

# PROJET DE NORME INTERNATIONALE

## ISO/DIS 17601

ISO/TC 190/SC 4

Secrétariat: AFNOR

Début de vote:  
2013-09-26

Vote clos le:  
2013-12-26

---

---

### Qualité du sol — Estimation de l'abondance de séquences de gènes microbiens par amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps réel à partir d'ADN directement extrait du sol

*Soil quality — Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative realtime PCR from DNA directly extracted from soil*

ICS: 13.080.30

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
(standards.iteh.ai)  
Full standard:  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/837e9eee-02df-483a-be2f-1f21de376ab0/iso-17601-2016>

CE DOCUMENT EST UN PROJET DIFFUSÉ POUR OBSERVATIONS ET APPROBATION. IL EST DONC SUSCEPTIBLE DE MODIFICATION ET NE PEUT ÊTRE CITÉ COMME NORME INTERNATIONALE AVANT SA PUBLICATION EN TANT QUE TELLE.

OUTRE LE FAIT D'ÊTRE EXAMINÉS POUR ÉTABLIR S'ILS SONT ACCEPTABLES À DES FINS INDUSTRIELLES, TECHNOLOGIQUES ET COMMERCIALES, AINSI QUE DU POINT DE VUE DES UTILISATEURS, LES PROJETS DE NORMES INTERNATIONALES DOIVENT PARFOIS ÊTRE CONSIDÉRÉS DU POINT DE VUE DE LEUR POSSIBILITÉ DE DEVENIR DES NORMES POUVANT SERVIR DE RÉFÉRENCE DANS LA RÉGLEMENTATION NATIONALE.

LES DESTINATAIRES DU PRÉSENT PROJET SONT INVITÉS À PRÉSENTER, AVEC LEURS OBSERVATIONS, NOTIFICATION DES DROITS DE PROPRIÉTÉ DONT ILS AURAIENT ÉVENTUELLEMENT CONNAISSANCE ET À FOURNIR UNE DOCUMENTATION EXPLICATIVE.



Numéro de référence  
ISO/DIS 17601:2013(F)

© ISO 2013

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
(standards.iteh.ai)  
Full standard:  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/837e9eee-02df-483a-be2f-1f21de376ab0/iso-17601-2016>

### Notice de droit d'auteur

Ce document de l'ISO est un projet de Norme internationale qui est protégé par les droits d'auteur de l'ISO. Sauf autorisé par les lois en matière de droits d'auteur du pays utilisateur, aucune partie de ce projet ISO ne peut être reproduite, enregistrée dans un système d'extraction ou transmise sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, les enregistrements ou autres, sans autorisation écrite préalable.

Les demandes d'autorisation de reproduction doivent être envoyées 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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Toute reproduction est soumise au paiement de droits ou à un contrat de licence.

Les contrevenants pourront être poursuivis.

