectrophotomètre, le fluorimètre ou le Nanodrop. Lors de ces mesures, on peut aussi avoir une idée sur l'état de pureté de l'ADN.

### 3.3. Contrôle de la qualité de l'ADN

La qualité de l'ADN extrait (état de dégradation par exemple), se fait généralement par électrophorèse dans un gel d'agarose à 0,8% en présence d'un témoin (standard) de taille connue (exemple sur la figure ci-dessus)

## 4. DÉMARCHE GLOBALE POUR LA DÉTECTION, IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION D'OGM

Trois tests sont utilisés pour la détection et la quantification des OGM par PCR (figure 5) à savoir :

- Le test de criblage : c'est un test présence/absence qui cible les séquences régulatrices de l'insert
- Le test construit spécifique : cible les jonctions entre promoteur/gène d'intérêt ou terminateur gène d'intérêt
- Le test événement spécifique : cible les jonctions entre génome de la plante et insert

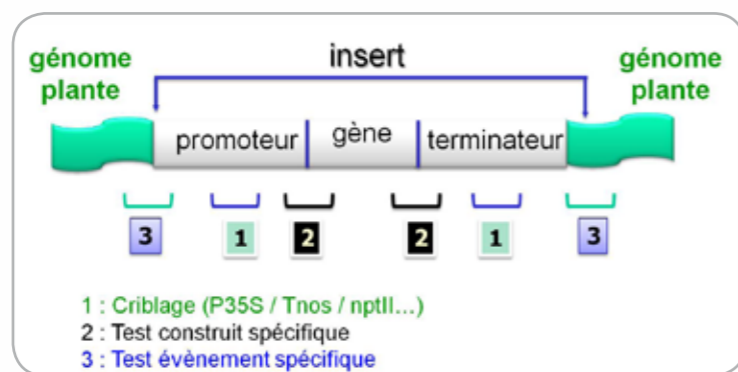


Figure 5: Cibles des Test PCR pour la détection, identification et quantification d'OGM

### 4.1. Première étape du contrôle d'OGM: Le criblage

La détection des OGM est basée sur la détection par PCR qualitative d'événements de transformations courants, c'est-à-dire qu'on va trouver dans la plupart des OGM autorisés sur le marché, à savoir le promoteur P35S du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV), le terminateur TNOS de la nopaline synthase issue de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*, le terminateur T35S du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV), et éventuellement des gènes d'intérêts telles que Cry1A(b), pat, Bar, etc..

Le panel d'amorces utilisé en PCR doit toujours être mis à jours en fonction des OGM qu'on pourrait rencontrer (consulter le site internet du BCH pour avoir une idée exhaustive sur les OGM) (Chaouachi et al. 2007)

### 4.2. Deuxième étape du contrôle d'OGM: L'identification

Après un criblage pour la détection des OGM, les échantillons positifs sont analysés pour identifier le ou les OGM présents (autorisés par la Commission nationale de Biosécurité). Il faut rappeler que les données relatives aux OGM autorisés sont fournies par la Commission Nationale de Biosécurité (CNB). Elles seraient aussi disponibles dans des sites gouvernementaux.

Pour cela, des amorces spécifiques au transgène en question sont utilisées. Le fragment d'ADN amplifié par la PCR doit couvrir la zone d'insertion du transgène dans le génome de la plante, c'est à dire qu'elle comporte une partie du transgène et une partie du génome de la plante (barre rouge sur la figure ci-dessus). Cela présente une signature unique du transgène à identifier (Chaouachi et al. 2007a).

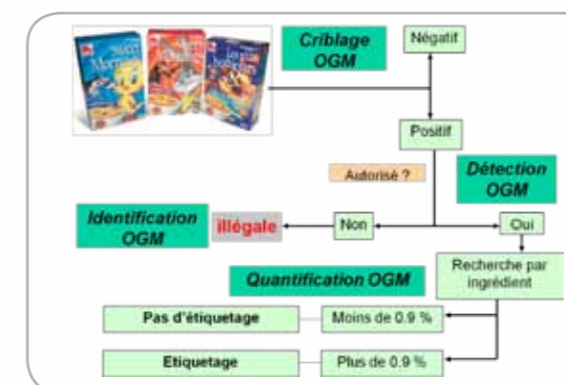


Figure 6: Logigramme général type de Détection et de Quantification des OGM en Europe

### 4.3. Troisième étape du contrôle d'OGM: La quantification

Après identification, la quantification des OGM pourrait être effectuée par PCR quantitative en temps réel. Ainsi, il est préférable d'utiliser des amorces et des sondes spécifiques à l'OGM ou aux OGM identifiés.

Par ailleurs, pour les OGM non identifiés, et qui sont par conséquent des OGM non autorisés par la CNB, une quantification n'est pas nécessaire, à moins que la CNB en décide autrement. Dans ce cas, un seuil devrait être fixé. Toutefois, la quantification va utiliser des amorces et des sondes non spécifiques, telles que P35S, TNOS et T35S, et ne serait pas par conséquent précise.

## 5. DÉMARCHE GLOBALE POUR LA DÉTECTION, IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION D'OGM : cas du maïs OGM Bt11

### 5.1. Cas du maïs transgénique Bt11 : Détection qualitative

Le maïs Bt11 est caractérisé par la présence de deux promoteurs P35S et de deux terminateurs TNOS (Figure ci-dessous). Une PCR qualitative utilisant des amorces spécifiques des séquences régulatrices P35S et de TNOS peut détecter ce transgène. La même démarche appliquée pour le maïs Bt11 doit être généralisée pour tous les OGM qui circulent et nécessite d'être continuellement mise à jour (Chaouachi et al. 2007b).

