

Première édition
2019-03

Version corrigée
2019-12

Qualité du sol — Identification des espèces par codes-barres ADN dans les essais d'écotoxicologie

*Soil quality — Identification of ecotoxicological test species by DNA
barcoding*

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 21286:2019](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/fl90d3a-c970-416e-8398-b41b67d2ec69/iso-21286-2019)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/fl90d3a-c970-416e-8398-b41b67d2ec69/iso-21286-2019>



Numéro de référence
ISO 21286:2019(F)

© ISO 2019

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 21286:2019](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/fl1e90d3a-c970-416e-8398-b41b67d2ec69/iso-21286-2019)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/fl1e90d3a-c970-416e-8398-b41b67d2ec69/iso-21286-2019>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2019

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée 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 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +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
4 Principe	2
5 Réactifs et matériel	3
5.1 Matériel biologique.....	3
5.2 Enzyme.....	3
5.3 Amorces oligonucléotidiques de PCR.....	4
5.4 Réactifs.....	4
6 Appareillage	5
7 Exigences générales	5
7.1 Précautions expérimentales et prévention de la contamination.....	5
7.2 Précautions de sécurité.....	6
7.2.1 Dangers chimiques.....	6
7.2.2 Dangers physiques.....	6
8 Mode opératoire	6
8.1 Isolement de l'ADN.....	6
8.2 Quantification.....	7
8.3 PCR.....	7
8.3.1 Région génomique cible.....	7
8.3.2 Désignation d'amorces.....	7
8.3.3 Synthèse d'amorces.....	8
8.3.4 PCR.....	8
8.4 Contrôle de la taille des amplicons.....	9
8.5 Purification.....	9
8.6 Séquençage.....	10
8.7 Bioinformatique.....	10
8.7.1 Généralités.....	10
8.7.2 Contrôle qualité des électrophorégrammes ou des séquences brutes.....	10
8.7.3 Rognage des séquences de faible qualité et des amorces.....	11
8.7.4 Assemblage des séquences.....	11
8.7.5 Vérification des séquences.....	11
8.7.6 Contrôle de la séquence éditée.....	11
8.7.7 Assignation des espèces.....	12
8.7.8 Qualité des bases de données de référence.....	13
9 Calcul et expression des résultats	14
10 Validité de l'essai	14
11 Rapport d'essai	15
Annexe A (informative) Initiative du code-barres ADN d'<i>Eisenia</i>: essai interlaboratoires visant à évaluer l'applicabilité du code-barres ADN dans le cadre de l'identification de l'espèce <i>Eisenia</i>	16
Bibliographie	19

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).

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).

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 nature volontaire des normes, de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute autre information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Caractérisation biologique*. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/11e90d3a-c970-416e-8398-b41b67d2ec69/iso-21286-2019>

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

La présente version corrigée de l'ISO 21286:2019 inclut la correction suivante: le titre du document a été corrigé en remplaçant «code-bare» par «codes-barres».

Introduction

Actuellement, l'identification des espèces utilisées pour des essais standardisés repose généralement sur des caractéristiques morphologiques. Toutefois, ceci ne permet pas toujours d'obtenir des résultats clairs car:

- a) peu de taxonomistes sont disponibles,
- b) des espèces très ressemblantes peuvent différer au niveau de quelques caractéristiques facilement ignorées, et
- c) surtout, plusieurs espèces d'essai sont en réalité des complexes d'espèces cryptiques.

Un bon exemple est le ver de compost *Eisenia fetida/andrei* (utilisé dans l'ISO 11268-1, l'ISO 11268-2 et l'ISO 17512-1), pour lequel les caractéristiques morphologiques seules peuvent ne pas être suffisantes pour distinguer les deux espèces^[5]^[36]. Un autre cas connu est l'acarien prédateur, *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*^[50], qu'il est possible de confondre avec *H. miles*, couramment utilisé dans la lutte biologique contre les parasites^[31].

