NORME INTERNATIONALE

ISO 11063

Deuxième édition
2020-09

Qualité du sol — Extraction directe de l'ADN du sol

Soil quality — Direct extraction of soil DNA

Numéro de référence
ISO 11063:2020(F)

© ISO 2020



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2020

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 **1**
5 Matériel d'essai **2**
5.1 Sol 2
5.2 Substances chimiques 3
5.3 Tampons et réactifs 3
6 Appareillage **4**
7 Modes opératoires **4**
7.1 Préparation des échantillons de sol 4
7.2 Lyse mécano-chimique 4
7.3 Précipitation des protéines 5
7.4 Précipitation et rinçage des acides nucléiques 5
7.5 Conservation des acides nucléiques 5
8 Estimation de la qualité et de la quantité d'ADN du sol **5**
8.1 Qualité et pureté de l'ADN du sol 5
8.2 Quantité d'ADN du sol 5
9 Validation du mode opératoire d'extraction **6**
10 Rapport d'essai **6**
Annexe A (informative) **Différences entre l'ISO 11063:2012 et le document révisé relatif à l'extraction directe de l'ADN d'échantillons de sol** **7**
Annexe B (informative) **Méthodes possibles de purification des extraits d'ADN du sol** **8**
Bibliographie **9**

© ISO 2020 – Tous droits réservés

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 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).

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 le lien suivant : www.iso.org/iso/fr/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 190/SC 4, *Qualité du sol,* sous-comité SC 4 *Caractérisation biologique.*

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 11063:2012), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes (voir l'Annexe A pour plus de détails) :

— la quantité de sol utilisée (1 g au lieu de 0,25 g équivalent poids sec) ;

— la nature et la quantité de billes (2,5 g de billes de céramique, 2 g de billes de silice de 0,1 mm et 4 billes de verre au lieu de 0,5 g de billes de verre de 106 µm et de 2 billes de verre) ;

— la durée de la lyse mécanique (90 s au lieu de 30 s) ;

— le sel utilisé pour précipiter les protéines (acétate de potassium au lieu d'acétate de sodium).

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.

 © ISO 2020 – Tous droits réservés

Introduction

L'ADN (acide désoxyribonucléique) est un composant essentiel des organismes vivants codant pour les enzymes responsables de leurs activités biologiques. L'étude des séquences d'ADN extrait de différentes matrices biologiques, à l'aide de nombreuses 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 microbiens de la qualité du sol applicables à des milieux complexes, tels que le sol, étaient biaisées par la nature incultivable de nombreux micro-organismes et par le manque de sensibilité des méthodes microbiologiques classiques.[1] Le développement récent de nombreuses méthodes de biologie moléculaire reposant principalement sur l'amplification des acides nucléiques extraits du sol a permis de proposer une alternative pertinente à la microbiologie pasteurienne, pour fournir des informations précieuses sur la composition, la richesse et la structure des communautés microbiennes.[2],[3],[4],[5],[6] Les approches reposant sur l'analyse de l'ADN sont désormais bien établies dans le domaine de l'écologie des sols et servent de marqueurs génotypiques (marqueurs génétiques) pour la détermination de la diversité microbienne.

Les résultats d'analyses moléculaires des communautés et/ou populations microbiennes du sol reposent sur deux paramètres principaux :

a) l'extraction d'ADN représentatif de la composition de la communauté bactérienne indigène ;

b) les biais introduits par la PCR, notamment le choix des amorces, la concentration en ADN amplifié, les erreurs de la PCR ou encore la méthode d'analyse choisie.[4],[7],[8],[9] Récemment, de nombreuses études ont été menées sur de nouvelles méthodes permettant d'améliorer l'extraction, la purification, l'amplification et la quantification de l'ADN des sols.[10]

La première édition (ISO 11063:2012) décrivait le mode opératoire utilisé pour extraire l'ADN directement des échantillons de sol adaptés à l'étude de la composition de la communauté microbienne à l'aide d'approches tant quantitatives (q-PCR) que qualitatives (A-RISA).[11]

L'objectif du présent document est de décrire une nouvelle méthode récemment rapportée[12] issue du mode opératoire de la première édition pour analyser la diversité des micro-organismes du sol par séquençage de dernière génération des amplicons ribosomiques générés par amplification en chaîne par polymérase (PCR) en utilisant l'ADN du sol comme matrice. Il a été montré que cette nouvelle méthode augmentait la récupération de l'ADN et représentait mieux l'abondance et la structure des communautés fongiques et des archées que la méthode d'origine.[12]

© ISO 2020 – Tous droits réservés

Qualité du sol — Extraction directe de l'ADN du sol

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode pour l'extraction directe de l'ADN des échantillons de sol afin d'analyser l'abondance et la composition des communautés microbiennes au moyen de différentes techniques de biologie moléculaire, y compris la PCR quantitative en temps réel (qPCR). Cette méthode est principalement destinée aux sols agricoles et forestiers. Cette méthode peut ne pas être appropriée aux sols riches en matières organiques (par exemple sols de tourbières) ou aux sols très pollués par des polluants organiques ou des métaux lourds.

L'extraction directe de l'ADN des échantillons de sol fournit des informations précieuses sur la diversité α et β des communautés microbiennes. Le séquençage de dernière génération des amplicons obtenus par amplification PCR (amplification en chaîne par polymérase) de l'ADN extrait du sol offre des perspectives prometteuses et pourra contribuer, dans un avenir proche, au développement d'outils de routine permettant de surveiller les communautés microbiennes des sols.

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 18400-206, *Qualité du sol — Échantillonnage — Partie 206 : Collecte, manipulation et conservation de sols destinés à l'évaluation de paramètres biologiques fonctionnels et structurels en laboratoire*

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 : disponible à l'adresse http://www.iso.org/obp ;

— IEC Electropedia : disponible à l'adresse http://www.electropedia.org/.

3.1
ADN du sol
ADN extrait de micro-organismes vivant dans le sol et ADN de micro-organismes morts persistants

4 Principe

L'ADN est directement extrait d'échantillons de sol de 1 g (équivalent poids sec) en appliquant le mode opératoire d'extraction suivant. Les échantillons de sol mélangés avec un tampon d'extraction et des billes de verre sont soumis à une lyse mécano-chimique. L'étape de lyse, réalisée par exemple à l'aide d'un broyeur à billes, est une étape cruciale pour extraire l'ADN, même de micro-organismes difficiles à lyser. Les échantillons sont ensuite soumis à une lyse chimique par incubation à 70 °C pendant 30 min. Après une brève centrifugation, les débris de sol sont éliminés et le surnageant est recueilli. Une partie est mélangée à de l'acétate de potassium pour précipiter les protéines. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et les acides nucléiques sont précipités avec de l'isopropanol froid. Après centrifugation, le culot d'acides nucléiques est rincé avec de l'éthanol à 70 % et est repris dans de l'eau stérile ultra-pure ou dans un tampon TE. La qualité de l'ADN est ensuite contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose

© ISO 2020 – Tous droits réservés