

---

---

**Analyse moléculaire des  
biomarqueurs — Exigences relatives  
à la détection sur microréseaux  
de séquences d'acides nucléiques  
spécifiques**

*Molecular biomarker analysis — Requirements for microarray  
detection of specific nucleic acid sequences*

**(standards.iteh.ai)**

ISO 16578:2022

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/27b25873-a41c-4e2e-b5d1-7ca8fd34c506/iso-16578-2022>



iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 16578:2022

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/27b25873-a41c-4e2e-b5d1-7ca8fd34c506/iso-16578-2022>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2022

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  
E-mail: [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

# Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>v</b>
<b>1 Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3 Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4 Principe</b> .....	<b>3</b>
4.1 Essai sur support de microréseau d'ADN .....	3
4.2 Conception et fabrication d'un microréseau .....	3
4.2.1 Généralités .....	3
4.2.2 Séquences de sondes témoins et sondes ciblées .....	3
4.2.3 Puissance analytique de l'essai sur microréseau .....	4
4.3 Validation de la spécificité d'hybridation .....	4
4.3.1 Évaluation théorique de la spécificité .....	4
4.3.2 Évaluation expérimentale de la spécificité .....	4
4.3.3 Évaluation expérimentale de l'hybridation croisée .....	5
4.4 Validation interlaboratoires des méthodes qualitatives .....	5
4.4.1 Généralités .....	5
4.4.2 Limite de détection .....	5
4.4.3 Probabilité de détection .....	6
4.4.4 Limite de détection pour le support de microréseau .....	6
4.4.5 Plage de signaux fiables .....	6
4.4.6 Échantillon pour essai .....	7
4.4.7 Système de mesure .....	7
4.4.8 Estimation de l'incertitude de mesure .....	7
4.4.9 Réactifs pour microréseaux .....	7
<b>5 Expression des résultats</b> .....	<b>7</b>
5.1 Généralités .....	7
5.2 Expression d'un résultat négatif .....	7
5.3 Expression d'un résultat positif .....	8
5.4 Expression de résultats non concluants ou ambigus .....	8
<b>6 Rapport d'essai</b> .....	<b>8</b>
<b>Annexe A (informative) Détermination pratique de la limite de détection pour le support de microréseau (LODP)</b> .....	<b>10</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>14</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 attirée 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 nature volontaire des normes, 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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir [www.iso.org/avant-propos](http://www.iso.org/avant-propos).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34 *Produits alimentaires*, sous-comité SC 16, *Méthodes horizontales pour l'analyse moléculaire de biomarqueurs*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 16578:2013), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications sont les suivantes:

- ajout de l'[Annexe A](#) relative à la détermination pratique de la limite de détection pour le support de microréseau (LODP).

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](http://www.iso.org/fr/members.html).

## Introduction

Les méthodes disponibles pour la détection des séquences d'acides nucléiques à l'aide d'échantillons contenant des acides nucléiques reposent sur trois technologies: la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), le séquençage de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et les microréseaux d'oligonucléotides<sup>[1]</sup>.

Les microréseaux d'ADN sont utilisés dans le cadre de l'identification des biomarqueurs et du mesurage de l'expression des gènes. Les travaux d'harmonisation sur le plan international des méthodes expérimentales pour les expériences sur microréseaux ont débuté avec la norme MIAME «Minimum Information about a Microarray Experiment (Informations minimales concernant les expériences sur microréseaux) — vers des normes pour les données obtenues sur microréseaux»<sup>[2]</sup> et le projet décisif MAQC «Microarray Quality Control (Contrôle qualité des microréseaux)»<sup>[3],[4]</sup> de l'US Food and Drug Administration, qui a commencé en 2005 et abordait les aspects techniques des mesurages de l'expression des gènes et des supports technologiques solides, ainsi que le développement de modèles de prédiction multivariés basés sur l'expression précise et reproductible des gènes.

Les microréseaux d'ADN sont fabriqués soit par synthèse chimique de sondes ADN sur une surface solide, soit en fixant des sondes ADN préfabriquées sur une surface solide, par exemple une microplaque ou une bille enrobée. Les essais sur microréseaux peuvent être conçus pour détecter simultanément de multiples polymorphismes mononucléotidiques (SNP). Les microréseaux oligonucléotidiques haute densité, synthétisés *in situ* à l'aide de techniques telles que photolithographie, jet d'encre et robot de dépôt de produits de PCR et d'oligonucléotides présynthétisés, sont fabriqués pour détecter des séquences spécifiques sur une vaste plage de variabilité.<sup>[5]</sup> Cette technologie continue de se développer avec la PCR et le séquençage de nouvelle génération (NGS).

