



**Norme
internationale**

ISO 17174

**Analyse de biomarqueurs
moléculaires — Codes-barres
d'ADN de poissons et de produits
à base de poisson à l'aide de
segments de gènes mitochondriaux
de cytochrome b et cytochrome c
oxydase I**

**Première édition
2024-09**

*Molecular biomarker analysis — DNA barcoding of fish and
fish products using defined mitochondrial cytochrome b and
cytochrome c oxidase I gene segments*

<https://standards.iso.org/standards/iso/58839c7b-403d-49f4-ad18-a4ff3d04b117/iso-17174-2024>

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

[ISO 17174:2024](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/58839c7b-403d-49f4-ad18-a4ff3d04b117/iso-17174-2024)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/58839c7b-403d-49f4-ad18-a4ff3d04b117/iso-17174-2024>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2024

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
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 Symboles et termes abrégés	3
5 Principe	3
6 Réactifs et matériels	4
7 Appareillage	5
8 Mode opératoire	5
8.1 Préparation de l'échantillon	5
8.2 Extraction d'ADN	5
8.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	5
8.3.1 Généralités	5
8.3.2 Déroulement de la PCR	6
8.3.3 Témoins de PCR	7
8.3.4 Cycle thermique	7
8.4 Évaluation des ADN amplifiés	7
8.5 Évaluation des résultats de la PCR	8
9 Séquençage	8
9.1 Séquençage des ADN amplifiés	8
9.2 Évaluation des données de séquençage	9
9.3 Comparaison de la séquence avec les bases de données publiques	9
9.3.1 Généralités	9
9.3.2 Comparaison de séquences d'ADN de <i>cytb</i> et/ou <i>cox1</i> avec GenBank®	10
9.3.3 Comparaison de séquences d'ADN de <i>cox1</i> avec BOLD	10
10 Interprétation des résultats de la requête de base de données	11
11 État de validation et critères de performance	12
11.1 Étude comparative interlaboratoires pour l'identification d'espèces de poisson à partir du séquençage du <i>cytb</i>	12
11.2 Étude comparative interlaboratoires pour l'identification d'espèces de poisson à partir du séquençage du <i>cox1</i>	13
12 Rapport d'essai	14
Annexe A (informative) Expériences pratiques de laboratoire sur l'amplifiabilité des segments de <i>cytb</i> et de <i>cox1</i> sur les espèces de poisson soumises à l'essai	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'ISO attire l'attention sur le fait que la mise en application du présent document peut entraîner l'utilisation d'un ou de plusieurs brevets. L'ISO ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à l'applicabilité de tout droit de propriété revendiqué à cet égard. À la date de publication du présent document, l'ISO n'avait pas reçu notification qu'un ou plusieurs brevets pouvaient être nécessaires à sa mise en application. Toutefois, il y a lieu d'avertir les responsables de la mise en application du présent document que des informations plus récentes sont susceptibles de figurer dans la base de données de brevets, disponible à l'adresse www.iso.org/brevets. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de brevet.

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.

Le présent document a été élaboré par le comité technique 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 16, *Méthodes horizontales pour l'analyse de biomarqueurs moléculaires*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 460, *Authenticité des aliments*, du Comité européen de normalisation (CEN), conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

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.

Introduction

La sécurité des denrées alimentaires est un aspect essentiel de la protection du consommateur. Au cours des trois dernières décennies, la mondialisation s'est imposée dans le commerce des produits alimentaires. Les circuits commerciaux du poisson deviennent de plus en plus longs et complexes, imposant donc l'emploi d'outils de traçabilité évolués pour garantir la sécurité des denrées alimentaires. L'étiquetage correct des produits alimentaires est un prérequis pour garantir la sécurité et le commerce équitable des produits à base de poisson ainsi que pour réduire le plus possible la pêche illicite, non déclarée et non réglementée (INN). En particulier, la transformation du poisson s'effectue de plus en plus dans les pays exportateurs, ce qui rend impossible l'identification des espèces par leurs caractéristiques morphologiques. L'élaboration de protocoles fiables, harmonisés et normalisés d'authentification des produits de la pêche est indispensable pour garantir la protection des consommateurs et la détection des fraudes alimentaires potentielles.

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

[ISO 17174:2024](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/58839c7b-403d-49f4-ad18-a4ff3d04b117/iso-17174-2024>

Analyse de biomarqueurs moléculaires — Codes-barres d'ADN de poissons et de produits à base de poisson à l'aide de segments de gènes mitochondriaux de cytochrome b et cytochrome c oxydase I

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode d'identification au niveau du genre ou de l'espèce des poissons individuels et des filets de poisson. Il permet l'identification d'un grand nombre d'espèces de poissons à forte importance commerciale au moyen de codes-barres d'ADN.

Cette méthode a été validée sur des poissons crus. L'expérience menée en laboratoire indique une applicabilité supplémentaire aux produits à base de poisson après transformation (fumage à froid ou à chaud, salage, congélation, cuisson, friture, etc.).