## Sommaire

Page

Avant-propos .....	4
Introduction.....	5
1 <b>Domaine d'application</b> .....	1
2 <b>Références normatives</b> .....	1
3 <b>Termes et définitions</b> .....	1
4 <b>Principe</b> .....	2
5 <b>Matériel d'essai</b> .....	3
5.1 <b>ADN</b> .....	3
5.2 <b>Bactéries</b> .....	3
5.3 <b>Plasmide</b> .....	3
5.4 <b>Enzymes et protéines</b> .....	3
5.5 <b>Produits chimiques</b> .....	3
5.6 <b>Produit pour le milieu de culture bactérienne</b> .....	4
5.7 <b>Tampon et réactifs</b> .....	4
6 <b>Appareillage</b> .....	5
7 <b>Mode opératoire</b> .....	6
7.1 <b>Préparation des étalons de qPCR et étalonnage de l'analyse par qPCR (tâche 1)</b> .....	6
7.2 <b>Préparation d'une matrice d'ADN du sol et essai d'inhibition (tâche 2)</b> .....	12
7.3 <b>Analyse par qPCR (tâche 3)</b> .....	14
7.4 <b>Validation et examen de l'analyse par qPCR (tâche 4)</b> .....	15
8 <b>Validation de l'analyse par qPCR</b> .....	16
9 <b>Expression des résultats de l'analyse par qPCR</b> .....	16
10 <b>Rapport d'essai</b> .....	17
<b>Annexe A (informative) Étude interlaboratoires internationale relative à l'évaluation de la quantification de l'abondance de groupes microbiens par qPCR</b> .....	18
<b>Annexe B (informative) Analyse basée sur un essai qPCR SYBR Green</b> .....	19
B.1 <b>Préparation de l'étalon de qPCR SYBR Green et étalonnage de l'analyse par qPCR SYBR Green®16)</b> .....	19
B.2 <b>Préparation d'une matrice d'ADN du sol et essai d'inhibition</b> .....	19
B.3 <b>Analyse par qPCR SYBR Green</b> .....	19
B.4 <b>Validation et examen de l'analyse par qPCR SYBR Green</b> .....	19
<b>Annexe C (informative) Analyse basée sur un essai qPCR TaqMan</b> .....	20
C.1 <b>Préparation de l'étalon de qPCR TaqMan et étalonnage de l'analyse par qPCR TaqMan</b> .....	20
C.2 <b>Préparation d'une matrice d'ADN du sol et essai d'inhibition</b> .....	20
C.3 <b>Analyse par qPCR TaqMan</b> .....	20
C.4 <b>Validation et examen de l'analyse par qPCR TaqMan</b> .....	20
<b>Bibliographie</b> .....	21

## 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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

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.

L'ISO 17601 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

## Introduction

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est un constituant majeur de tout organisme vivant codant pour les enzymes responsables de ses activités biologiques. L'étude des séquences d'ADN extrait de différentes matrices environnementales, à l'aide d'approches moléculaires, permet de fournir des marqueurs moléculaires qui peuvent être utilisés pour différencier et identifier clairement différents micro-organismes (bactéries, archées et eucaryotes).

Jusqu'à présent, la plupart des études visant à développer des indicateurs microbiens de la qualité du sol et applicables aux milieux complexes, tels que le sol, étaient biaisées par la nature incultivable de nombreux micro-organismes et par le manque de sensibilité des méthodes microbiologiques classiques [1]. Le développement récent de nombreuses méthodes de biologie moléculaire reposant principalement sur l'amplification des acides nucléiques extraits du sol a permis de proposer une alternative pertinente à la microbiologie pasteurienne permettant de connaître en détail la composition, la richesse et la structure des communautés microbiennes [2], [3], [4], [5], [6]. Les approches reposant sur l'extraction de l'ADN à partir d'échantillons environnementaux sont désormais bien établies dans le domaine de l'écologie des sols et servent de marqueurs génétiques permettant d'évaluer la diversité microbienne. Les résultats d'analyses moléculaires des communautés et/ou populations microbiennes du sol reposent sur deux paramètres principaux : (i) l'extraction d'ADN représentatif de la composition de la communauté microbienne indigène et (ii) les biais introduits par la PCR, notamment le choix des amorces oligo-nucléotidiques, la concentration de l'ADN utilisé comme matrice pour la PCR, les erreurs de PCR ou encore la méthode d'analyse post-PCR choisie [7], [4], [8], [9].

De nombreuses études ont été conduites avec ces nouvelles méthodes permettant d'améliorer l'extraction, la purification, l'amplification et la quantification de l'ADN des sols [10]. Récemment, l'ISO 11063 décrivant « une méthode pour extraire directement les acides nucléiques d'échantillons de sol », dérivée de [10], a ouvert de nouvelles perspectives de développement d'approches moléculaires normalisées pour estimer la qualité du sol [11].

