
**Produits alimentaires — Principes
de sélection et critères de validation
des méthodes d'identification
variétale utilisant des acides
nucléiques spécifiques**

*Foodstuffs — Principles of selection and criteria of validation for
varietal identification methods using specific nucleic acid*
(standards.iteh.ai)

[ISO 13495:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdc058a8-5275-433d-a061-008eda21f2f1/iso-13495-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdc058a8-5275-433d-a061-008eda21f2f1/iso-13495-2013>



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 13495:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdc058a8-5275-433d-a061-008eda21f2f1/iso-13495-2013>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2013

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

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

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
3.1 Termes relatifs à la variété.....	1
3.2 Termes relatifs à l'extraction et à la purification de l'ADN/ARN.....	2
3.3 Termes relatifs à l'amplification des acides nucléiques par PCR.....	2
3.4 Termes relatifs à la détection.....	3
3.5 Termes relatifs aux témoins.....	3
3.6 Termes relatifs aux marqueurs.....	4
4 Assurance qualité des résultats d'essai	4
5 Choix des méthodes	6
6 Choix des marqueurs	6
6.1 Critères généraux.....	6
6.2 Choix du jeu de marqueurs.....	6
6.3 Marqueurs SSR.....	6
6.4 Polymorphisme mononucléotidique (SNP).....	7
7 Échantillons pour laboratoire	7
7.1 Échantillon.....	7
7.2 Taille de l'échantillon.....	7
7.3 Matériau de référence.....	7
8 Validation en laboratoire	8
8.1 Généralités.....	8
8.2 Critères de validation intralaboratoire.....	8
8.3 Critères de validation interlaboratoires.....	9
9 Interprétation et expression des résultats	11
9.1 Généralités.....	11
9.2 Système de notation des données.....	11
9.3 Analyse des résultats.....	11
9.4 Expression des résultats.....	12
10 Rapport d'essai	12
Bibliographie	13

Avant-propos

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

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

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou sur la liste ISO des déclarations de brevets reçues, www.iso.org/brevets.

Les éventuelles appellations commerciales utilisées dans le présent document sont données pour information à l'intention des utilisateurs et ne constituent pas une approbation ou une recommandation.

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 16, *Méthodes horizontales pour l'analyse moléculaire de biomarqueurs*.

[ISO 13495:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdc058a8-5275-433d-a061-008eda21f2f1/iso-13495-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdc058a8-5275-433d-a061-008eda21f2f1/iso-13495-2013>

Introduction

La présente Norme internationale présente des lignes directrices en vue du choix et de la validation des méthodologies utilisées pour produire des données moléculaires de haute qualité destinées à l'identification variétale.

Les essais d'identification variétale nécessitent des marqueurs de haute qualité capables de fournir des données reproductibles en utilisant une diversité d'équipements, de produits chimiques et de réactifs. Par conséquent, seules des méthodes d'amplification spécifiques sont traitées dans la présente Norme internationale.

La présente Norme internationale a pour objectif d'assurer la compatibilité des méthodes d'analyse par rapport aux demandes du client, de lister les différentes étapes pour la validation des méthodes et de définir des critères d'acceptation. Elle garantit également que les principes généraux utilisés pour effectuer ces analyses seront identiques dans tous les laboratoires (matériau de référence, taille de l'échantillon, échantillon pour laboratoire, prise d'essai, extraction, analyse et interprétation des résultats, certificat d'analyse).

Enfin, la présente Norme internationale participe à l'homogénéisation des résultats obtenus dans les différents laboratoires.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 13495:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdc058a8-5275-433d-a061-008eda21f2f1/iso-13495-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdc058a8-5275-433d-a061-008eda21f2f1/iso-13495-2013>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 13495:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdc058a8-5275-433d-a061-008eda21f2f1/iso-13495-2013>

Produits alimentaires — Principes de sélection et critères de validation des méthodes d'identification variétale utilisant des acides nucléiques spécifiques

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie des outils moléculaires qui permettent d'établir des profils moléculaires de variétés d'espèces végétales aux fins de l'identification variétale, c'est-à-dire la confirmation d'identité par rapport à une ou plusieurs références.

La présente Norme internationale s'applique à différentes matrices (semences, feuilles, racines, produits industriels) constituées d'une seule variété. Les matrices se présentant sous forme de mélanges de variétés (purées, compotes, farines) sont exclues du domaine d'application du présent document.

La présente Norme internationale ne traite pas de la pureté génétique.

2 Références normatives

Les documents suivants, en tout ou partie, sont référencés de manière normative dans le présent document et sont indispensables pour son application. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO/CEI 17025:2005, *Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais*
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdc058a8-5275-433d-a061-008eda21f2f1/iso-13495-2013>

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1 Termes relatifs à la variété

3.1.1 cultivar

ensemble de plantes cultivées pouvant être clairement défini par des caractéristiques morphologiques, physiques, cytologiques, chimiques ou autres et qui, après reproduction sexuée ou asexuée, conserve ses caractères distinctifs

[SOURCE: ISO 7563:1998, définition 1.12]

Note 1 à l'article: Le concept de «cultivar» diffère essentiellement du concept de variété botanique «varietas» en ce que:

- «cultivar» est une division infraspécifique résultant d'une sélection contrôlée, même empirique;
- «varietas» est une division infraspécifique résultant d'une sélection naturelle.