De manière générale, la méthode décrite est inadaptée à l'analyse d'aliments hautement transformés (comme les poissons en conserve dont l'ADN est fortement dégradé et dont les longueurs des fragments se révèlent insuffisantes pour l'amplification des cibles). En outre, la méthode présentée ici ne s'applique pas aux produits complexes à base de poisson qui mélangent deux espèces de poissons et plus.

L'identification des espèces de poisson s'effectue par amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR : Polymerase Chain Reaction) d'un segment du gène du cytochrome b mitochondrial (*cytb*), du gène du cytochrome c oxydase I (*cox1* ou *COI*) ou des deux, suivie d'un séquençage des produits de la PCR et d'une comparaison des séquences aux entrées de bases de données.

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

ISO 20813, *Analyse moléculaire de biomarqueurs — Méthodes d'analyse pour la détection et l'identification des espèces animales dans les aliments et les produits alimentaires (méthodes basées sur l'utilisation des acides nucléiques) — Exigences générales et définitions*

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

alignement

alignement de séquence

disposition des séquences d'acide nucléique ou de séquences protéiques en fonction des régions de similarité

Note 1 à l'article: L'alignement est un processus ou un résultat de mise en correspondance de résidus de nucléotides de deux séquences biologiques ou plus afin d'obtenir des niveaux maximaux d'*identité* (3.3).

[SOURCE: : ISO 16577:2022, 3.7.18, modifié — Le terme « alignement » a été ajouté comme terme recommandé ; la Note 1 à l'article a été ajoutée.]

3.2

format FASTA

format de texte permettant de représenter soit des séquences de nucléotides soit des séquences (protéiques) d'acides aminés à l'aide de codes à un seul caractère

Note 1 à l'article: Une séquence au format FASTA commence par une description d'une seule ligne, suivie des lignes de données de la séquence. La ligne de description (defline) se distingue des données de séquence par le symbole « supérieur » (>) à son début. Il est recommandé que toutes les lignes de texte contiennent moins de 80 caractères.

Note 2 à l'article: Voici un exemple de séquence au format FASTA :

```
>Sample_04_cytb
ATGGCCAGCCTCCGAAAACTCATCCCCTTCTAAAGATTGCTAATGATGCATTAGTAGACCTTCCTGCCCCCTCT
AACCTCTCAACATTATGAAACTTCGGGTCTCTCCTAGGCCCTCTGCTTAGCCGCCCAAATCTTAACAGGACTATTT
CTAGCGATACATTATACCGCAAACGTCGAGATAGCTTTCTCATCCGTCGTACACATCTGCCGCGACGTAAATTAC
GGATGACTAATCCGCAACATACACGCCAACGGCGCTTCTTTCTTCTTCATCTGCCTCTACCTACACATTGCACGA
GGCCTATATTACGGCTCCTACTTATTCATAGAGACCTGAAACATTGGAGTTGTACTATTCCCTTTTAGTAATAATG
ACCGCCTTCGTAGGCTACGTCCCTCCCT
```

Note 3 à l'article: Il n'est pas autorisé de laisser de lignes vides au milieu d'une séquence au format FASTA. Les séquences sont représentées selon les codes d'acides nucléiques et d'acides aminés normalisés de l'IUB/IUPAC, à l'exception de ce qui suit :

- les lettres minuscules sont acceptées, elles sont ensuite retranscrites en majuscules ;
- un seul tiret ou trait d'union peut être utilisé pour représenter un espace libre d'une longueur indéterminée.

Il est courant de terminer la séquence par un « * » (astérisque) et de laisser une ligne blanche entre la description et la séquence.

[SOURCE: : ISO 16577:2022, 3.1.2, modifié — L'exemple de la Note 2 à l'article a été remplacé ; le troisième élément de la liste de la Note 3 à l'article a été supprimé.]

3.3

identité

mesure dans laquelle deux séquences de nucléotides ou d'aminoacides présentent les mêmes résidus dans les mêmes positions d'un *alignement* (3.1)

Note 1 à l'article: L'identité est le plus souvent exprimée en pourcentage.

Note 2 à l'article: Dans la base de données des séquences de BOLD (Barcode of Life), le terme « similarité » est utilisé à la place d'identité.

3.4

ADN introgressé

allèle provenant d'une espèce et incorporé dans le patrimoine génétique d'une autre espèce différente de la première

Note 1 à l'article: L'introgression est généralement la conséquence de l'hybridation et du rétrocroisement d'individus appartenant à des espèces différentes.