La présente Norme internationale a pour objectif de décrire le mode opératoire utilisé pour mettre en place et réaliser une PCR quantitative afin de quantifier l'abondance de groupes microbiens du sol ainsi que les groupes fonctionnels à partir d'extrait d'ADN de sol. La quantification des phyla microbiens du sol ainsi que des groupes fonctionnels par des analyses qPCR peut contribuer au développement d'outils de routine permettant de surveiller la qualité du sol. A la demande de l'ISO, la reproductibilité de la quantification de l'abondance de séquences spécifiques de gènes microbiens par amplification par réaction de polymérisation en en chaîne par polymérase (PCR) quantitative en temps réel à partir d'ADN directement extrait du sol, a été évaluée lors d'une étude interlaboratoires internationale (Annexe A).

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

Full standard:  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/837e9eee-02df-483a-be2f-1f21de376ab0/iso-17601-2016>

# Qualité du sol — Estimation de l'abondance de séquences de gènes microbiens par amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps réel à partir d'ADN directement extrait du sol

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie les étapes cruciales d'une méthode d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps réel (qPCR) permettant de mesurer l'abondance de séquences spécifiques de gènes microbiens à partir d'un extrait d'ADN du sol qui fournit une estimation de l'abondance de groupes microbiens spécifiques.

Il convient de noter que le nombre de gènes n'est pas nécessairement lié directement au nombre de micro-organismes mesurés. Par exemple, le nombre d'opérons ribosomiques va d'une copie à 20 copies dans différents phyla bactériens. Par conséquent, le nombre de séquences d'ARNr 16S quantifiées dans des extraits d'ADN du sol ne donne pas une estimation exacte du nombre de bactéries du sol. Par ailleurs, le nombre de séquences n'est pas nécessairement lié à des micro-organismes vivants et peut comprendre des séquences amplifiées à partir de l'ADN extrait de micro-organismes morts.

## 2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 10381-6, *Qualité du sol — Échantillonnage — Partie 6 : Lignes directrices pour la collecte, la manipulation et la conservation, dans des conditions aérobies, de sols destinés à l'évaluation en laboratoire des processus, de la biomasse et de la diversité microbiens.*

ISO 11063, *Qualité du sol — Méthode pour extraire directement l'ADN d'échantillons de sol.*

## 3 Termes et définitions

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

### 3.1

#### ADN du sol

ADN extrait du biote vivant et mort du sol

EXEMPLE Micro-organismes, plantes, animaux.

### 3.2

#### amplification par réaction de polymérisation en chaîne

#### PCR

méthode permettant l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN en utilisant une paire spécifique d'amorces oligonucléotidiques

### 3.3 amplification par réaction de polymérisation quantitative en temps réel qPCR

méthode permettant la quantification dans une matrice d'ADN du nombre d'une séquence spécifique d'ADN en utilisant une paire spécifique d'amorces oligonucléotidiques

### 3.4 matrice

échantillon d'ADN utilisé pour réaliser une réaction de PCR afin d'amplifier une séquence spécifique d'ADN