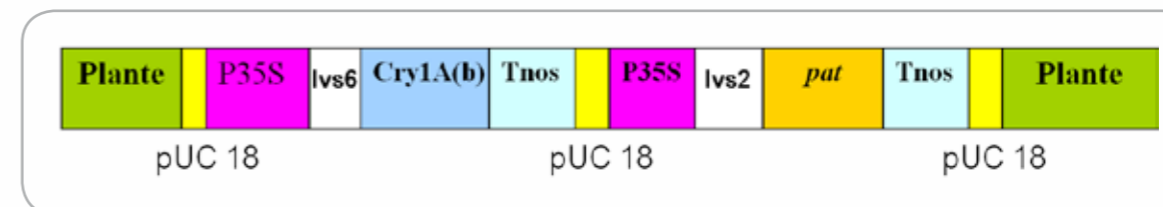


figure 7: Représentation schématique de la cassette génique du maïs Bt11

**P35S:** Promoteur (virus de mosaïque du chou-fleur)

**lvs6, Ex6:** Intron et Exon 6 (*Adh-1S*)

**CryIA (b):** Gène codant la toxine de *Bacillus thuringiensis*

**Tnos:** Termineur (*Agrobacterium tumefaciens*)

**lvs2, Ex2:** Intron et Exon 2 (*Adh-1S*)

**pat:** Gène de la Phosphonitricine acétyl-transférase

**pUC 18:** Fragments du vecteur de clonage

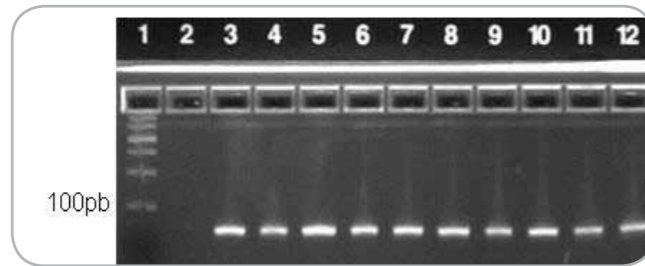


Figure 8: Exemple de résultats d'amplification de la jonction 3' du maïs Bt11 (75pb) (puits de 3 à 12)

## 5.2. Cas du maïs transgénique Bt11 : quantification par QRT-PCR

Le maïs Bt11 possède une cassette comportant deux transgènes sous le contrôle du promoteur P35S (Cry1A(b) et pat). Deux séquences vont être utilisées pour la quantification de cet OGM. La première correspond au gène endogène *Adh1*, qui va être utilisé pour quantifier d'ADN totale de maïs présent dans l'échantillon (135pb). Le second concerne la zone d'insertion de la cassette génique dans le maïs Bt11 (75pb) (Figure ci-dessous). Deux jonctions sont considérées comme signature univoque pour l'événement Bt11 (5' et 3'). Ces empreintes génétique sont unique pour cet OGM et vont permettre de détecter et de quantifier le maïs Bt11 de façon exacte et précise, autrement dit elle va permettre de doser la quantité d'ADN correspondant à ce transgène (le nombre de copies de ce transgène) (Chaouachi et al. 2007b).

La QRT-PCR va donc utiliser deux amorces et une sonde pour chaque gène. Les amorces et la sonde cible la jonction 3' (Tableau ci-dessous).

Méthode pour la quantification du maïs	
ADH-F3 forward primer	5'-CgT CgT TTC CCA TCT CTT CCT CC-3'
ADH-R4 reverse primer	5'- CCA CTC CgA gAC CCT CAg TC-3'
ADH1-MDO probe	5'-FAM-AAT CAg ggC TCA TTT TCT CgC TCC TCATAMRA-3'
Méthode pour la quantification du maïs événement Bt11	
Bt113JFor primer	5'-gCg gAA CCC CTA TTT gTT TA-3'
Bt113JRev primer	5'-TCC AAg AAT CCC TCC ATg Ag-3'
Bt113JFT FAM probe	5'-FAM-AAA TAC ATT CAA ATA TgT ATC CgC TCATAMRA-3'

## 6. DÉTERMINATION DE LA QUANTITE D'OGM DANS LES ÉCHANTILLONS ANALYSÉS

Le pourcentage d'OGM est calculé par le rapport de la quantité d'ADN exprimée en nombre de copie équivalent génome (CEG) correspondant au transgène (exmple Bt11), sur la quantité d'ADN totale (Adh1)

Le Calcul du pourcentage d'OGM est basé sur l'utilisation de deux courbes standards en utilisant du matériel de référence certifié (CRM) :

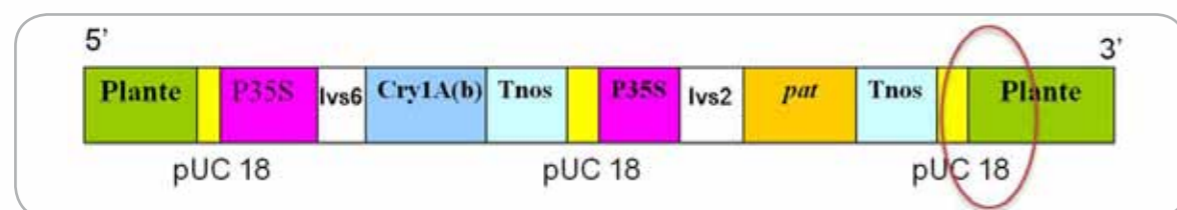
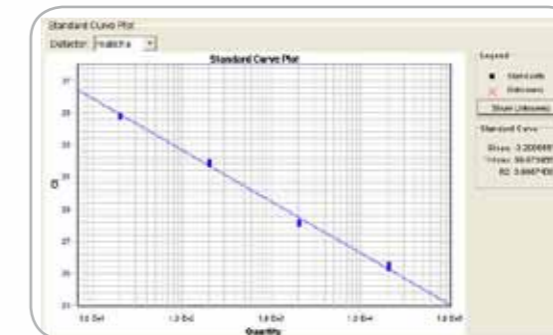


Figure 9: Construction génétique de l'événement BT 11: Jonction 31

- La première concerne un gène endogène (gène de référence): la lectine pour le soja, *adh1*, zéine ou LTP pour le maïs, etc. : elle va servir pour calculer la Quantité d'ADN de l'espèce en question (càd du gène endogène).
- La seconde concerne le transgène : elle va servir pour calculer la Quantité d'ADN transgénique.

