



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 31297 B1** (51) Cl. internationale : **C12N 15/06; C12N 15/10**
- (43) Date de publication : **01.04.2010**

-
- (21) N° Dépôt : **32252**
- (22) Date de Dépôt : **02.10.2009**
- (30) Données de Priorité : **26.06.2008 MY PI20082327**
- (86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/MY2009/000047 31.03.2009**
- (71) Demandeur(s) : **UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA, SELANGOR DARUL EHSAN 43400 UPM SERDANG (MY)**
- (72) Inventeur(s) : **B. CHE MAN, Yaakob ; MUSTAFA, Shuhaimi ; KHALID, Fariyah Liyana ; AZMI , Aida Azrina ; SAZILI , Awis Qurni ; ABDUL RAHIM, Raha**
- (74) Mandataire : **CABINET AKSIMAN**

(54) Titre : **PROCEDE D'IDENTIFICATION DE MATIERE PORCINE DANS UN ALIMENT**

(57) Abrégé : SELON L'INVENTION, UNE ANALYSE PCR EN TEMPS RÉEL SPÉCIFIQUE AU PORC A ÉTÉ MISE AU POINT EN VUE D'UNE AUTHENTIFICATION HALAL. TROIS ESPÈCES D'ÉCHANTILLONS DE VIANDE ONT ÉTÉ UTILISÉES : DU PORC, DU BŒUF ET DU POULET. CES TROIS TYPES DE VIANDE FIGURENT PARMIS LES PLUS COURAMMENT CONSOMMÉS EN MALAISIE ET SE TROUVENT FACILEMENT SUR LE MARCHÉ. DE L'ADN DE CHAQUE ÉCHANTILLON DE VIANDE CRUE A ÉTÉ EXTRAIT AVEC SUCCÈS AU MOYEN DU KIT DNEASY® BLOOD & TISSUE (QIAGEN, HILDEN, ALLEMAGNE). LA CONCENTRATION D'ADN EXTRAIT A ÉTÉ ESTIMÉE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE D'ABSORPTION DANS L'ULTRAVIOLET AU MOYEN D'UN BIOPHOTOMÈTRE (EPPENDORF AG, HAMBOURG, ALLEMAGNE), AVANT LA RÉACTION PCR EN TEMPS RÉEL. LA TEMPÉRATURE D'HYBRIDATION DES AMORCES ÉTAIT DE 580 °C. AFIN DE VÉRIFIER LA SPÉCIFICITÉ DES AMORCES ÉLABORÉES, UNE RÉACTION VISANT À TESTER LES AMORCES PAR RAPPORT AUX DEUX AUTRES ÉCHANTILLONS DE VIANDE A ÉTÉ RÉALISÉE AFIN DE DÉTECTER

DE POSSIBLES RÉACTIONS CROISÉES. LA RÉACTION N'A AMPLIFIÉ QUE L'ADN DE PORC À $\pm 22,83$ CT. L'ANALYSE PCR EN TEMPS RÉEL DÉCRITE DANS LA DESCRIPTION S'EST RÉVÉLÉE TRÈS SENSIBLE, AVEC UNE LIMITE DE DÉTECTION BASSE LORS DU TEST DES ÉCHANTILLONS. LADITE ANALYSE A ÉTÉ EFFECTUÉE EN PRÉPARANT DES GAMMES DE DILUTION DE RAISON 10 À PARTIR DE 100 NG D'ADN, AFIN DE DÉTERMINER LA SENSIBILITÉ DE LA RÉACTION. LE SEUIL DE SENSIBILITÉ ALLAIT JUSQU'À 0,001 NG D'ADN DE PORC. IL A ÉTÉ CONSTATÉ QUE LA LIMITE DE DÉTECTION SE SITUAIT À 0,1 NG D'ADN DE PORC AU MOYEN DE LA PCR CONVENTIONNELLE. DANS CE CONTEXTE, CE PROCÉDÉ SERAIT UTILE DANS LA DÉTECTION D'ADN PORCIN PRÉSENT DANS DES PRODUITS ALIMENTAIRES.