Les microréseaux d'ADN sont généralement utilisés pour étudier une solution d'acides nucléiques mixtes marqués: l'hybridation des cibles marquées aux sondes fixées sur le réseau est détectée, et leur concentration relative par rapport aux espèces d'acides nucléiques résiduelles dans la solution est mesurée. En généralisant vers un très grand nombre de points d'ADN, un réseau peut être utilisé pour quantifier un nombre arbitrairement élevé de séquences différentes d'acides nucléiques dans la solution<sup>[6]</sup>.

Les technologies des microréseaux sont utilisées dans le domaine de l'analyse des aliments, pour détecter et identifier les organismes génétiquement modifiés (OGM) et d'autres biomarqueurs.<sup>[7][8][9][10][11][12]</sup> Le présent document porte sur les méthodologies basées sur les microréseaux d'ADN pour les produits alimentaires et agricoles.



# Analyse moléculaire des biomarqueurs — Exigences relatives à la détection sur microréseaux de séquences d'acides nucléiques spécifiques

## 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie les paramètres et procédés de vérification et de validation pour la détection et l'identification de séquences d'acides nucléiques spécifiques à l'aide de microréseaux.

Il fournit des recommandations et des protocoles pour:

- la conception et la fabrication d'un microréseau;
- la validation de la spécificité d'hybridation;
- la validation interlaboratoires des méthodes qualitatives;
- la détermination des limites de détection pour un microréseau;
- la détermination d'une plage de signaux fiables;
- les critères d'évaluation des performances techniques du support de microréseau.

Il est applicable à toutes les méthodes qui utilisent des microréseaux pour la détection d'acides nucléiques.

Il ne s'applique pas aux protocoles suivants: [16578:2022](https://standards.iso.org/standards/catalog/standards/sist/27b25873-a41c-4e2e-b5d1-7ca8fd34c506/iso-16578-2022)

- le mesurage quantitatif;
- les exigences relatives à la préparation de l'échantillon avant les expériences sur microréseaux d'ADN.

## 2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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/TS 16393, *Analyse de biomarqueurs moléculaires — Détermination des caractéristiques de performance des méthodes de mesure qualitatives et validation des méthodes*

ISO 16577, *Analyse de biomarqueurs moléculaires — Vocabulaire pour les méthodes d'analyse de biomarqueurs moléculaires dans l'agriculture et la production agroalimentaire*

## 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et les définitions de l'ISO 16577 ainsi que les 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: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>

### 3.1

#### **limite de détection pour le support de microréseau**

##### **LODP**

plus petite quantité relative d'*étalon externe* (3.11) (ou de matériau de référence) susceptible d'être identifiée positivement avec un niveau de confiance raisonnable et/ou préalablement déterminé, dans une matrice définie à l'aide d'une méthode analytique spécifique

Note 1 à l'article: Lors des essais qualitatifs, une estimation de la LOD est effectuée à la probabilité de détection (POD) choisie.

### 3.2

#### **plage de signaux fiables**

concentrations de la séquence cible pour lesquelles une méthode peut fournir des résultats lorsque le signal de sortie est proportionnel à la concentration et/ou au nombre de copies de l'*étalon externe* (3.11) (ou du matériau de référence)

Note 1 à l'article: La proportionnalité directe dérivée est acceptable dans cette plage.

### 3.3

#### **microréseau d'ADN**

puce à ADN

support solide sur lequel une collection de *sondes ADN* (3.6) disposée selon un motif particulier est fixée en haute densité, directement ou indirectement, pour analyser de grandes quantités de matériau biologique par des méthodes de criblage à haut débit

### 3.4

#### **puissance analytique**

##### **puissance**

probabilité pour qu'un analyte ne soit pas non détecté s'il est présent

### 3.5

#### **sensibilité**

plus petite réponse de traitement qui sera détectable

### 3.6

#### **sonde ADN**

acide nucléique simple brin défini par son aptitude à cibler une séquence d'acide nucléique spécifique par complémentarité des bases, pour lequel la solidité de la liaison est liée à la longueur des sondes et à la composition de leur acide nucléique, ainsi qu'aux paramètres réactionnels

### 3.7

#### **support**

dispositif sur lequel reposent les éléments nécessaires à la technologie des *microréseaux d'ADN* (3.3)

### 3.8

#### **détection de fluorescence**

méthode de détection de l'hybridation au moyen d'une *sonde ADN* (3.6) immobilisée, par mesurage d'un signal de fluorescence

### 3.9

#### **détection colorimétrique**

méthode de détection de l'hybridation au moyen d'une *sonde ADN* (3.6) immobilisée, par mesurage d'un signal colorimétrique

