



Etude technico-économique de méthodes d'extraction de l'ADN chez le lapin Européen (*Oryctolagus cuniculus*) à partir du sang

M. BEN LARBI ^{1*}
G. NAOUARIA ¹
M. H. YAHYAOU ²
B. HADDED ¹

¹ Laboratoire des ressources animales et alimentaire,
Institut National Agronomique de Tunisie (INAT), 43
Avenue Charles Nicole, 1082 Tunis, Tunisie

² Institut des Régions Arides Médenine (IRA) Route du
Djorf Km 22.5 Médenine, Tunisie

*Corresponding author : arbi_mana@yahoo.fr

Abstract - Several DNA isolation techniques have been developed and some ready-to-use kits are now widely commercialized. To test the reliability of these products, two standard methods and two kit-extractions have been performed on a total number of ten rabbit blood samples.

The DNA obtained revealed significant difference between the methods in concentration, but not in terms of DNA purity. The highest DNA quantity was obtained by the method saline (305µg) and the lowest with the kit Invitrogen ® (7.33µg). The quality of the DNA, characterized by the A260/A280 ratio of 1.8 is good for all samples, except for extractions with saline extraction method, which gives a lower value (1.57) than all the others.

A comparative study concerning the extraction costs reveals that the used kits are up to 5 times more expensive than the standard methods.

Other parameters such as extraction time, the initial volume of blood required may explain the use of a method or the other. These are the specific needs of the experimenter who decide on the method of DNA isolation used.

Key words: DNA extraction / rabbit / standard methods / kit.



Résumé - Diverses techniques d'isolement d'ADN ont été élaborées. Outre les méthodes classiques, des méthodes d'extraction commercialisées sous forme de kits prêts à l'emploi ont surgit récemment. L'étude de la fiabilité de ces kits a été l'objectif de ce projet. Deux méthodes d'extractions classiques et deux kits d'extractions ont été utilisés sur une dizaine d'échantillons de sang de lapin.

L'ADN obtenu a révélé des différences significatives entre les méthodes utilisées en termes de concentration, mais pas en termes de pureté de l'ADN. La quantité la plus élevée était obtenue par la méthode saline (305µg) et la plus faible avec les kits commercialisés, en particulier avec l'extraction avec le kit Invitrogen® (7.33µg). La qualité de l'ADN, caractérisée par un rapport A260/A280 de l'ordre de 1,8, est bonne pour tous les échantillons, sauf pour les extractions avec la méthode d'extraction saline, qui donne des valeurs significativement plus faibles (1.57) que tous les autres.

Par contre, au niveau des coûts, les kits utilisés coûtent 2.5 voire 5 fois plus cher que les méthodes classiques.

D'autres paramètres comme la durée de l'extraction, le volume initial de sang requis peuvent expliquer le recours à l'utilisation d'un procédé ou l'autre. Ce sont les besoins spécifiques de l'expérimentateur qui décident de la méthode d'isolement d'ADN utilisée.

Mots clé : extractions, ADN, lapin, méthodes classiques, kits

1- Introduction

Chez le lapin comme dans toutes les espèces domestiques, la génétique moléculaire est devenue un outil incontournable de la gestion des populations, que ce soit à des fins d'amélioration génétique des souches sélectionnées ou de gestion des populations en conservation (Rogel-Gaillard *et al.*, 2009). La génétique moléculaire a connu une inflation des technologies. En effet, diverses techniques d'isolement de l'ADN ont été élaborées. De nouvelles issues sont alors apparues présentant de nouveaux avantages: facilité d'utilisation, meilleurs résultats, gain de temps, etc. et qui répondent à une demande accrue et diversifiée. Cependant, la technologie a un prix, et ces méthodes d'extraction nouvellement développées se présentent sous forme de biens commercialisés (automates, kits, etc.). Outre

les méthodes classiques, des méthodes d'extraction commercialisées sous forme de kits prêts à l'emploi ont surgit récemment et ne cessent de prendre ampleur malgré leur coût élevé (Ben Larbi *et al.*, 2012). Les sociétés leaders en ce domaine ne cessent d'offrir des méthodes de meilleure efficacité, et plus spécifiques aux besoins de l'utilisateur, mais avec des coûts qui peuvent être élevés. Pour l'extraction de l'ADN, on trouve aujourd'hui différents types de kits d'extractions ainsi que d'automates d'extraction. C'est pourquoi nous avons voulu valider l'utilisation et la comparaison des méthodes d'extraction de l'ADN à partir du sang de lapin de chair. Pour cela, nous avons comparé 4 méthodes d'extractions d'ADN à savoir la méthode saline, la méthode Phénol-Chloroforme (PCI), le Kit commercialisé Proméga et le Kit commercialisé magnétique Invitrogen.