PROCEDE D'IDENTIFICATION DE MATIERE PORCINE DANS UN ALIMENT**RESUME**

5 Dans cette recherche, une analyse PCR en temps réel spécifique au porc est développée pour une authentification Halal. Trois espèces d'échantillons de viande sont employées à savoir le porc, le bœuf et le poulet. Ces trois types de viande sont des plus consommées en Malaisie et sont disponibles dans le marché. L'ADN a été extrait avec succès de chaque échantillon de viande crue au moyen de la trousse DNeasy® Blood et Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

10 La concentration d'ADN extrait est évaluée par une spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet à l'aide d'un biophotomètre (Eppendorf AG, Hambourg, Allemagne) avant une réaction PCR en temps réel. La température de recuit des amorces est de 58°C. Pour vérifier la spécificité des amorces conçues, une réaction est effectuée pour tester les amorces par rapport aux deux autres échantillons de viande en vue de détecter les réactions croisées

15 possibles. La réaction a amplifié l'ADN du porc seulement à $Ct \pm 22,83$. L'analyse PCR en temps réel décrite dans la présente s'est avérée être très sensible avec une limite de détection faible lorsque les échantillons ont été testés. L'analyse a été menée en préparant une dilution en série (10 fois), et 100 ng d'ADN a été employé au début pour déterminer la sensibilité de la réaction. Le seuil de sensibilité va jusqu'à 0,001ng d'ADN du porc. Une limite de détection

20 de 0.1 ng de l'ADN du porc en utilisant l'analyse PCR classique a été rapportée. Dans ce contexte, la méthode sera utile pour la détection de l'ADN du porc dans les produits alimentaires.



Titre

01 AVR 2010

3.1 297

PROCEDE D'IDENTIFICATION DE MATIERE PORCINE DANS UN ALIMENT**5 Domaine de l'invention**

L'invention concerne une méthode pour concevoir des amorces qui permettent d'identifier les ingrédients de produits alimentaires, notamment les aliments traités à base de viande. Cette méthode vise plus particulièrement à détecter la présence du porc (*Sus scrofa*) dans les aliments traités en vue d'une authentification Halal.

10

Fondement de l'invention

La falsification des produits alimentaires est un problème courant qui touche la planète tout entière. Par exemple, des viandes de prix bas ont été utilisées comme substitut aux viandes plus chères. Le plus souvent, la viande de porc a été utilisée pour remplacer d'autres types de viande dans les produits alimentaires. De là, l'identification des espèces animales, et plus particulièrement le porc dans les produits alimentaires est devenu une préoccupation importante pour les consommateurs. L'étiquetage trompeur de certains produits alimentaires peut être lourd de conséquences surtout dans le cas d'une présence éventuelle d'ingrédients non halal dans les aliments. C'est pourquoi, plusieurs techniques ont été mises au point pour identifier les espèces animales qui sont à l'origine de la viande fraîche et des produits de viande. Un nombre important de méthodes basées sur l'analyse de l'ADN ont été employées dans l'industrie alimentaire. Elles visent à contrôler la falsification des produits alimentaires. Les méthodes établies pour la spéciation animale sont principalement basées sur l'analyse des lipides, des protéines et de l'ADN. Toutefois, les méthodes basées sur l'ADN demeurent d'autant plus fiables que l'ADN est plus stable sous des conditions associées à la température élevée, la pression et le traitement chimique lié à la transformation des aliments.

L'identification des espèces des tissus animaux dans les produits de viande est une question importante qui permet, pour des raisons économiques, religieuses ou de santé, de protéger le consommateur de la falsification indésirable ou illégale. Dans ce sens, de nombreuses méthodes analytiques ont été développées qui sont basées sur l'analyse des protéines et de l'ADN. Parmi ces méthodes basées sur l'analyse de l'ADN et qui sont très développées pour identifier les espèces animales figurent la méthode PCR classique spécifique à l'espèce et la

A

PCR en temps réel. Parmi les fragments de gènes ciblés développés pour la PCR spécifique à l'espèce des porcs, on trouve ceux dérivés de 12S rRNA, ND5, la boucle de déplacement mitochondrial (boucle D) et le récepteur de mélanocortine nucléaire de type 1(MCIR).