Les erreurs d'identification des espèces, l'utilisation d'une morpho-espèce qui est en réalité un complexe d'espèces cryptiques, ou encore le mélange d'espèces dans des cultures de laboratoire, peuvent être très problématiques pour la fiabilité des essais écotoxicologiques. Dans un complexe de morpho-espèces, les espèces jumelles peuvent présenter des différences écologiques, comportementales et physiologiques et peuvent également réagir différemment aux substances toxiques (par exemple, Références [2], [17], [35], [40]). Il semblerait que cela soit également le cas du collembole *Folsomia candida* (utilisé dans l'ISO 11267 et l'ISO 17512-2), dans lequel des niveaux de différenciation génétique ont été observés parmi les populations naturelles de *F. candida* et parmi les souches de laboratoire^[9]^[19]^[41]. Même si différentes souches de laboratoire se sont avérées présenter uniquement des différences mineures en termes de sensibilité à certains produits chimiques^[12]^[9], d'autres études ont détecté une variation importante du comportement d'évitement du phenmedipham et des réactions d'adaptation divergentes à l'exposition au cadmium parmi les souches génétiquement différenciées^[14]^[30]. De plus, même si deux espèces présentent des réponses similaires aux substances toxiques, la présence de deux espèces dans la même culture de laboratoire peut entraîner la production d'hybrides stériles, ce qui faussera le résultat des essais de reproduction^[36].

L'identification des espèces par code-barres ADN peut contribuer à pallier ces problèmes, en assurant que l'espèce ou la souche utilisée pour l'essai est correctement caractérisée. Par conséquent, l'assurance de la qualité des essais peut être améliorée, et ce faisant, les résultats obtenus par différents laboratoires d'écotoxicologie sont donc nettement plus fiables et comparables. Pour *Eisenia fetida/E. andrei*, ce travail, y compris un essai interlaboratoires international, a déjà été effectué^[36], voir [Annexe A](#). Les conclusions de cet essai interlaboratoires peuvent être résumées de la manière suivante:

- Le code-barres ADN est une méthode fiable et pratique pour identifier l'espèce *Eisenia*.
- Seuls 17 des 28 laboratoires d'écotoxicologie ont réalisé une assignation taxonomique correcte. La majorité des laboratoires ayant effectué une assignation erronée ou inconnue avaient *E. andrei* en stock.
- L'existence d'une paire d'espèces cryptiques au sein d'*E. fetida* est une hypothèse plausible.
- Il est important que les vers de terre utilisés pour les essais écotoxicologiques soient régulièrement (ré-)identifiés par code-barres ADN.

Très probablement, des expériences et recommandations similaires peuvent être tirées pour d'autres espèces d'invertébrés utilisées dans l'écotoxicologie terrestre, ainsi que pour des végétaux. En effet, le code-barres ADN s'est révélé utile pour l'identification de spécimens et la délimitation d'espèces dans de nombreux groupes d'organismes, y compris les vers de terre^[13]^[37], les enchytréides^[16], les acariens^[15], les collemboles^[32], les mollusques^[42], les nématodes^[28] et les plantes terrestres^[8].

Qualité du sol — Identification des espèces par codes-barres ADN dans les essais d'écotoxicologie

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie un protocole d'identification de spécimens d'essais écotoxicologiques (principalement des invertébrés et des végétaux) au niveau de l'espèce, reposant sur la technique du code-barres ADN. Ce protocole peut être utilisé par les laboratoires effectuant le code-barres ADN afin de normaliser le plus possible les travaux de laboratoire et les flux d'analyse de données, et de les mettre en conformité avec les normes et les lignes directrices communautaires.

Le présent document ne prévoit pas de spécifier une souche particulière pour chaque méthode d'essai, mais de documenter avec exactitude l'espèce/la souche qui a été utilisée.

NOTE 1 Cela ne veut pas dire que le code-barres ADN est effectué parallèlement à chaque cycle d'essai, mais qu'il est effectué régulièrement (par exemple, une fois par an, notamment pour l'essai mené avec la substance de référence) et à chaque fois qu'une nouvelle culture est démarrée ou que de nouveaux individus sont ajoutés à une culture existante.