Les termes «cultivar» et «variété» (au sens de variété cultivée) sont équivalents. Dans les traductions ou les adaptations de la nomenclature botanique à des fins particulières, les termes «cultivar» ou «variété» (ou leurs équivalents dans d'autres langues) peuvent être employés dans le texte.

Note 2 à l'article: Les noms des propriétés et des espèces botaniques sont toujours présentés sous forme latine et sont régis par la nomenclature botanique.

3.1.2

espèce

groupe d'organismes présentant un haut niveau de similitude génétique (ADN) et pouvant se croiser entre eux; contenant souvent des sous-espèces, des variétés ou des races

Note 1 à l'article: Une espèce est désignée en italique par le nom du genre suivi du nom spécifique, par exemple *Ananas comosus*.

3.1.3

variété

individu unique et uniforme d'une espèce végétale (à l'exception des espèces hybrides) qui conserve ses caractéristiques de génération en génération, par son mode de reproduction naturel

[SOURCE: ISO 5527:—, définition 2.1.7, modifiée — l'autre terme préféré «cultivar» a été supprimé.]

3.2 Termes relatifs à l'extraction et à la purification de l'ADN/ARN

3.2.1

extraction de l'acide nucléique

préparation d'un échantillon pour la libération de l'acide nucléique cible

Note 1 à l'article: Le mode opératoire d'extraction de l'acide nucléique est utilisé pour isoler les acides nucléiques des autres composants cellulaires tels que les protéines, les lipides, les glucides, ainsi que les autres impuretés dans un échantillon pour essai.

[SOURCE: ISO 22174:2005, définition 3.2.1, modifiée — La Note 1 a été ajoutée.]

3.2.2

purification de l'acide nucléique

méthode permettant d'obtenir un ADN purifié

Note 1 à l'article: Mode opératoire ou méthode impliquant des étapes séquentielles et utilisé(e) pour séparer l'ADN et/ou l'ARN des autres composants dans un échantillon. Un échantillon d'ADN ou d'ARN hautement purifié contient des effets observables et mesurables négligeables pouvant être attribués aux inhibiteurs de la réaction de polymérisation en chaîne.

Note 2 à l'article: Dans ce contexte, la pureté renvoie à la réduction d'effets observables et mesurables d'inhibiteurs de PCR.

[SOURCE: ISO 22174:2005, définition 3.2.2, modifiée — La Note 1 a été ajoutée; la Note 2 a été modifiée.]

3.3 Termes relatifs à l'amplification des acides nucléiques par PCR

3.3.1

amplicon

fragment d'ADN spécifique produit par une technologie d'amplification de l'ADN telle que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

3.3.2

hybridation

liaison spécifique de séquences complémentaires d'acides nucléiques dans les conditions de réaction appropriées

[SOURCE: ISO 22174:2005, définition 3.6.3]

3.3.3

PCR multiplex

PCR qui utilise des paires d'amorces multiples dans différents loci combinés au sein d'un seul mélange de réaction pour produire plusieurs amplicons simultanément

[SOURCE: ISO 22174:2005, définition 3.4.11, modifiée — la portion de phrase suivant «amorces multiples» a été ajoutée.]

3.3.4 réaction de polymérisation en chaîne PCR

méthode enzymatique permettant l'amplification in vitro de l'ADN

[SOURCE: ISO 22174:2005, définition 3.4.1]

3.3.5 amorce

oligonucléotide de longueur et de séquence définies, complémentaire d'un segment d'une séquence d'ADN pertinente pour l'analyse

[SOURCE: ISO 22174:2005, définition 3.4.12]

3.3.6 sonde d'ADN

molécule d'acide nucléique marqué ayant une séquence définie, utilisée pour détecter l'ADN cible par hybridation

[SOURCE: ISO 22174:2005, définition 3.6.1]

3.3.7 spécificité

propriété d'une méthode à répondre exclusivement à la caractéristique ou à l'analyte soumis à essai

Note 1 à l'article: Elle décrit l'aptitude à reconnaître spécifiquement la séquence d'acide nucléique à détecter en la distinguant des autres séquences d'acide nucléique et la tendance d'une amorce ou d'une sonde à s'hybrider avec sa cible prévue et à ne pas s'hybrider avec les autres séquences non cibles.

[SOURCE: ISO 24276:2006, définition 3.1.4, modifiée — La Note 1 a été ajoutée.]

3.3.8 thermocycleur

appareil de laboratoire automatique utilisé pour augmenter et baisser la température d'un échantillon de façon répétée en réalisant des cycles par l'intermédiaire d'une série d'étapes discrètes préprogrammées

Note 1 à l'article: Ce cyclage des températures amorce le processus de PCR.

3.4 Termes relatifs à la détection

3.4.1 électrophorèse

méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique

Note 1 à l'article: Les produits PCR peuvent être séparés par différents types d'électrophorèse.

