

---

---

**Textiles — Identification de certaines  
fibres animales par la méthode  
d'analyse de l'ADN — Cachemire, laine,  
yack et leurs mélanges**

*Textiles — Identification of some animal fibres by DNA analysis  
method — Cashmere, wool, yak and their blends*

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

[ISO 18074:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/40391e27-8cbc-4502-b4a1-7c2de646f164/iso-18074-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/40391e27-8cbc-4502-b4a1-7c2de646f164/iso-18074-2015>



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

ISO 18074:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/40391e27-8cbc-4502-b4a1-7c2de646f164/iso-18074-2015>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2015, Publié en Suisse

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  
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401  
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland  
Tel. +41 22 749 01 11  
Fax +41 22 749 09 47  
copyright@iso.org  
www.iso.org

## Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>v</b>
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Mise en garde</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>5</b> <b>Principe</b> .....	<b>3</b>
<b>6</b> <b>Appareillage et équipement</b> .....	<b>3</b>
<b>7</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>4</b>
<b>8</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>6</b>
<b>9</b> <b>Méthodes d'essai</b> .....	<b>7</b>
9.1 Généralités.....	7
9.2 Découpage de l'échantillon.....	7
9.3 Extraction de l'ADN.....	7
9.4 Purification de l'ADN.....	7
9.5 Amplification de l'ADN.....	8
9.5.1 Composition de la solution de réaction.....	8
9.5.2 Paramètres de la machine d'amplification PCR pour l'amplification de l'ADN.....	9
9.5.3 Méthode d'essai d'amplification de l'ADN.....	9
9.6 Détection et confirmation de l'amplification d'ADN.....	9
9.6.1 Préparation.....	9
9.6.2 Essai de migration électrophorétique.....	10
<b>10</b> <b>Vérification</b> .....	<b>10</b>
10.1 Généralités.....	10
10.2 Vérification d'absence d'amplification après le processus d'extraction (vérification négative).....	10
10.3 Vérification d'amplification après le processus d'extraction (vérification positive).....	10
10.4 Vérification d'amplification après le processus de PCR.....	11
10.5 Vérification d'absence d'amplification après le processus de PCR.....	11
10.6 Vérification d'amplification de la solution de réaction PCR.....	11
<b>11</b> <b>Évaluation</b> .....	<b>12</b>
<b>12</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>12</b>
<b>13</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>13</b>
<b>Annexe A (informative) Amplification du fragment d'ADN de longueur constante par la méthode PCR</b> .....	<b>14</b>
<b>Annexe B (informative) Purification complémentaire de l'ADN</b> .....	<b>16</b>
<b>Annexe C (informative) Répétabilité et reproductibilité</b> .....	<b>18</b>
<b>Annexe D (informative) Application pratique à divers produits textiles</b> .....	<b>23</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>24</b>

## Avant-propos

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

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

L'attention est 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 dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant : [Avant-propos — Informations supplémentaires](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sis/40591e27-8c8c-4502-b4a1-7c2de646f164/iso-18074-2015).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 38, *Textiles*.

## Introduction

La composition des fibres utilisées dans les produits textiles est l'une des propriétés les plus importantes. L'étiquetage de la composition des produits textiles est exigé au niveau mondial par les législations ou les réglementations volontaires liées au commerce équitable.

La méthode d'essai visant à déterminer la composition de certaines fibres animales utilisées dans les produits textiles a été décrite dans l'ISO 17751.[3] Il s'agit actuellement de la seule méthode permettant de déterminer la composition de fibres animales. Dans cette méthode, les fibres animales sont observées au microscope et identifiées en fonction de la forme de leurs écailles par des opérateurs expérimentés. De cette manière, de nombreux échantillons peuvent être soumis à essai de façon très efficace. Toutefois, des opérateurs, même expérimentés, peuvent rencontrer des difficultés dans l'identification de fibres, car les produits textiles présentent une grande diversité de couleurs et de traitements d'ennoblissement, et parce qu'il existe de nombreux mélanges de fibres animales.

C'est pourquoi plusieurs méthodes d'essai visant à obtenir des résultats plus précis ont été recherchées et élaborées. Parmi elles, la méthode d'analyse de l'ADN (acide désoxyribonucléique) s'est révélée pratique et facile à mettre en œuvre pour identifier la nature des fibres animales.

Il est bien connu que tous les animaux possèdent un ADN spécifique. La méthode d'amplification de l'ADN par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) a récemment évolué, atteignant une haute précision. De très faibles quantités d'ADN extraites de fibres animales sont amplifiées par PCR afin d'obtenir de grandes quantités d'ADN copié. Pour cette analyse, on utilise l'ADN mitochondrial, plutôt que l'ADN nucléaire, car il engendre de plus grandes quantités.