3.5**requête**

séquence (ou tout autre type de terme de recherche) qui est comparée à toutes les entrées d'une base de données

3.6**couverture de requête**

pourcentage de la *requête* (3.5) couvert par l'*alignement* (3.1) avec la séquence de la base de données

4 Symboles et termes abrégés

pb	paires de bases
Glu	acide glutamique, glutamate
ARNt	ARN de transfert
<i>cox1</i> , <i>COI</i>	gène du cytochrome c oxydase I
<i>cytb</i>	gène du cytochrome b
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
A	adénine
C	cytosine
G	guanine
I	inosine
R	base purique (adénine ou guanine)
T	thymine
Y	base pyrimidique (cytosine ou thymine)
INN	illicite, non déclarée et non réglementée
PCR	réaction de polymérisation en chaîne

5 Principe

L'ADN est extrait des poissons et des produits à base de poisson à l'aide d'une méthode adaptée. Des segments d'environ 460 paires de bases de *cytb* et/ou d'environ 650 paires de bases de *cox1* sont amplifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Pour l'amplification du segment de *cytb*, un ensemble de deux amorces est utilisé. L'amplification de *cox1* utilise un ensemble de quatre amorces pour assurer l'amplification de l'ADN du plus grand nombre possible d'espèces de poissons. Certaines des amorces utilisées comprennent des bases ambiguës pour augmenter le nombre d'espèces détectées par les deux méthodes. Les séquences des nucléotides des produits de la PCR sont déterminées à l'aide d'une méthode adaptée de séquençage de l'ADN (comme la méthode de Sanger). Les deux amorces PCR utilisées pour générer l'amplicon *cytb* sont également utilisées pour le séquençage. Les amorces de *cox1* ont des terminaisons M13 qui permettent le séquençage des amplicons *cox1* à l'aide d'amorces de séquençage M13. La séquence déterminée est évaluée par comparaison avec les entrées des bases de données de séquence pour permettre son attribution à une espèce ou à un genre de poisson en fonction du degré d'identité avec les séquences disponibles.

Le choix de l'utilisation de segments de *cytb*, de *cox1* ou des deux pour l'identification du poisson dépend de l'espèce de poisson déclarée, en particulier de la facilité d'application de la méthode PCR à l'espèce de poisson considérée et de la disponibilité des séquences de comparaison dans les bases de données publiques.

6 Réactifs et matériels

Pendant l'analyse, sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité reconnue et appropriés à la biologie moléculaire et de l'eau déminéralisée, distillée ou de l'eau de pureté équivalente, conformément à l'ISO 20813. L'organisation du laboratoire doit suivre l'ISO 20813.

6.1 ADN polymérase thermostable¹⁾.

6.2 Tampon de réaction PCR (avec MgCl₂ ou avec solution MgCl₂ séparée)¹⁾.

6.3 Mélange dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP).

NOTE Les dNTP peuvent également faire partie d'un master mix commercial pour la PCR.

6.4 Oligonucléotides (voir les [Tableaux 1](#) et [2](#)).

NOTE 1 Les abréviations des bases d'ADN dans les [Tableaux 1](#) et [2](#) sont basées sur les recommandations pour une nomenclature univoque, uniforme et cohérente, publiées par l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)^[4].

Tableau 1 — Oligonucléotides pour l'amplification de la région du gène *cytb*^[1]

Nom	Séquence ADN de l'oligonucléotide
L14735	5'-AAA AAC CAC CGT TGT TAT TCA ACT A-3'
H15149ad	5'-GCI CCT CAR AAT GAY ATT TGT CCT CA-3'

NOTE 2 L'expérience menée en laboratoire a montré que les terminaisons M13 peuvent également être utilisées avec des amorces de *cytb*.

Tableau 2 — Oligonucléotides pour l'amplification de la région du gène *cox1*^{[2][3]}

Nom	Séquence ADN de l'oligonucléotide ^a
VF2_t1	5'- <i>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</i> CAA CCA ACC ACA AAG ACA TTG GCA C-3'
FishF2_t1	5'- <i>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</i> CGA CTA ATC ATA AAG ATA TCG GCA C-3'
FishR2_t1	5'- <i>CAG GAA ACA GCT ATG ACA</i> CTT CAG GGT GAC CGA AGA ATC AGA A-3'
FR1d_t1	5'- <i>CAG GAA ACA GCT ATG ACA</i> CCT CAG GGT GTC CGA ARA AYC ARA A-3'

^a Les terminaisons M13 des amorces sont en gras et italique.

6.5 Tréhalose

6.6 Agarose

1) Au cours des études comparatives interlaboratoires, la solution tampon pour PCR prête à l'emploi comprenant de l'ADN polymérase thermostable Maxima[®] Hot Start PCR Master Mix (2 ×) de Fermentas GmbH a été utilisée pour l'amplification de *cytb*. L'amplification de *cox1* a été réalisée avec de l'ADN polymérase BIOTAQ[™] de Bioline, un tampon de réaction 10 × et une solution MgCl₂ séparée. En plus des ADN polymérases BIOTAQ[™] recommandés, d'autres « mastermix » et polymérases ont été utilisés avec succès. La solution tampon pour PCR prête à l'emploi comprenant de l'ADN polymérase thermostable Maxima[®] Hot Start PCR Master Mix (2 ×) de Fermentas GmbH et l'ADN polymérase BIOTAQ[™] de Bioline sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve l'emploi des produits ainsi désignés.