3.5 Termes relatifs aux témoins

3.5.1 témoin d'identification matériau de référence

matériau ou substance dont une ou plusieurs valeurs des propriétés sont suffisamment homogènes et bien définies pour permettre de l'utiliser pour l'étalonnage d'un appareil, l'évaluation d'une méthode de mesure ou l'attribution de valeurs aux matériaux

Note 1 à l'article: Le matériau de référence peut être fourni par le client, être interne au laboratoire ou être une référence officielle.

[SOURCE: Guide ISO 30]

[SOURCE: ISO 24276:2006, définition 3.5.1, modifiée — La Note 1 a été ajoutée.]

3.5.2

témoin de manipulation

un ou plusieurs échantillons ayant subi une partie ou la totalité du processus analytique des échantillons cibles et permettant de révéler des allèles connus des marqueurs utilisés, en servant ainsi à repérer les erreurs de processus et en fournissant des allèles de référence susceptibles de faciliter la lecture des résultats

3.6 Termes relatifs aux marqueurs

3.6.1

compétition allélique

amplification préférentielle d'un allèle par rapport à un autre dans le cas d'un hétérozygote ou d'un mélange

3.6.2

fréquence allélique

mesure de la fréquence d'un allèle dans une population; proportion ou pourcentage total(e) d'apparition d'un locus occupé par un allèle donné

3.6.3

marqueur

marqueur génétique qui s'applique généralement aux fragments d'ADN correspondant à un locus donné qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte ou sur le génotype des loci voisins

3.6.4

allèle nul

<contexte de la PCR> variant de séquence qui exclut l'amplification par PCR d'une cible particulière, résultant en l'absence de produit PCR détectable

[ISO 13495:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdc058a8-5275-433d-a061-008eda21f2f1/iso-13495-2013)

3.6.5

région répétée

région du génome dans laquelle une séquence d'ADN ou d'ARN spécifique est présente en plusieurs copies

3.6.6

marqueur SSR

[abréviation de Simple Sequence Repeat]

région de l'ADN constituée d'une courte (1 pb à 6 pb) séquence (unité de répétition) qui est répétée en tandem à de nombreuses (généralement 5 à 50) reprises

Note 1 à l'article: Les SSR sont généralement appelés «microsatellites».

Note 2 à l'article: Le nombre d'unités de répétition présentes à un SSR spécifié, et donc la longueur globale du SSR, varie souvent selon les individus.

3.6.7

polymorphisme mononucléotidique

SNP

variation mononucléotidique dans une séquence génétique qui se produit à une fréquence appréciable dans la population

Note 1 à l'article: SNP se prononce souvent «snip».

[SOURCE: ISO 25720:2009, définition 4.23, modifiée — La Note 1 a été ajoutée.]

4 Assurance qualité des résultats d'essai

Les exigences et lignes directrices présentées dans le [Tableau 1](#) utilisent le code suivant:

— O: Obligatoire; C: Conseillé.

Tableau 1 — Exigences et lignes directrices relatives aux résultats d'essai

PERSONNEL		
Le personnel qui exécute des tâches spécifiques doit être qualifié sur la base d'un niveau d'études, d'une formation, d'une expérience appropriés et/ou de compétences démontrées, selon les tâches exigées.		
	Critères	Exigence (O ou C)
	Formation à l'utilisation du matériel	O
	Manipulation des produits chimiques	O
	Le personnel responsable des avis et interprétations doit avoir une bonne connaissance des différentes structures génétiques et des systèmes de production de semences concernés afin de pouvoir conseiller les clients et/ou de leur proposer des pistes d'interprétation des résultats	O
MATÉRIEL		
La maintenance des appareils et équipements doit être assurée conformément aux instructions des fabricants. Des programmes d'étalonnage appropriés doivent être établis pour les appareils.		
	Critères	Exigence (O ou C)
Maintenance du matériel clé	Équipements utilisés pour la préparation de l'échantillon Exemple: broyeurs	O
	Système de pipetage	O
	Autoclaves utilisés pour la stérilisation du matériel de laboratoire et des divers tampons et solutions employés	O
	Congélateur(s) de stockage pour la conservation des extraits, produits, mélanges, etc.	O
	Réfrigérateur/chambre froide pour la conservation des échantillons extraits, solutions et produits chimiques	O
	Équipement servant à effectuer des cycles d'amplification de l'ADN (thermocycleur, bain-marie, etc.)	O
	Système de visualisation et d'enregistrement de l'amplicon (photocopieuse, scanners, etc.)	O
	Système d'électrophorèse, analyseur génétique	C
	Balances analytiques	O
	pH-mètre	C
	Robots	C
LOCAUX		
	Critères	Exigence (O ou C)
	Toutes les mesures nécessaires ont été prises pour garantir la santé du personnel et la protection de l'environnement	C
	Système de pipetage manuel ou automatique spécifique à chaque zone de travail	O
	Deux zones de travail séparées	
	Pré- et post-PCR	O
RÉACTIFS		
	Les produits utilisés ne doivent pas constituer une source potentielle de contamination ou de dégradation d'ADN. Tous les réactifs doivent être conservés et utilisés conformément aux recommandations des fournisseurs.	O