Le présent document ne vise pas à reproduire ou remplacer les identifications d'espèces reposant sur des caractéristiques morphologiques. En revanche, le code-barres ADN est proposé comme outil d'identification complémentaire lorsque l'identification morphologique est incertaine, ou pour diagnostiquer les espèces cryptiques, afin d'assurer que les résultats obtenus auprès de différents laboratoires d'écotoxicologie font référence à la même espèce ou souche.

Le présent document est applicable à l'identification de formes immatures n'ayant pas de caractéristiques morphologiques de diagnostic (œufs, larves, juvéniles) ainsi qu'à l'identification rationalisée des spécimens prélevés lors d'études de surveillance sur le terrain, où un grand nombre d'organismes de taxons divers sont classés.

NOTE 2 En principe, toutes les espèces régulièrement utilisées lors des essais écotoxicologiques peuvent être analysées par code-barres ADN. Outre les vers de terre *Eisenia fetida* et *E. andrei*, d'autres exemples d'espèces terrestres sont *Lumbricus terrestris*, *L. rubellus*, *Allolobophora chlorotica*, *Aporrectodea rosea*, *A. caliginosa*, *Dendrodrilus rubidus*, *Enchytraeus albidus* et *E. crypticus* (Haplotaxida); *Folsomia candida*, *F. fimetaria*, *Proisotoma minuta* et *Sinella curviseta* (Collembola); *Hypoaspis aculeifer* et *Oppia nitens* (Acari); *Aleochara bilineata* et *Poecilus cupreus* (Coleoptera); *Scathophaga stercoraria*, *Musca autumnalis* (Diptera) ou *Pardosa* sp. (Arachnida). De plus, les nématodes ou les escargots et même les plantes peuvent être ajoutés à cette liste non exhaustive.

2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online Browsing Platform (OBP): disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

**3.1
amplicon**

fragment d'ADN spécifique généré par PCR (3.5) à l'aide d'une *paire d'amorces PCR* (3.6)

**3.2
code-barres ADN**

motif unique de séquence ADN qui identifie chaque espèce

**3.3
électrophérogramme
électrophoregramme d'ADN**

ensemble constitué d'une représentation graphique de la séquence ADN composée de pics de couleur, chaque couleur correspondant à un nucléotide

Note 1 à l'article: Il est automatiquement fourni par les programmes de séquençage d'ADN.

**3.4
score de qualité Phred
score Q**

mesure de qualité utilisée pour évaluer l'exactitude d'une réaction de séquençage

Note 1 à l'article: Cette mesure de qualité indique la probabilité pour qu'une base donnée soit dénommée à tort par le séquenceur. Les scores Phred utilisent une échelle logarithmique. Par conséquent, si le programme Phred assigne un score Q de 30 (Q30) à une base, cela correspond à une probabilité de dénomination de base incorrecte de 1 sur 1 000. Une exactitude de dénomination de base moins élevée de 99 % (Q20) donnera une probabilité de dénomination de base incorrecte de 1 sur 100, soit un risque d'erreur de séquençage toutes les 100 paires de base.

**3.5
réaction de polymérisation en chaînes
PCR**

technique de biologie moléculaire permettant de synthétiser rapidement plusieurs copies d'un segment d'ADN donné en utilisant l'enzyme ADN polymérase et une paire d'amorces oligonucléotidiques

**3.6
amorces PCR**

oligonucléotides courts (généralement d'une longueur de 15 à 30 nucléotides) permettant l'amplification PCR de l'ADN entre des sites spécifiques

Note 1 à l'article: Les deux amorces (une amorce sens et une amorce antisens) sont appariées au brin supérieur et au brin inférieur de la matrice d'ADN, et leurs extrémités 3'-OH sont dans une direction convergente.

4 Principe

Le code-barres ADN est une méthode moléculaire qui utilise une région d'ADN courte et normalisée (le code-barres ADN) comme marqueur génétique pour l'identification au niveau de l'espèce^[22].