Ainsi, l'objectif principal de la présente étude était la comparaison de ces méthodes d'extractions d'ADN à partir du sang du lapin. Les comparaisons ont concerné principalement les concentrations de l'ADN, les puretés des échantillons, et le coût d'extraction par échantillon.

2- Matériels et méthodes

2-1- Prélèvements sanguins

Nous avons utilisé 10 lapins âgés d'environ 75 jours appartenant à des souches hybrides élevés en cage grillagée au clapier expérimental de l'INAT. Du sang a été prélevé dans la veine marginale de l'oreille dans un tube de 5 ml contenant de l'EDTA et stocké à +4°C pendant environ une semaine.

2-2- Extraction de l'ADN

Quatre méthodes d'extraction d'ADN ont été réalisées, deux méthodes classiques et deux méthodes en utilisant des kits commercialisés. La première méthode d'extraction était la méthode saline. Cette méthode requiert un volume initial de 2,5 ml de sang. La méthode comporte une lyse osmotique et une lyse enzymatique par des solutions préparées par l'utilisateur. La deuxième méthode classique d'extraction était la méthode dite par Phénol-Chloroforme (Miller *et al.*, 1988). En plus des étapes de lyse, elle comporte une étape supplémentaire de purification par le phénol, l'iso-amyle alcool et le chloroforme. Cette méthode requiert un volume initial de 0.5 ml de sang.



Deux extractions par kits ont été réalisées. Le premier kit dit Wizard® Genomic DNA Purification: A1125 de Promega est un kit en solutions chimiques Cette méthode requiert un volume initial de 300µl de sang. Le kit Invitrogen Charge Switch® Blood kit: CS11000 est un kit qui utilise des billes magnétiques.

2-3- Evaluation de la quantité et la qualité de l'ADN

La pureté des échantillons a été déterminée par le rapport de la mesure de l'absorbance aux longueurs d'onde de 260 et 280 nm, un rapport supérieur à 1,8 signifiant que les échantillons ne contenaient que de faibles niveaux de contaminants protéiques. Il a été mesuré en utilisant un spectrophotomètre.

Les échantillons d'ADN ont été dilués à raison de 10µl dans 1990 µl d'eau bidistillée autoclavée pour avoir un volume final de 2ml. La densité optique (DO) lue à 260 nm permet d'estimer la concentration de l'échantillon en ADN de la manière suivante, comme une DO lue à 260 nm de 50 unités correspond à une solution d'ADN à 1 µg/ml. On a alors :

$$[\text{ADN}] \mu\text{g/ml} = [50 * (\text{DO à } 260) * V1] / V2$$

Avec:

V1= volume en µl de la cuvette du spectrophotomètre = 2ml = 2000µl

V2= volume en µl de l'aliquote de l'échantillon = 10µl

Une seconde mesure à 280 nm (longueur d'onde absorbée par les protéines) est effectuée à fin de pouvoir calculer le rapport:

DO lue à 260 nm/ DO lue à 280 nm

2-4- Analyse statistique

En raison de la non-normalité de la distribution de la quantité d'ADN (qADN), nous avons opté pour une transformation logarithmique de cette variable (log qADN). L'étude de la qualité (A260/A280) et du log de la quantité d'ADN a été réalisée par analyse de variance de l'effet fixe de la méthode d'extraction. La comparaison des variables statistique a été réalisée moyennant un test SNK et les niveaux du facteur de variation ont été comparés par la méthode des moyennes des moindres carrés LSmeans (procédure GLM du logiciel SAS).

3- Résultats

3-1- Quantité et qualité de l'ADN

La méthode d'extraction a un effet très significatif sur la quantité d'ADN mais pas sur la qualité. Même si toutes les méthodes d'extraction donnent une quantité correcte d'ADN, mais que la plus grande quantité est obtenue avec la méthode saline (305µg) et la plus faible avec les kits commercialisés, en particulier avec l'extraction avec le kit Invitrogen® (7.33µg). La qualité de l'ADN, caractérisée par un rapport A260/A280 de l'ordre de 1,8, est bonne pour tous les échantillons, sauf pour les extractions avec la méthode d'extraction saline, qui donne des valeurs significativement plus faibles (1.57) que tous les autres (tableau 1).