5 Bien que la PCR classique ait porté ses fruits, la méthode nécessite une manipulation post-PCR qui permet de prolonger le temps de l'analyse et une manipulation d'un produit chimique dangereux susceptible de provoquer une contamination de laboratoire. De plus, les méthodes PCR en temps réel possèdent un grand potentiel pour remplacer la PCR classique. Cela est essentiellement dû au fait que les méthodes PCR en temps réel sont rapides,
10 sensibles, spécifiques, fortement automatisées avec une quantification cible élevée (Heid et al, 1996).

Résumé de l'invention

La présente invention a trait à une méthode qui permet de détecter la teneur d'un aliment en porc, où la méthode inclut les étapes d'extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN) à
15 partir d'un échantillon de porc et la conception d'une amorce sens (directe) et une amorce antisens (inverse) à partir du gène du porc ND5 mitochondrial en effectuant un test d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sur les amorces sens et antisens caractérisées par le fait que la séquence de l'amorce sens (directe) est (SUS-DIR :5'-AGC
20 TGC ACT ACA AGC AAT CC-3') et la séquence de l'amorce antisens (inverse) est (SUS-INV :5-ATG CGT TTG AGT GGG TTA GG-3').

Brève description des figures

La figure 1 montre le test de spécificité sur une amorce de porc conçue contre les autres
25 espèces de viande (bœuf et poulet).

La figure 2 montre le test de sensibilité d'une amorce de porc avec une dilution en série (10 fois).

La figure 3 montre l'optimisation de la concentration de l'amorce.

La figure 4 montre l'optimisation de la température de recuit de l'amorce.

30

Description détaillée de l'invention

L'invention décrit le développement et l'application de l'analyse PCR en temps réel spécifique au porc pour une authentification halal. Les amorces ont été conçues pour amplifier un 89 bp amplicon du gène ND5 mitochondrial du porc (ND5) et elles ont été mésappariées

7

aux espèces commerciales de bœuf et de poulet. L'analyse est très sensible, et a permis de détecter la présence de 0,001 ng d'une matrice d'ADN de porc lorsque cette présence est évaluée par les dilutions de l'ADN dans l'eau. L'ensemble des amorces développées pour la vérification d'un produit halal sont basées sur le gène ND5 mitochondrial du porc, et la séquence des amorces se présente comme suit :

Amorce avant (SUS-DIR : 5'-AGC TGC ACT ACA AGC AAT CC-3')

Amorce arrière (SUS-INV :5-ATG CGT TTG AGT GGG TTA GG-3')

- 10 Les conditions PCR pour la détection d'un ADN du porc ont été réalisées par amplification dans le Mastercycler ep (Eppendorf AG, Hambourg, Allemagne). Chaque tube à réaction contient 20 µl d'un mélange réactionnel composé de 10µl 2x Quantitect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen,Hilden,Germany), 1 µl d'une amorce sens (directe), 1 µl d'une amorce antisens (inverse), 3 µl dH2O et 5 µl échantillon d'ADN(20ng/ µl).Le programme de cycle
- 15 d'amplification de trois étapes se présente comme suit : une première activation à 95 °C pendant 15 minutes, une dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, un recuit à 58°C pendant 30 secondes et une extension à 72°C pendant 30 secondes. L'étape de l'activation première vise à activer la polymérase d'ADN HotStarTaq présente dans le mélange réactionnel. Le cycle est répété 40 fois et une analyse en **courbe de la fusion (melting curve)** a été réalisée
- 20 pour vérifier la spécificité et l'identité de l'ADN amplifié.

Les échantillons

- Le porc, le bœuf et le poulet sont les trois espèces utilisées dans cette recherche. Les échantillons de viande sont achetés d'un marché local, en l'occurrence le marché de gros
- 25 Selangor. Les viandes sont conservées à -20°C en attendant d'en extraire l'ADN.