$$\text{Taux OGM} = (\text{Nb. Copies transgène} / \text{Nb. Copies gène endogène}) \times 100$$

A: Courbe Standard



B: Courbe d'Amplification

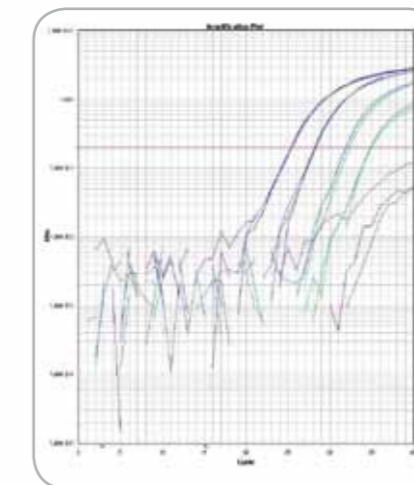


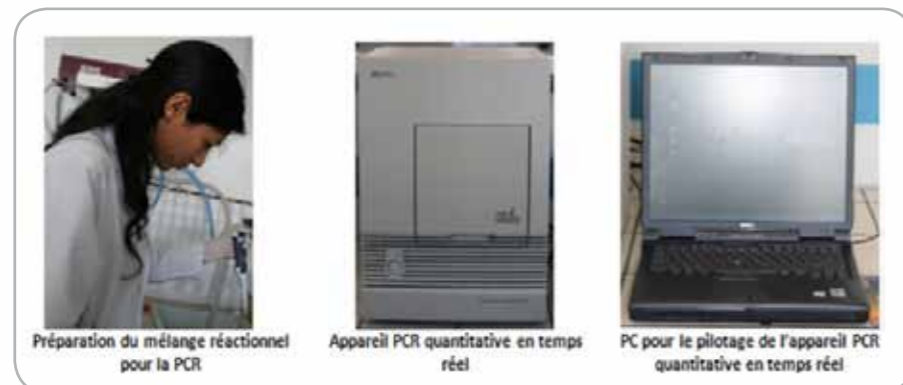
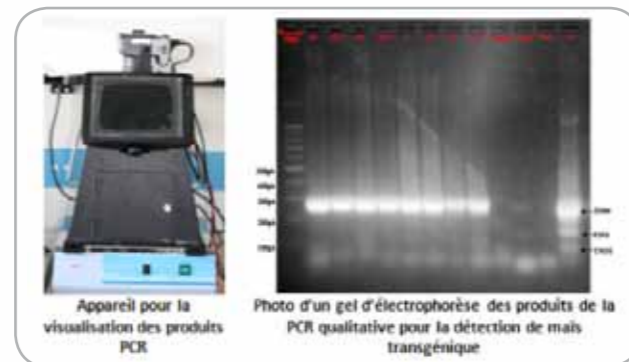
Figure 10: Exemples de résultats de la PCR en temps réel pour la quantification du maïs Bt11.

Cette démarche détaillée pour le maïs Bt11, pourrait être appliquée à tout autre OGM, avec adaptation des amorces spécifiques de l'OGM en question. En effet, il faut savoir que pour chaque OGM, il faudra toujours utiliser des méthodes validées en Europe (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>) ou dans d'autres pays (<http://gmdd.shgmo.org>). A défaut, il faut valider toute nouvelle méthode avant son utilisation. D'où l'importance de mettre en place un réseau de Laboratoires de références en Tunisie afin d'harmoniser les méthodes.

Par ailleurs, d'autres techniques de quantification pourraient être utilisées, comme les « microarrays » par exemple. D'ailleurs, une méthode clé en mains a été validée en Europe pour les OGM autorisés : (<http://www.eppendorf.com/int/index.php?l=251&action=products&contentid=176&sitemap=2.2>).

## 7. Equipements pour la détection des OGM

### 7.1. PCR qualitative (classique)



## Références

**Maier Chaouachi**, Yves Bertheau, Ahmed Nouredine Helal, Aghleb Bartegi (2007a) OGM: des besoins des consommateurs aux techniques analytiques Biofutur274: 39 - 43

**Maier Chaouachi**, Cécile Collonier, Bernoit Le Touzé, Souhir Mestiri, M'Farrej, Aghleb Bartegi (2007b) An accurate and specific and quantification of the GMO event Bt11 Microbiol. Hyg. Alim.-Vol 19,N° 56.

[http://ec.europa.eu/food/dyna/gm\\_register/index\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm)

<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>

<http://gmdd.shgmo.org/>

<http://bch.cbd.int/>



**Guide for Genetically Modified Organisms  
detection and quantification**



## 1. SAMPLING

Sampling is a key step that will determine the accuracy and precision of detection, identification and quantification of GMOs in a sample. It must be done in compliance with the Law on Biosafety and in accordance with current international methods of use, including ISO6644, 13690 standards, ISO 5725 (1994), ISO 2859 (1985), ISO 542 (1990 ) and FAO standards (International Standards for Phytosanitary Measures), CODEX Alimentarius. It is made by the competent authorities in the matter.