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

[ISO 18074:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/40391e27-8cbc-4502-b4a1-7c2de646f164/iso-18074-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/40391e27-8cbc-4502-b4a1-7c2de646f164/iso-18074-2015>

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

ISO 18074:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/40391e27-8cbc-4502-b4a1-7c2de646f164/iso-18074-2015>

# Textiles — Identification de certaines fibres animales par la méthode d'analyse de l'ADN — Cachemire, laine, yack et leurs mélanges

**AVERTISSEMENT** — L'utilisation de la présente Norme internationale peut impliquer des matériaux, opérations et équipements dangereux. La présente Norme internationale n'a pas pour objectif de traiter l'ensemble des problèmes de sécurité associés à son utilisation. L'utilisateur de la présente Norme internationale est tenu, avant utilisation, d'établir des pratiques de sécurité et d'hygiène appropriées et de déterminer l'applicabilité des limitations réglementaires et des exigences du fournisseur en matière de sécurité.

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode d'essai pour l'analyse de l'ADN de certaines fibres animales afin d'identifier le cachemire, la laine, le yack et leurs mélanges au moyen d'une extraction, d'une amplification par la méthode PCR (réaction par polymérisation en chaîne) et de procédés de détection de l'ADN.

La présente Norme internationale s'applique au cachemire, au yack, à la laine et à leurs mélanges en tant que méthode qualitative.

## 2 Mise en garde

Les résultats d'essai pour l'identification de fibres par la méthode d'analyse de l'ADN peuvent être obtenus avec un haut degré de précision pour les produits textiles mentionnés ci-dessus ayant été traités avec de faibles concentrations en colorants ou ayant été teints en couleurs claires.

En revanche, lorsque les produits textiles ont été traités dans des conditions plus agressives ou à de hautes températures, l'ADN mitochondrial est susceptible d'avoir été endommagé. Dans ce cas, l'identification peut s'avérer difficile car l'amplification de l'ADN par PCR peut être impossible. Dans le cas où des produits textiles sont sujets à des contaminations par d'autres espèces, telles que la présence de suint de cachemire sur des fibres de laine, cette situation peut trouver une solution par une vérification utilisant les techniques de microscopie.

## 3 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à 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 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

ISO 8655-2, *Appareils volumétriques à piston — Partie 2: Pipettes à piston*

## 4 Termes et définitions

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

#### 4.1

##### **ADN**

acide désoxyribonucléique, présent dans le noyau et les mitochondries des cellules composant les fibres animales et constitué d'une chaîne linéaire de 4 bases : l'adénine (A), la thymine (T), la guanine (G) et la cytosine (C)

Note 1 à l'article: à l'article : Chaque fibre animale possède une séquence d'ADN identique qui lui est propre.

#### 4.2

##### **fibres animales**

fibres de cachemire, de laine ou de yack

#### 4.3

##### **solution tampon**

solution utilisée afin de maintenir le pH de la solution de réaction à une valeur souhaitée

#### 4.4

##### **agent réducteur**

agent dissolvant les fibres animales par décomposition réductrice des ponts disulfure de la protéine

#### 4.5

##### **amplification de l'ADN**

amplification du fragment spécifique d'ADN par la méthode PCR

#### 4.6

##### **méthode PCR**

méthode d'amplification en chaîne par polymérase

Note 1 à l'article: à l'article : Le procédé d'amplification du fragment d'ADN de longueur constante est expliqué à l'Annexe A.

#### 4.7

##### **ADN polymérase pour la méthode PCR**

ADN polymérase thermostable, sans la fonction de correction sur éprouvettes, spécifiée pour la méthode PCR

#### 4.8

##### **amorces**

fragment de courte taille d'ADN simple brin, initiateur de réaction et défini comme la séquence de 18-30 bases identique par rapport à l'ADN de la fibre animale

#### 4.9

##### **jeu d'amorces**

ensemble d'amorces avec la réaction direction sens et anti-sens

#### 4.10

##### **amorces pour le cachemire**

amorces présentant une séquence de bases identique à l'ADN mitochondrial du cachemire

Note 1 à l'article: à l'article : La séquence de bases pour les amorces sera déposée auprès de la base de données publique.

Note 2 à l'article:

#### 4.11

##### **amorces pour la laine**

amorces présentant une séquence de bases identique à l'ADN mitochondrial de la laine

**4.12****amorce pour le yack**

amorce d'ADN présentant une séquence de bases identique à l'ADN mitochondrial du yack

Note 1 à l'article: à l'article : Des informations sur les amorces peuvent être obtenues auprès du secrétariat de l'ISO/TC 38.