L'extraction de l'ADN

- L'extraction de l'ADN des échantillons de viande se fait au moyen de la trousse DNeasy® Blood et Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). 25 mg de l'échantillon est pesé dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml, 180 µl de tampon ATL et 20 µl d'une protéinase K ont été ajoutés.
- 30 Le mélange est agité au Vortex puis incubé pendant la nuit dans un bain-marie de 56°C pour une lyse. Lorsque les échantillons sont complètement lysés, 4 µl de RNase A (100 mg/ml) a été ajouté, mélangé et incubé à température ambiante pendant 2 minutes. Le mélange est agité au Vortex avant l'ajout de 200 µl de tampon AL, puis agité de nouveau au Vortex jusqu'à ce

que le tout soit complètement mélangé. Ensuite, 200 µl d'éthanol (96-100%) est ajouté puis mélangé au Vortex jusqu'à ce qu'on obtienne une solution homogène. Le mélange est versé à l'aide d'une pipette dans la mini spin colonne DNeasy et est centrifugé à 8000 tr/min pendant 1 minute. Le flux passant à travers et le tube de collecte sont écartés. La mini spin colonne DNeasy est ensuite mise dans un nouveau tube de collecte de 2ml. 500 µl d'un tampon AW2 est ajouté et est centrifugé à 14.000 tr/min pendant 3 minutes pour s'assurer que la colonne est sèche et qu'aucun transfert d'éthanol ne s'est produit. La mini spin colonne DNeasy est ensuite placée dans un nouveau tube microcentrifuge de 1,5 ml et 100 µl d'un tampon AF a été ajouté pour élution. Le tube est incubé pendant 1 minute à température ambiante puis centrifugé pendant 1 minute à 8.000 tr/min. Le surnageant contenant l'extrait d'ADN est conservé à 4°C avant un usage ultérieur.

Conception de l'amorce

Le logiciel Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) est employé pour concevoir l'ensemble des amorces employées dans la PCR en temps réel. Les séquences du gène ND5 du porc (NC_000845), du bœuf (NC_006853) et du poulet (NC_001323) obtenues à partir de la base de données des gènes NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sont alignées et comparées. Un ensemble d'amorces (SUS-DIR :5'-AGC TGC ACT ACA AGC AAT CC-3' et SUS-INV :5-ATG CGT TTG AGT GGG TTA GG-3') a été synthétisé pour amplifier de façon spécifique un fragment 89 bp du gène ND5 du porc.

L'analyse PCR en temps réel

La détection de l'ADN du porc s'est faite par amplification dans le Mastercycler ep (Eppendorf AG, Hambourg, Allemagne). Chaque tube à réaction contient 20 µl de mélange réactionnel consistant en 2x Quantitect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 1 µl d'une amorce sens, 1 µl d'une amorce antisens, 3 µl dH₂O et 5 µl d'un échantillon d'ADN. Le programme de cycle d'amplification de trois étapes se présente comme suit : une première activation à 95°C pendant 15 minutes, une dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, un recuit à 58°C pendant 30 secondes et une extension à 72°C pendant 30 secondes. L'étape de l'activation première vise à activer la polymérase d'ADN HotStarTaq présente dans le mélange réactionnel. Le cycle est répété 40 fois et une analyse en **courbe de la fusion** a été

réalisée pour vérifier la spécificité et l'identité de l'ADN amplifié. Sauf indication contraire, toutes les réactions sont réalisées en triplicata.



5

10

15

20

25

30

Revendications

1. Une méthode pour détecter la présence du porc dans a nourriture où la méthode consiste dans les étapes que voici :
 - 5 a- extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN) à partir d'un échantillon de porc ;
 - b- conception d'une amorce sens (directe) et d'une amorce antisens (inverse) à partir d'un gène ND5 mitochondrial du porc et
 - 10 c- réalisation d'un test d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sur les amorces sens et antisens qui se caractérise par ceci que la séquence de l'amorce sens (directe) est (SUS-DIR :5'-AGC TGC ACT ACA AGC AAT CC- 3') et que la séquence de l'amorce antisens (inverse) est (SUS-INV :5-ATG CGT TTG AGT GGG TTA GG-3').
2. La méthode selon la revendication 1 où la concentration des amorces sens et antisens se situe entre 0,3 et 0,9 μm .
- 15 3. La méthode selon la revendication 1 où la température de la réaction se situe entre 50 et 70°C.
4. Une méthode pour détecter la teneur d'un aliment en porc où la méthode consiste dans les étapes que voici :
 - 20 a- conception d'une amorce sens et d'une amorce antisens à partir d'un gène ND5 mitochondrial du porc et
 - b- réalisation d'un test d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sur les amorces sens et antisens qui se caractérisent par ceci que la séquence de l'amorce sens (directe) est (SUS-DIR :5'-AGC TGC ACT ACA AGC AAT CC- 3') et que la séquence de l'amorce antisens (inverse) est (SUS-INV :5-ATG CGT TTG AGT GGG TTA GG-3').
 - 25
5. La méthode de la revendication 4 où la concentration des amorces sens et antisens se situe entre 0,3 et 0,9 μm .
6. La méthode de la revendication 4 où la température de la réaction se situe entre 50 et 70°C.
- 30