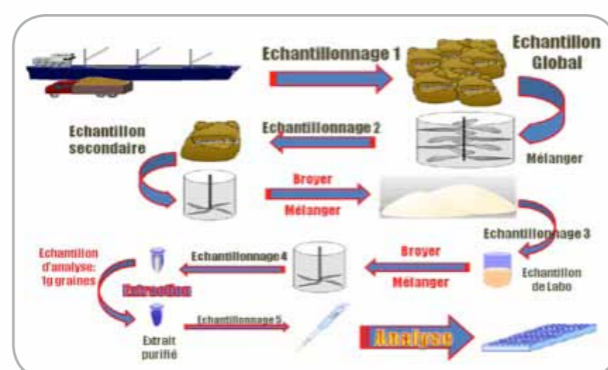


Figure 1: Sampling procedure

Sampling 1, 2 and 3 are conducted by relevant agents. Preferably, the sampling of unprocessed agricultural products (grains, oilseeds) is performed in accordance with ISO 6644 and 13690. With grains in movement, the sampling period should be defined in accordance with ISO 6644. With static grains, samples shall be collected at specific points that need to be uniformly distributed in the total volume of the batch following the ISO 13690 guidelines. The number of primary samples or sampling points is defined by the size of the lot (see table)

Table 1: The sampling procedure of the global sample

Lot size (in tons)	Global sample size (in kg)	Nombre of primary samples
= 50	5	10
100	10	20
250	25	50
>= 500	50	100

Sampling products larger than grains such as fruits or potatoes should be performed according to ISO 2859 whereas the oilseeds according to ISO 542 standard materials. Moreover, a control sample will be retained by competent service such as Customs, CNB, or otherwise for a second expert opinion in possible litigation cases. For these same reasons, a copy of the bulk sample could also be done.

Sampling 4 and 5 takes place at control laboratories.

The laboratory sample is provided by the competent body. It must be completely ground and kept at a temperature suitable for the product in question, which allows a good control of the sample even months later.

Then, an analysis (sampling 4, Fig.1) sample must be taken to extract either the DNA (or proteins) necessary for the detection and quantification of GMOs. In the case of detection by PCR, the size of the sample must be fixed in accordance with the limit of detection (LOD = 20 copies of DNA) and the limit of quantification (LOQ = 100 copies of DNA).

In general, 1g is necessary when it is the case of unmanufactured raw product made from 100% the same product. Subsequently, the more the product undergoes further processing, the more it is necessary to increase the quantity. In the case of a manufactured product composed of several ingredients, it must take into account the proportion of the test product to adjust the size of the sample.

Example of sampling equipment



Simple Divider



Planetary Ball Mill 400

## 2. Methods of detection based on proteins: immunological methods

Les deux principales techniques utilisées en routine sont la méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) sur plaques et les tests sur bandelettes, appelés « strip tests » ou « dip sticks ». Les méthodes immunologiques sont applicables majoritairement à des produits peu ou pas transformés en raison de la sensibilité des protéines aux conditions de transformation des produits.

### 2.1. Détection des protéines transgéniques : ELISA (Enzym Linked Immunosorbent ASSAY)

Cette technique quantitative a été largement utilisée en recherche pour la détermination du taux d'expression des protéines transgéniques.

Dans un certain nombre de cas, des méthodes ELISA appliquées à la détection des OGM ont pu être validées par des tests interlaboratoires, comme celui de la société américaine Strategic Diagnostics Inc. (SDI, Newark, Delaware) qui commercialise un kit d'immuno-diagnostic du soja RRS (*Roundup Ready Soybean*, résistant à l'herbicide glyphosate) produit par Monsanto. Les résultats mettent en évidence un fort impact de la qualité de l'OGM et des variétés cultivées sur la teneur en protéine des plantes. Une teneur en masse de 1% n'est ainsi quasiment pas détectable sur des variétés Bt176. (*Chaouachi et al 2007b*)

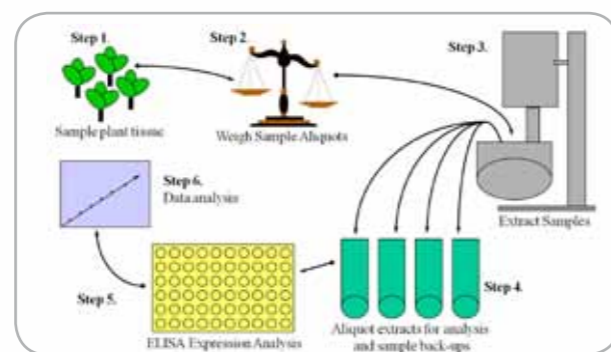


Figure 2: ELISA's principle

### 2.3. Detection of transgenic proteins: Lateral flow device (strip test)

The immunological tests are widely employed in « dip stick » form (figure). It is about a strip comprising generally a cellulose membrane with a plastic support and boxed with two absorbant paper systems. The inferior part of the strip comprising the antibodies is submersed in a solution of test sample containing the antigene and will permit later to visualize the presence with the appared of a colored band. This test is used in dozens of minutes from the land to the laboratory, plant per plant in the case of the production of GM or non GM seeds or per *batch* (collection of many plants or grains). The Strip test system was particularly used for the detection of the Bt Cry9C protein derived from the *Cry9C* gene when removing contaminated products with the CBH351 (Starlink) (*Chaouachi et al 2007a*).