Depuis sa création en 2003 et le lancement du projet Barcode of Life, le code-barres ADN a été systématiquement appliqué non seulement à la recherche biologique, mais également dans plusieurs domaines industriels dans lesquels il est essentiel d'identifier correctement le matériel biologique, notamment dans l'industrie agroalimentaire. Par exemple, il est utile pour détecter les fraudes dans les médicaments à base de plantes^[29], et il a été adopté par la Food and Drug Administration (FDA) pour l'identification des poissons et produits de la mer^{[21][44]}. En fait, le code-barres ADN devrait devenir un essai de routine dans de nombreux domaines, en particulier dans le contrôle de la qualité et la traçabilité des aliments^[20].

Pour résumer, les objectifs du code-barres ADN sont:

- a) d'obtenir la séquence nucléotidique de la région d'ADN ciblée à partir d'un échantillon non identifié (un spécimen d'essai);

- b) de comparer cette séquence avec les séquences connues dans une base de données de référence en utilisant des méthodes bioinformatiques, et
- c) d'identifier, d'après cette comparaison, l'échantillon au niveau de l'espèce.

Par conséquent, le code-barres ADN ne peut pas être un outil d'identification utile si l'on ne dispose pas d'une base de données de référence fiable et exhaustive. Il faut donc avoir suffisamment d'échantillons de chaque espèce de toute sa zone géographique pour tenir compte de la variabilité intraspécifique. De plus, le code-barres ADN repose sur l'hypothèse selon laquelle que les séquences du code-barres sont davantage similaires entre les membres d'une espèce qu'à celles d'autres espèces (appelé barcode gap). Ainsi, avant d'appliquer le code-barres ADN, il convient d'effectuer une étude de délimitation des espèces du groupe d'organismes cible pour évaluer son efficacité de différenciation des espèces.

Il est essentiel que la méthode de code-barres ADN soit effectuée par un personnel qualifié. De plus, il est nécessaire que les techniciens de laboratoire soient formés pour appliquer de manière optimale les protocoles de travaux de laboratoire pour chaque groupe d'organismes. Par ailleurs, le déroulement des travaux de laboratoire doit être supervisé par des scientifiques ayant une formation en génomique et en systématique. Il convient également que ces scientifiques effectuent l'analyse des électrophorégrammes et/ou du fichier de séquences ADN brutes ainsi que l'assignation des espèces.

5 Réactifs et matériel

5.1 Matériel biologique

Il est essentiel de conserver correctement les spécimens pour obtenir des échantillons d'ADN de bonne qualité. Si cela est possible, il convient de prélever des échantillons de spécimens pour le code-barres ADN sur un tissu fraîchement recueilli ou un tissu frais congelé. Il convient d'éviter toute exposition à des agents conservateurs tels que l'acétate d'éthyle ou le formaldéhyde, car ils détruisent l'ADN.

Privilégier la congélation à -80 °C ou dans l'azote liquide (-196 °C) pour le stockage à long terme des échantillons de tissu. L'ADN des spécimens séchés reste généralement stable pendant au moins un an, mais la dégradation devient de plus en plus problématique au fil du temps^[23].

Le matériel conservé dans l'éthanol est facilement analysé quand il est frais, mais l'ADN va lentement s'acidifier et se dégrader, sauf si l'éthanol est régulièrement changé ou tamponné. Pour conserver correctement le tissu, utiliser une concentration en éthanol de 95 % à 99 % et vérifier que le volume d'éthanol est au moins trois fois plus élevé que le volume de tissu. Pour maintenir la concentration en éthanol à 95 % minimum, il est nécessaire de remplacer la solution d'éthanol pendant les premiers jours (au moins trois jours) suivant l'échantillonnage, et de fermer hermétiquement le flacon pour éviter toute évaporation^[23]. La combinaison de faibles températures (-20 °C) et d'éthanol permettra de conserver les échantillons pendant longtemps et d'éviter toute dégradation pendant les cycles de décongélation et recongélation.