### 3.5 amplicon

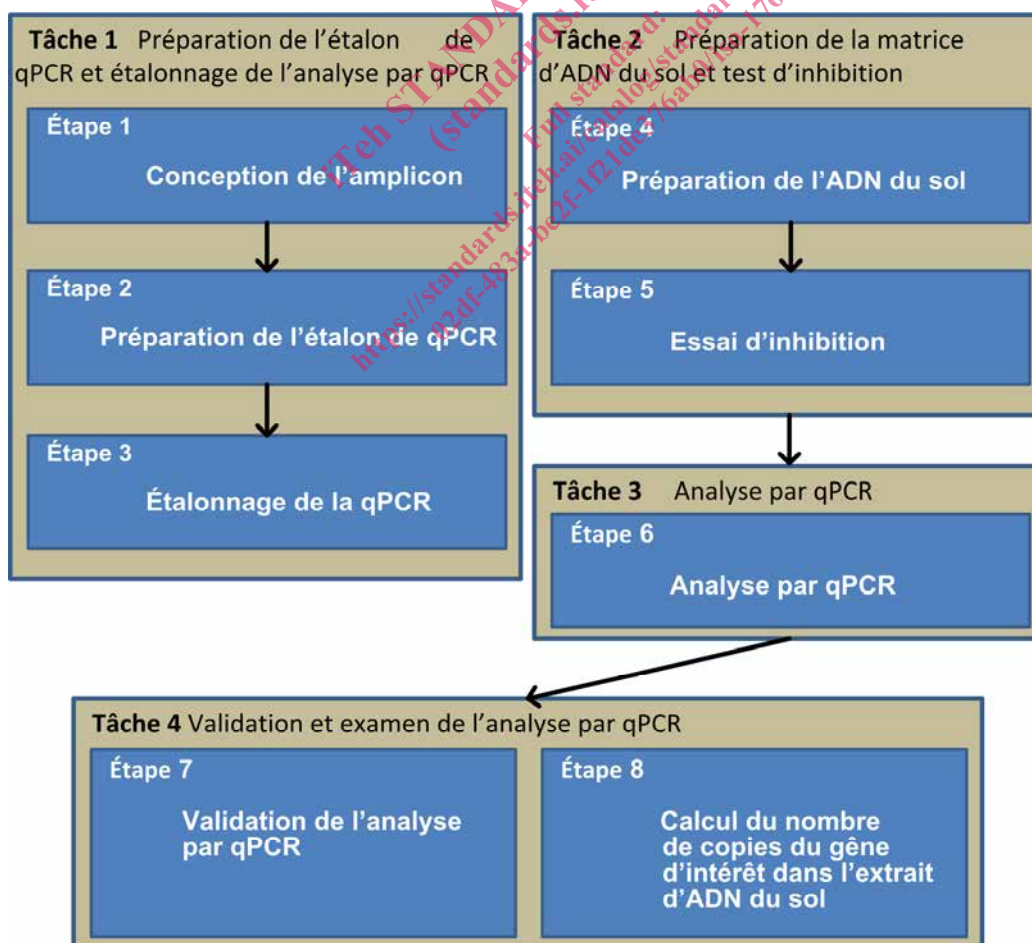
produit de PCR obtenu par PCR à partir d'une matrice

### 3.6 vecteur de clonage

molécule d'ADN circulaire dans laquelle l'amplicon est inséré par réaction de ligation, utilisée pour la transformation d'*Escherichia coli* compétente en vue du clonage de l'amplicon

## 4 Principe

La méthode vise à mesurer l'abondance de séquences spécifiques de gènes microbiens à partir d'un extrait d'ADN du sol. La méthode comprend quatre tâches et huit étapes, comme illustré à la Figure 1.





**Figure 1 — Principales tâches permettant d'estimer l'abondance de séquences spécifiques de gènes microbiens par qPCR**

La première tâche comporte trois étapes décrivant la conception d'un amplicon optimal pour la qPCR (étape une), la préparation d'étalons de qPCR (étape deux) et le mode opératoire d'étalonnage de l'analyse par qPCR (étape trois). La deuxième tâche comporte deux étapes supplémentaires décrivant les modes opératoires de préparation des échantillons d'ADN du sol (étape quatre) et d'essai pour détecter la présence d'inhibiteurs de qPCR dans les échantillons d'ADN du sol (étape cinq). La troisième tâche comporte une seule étape décrivant le protocole pour réaliser les analyses par qPCR de SYBR®<sup>1)</sup> Green et TaqMan®<sup>2)</sup> (étape six). Enfin, la quatrième tâche comporte deux étapes, l'une décrivant la procédure de validation des analyses par qPCR (étape sept) afin de vérifier la qualité de l'analyse par qPCR, et l'autre décrivant les différentes options permettant de calculer le nombre de séquences de la copie du gène d'intérêt à partir du cycle seuil (Ct) obtenu par l'analyse de tracés d'amplification par qPCR (étape huit).

## 5 Matériel d'essai

### 5.1 ADN

**5.1.1** L'ADN est extrait d'isolats bactériens et fongiques purs en utilisant des modes opératoires d'extraction classiques ou en utilisant un kit du commerce pour extraire l'ADN génomique.