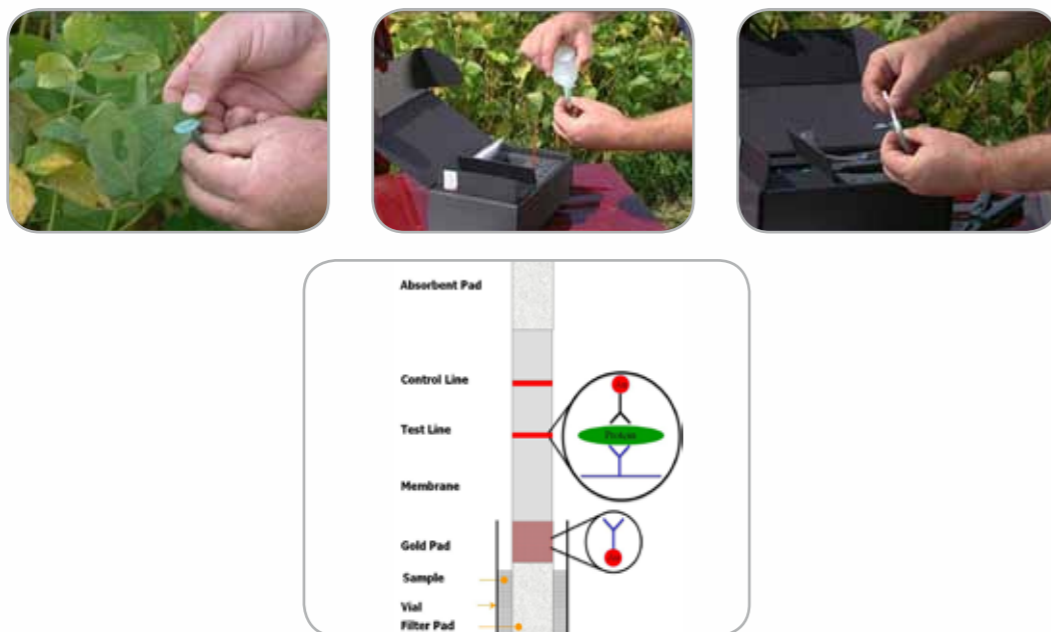


Figure 3: Strip test principal

#### Drawbacks of the Immunological methods

- Methods are specific of a trait and not GMO event and limited to products containing proteins (sometimes no proteins are expressed, ex: in grains)
- Sensitivity depending on the level of expression (different depending on events and cv coming from the same event)
- Possible cross reaction of antibodies

For these reasons, nowadays methods based on DNA are the reference methods for the detection and the quantification of GMOs in Europe

## 3. Methods based on the detection of DNA

### 3.1. DNA EXTRACTION

It is desirable to use previously validated methods such as those used most commonly in the European Union. Otherwise, it is preferable to validate the method in a recognised laboratory in Tunisia.

It should always be remembered that all protocols validated in Europe always start with a CTAB or SDS buffer extraction method and finish with a column based or resin purification. This purification step is required to remove PCR inhibitors that could negatively affect the test results.

### 3.2. Principle

The basic principle of this DNA extraction method is to release the first DNA in an aqueous solution and then purify it. The method begins by a step of lysis at high temperature using a CTAB buffer (detergent type) followed by an extraction with chloroform that removes contaminants (lipids, proteins, sugars). The DNA is thus obtained by precipitation. It will then be cleaned and stored under non-denaturing conditions. Commercial extraction and purification of DNA kits are also available. Procedures are adapted according to the nature of the sample.

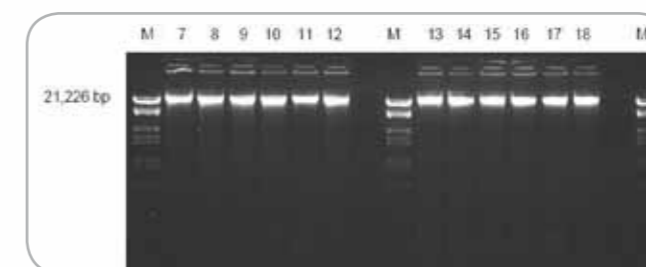


Figure 4: Electrophoresis gel of 12 DNA samples; column 1 on the left represents the indicator having a control range of DNA fragments of known sizes.

### 3.3. Determination of the amount of DNA

The concentration of the extracted DNA is usually determined by measuring instruments such as a spectrophotometer or fluorimeter (more accurate). During these measurements, we can also get an idea about the state of purity of the DNA.

### 3.4. Quality Control DNA

The quality of the extracted DNA such as the state of degradation is usually done by electrophoresis in an agarose gel at 0.8% in the presence of a standard indicator of known size (c.f. example in the figure above).

## 4. OVERALL APPROACH FOR THE DETECTION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF GMOs

Three tests are used for the detection and the quantification of GMOs with PCR (figure 4) namely :

- Screening test: It is a presence / absence test targeting the regulator sequences of the insert
- Construct specific test: targets the promotor/gene or terminator/gene junctions
- Event specific test: targeting the junctions between plant genomes and the insert

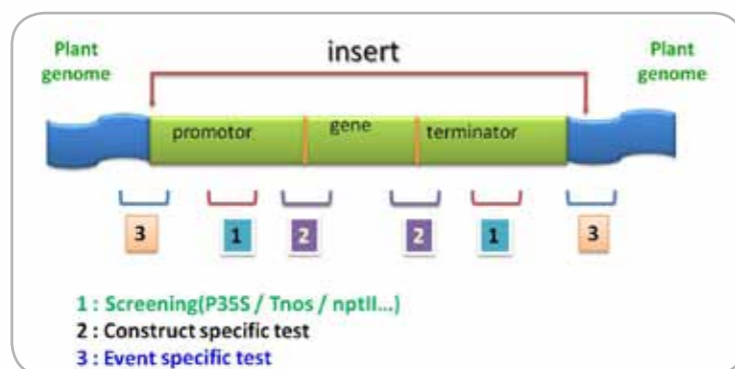


Figure 5: PCR targets for GMO detection and quantification

### 4.1. First step in GMO control: the screening

GMO detection is based on detecting with the use of PCR qualitative of current transformation events. Understandably, we will find in most authorized GMOs on the market, namely the P35S promoter of the cauliflower mosaic virus, the TNOS terminator of the nopaline solution, the T35S terminator of the cauliflower mosaic virus and possibly genes of interest such as Cry1A (b), pat or Bar. The primers used in the PCR panel must always be up-to date depending on the GMOs that could be met. (Please visit the BCH website to get an exhaustive idea on GMOs) (Chaouachi et al. 2007a)

### 4.2. Second step of GMO control: the identification

After the screening to detect GMOs, positive samples are analyzed to identify the modified gene(s), a method approved by the National Commission on Biosafety (NCB). As a reminder, data on authorized GMOs are provided by the NCB and are also available in government websites.

For this, the modified gene primers in question are used. The DNA fragment amplified by the PCR should cover the region of the modified gene insertion in the plant genome, i.e. it comprises a portion of the modified gene and a portion of the plant genome (the bar red in the figure above). This presents a unique signature to identify the modified gene (Chaouachi et al. 2007a).