### 3.10

#### **détection électrochimique**

méthode de détection de l'hybridation par mesurage des courants électriques sortant d'une électrode sur laquelle sont immobilisées des *sondes ADN* (3.6)



**3.11****étalon externe**

matériau ou substrat préparé pour tester la compatibilité de méthodes d'analyse basées sur des microréseaux, dont la valeur caractéristique reconnue a été obtenue à partir d'essais interlaboratoires menés sous l'égide d'un groupe scientifique ou d'ingénierie

**3.12****hybridation croisée**

liaison non spécifique d'une *sonde ADN* (3.6) à un acide nucléique non-cible

**4 Principe****4.1 Essai sur support de microréseau d'ADN**

Un essai sur support de microréseau comprend au moins les étapes suivantes:

- la dénaturation d'un analyte d'ADN ou d'acide ribonucléique (ARN) simple ou double brin (échantillon d'ADN);
- l'hybridation de la ou des cibles aux sondes ADN liées à un support solide;
- la détection de chaque cible hybridée par un signal électrochimique, colorimétrique ou de fluorescence;
- l'analyse des données.

Le laboratoire doit vérifier le mode opératoire utilisé pour chaque étape de mesurage sur microréseau, à l'aide d'étalons connus (ou d'un matériau de référence) et de témoins appropriés. Les exigences qui régissent la vérification des méthodes basées sur des microréseaux d'ADN doivent être notées.

**4.2 Conception et fabrication d'un microréseau****4.2.1 Généralités**

Le microréseau d'ADN et le dispositif d'analyse doivent être validés comme système de mesure intégré pour l'analyse des acides nucléiques spécifiques. La performance d'un microréseau d'ADN doit être spécifiée, en association avec son dispositif analytique. Il convient que le microréseau d'ADN et le dispositif qui permet de l'analyser spécifient la performance dans un état intégré et évaluent sa fiabilité<sup>[13]</sup>.

**4.2.2 Séquences de sondes témoins et sondes ciblées**

Une analyse sur microréseau d'ADN doit utiliser les types suivants de sondes ADN:

- les étalons externes (ou le matériau de référence);
- un témoin positif;
- un témoin négatif;
- la séquence d'acide nucléique étudiée.

Elle doit être conçue pour être vérifiable.

Les sondes ADN immobilisées pour le contrôle qualité du signal, y compris les témoins positifs et négatifs, doivent être incluses dans la conception du microréseau sous forme de réplicats situés en différentes positions sur le microréseau.<sup>[14]</sup> La conception des sondes ADN doit tenir compte de la valeur  $T_m$ , du ratio G/C et de la spécificité des séquences oligonucléotidiques de l'acide nucléique. Des informations sur la séquence de la sonde oligonucléotidique doivent être fournies conformément à la

nomenclature de l'Union internationale de chimie pure et appliquée (UICPA) pour les acides nucléiques. [15] Pour différencier «G» et «C», il convient d'utiliser un «g» minuscule dans la description (c'est-à-dire que C, g, A et T doivent être utilisés pour indiquer les bases). La qualité de la sonde ADN doit être garantie par une méthode appropriée, comme l'analyse spectroscopique ou l'analyse par spectrométrie de masse.

#### 4.2.3 Puissance analytique de l'essai sur microréseau

La puissance détermine le nombre de réplicats nécessaires pour valider l'exigence de performance. [16] Une estimation de la variance prévue (incertitude) des réplicats est requise (voir ISO/IEC Guide 98-3 [17]). Il convient d'utiliser la probabilité de détection (POD), qui est une mesure de la variance de la limite de détection (LOD) pour une analyse qualitative (binaire), pour s'assurer que la performance de la méthode se situe dans l'intervalle de confiance choisie. L'ISO/TS 16393 fournit des recommandations pour déterminer le nombre de réplicats nécessaires pour valider une méthode qualitative.

Il convient de faire la distinction entre la réplication et la répétition lors d'un essai, c'est-à-dire la répétition d'une hybridation sur la même position d'échantillon d'ADN immobilisé. La puissance et la limite de détection d'une méthode ne sont pas nécessairement améliorées en multipliant par deux le nombre d'hybridations pour chaque échantillon d'ADN et en réduisant de moitié le nombre d'échantillons.

NOTE En pratique, des méthodes ayant une puissance et/ou une limite de détection moins élevée peuvent être utilisées pour détecter la présence présumée d'une cible. Des méthodes secondaires ayant une puissance et/ou une limite de détection plus élevée peuvent être utilisées pour confirmer la présence de la cible ou pour corriger les résultats présumés du premier criblage. C'est souvent le cas lorsqu'une méthode de criblage est utilisée avant une méthode de description d'un produit de synthèse spécifique.