**5.1.2** L'ADN du sol est extrait d'aliquotes de sol conformément à l'ISO 11063.

### 5.2 Bactéries

**5.2.1** Souche d'*Escherichia coli*, habituellement utilisée pour le clonage de produit de PCR.

### 5.3 Plasmide

**5.3.1** Vecteur de clonage, habituellement utilisé pour le clonage d'un produit de PCR dans une souche d'*Escherichia coli* compétente, comportant les amorces oligonucléotidiques universelles SP6 et T7 situées de part et d'autre du site d'insertion.

### 5.4 Enzymes et protéines

**5.4.1** Taq polymérase.

**5.4.1** T4 ADN ligase.

**5.4.3** Protéine T32 codée par le gène correspondant du phage T4.

**5.4.4** Albumine de sérum de bovin (n° CAS 9048-46-8).

### 5.5 Produits chimiques

**5.5.1** Ampicilline sodique, C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub>S (n° CAS 69-52-3).

**5.5.2** Acide borique, BH<sub>3</sub>O<sub>3</sub> (n° CAS 10043-35-3).

1) SYBR Green est une marque déposée de Molecular Probes. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

2) TaqMan est une marque déposée de Roche Molecular Systems, Inc. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.5.3 Solution de désoxynucléotides, dNTPs.

5.5.4 Bromure d'éthidium (n° CAS 1239-45-8).

5.5.5 Sel disodique de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA),  $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2 H_2O$  (n° CAS 6381-92 6).

5.5.6 Glucose,  $C_6H_{12}O_6$  (n° CAS 50-99-7).

5.5.7 Acide chlorhydrique, HCl (n° CAS 7647-01-0).

5.5.8 IPTG, Isopropyl-bêta-D-Thiogalactopyranoside (n° CAS 367-93-1).

5.5.9 Chlorure de magnésium,  $MgCl_2$  (n° CAS 7786-30-3).

5.5.10 Sulfate de magnésium,  $MgSO_4$  (n° CAS 7487-88-9).

5.5.11 Eau de qualité biologie moléculaire,  $H_2O$ .

5.5.12 Chlorure de potassium, KCl (n° CAS 7447-40-7).

5.5.13 Chlorure de sodium, NaCl (n° CAS 7647-14-5).

5.5.14 Tris[hydroxyméthyl]aminométhane,  $C_4H_{11}NO_3$  (n° CAS 77-86-1).

5.5.15 X-Gal, bromo-5-chloro-4-indolyl-3-bêta-D-galactopyranoside (n° CAS 7240-90-6).

## 5.6 Produit pour le milieu de culture bactérienne

5.6.1 Bacto<sup>®3)</sup> tryptone, digestat enzymatique de caséine.

5.6.2 Extrait de levure en poudre (n° CAS 8013-01-2).

5.6.3 Gélose

## 5.7 Tampon et réactifs

5.7.1 Solution d'ampicilline, 2 g d'ampicilline sodique dans 4 ml de  $H_2O$  stérilisée à l'aide d'un filtre de 0,22  $\mu m$ . Compléter à 20 ml avec  $H_2O$  stérilisée, préparer des aliquotes de 1 ml et conserver à - 20 °C.

5.7.2 EDTA, 0,5 mol/l, 186,10 g d'EDTA dans 1 000 ml de  $H_2O$ , en ajustant le pH à 8,0 à l'aide de NaOH (10 mol/l).

5.7.3 Bromure d'éthidium, 5 mg de bromure d'éthidium dans 1 000 ml de  $H_2O$ .

5.7.4 Solution mère d'IPTG, 1 g d'IPTG dans 8 ml de  $H_2O$ . Après l'avoir mélangée soigneusement, la solution est complétée à 10 ml et stérilisée dans un poste de sécurité microbiologique. Préparer une aliquote de 1 ml d'IPTG et la conserver à - 20 °C.

<sup>3)</sup> Bacto tryptone est la marque déposée d'un produit fourni par Difco Laboratories. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est possible de démontrer qu'ils conduisent aux mêmes résultats.