### 4.3. Third step of GMO control: the quantification

Following the identification of GMOs, their quantification could be performed by quantitative real-time PCR. Thus, it is preferable to use primers and probes specific to the GMO or GMOs identified. Moreover, for unidentified GMOs and therefore unauthorized by the NCB, a GMO quantification is not necessary, unless NCB decides otherwise. In this case, a

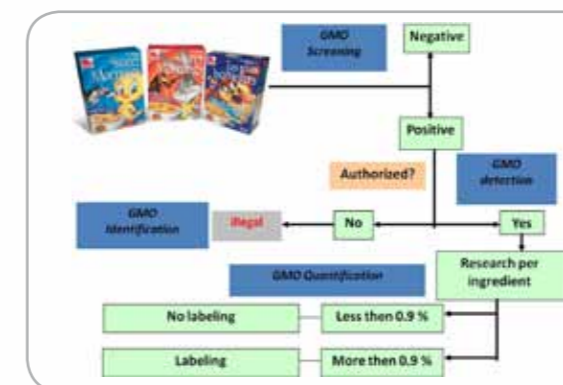


Figure 6: Logigram model used for the detection quantification of GMO in Europe

threshold should be set. The quantification will use primers and non-specific probes such as P35S, T35S and TNOS, and therefore would not be accurate.

## 5. OVERALL APPROACH FOR THE DETECTION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF GMOs: case of the GM maize Bt11

### 5.1. Case of the transgenic maize Bt11 : qualitative detection

Bt11 maize is characterized by the presence of two P35S promoters and two TNOS terminators (Figure below). Qualitative PCR using specific P35S and TNOS primers can detect this modified gene. The same approach applied to Bt11 maize should be generalized to all GMOs that circulate and needs to be continually updated (Chaouachi et al. 2007b).

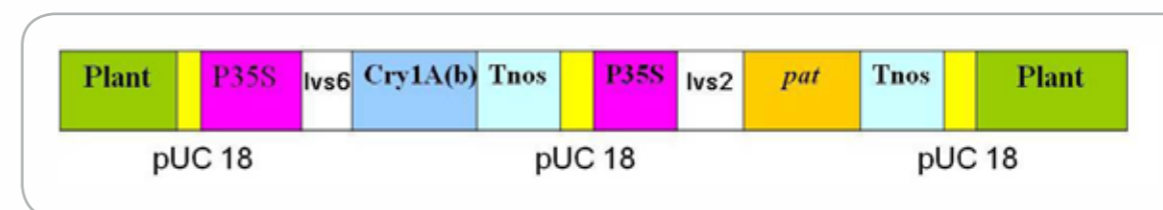


Figure 7: Schematic representation of the gene cassette of the maize Bt11

**P35S:** Promotor (Cauliflower mosaic virus)

**lvs6, Ex6:** Intron and Exon 6 (*Adh-1S*)

**Cry1A (b):** Gene coding the toxin of *Bacillus thuringiensis*

**Tnos:** Terminator (*Agrobacterium tumefaciens*)

**lvs2, Ex2:** Intron and Exon 2 (*Adh-1S*)

**pat:** Gene of the Phosphonitrilic acetyl-transferase

**pUC 18:** Fragments of the cloning vector

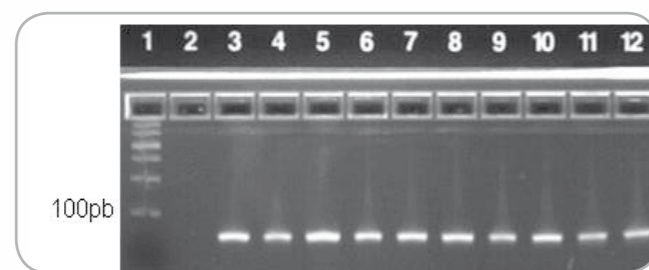


Figure 8: Example of amplification results of the 3<sup>1</sup> junction of the maize Bt11 (75bp) (wells from 3 to 12)

## 5.2. Case of the transgenic maize Bt11 : QRT-PCR quantification

Bt11 maize has a cassette containing two modified genes under the control of P35S promoter (Cry1A (b) and pat). Two regions will be used for the quantification of the GMO. The first is the endogenous *Adh1* gene (135bp) which will be used to quantify the total amount of DNA present in the maize sample. The second is the insertion region of the gene cassette into the Bt11 maize (75bp) (Figure below, arrow). The 5' and 3' event specific junctions are considered as the unambiguous signatures of the Bt11 event.

This genetic fingerprint is unique for this GMO and it will allow to detect and quantify the Bt11 maize accurately and precisely, i.e. it will allow to dose the amount of DNA corresponding to the modified gene (Chaouachi et al. 2007b).

For QRT-PCR we will therefore use the two primers and one probe for each gene (Table below).

Method for maize quantification	
ADH-F3 forward primer	5'-CgT CgT TTC CCA TCT CTT CCT CC-3'
ADH-R4 reverse primer	5'- CCA CTC CgA gAC CCT CAg TC-3'
ADH1-MDO probe	5'-FAM-AAT CAg ggC TCA TTT TCT CgC TCC TCATAMRA-3'
Method for the quantification of the event Bt11	
Bt113JFor primer	5'-gCg gAA CCC CTA TTT gTT TA-3'
Bt113JRev primer	5'-TCC AAg AAT CCC TCC ATg Ag-3'
Bt113JFT FAM probe	5'-FAM-AAA TAC ATT CAA ATA TgT ATC CgC TCATAMRA-3'