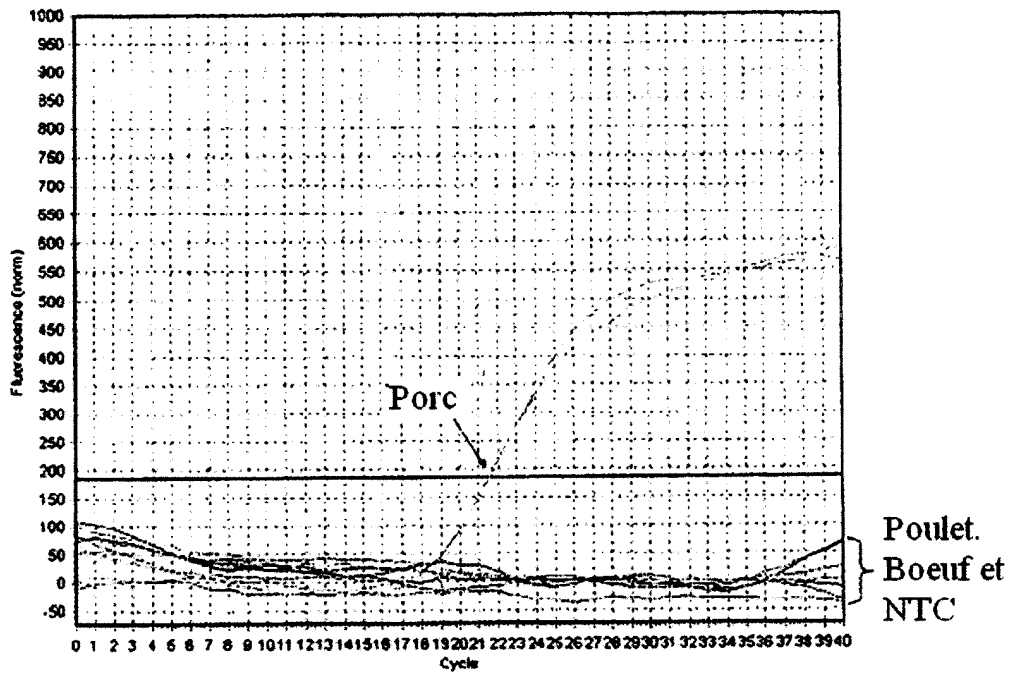


Fig. 1

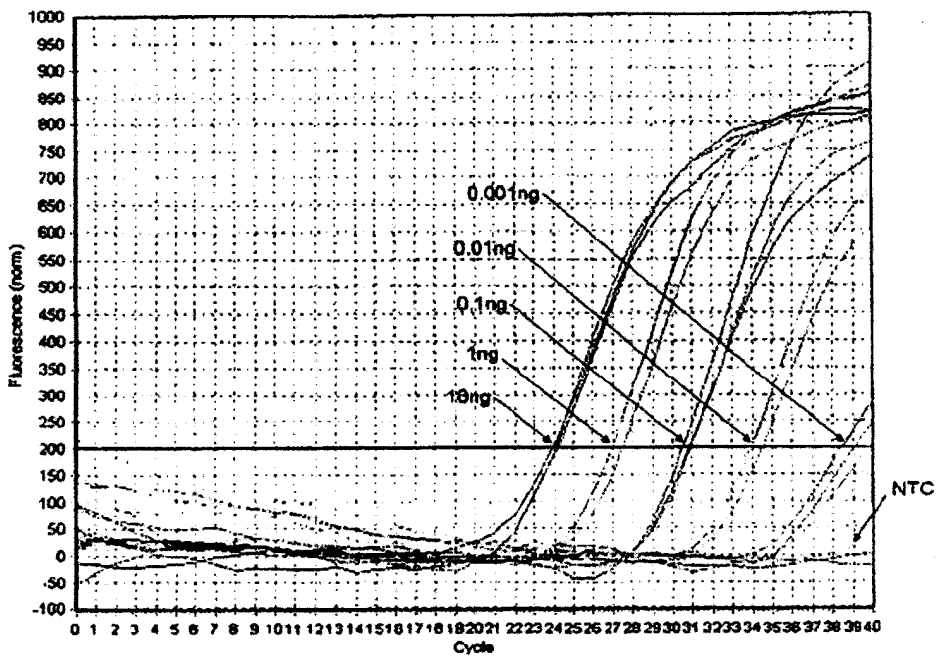


Fig. 2

Concentration de l'Amorce (μM)	Valeur C_1