**4.13****migration par électrophorèse sur gel**

méthode permettant de détecter les fragments d'ADN amplifié de longueur constante

**5 Principe**

L'ADN mitochondrial est extrait des échantillons de fibres animales à l'aide d'une réaction chimique et enzymatique. L'ADN extrait est purifié au moyen d'une méthode de précipitation et par centrifugation. L'ADN purifié est employé pour la réaction d'amplification de la méthode PCR. Dans la méthode PCR, des amorces pour le cachemire, le yack et la laine sont respectivement soumises à essai. Si l'échantillon est constitué de cachemire, seule l'amorce de cachemire permet d'amplifier les fragments d'ADN de longueur constante. Ensuite, les fragments d'ADN de longueur constante sont détectés par la méthode de migration électrophorétique.

Les fibres sont identifiées par l'observation d'amplification ou d'absence d'amplification dans les essais effectués en utilisant successivement toutes les amorces.

**6 Appareillage et équipement**

**6.1 Pipettes**, permettant de mesurer et de prélever (0 à 20)  $\mu\text{l}$  ( $\pm 0,20 \mu\text{l}$ ), (20 à 200)  $\mu\text{l}$  ( $\pm 1,60 \mu\text{l}$ ), (200 à 1 000)  $\mu\text{l}$  ( $\pm 8 \mu\text{l}$ ) dans la limite des erreurs systématiques définies dans l'ISO 8655-2.

**6.2 Microtube**, capable de supporter une centrifugation de 14 000  $g$  et le séjour en autoclave.

Des capacités de 2 ml et de 0,2 ml sont respectivement nécessaires pour la purification et pour la méthode PCR. Il convient que les tubes de 0,2 ml utilisés pour la méthode PCR soient conformes aux recommandations du fabricant de la machine PCR.

**6.3 Capuchon vissant**, pour le microtube.

**6.4 Bloc thermique**, muni d'orifices pour accueillir les microtubes et capable de chauffer jusqu'à environ 80 °C ( $\pm 1,0$  °C).

**6.5 Agitateur vibrant avec dispositif chauffant**, permettant de chauffer jusqu'à 50 °C et de maintenir cette température, ainsi que d'appliquer au microtube une agitation d'environ 500 tr/min ou plus.

**6.6 Agitateur**, permettant d'accueillir les microtubes et de les agiter environ 500 fois/min ou plus.

Cette machine peut être remplacée par un instrument équivalent, par exemple un agitateur rotatif à microtubes pouvant fonctionner à 30 tr/min ou plus.

**6.7 Centrifugeuse**, permettant de réaliser une centrifugation à 14 000  $g$  ou plus, de passer de 0 °C à la température ambiante et d'accueillir des microtubes ou des unités d'ultrafiltration par centrifugation.

**6.8 Unité d'ultrafiltration par centrifugation**<sup>1)</sup> permettant de retenir les molécules présentant une masse moléculaire de 100 kDa (Dalton) ou plus.

**6.9 Machine PCR**<sup>2)</sup>, dont la température et la durée de fonctionnement sont programmables.

**6.10 Illuminateur UV, émetteur d'UV.**

**6.11 Cabine photo.**

**6.12 Boîte plastique banalisée avec un couvercle refermable.**

**6.13 Peigne**, utilisé pour former des puits dans le gel d'agarose employé dans l'essai de migration par électrophorèse sur gel.

**6.14 Broyeur**, utilisé pour mélanger et homogénéiser les fibres animales.

**6.15 Fiole Erlenmeyer**, de capacité 200 ml.

## 7 Réactifs

### 7.1 Eau pure.

Utiliser de l'eau pure telle que définie dans l'ISO 3696, présentant une pureté correspondant à la qualité 1. Il convient que cette eau ne présente aucune activité DNase (digestion de l'ADN). Il convient qu'elle ne contienne pas d'ADN susceptible d'être amplifié par les amorces en quantité significative et qu'elle ne présente aucun effet inhibiteur pour cette méthode d'essai.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/40391e27-8cbc-4502-b4a1-46f164/iso-18074-2015>

### 7.2 Réactif chloroforme/alcool isoamylique.

Concentration à 100 % de la plus haute qualité.

—	Chloroforme	9,6 ml
—	Alcool isoamylique	400 µl

### 7.3 Solution de perchlorate de sodium.

—	Perchlorate de sodium	6,1 g
---	-----------------------	-------

Compléter la solution à 10 ml avec de l'eau pure.

### 7.4 Tris [tris(hydroxyméthyl)aminométhane] – HCl à 1 mol/l.

Dissoudre 12,1 g de tris(hydroxyméthyl)aminométhane dans 800 ml d'eau pure, puis ajuster le pH à une valeur de 8,0 en ajoutant du HCl et à l'aide d'un pH-mètre. Compléter ensuite à 1 000 ml avec de l'eau pure.

1) Amicon Ultra est un exemple d'un produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit.

