



PROJET FINAL

Norme internationale

ISO/FDIS 17601

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

Soil quality — Estimation of abundance of selected microbial gene sequences by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) from DNA directly extracted from soil

[ISO/FDIS 17601](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/b998e112-bb9e-4238-949a-53cc791a89f7/iso-fdis-17601)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/b998e112-bb9e-4238-949a-53cc791a89f7/iso-fdis-17601>

ISO/TC 190/SC 4

Secrétariat: **AFNOR**

Début de vote:
2025-08-07

Vote clos le:
2025-10-02

TRAITEMENT PARALLÈLE ISO/CEN

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.

OUTRE LE FAIT D'ÊTRE EXAMINÉS POUR ÉTABLIR S'ILS SONT ACCEPTABLES À DES FINS INDUSTRIELLES, TECHNOLOGIQUES ET COM-MERCIALES, 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.

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

ISO/FDIS 17601

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/b998e112-bb9e-4238-949a-53cc791a89f7/iso-fdis-17601>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2025

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 Principe	2
5 Matériel d'essai	4
5.1 ADN	4
5.2 Bactéries	4
5.3 Plasmide	4
5.4 Enzymes	4
5.5 Produits chimiques	4
5.6 Produits pour le milieu de culture bactérienne	5
5.7 Tampons et réactifs	5
6 Appareillage	6
7 Mode opératoire	6
7.1 Préparation des étalons de qPCR et étalonnage de l'essai de qPCR (tâche 1)	6
7.1.1 Généralités	6
7.1.2 Création de l'amplicon (tâche 1, étape 1)	7
7.1.3 Préparation des étalons de qPCR (tâche 1, étape 2)	7
7.1.4 ADN d'isolat bactérien, ADN environnemental, ADN artificiel	7
7.1.5 Étalonage de la qPCR (tâche 1, étape 3)	9
7.2 Préparation d'une matrice d'ADN du sol et essai d'inhibition (tâche 2)	10
7.2.1 Généralités	10
7.2.2 Préparation de l'ADN du sol (tâche 2, étape 4)	10
7.2.3 Essai d'inhibition (tâche 2, étape 5)	11
7.3 Essai de qPCR (tâche 3)	13
7.3.1 Généralités	13
7.3.2 qPCR (tâche 3, étape 6)	13
7.4 Validation et examen de l'essai de qPCR (tâche 4)	13
7.4.1 Généralités	13
7.4.2 Validation de l'essai de qPCR (tâche 4, étape 7)	13
7.4.3 Calcul du nombre de copies du gène d'intérêt dans l'extrait d'ADN du sol (tâche 4, étape 8)	14
8 Examen des étapes critiques de l'essai de qPCR	14
9 Expression des résultats de l'essai de qPCR	15
10 Essai interlaboratoires international	15
11 Rapport d'essai	15
Annexe A (informative) Description des principales étapes d'un essai de qPCR TaqMan®	16
Annexe B (informative) Essai interlaboratoires international relatif à l'évaluation de la qPCR pour quantifier l'abondance de séquences spécifiques de gènes microbiens à partir d'ADN extrait directement du sol	18
Annexe C (informative) Exemples de systèmes d'amorces bien établis pour une quantification par qPCR de gènes marqueurs dans des échantillons de sol	31
Bibliographie	34

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 brevet 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 propriété et averti de leur existence.

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 ISO/TC 190, *Qualité du sol*, sous-comité SC 4, *Caractérisation biologique*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 444, *Caractérisation environnementales des matrices solides*, du Comité européen de normalisation (CEN), conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 17601:2016), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications sont les suivantes:

- l'[Annexe C](#) a été enrichie par des exemples de systèmes de qPCR bien établis permettant de quantifier certains groupes microbiologiques ou leur fonction.

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

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est un constituant majeur de tous les organismes vivants codant pour les enzymes responsables de leurs 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 organismes (bactéries, archées et eucaryotes).

Jusqu'à présent, la plupart des études visant à développer des indicateurs de la qualité microbienne applicables aux milieux complexes, tels que le sol, étaient biaisées par la nature incultivable de nombreux micro-organismes dans des conditions de laboratoire et par le manque de sensibilité des méthodes microbiologiques classiques. Le développement récent de nombreuses méthodes de biologie moléculaire reposant sur l'amplification des acides nucléiques extraits du sol a permis de proposer une alternative pertinente à la microbiologie pasteurienne permettant de décrire 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 génotypiques pour la détermination de la diversité microbienne. Les résultats d'analyses moléculaires des communautés et populations microbiennes du sol reposent sur deux paramètres principaux: a) l'extraction d'ADN représentatif de la composition de la communauté microbienne indigène et b) les biais introduits par la PCR, notamment le choix des amorces oligonucléotidiques, la concentration de l'ADN utilisé comme matrice, les erreurs de PCR ou encore la méthode d'analyse post-PCR choisie^{[7][4][8][9]}.

De nombreuses études ont été menées 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 a décrit une «méthode pour extraire directement les acides nucléiques d'échantillons de sol», dérivée de la Référence ^[10], ouvrant de nouvelles perspectives de développement d'approches moléculaires normalisées pour estimer la qualité du sol^[11].

Le présent document a pour objectif de décrire le mode opératoire utilisé pour mettre en place et réaliser une PCR quantitative afin de quantifier l'abondance des phyla microbiens du sol ainsi que celle de groupes fonctionnels, à partir d'extrait d'ADN de sol. La quantification des phyla microbiens du sol et des groupes fonctionnels par des essais de qPCR peut contribuer au développement d'outils de routine permettant de surveiller la qualité du sol. La répétabilité et la reproductibilité du mode opératoire de la qPCR ont été évaluées lors d'un essai interlaboratoires international (voir [Annexe B](#)). La répétabilité de cette méthode a été évaluée avec succès pour les essais de qPCR ciblant les gènes ARNr 16S ainsi que des gènes codant un marqueur fonctionnel de bactéries dénitrifiantes (le gène nitrite réductase *nirK*). La reproductibilité de cette méthode a révélé un effet de laboratoire qui peut être surmonté en interprétant les résultats de la quantification de l'abondance de groupes microbiens par comparaison, soit en utilisant une référence externe (ADN extrait d'une souche témoin) lors de l'essai de qPCR, soit en calculant un pourcentage de variations entre traitements pour normaliser les données. 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 est compris entre une et 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 contenues dans le 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.

Une liste d'essais de qPCR actuellement bien établis permettant d'évaluer une sélection de traits fonctionnels du microbiome du sol est donnée à l'[Annexe C](#).