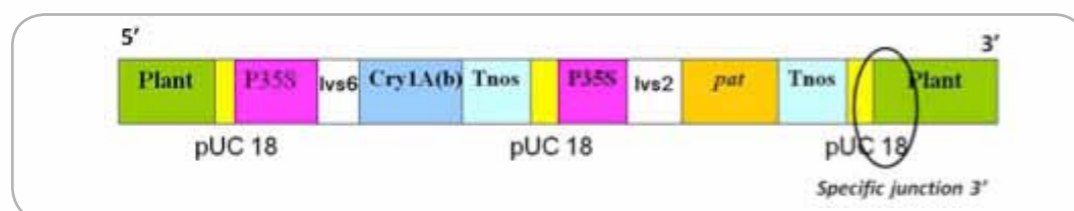


Figure 9: Genetic construction of the BT11 event 3<sup>1</sup> junction

## 6. Determination of the GMO quantity in analyzed samples

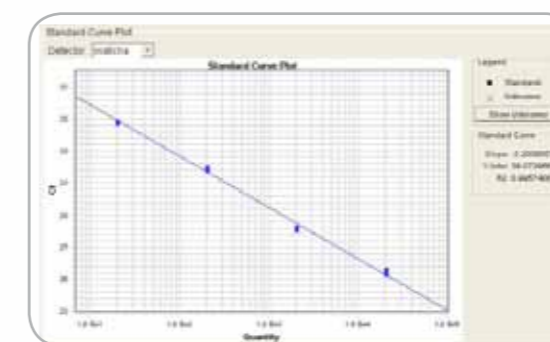
The GMO percentage is calculated by dividing the ratio of the amount of DNA expressed with the unit Copy Equivalent Genome (CEG) corresponding to the modified gene (example Bt11) on the total amount of DNA (Adh1).

Calculation of the rate of GMOs is based on the use of two standard curves obtained with the certified reference material (CRM):

$$\text{GMO \%} = \left( \frac{\text{Copy number transgene}}{\text{Copy number reference gene}} \right) \times 100$$

- The first concerns the endogenous gene (reference gene) whereby for the soybean lectin, *adh1*, LTP are used whereas zein is used for the maize. This curve will be used to calculate the quantity of DNA of the species in question (ie the endogenous gene).
- The second concerns the modified gene: it will be used to calculate the quantity of transgenic DNA.

### A- Standard Curve



### B- Amplification Plat

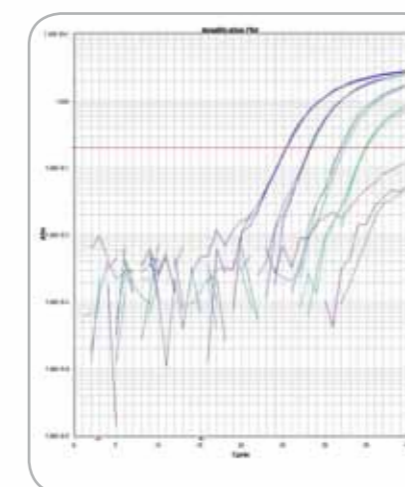
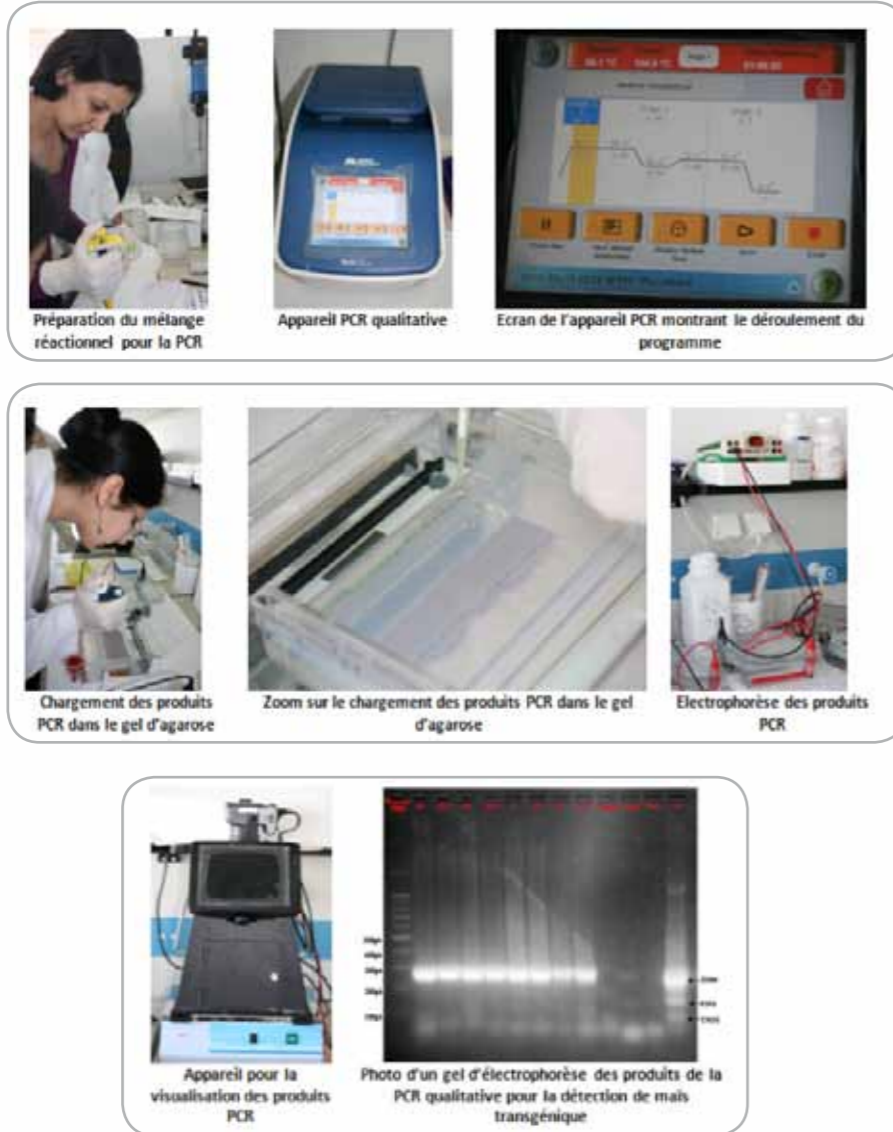


Figure 10: Example of real-time PCR for the quantification of the event Bt11 (Standard curves).