2) Life Technologies Corporation est le fournisseur d'un produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il peut être démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

**7.5 EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) à 500 mmol/l.**

Dissoudre 186,1 g d'EDTA·Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (sel disodique dihydraté d'EDTA) dans 800 ml d'eau pure, puis ajuster le pH à une valeur de 8,0 en ajoutant de la soude NaOH et à l'aide d'un pH-mètre. Compléter ensuite à 1 000 ml avec de l'eau pure.

**7.6 Solution tampon A.**

—	Tris-HCL à 1 mol/l (7.4)	5 ml
—	EDTA à 500 mmol/l (7.5)	2 ml
—	Laurylsulfate de sodium (LSS) (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> Na)	0,2 g
—	Saccharose	1,2 g
—	Chlorure de sodium	170 mg
—	Dithiothréitol (DTT)	920 mg

Compléter à 10 ml avec de l'eau pure. Préparer directement avant utilisation.

En raison de sa nature volatile, il convient d'ajouter le DTT après le passage en autoclave, de façon à ce que son efficacité ne soit pas réduite.

**7.7 Solution tampon B.**

—	EDTA à 500 mmol/l (7.5)	0,2 ml
---	-------------------------	--------

Compléter à 100 ml avec de l'eau pure.

**7.8 Solution enzymatique d'extraction des protéines, solution papainique**, avec 10 unités de papaine dissoutes dans de l'eau pure (par exemple, 10 unités/20 µl).

**7.9 ADN polymérase thermostable**, sans l'activité exonucléase 3' à 5'.

**7.10 Fibre animale A amorce 1**, amorces sens pour le cachemire, le yack et la laine.

**7.11 Fibre animale A amorce 2**, amorces anti-sens pour le cachemire, le yack et la laine.

**7.12 Élément de composition de l'ADN**, de qualité adaptée à la méthode PCR.

**7.13 Solution tampon pour la polymérase**, adaptée à la polymérase de la réaction PCR.

Cette solution tampon peut être conçue par les personnes réalisant la polymérase.

**7.14 Sel, chlorure de potassium (KCl)**, utilisé pour stabiliser la réaction PCR.

**7.15 Chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>)**, utilisé pour stabiliser la réaction PCR.

**7.16 Marqueur de migration électrophorétique sur gel.**

**7.17 Agarose**, variété d'agar-agar de qualité adaptée pour la migration électrophorétique de l'ADN.

### 7.18 Solution tampon à charger pour la migration électrophorétique.

—	Glycérol	36 g
—	EDTA à 500 mmol/l (7.5)	6 ml
—	Bleu de bromophénol	0,25 g
—	Xylène cyanol	0,25 g

Compléter à 100 ml avec de l'eau pure. Après avoir ajouté plus de 1/6 de cette solution à la solution de réaction de l'échantillon, la charger sur le gel.

### 7.19 Solution tampon pour la migration électrophorétique.

—	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Trizma base)	242 g
—	Acide acétique (acide acétique glacial)	57,1 ml
—	EDTA·2Na	7,43 g

Dissoudre dans de l'eau pure et compléter la solution à 1 l avec de l'eau pure. Ensuite, diluer 50 fois avec de l'eau pure.

### 7.20 Colorant d'ADN, bromure d'éthidium.

Le bromure d'éthidium se dissout dans la solution tampon pour la migration électrophorétique, à raison d'environ 5 µg/ml.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

NOTE D'autres agents intercalant d'ADN peuvent se substituer au bromure d'éthidium.

[ISO 18074:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/40391e27-8cbc-4502-b4a1-7c2de646f164/iso-18074-2015)

### 7.21 Fragment d'ADN commun, amorce.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/40391e27-8cbc-4502-b4a1-7c2de646f164/iso-18074-2015>

Les fragments d'ADN communs sont des enchaînements de bases communs à l'ADN du cachemire, du yack et de la laine. L'amorce commune 1 est une amorce sens ; l'amorce commune 2 est une amorce anti-sens.

NOTE Des informations sur les amorces peuvent être obtenues auprès du secrétariat de l'ISO/TC 38.

## 8 Échantillonnage

Les échantillons de fibres animales doivent être représentatifs des produits textiles pour l'essai. Si le produit textile est composé de plusieurs parties, séparer ces dernières en parties identiques et inclure une description détaillée de ces parties dans le rapport d'essai. Éviter toute contamination entre les différentes parties.

Deux éprouvettes d'essai sont prélevées sur l'échantillon. Lorsque les deux résultats ne sont pas cohérents, ils ne doivent pas être retenus et un nouvel essai doit être effectué sur deux autres éprouvettes.

NOTE L'Annexe B de l'ISO 17751:2007 peut servir de référence pour ce mode opératoire.