0.3	20.90 ± 0.64
0.5	18.61 ± 0.29
0.7	20.92 ± 0.74
0.9	19.46 ± 0.15

Fig. 3

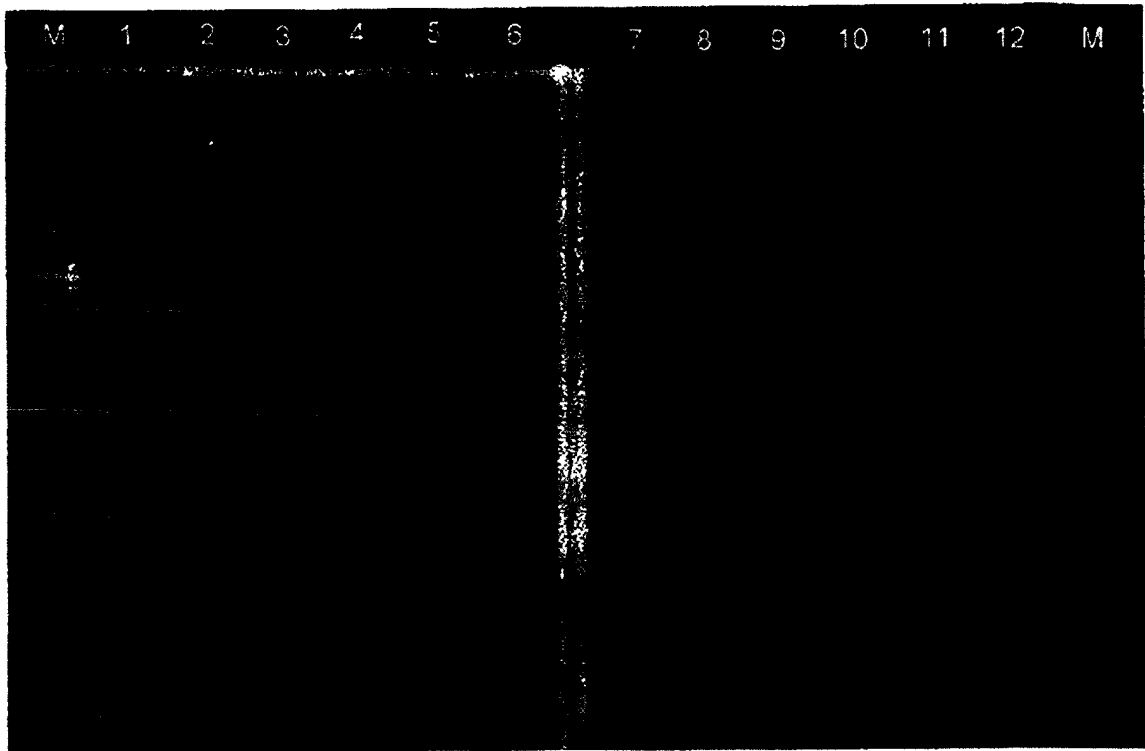


Fig. 4

2