### 4.3 Validation de la spécificité d'hybridation

#### 4.3.1 Évaluation théorique de la spécificité

Une évaluation théorique de la spécificité de la sonde ADN doit être effectuée. Elle consiste à réaliser un criblage *in silico* de la sonde en fonction d'une base de données de séquences d'acides nucléiques adaptée à l'analyse à effectuer. Exemples de base de données ADN:

- DNA Data Bank of Japan (National Institute of Genetics) [18];
- EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) [19];
- GenBank (National Center for Biotechnology Information) [20].

Exemples d'applications de recherche des similarités de séquences:

- BLAST [21];
- FASTA [22].

Il convient de choisir des séquences spécifiques qui ne sont pas susceptibles de générer une hybridation croisée et de les soumettre à essai expérimentalement.

#### 4.3.2 Évaluation expérimentale de la spécificité

Il convient de valider expérimentalement la spécificité des séquences des sondes ADN d'après l'exclusivité et l'inclusivité, c'est-à-dire sur des échantillons ayant des séquences d'acides nucléiques similaires mais pas identiques à la séquence cible, ainsi que sur des biomarqueurs dont l'évaluation *in silico* (voir 4.3.1) a permis d'identifier qu'ils présentent des homologies de séquences susceptibles d'engendrer des hybridations croisées: exclusivité et inclusivité. [23] Il convient que les conditions expérimentales soient les mêmes que celles mises en œuvre en routine.

### 4.3.3 Évaluation expérimentale de l'hybridation croisée

Le processus de validation doit démontrer qu'il ne peut se produire d'hybridations croisées sur une sonde ADN permettant de détecter un étalon externe (ou un matériau de référence) dans la matrice. Un résultat expérimental est accepté uniquement si les sondes ADN permettant de détecter les étalons externes (ou un matériau de référence) sont toutes positives et si les sondes ADN permettant de détecter des témoins négatifs sont négatives.

## 4.4 Validation interlaboratoires des méthodes qualitatives

### 4.4.1 Généralités

Les résultats d'essais qualitatifs (binaires) fournissent uniquement des données sur la détection ou non-détection dans une plage de performance prédéterminée. La sensibilité est un indicateur de la puissance du signal, mais ne peut servir directement à mesurer la performance du système. Les limites de détection sont des indicateurs directs de la performance du système. Il convient de déterminer la plage de performance de la méthode lors de l'étude de validation. Il convient de commencer l'étude de validation dès que la méthode est établie ou modifiée.

### 4.4.2 Limite de détection

La limite de détection est la concentration nette vraie de l'ADN cible dans l'échantillon. Elle permet d'aboutir à la conclusion, avec une probabilité  $(1-\beta)$ , que la quantité de cible dans l'échantillon est supérieure à celle dans le témoin négatif. Elle est définie comme indiqué dans la [Formule \(1\)](#):

$$P_r(\hat{L} \leq L_c | L = L_D) = \beta \quad (1)$$

où

$\hat{L}$  est la valeur estimée;

$L_c$  est la valeur critique;

$L$  est la prévision ou valeur vraie;

$L_D$  est la LOD.

NOTE 1 La limite de détection est estimée par:

$$L_D \approx 2t_{1-\alpha\nu}\sigma_o$$

où

$L_D$  est la LOD;

$\alpha = \beta$ ;

$t_{1-\alpha\nu}$  est la valeur de distribution t de Student, d'après  $\nu$  degrés de liberté pour un intervalle de confiance unilatéral de  $1-\alpha$ ;

$\sigma_o$  est l'écart-type de la valeur vraie (prévision).

$L_D = 3,29 \sigma_o$ , lorsque l'incertitude de la valeur moyenne (prévue) du blanc est négligeable,  $\alpha = \beta = 0,05$  et  $L$  est normalement distribuée avec une variance constante connue. Toutefois,  $L_D$  n'est pas simplement définie comme un coefficient fixe (par exemple 3 ou 6) multipliant l'écart-type d'un bruit de fond d'une solution pure. Cela peut être extrêmement trompeur. L'estimation correcte de  $L_D$  peut tenir compte des degrés de liberté,  $\alpha$  et  $\beta$ , et de la distribution de  $L$  influencée par des facteurs tels que la concentration en analytes, les effets de matrice et les interférences.

Cette description de la LOD est appropriée pour les analyses nucléotidiques telles que celles utilisées pour la PCR en temps réel qui présentent des distributions non normales avec une hétéroscédasticité