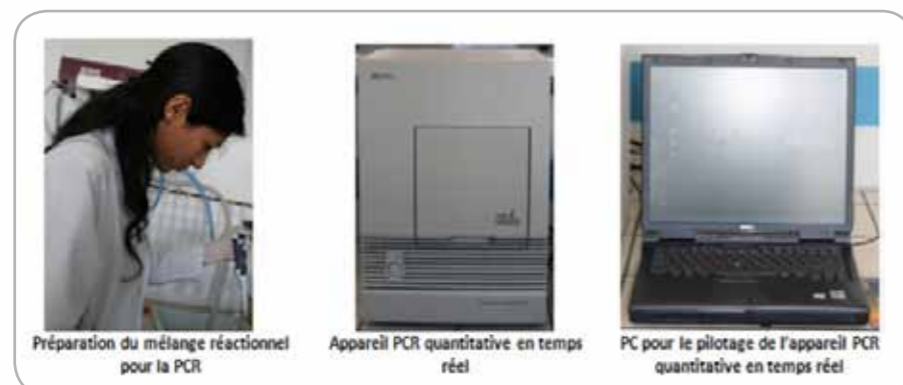
This detailed approach to Bt11 maize could be transferred to any other GMO with adopting the GMO in question specific primers. It is worth noting that for each GMO, methods validated in Europe are always used (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>) or in other countries (<http://gmdd.shgmo.org>). Otherwise, new methods are validated before use. Hence the importance of establishing a network of recognised laboratories in Tunisia in order to harmonize methods. Furthermore, other quantification techniques such as microarrays could be used. Moreover, a key method in hand has been validated in Europe for the authorized GMOs (<http://www.eppendorf.com/int/index.php?l=251&action=products&contentid=176&sitemap=2.2>).

## 7. Detection stages and equipment

### 7.1. Qualitative PCR (classic)



### 7.2. Real time quantitative PCR



## References

Maher Chaouachi, Yves Bertheau, Ahmed Nouredine Helal, Aghleb Bartegi (2007a) OGM: des besoins des consommateurs aux techniques analytiques Biofutur274: 39 - 43

Maher Chaouachi, Cécile Collonier, Benoit Le Touzé, Souhir Mestiri, M'Farrej, Aghleb Bartegi (2007b) An accurate and specific and quantification of the GMO event Bt11 Microbiol. Hyg. Alim.-Vol 19,N° 56.

[http://ec.europa.eu/food/dyna/gm\\_register/index\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm)

<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/statusofdoss.htm>

<http://gmdd.shgmo.org/>

<http://bch.cbd.int/>

Ce document a été réalisé dans le cadre du projet : « Renforcement des capacités pour la mise en œuvre du cadre national sur la biosécurité en Tunisie » financé par le Fonds pour l'Environnement Mondial (FEM) et le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (UNEP).

## Autorité Nationale désignée du projet:

**M. Salah HASSINI** : Directeur Général de l'Environnement et de la Qualité de la Vie / Ministère de l'Environnement et du Développement Durable (dgeqv@mineat.gov.tn)

**M. Nabil HAMADA** : Directeur de l'Ecologie et des Milieux Naturels / Ministère de l'Environnement et du Développement Durable (nabil.hamada@mineat.gov.tn)

## Coordinateur régional (FEM / UNEP) :

**M. Alex OWUSU-Biney** : Coordinateur régional pour l'Afrique des projets « biosécurité » (alex.owusu-biney@unep.org)

## Coordinateurs nationaux du projet :

- **M. Abdelhakim ISSAOUI** : Direction Générale de l'Environnement et de la Qualité de la Vie / Ministère de l'Environnement et du Développement Durable (hakissaoui@yahoo.fr)
- **Mme Hazar BELLI Ep ABDELKEFI** : Direction Générale de l'Environnement et de la Qualité de la Vie / Ministère de l'Environnement et du Développement Durable (bel\_hazar\_2000@yahoo.com)
- **M. Hatem BEN BELGACEM** : Direction Générale de l'Environnement et de la Qualité de la Vie / Ministère de l'Environnement et du Développement Durable (hatem\_medd@yahoo.fr)

Le présent document a été préparé par les coordinateurs nationaux du projet en -collaboration avec :

- **M. Maher CHAOUACHI** : Enseignant chercheur – Expert en biotechnologie et biosécurité (maher.chaouachi@gmail.com)
- **CDCGE** : Consulting Développement Communautaire et Gestion

NB : La version originale a été rédigé en français et traduite en anglais

---

This document was produced as part of the project "Capacity building for implementation of the National Biosafety Framework in Tunisia" financed by the Global Environment Fund (GEF) and the United Nations Environment Programme (UNEP).

## National Authorities of the project:

**M. Salah HASSINI** : General Director of Environment and Quality of Life / Ministry of Environment and Sustainable Development (dgeqv@mineat.gov.tn)

**M. Nabil HAMADA** : Director of ecology and natural resources / Ministry of Environment and Sustainable Development (nabil.hamada@mineat.gov.tn)

## Regional project coordinator (GEF / UNEP) :

**M. Alex OWUSU-Biney** : Portfolio Manager (Biosafety) (alex.owusu-biney@unep.org)

## National Project Coordinators :

- **M. Abdelhakim ISSAOUI** : General Direction of Environment and Quality of Life / Ministry of Environment and Sustainable Development (hakissaoui@yahoo.fr)
- **Mme Hazar BELLI Ep ABDELKEFI** : General Direction of Environment and Quality of Life / Ministry of Environment and Sustainable Development (bel\_hazar\_2000@yahoo.com)
- **M. Hatem BEN BELGACEM** : General Direction of Environment and Quality of Life / Ministry of Environment and Sustainable Development (hatem\_medd@yahoo.fr)

This document was prepared by the national coordinators of the project in Collaboration with:

- **M. Maher CHAOUACHI** : Associate professor – expert on biotechnology and biosafety (maher.chaouachi@gmail.com)
- **CDCGE** : Consulting Développement Communautaire et Gestion

NB: The original version was written in French and translated into English