En règle générale, il convient d'effectuer l'analyse par code-barres ADN dès que possible après le prélèvement du tissu. Toutefois, des spécimens correctement conservés et stockés pendant plusieurs mois seront parfaitement exploitables pour l'extraction d'ADN^{[21][23]}.

5.2 Enzyme

La Taq Polymérase de *Thermus aquaticus* est l'enzyme de référence pour la PCR. Les Taq Polymérases « hot start » et/ou les ADN polymérases haute-fidélité offrent une haute performance pour le code-barres ADN, permettant d'obtenir une meilleure sensibilité d'amplification et une plus grande facilité de préparation de la réaction PCR que les polymérases classiques (<http://ccdb.ca/resources/>).

Les mélanges prêts à l'emploi disponibles dans le commerce peuvent également être utilisés. Ils comprennent une solution pré-mélangée contenant de la Taq ADN polymérase, des dNTP, du MgCl_2 et des tampons de réaction à des concentrations optimales pour amplifier efficacement les matrices d'ADN lors de la PCR de routine.

5.3 Amorces oligonucléotidiques de PCR

Pour les amorces oligonucléotidiques de PCR, voir [8.3.2](#) et [8.3.3](#).

5.4 Réactifs

5.4.1 Eau de qualité biologie moléculaire exempte de nucléase (dd H₂O).

5.4.2 Tampon TE (tampon Tris-EDTA), 1x, pH 8,0.

Dissoudre 1 ml de base Tris 1 mol/l (pH 8,0) et 0,2 ml d'EDTA (0,5 mol/l) dans 98,8 ml d'eau de qualité biologie moléculaire. Ajuster le pH à 8,0 avec du HCl concentré.

5.4.3 Désoxynucléoside triphosphates (dNTP).

5.4.4 Tampon de PCR, sans Mg (KCl 500 mmol/l, Tris-HCl 100 mmol/l, pH 8,3 à 25 °C).

Le tampon est généralement fourni avec chaque enzyme sous la forme d'un concentré 10x ou 5x. Utiliser uniquement le tampon fourni avec chaque enzyme spécifique.

5.4.5 Chlorure de magnésium, MgCl₂.

5.4.6 Additifs de PCR (en option): tréhalose dihydraté, sérumalbumine bovine (BSA), formamide, diméthylsulfoxyde (DMSO).

5.4.7 Agarose (de qualité analytique, température de fusion standard).

5.4.8 TAE (tampon d'électrophorèse), solution mère concentrée 50x, pH 8,3.

Dissoudre 242 g de base Tris [tris(hydroxyméthyl)aminométhane], 57,1 ml d'acide acétique glacial (17,4 mol/l), 100 ml de solution d'EDTA 500 mmol/l (pH 8,0) dans 842,9 ml d'eau de qualité biologie moléculaire.

5.4.9 Échelle d'ADN de 100 paires de base (pb) de taille standard, un marqueur de poids moléculaire disponible dans le commerce pour déterminer la taille des fragments d'ADN double brin de 100 à 1 000 paires de base pendant l'électrophorèse sur gel.

5.4.10 Tampon de charge 6x, 3 ml de glycérol 100 %, 0,025 g de base bromophénol, 0,025 g de xylène cyanol FF dans 7 ml d'eau de qualité biologie moléculaire.

5.4.11 Solution de bromure d'éthidium (0,5 µg/ml) ou tout autre colorant d'acide nucléique plus sûr.

5.4.12 Kit de purification pour PCR, en utilisant des réactions enzymatiques et des billes magnétiques ou la purification sur membrane de silice.

5.4.13 Tampon de séquençage 5x (400 nm de Tris-HCl, pH 9,0, MgCl₂ 10 mmol/l).

5.4.14 Kit de séquençage de cycle BigDye® Terminator v3.1¹⁾.

1) Ce protocole a été validé en utilisant le système d'électrophorèse capillaire de l'analyseur d'ADN 3730 et la chimie du BigDye Terminator. Ils sont des marques déposées d'Applied Biosystems. 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 est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.