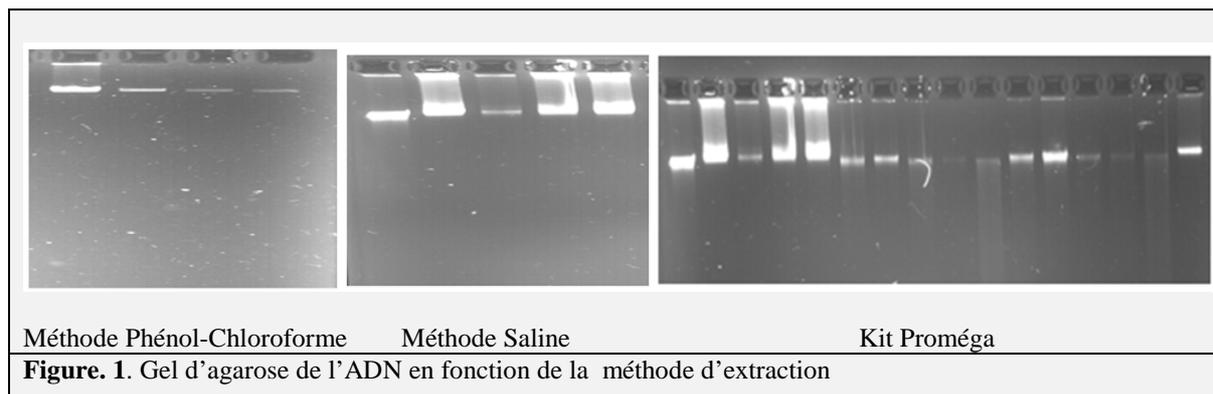
Tableau1. Quantité (qADN) et qualité (A260/A280) de l'ADN selon de la méthode d'extraction (Estimées des moindres carrés ± écart-type)

Méthode	Log qADN	qADN (µg)*	A260/A280
Saline	5.34 ^a ±0.17	305 ^a	1.57±0.09
PCI	5.21 ^a ±0.17	185.33a b	1.82±0.09
Proméga	4.35 ^b ±0.19	67 b	1.81 ±0.1
Invitrogen	2.34 ^b ±0.31	7.33 b	1.8 ±0,31

3-2- Caractérisation de l'ADN

L'électrophorèse fournit des informations sur la qualité globale de l'ADN. On observe que, quelle que soit la méthode d'extraction, on

obtient de l'ADN. Celui-ci montre partiellement des smirts dans le cas de l'ADN extrait par la méthode saline (Figure 1).



La première photo (a) représente les échantillons extraits par la méthode phénol-chloroforme. La migration de ces échantillons est typique d'un ADN animal. Les valeurs du coefficient de pureté de ces échantillons sont très rapprochées, et l'ADN est d'une bonne pureté. L'échantillon 3 représente une concentration inférieure aux autres, mais ceci n'explique pas la petite taille du fragment de migration. On suspecte une erreur lors du chargement de ce puits. De plus, l'ADN qui résulte de cette méthode d'extraction semble être de bonne pureté. Les mesures des DO peuvent alors suffire pour conclure sur les concentrations. L'efficacité de cette extraction s'approche de 100%.

Les échantillons de la photo (b) sont issus de l'extraction par la méthode saline. On peut donc considérer cet ADN comme provenant de l'extraction de 2.5 ml de sang. Ceci explique leurs concentrations élevées et donc la forte fluorescence. Même l'ADN contaminé par les protéines ou l'ARN (numéro: 3, 5 et 6) est suffisamment concentré pour combler ces défauts (lors d'une amplification ou d'une autre manipulation de génétique moléculaire). Toutefois, cet ADN semble un peu dégradé puisque la migration révèle des traces d'acide nucléique (des nucléotides) qui dépassent le fragment du marqueur. L'échantillon semble être mal chargé dans le puits. L'ADN des échantillons de la photo (b) doit être dilué pour pouvoir le comparer à celui du marqueur.

Les échantillons de la photo (c) sont obtenus de l'extraction par le kit Invitrogen. La

migration révèle l'absence d'ADN dans les échantillons 9 et 10. Cependant, les résultats restent loin de ceux obtenus par la méthode du phénol chloroforme (alors que le volume initial de sang n'est pas très différent entre les deux méthodes). De plus, l'ADN mesuré par DO représente partiellement des fragments dégradés ou des nucléotides. Ils sont bien visibles pour les échantillons 2, 4 et 5 (trace de fluorescence tout au long du gel). L'échantillon 1 mesure une bonne concentration d'ADN par DO, le rapport indique une bonne pureté, la migration révèle que cet ADN n'est pas dégradé et peut être utilisé pour des applications de génétique moléculaire qui demandent de l'ADN génomique

3-3- Etude des coûts

Concernant les coûts, on ne peut pas les ramener à un même volume initial de sang. En effet, pour les méthodes classiques, lorsque le volume de sang augmente, les volumes des solutions utilisées augmentent aussi et de même le coût. Pour les kits, les mêmes fabricants offrent des modèles de la même technologie conçus pour utiliser des volumes supérieurs. Le prix est alors fixé par le fournisseur et ne varie pas de manière linéaire. Toutes ces considérations doivent être prises en compte en comparant les coûts d'extraction. Le Tableau 2 résume les coûts de chaque méthode d'extraction.

Tableau 2. Les coûts et les volumes initiaux des méthodes d'extraction

Méthode	Kit Invitrogen	Kit Promega	M. Phénol	M. Saline
Volume initial de sang	50-100 µl	300 µl	500 µl	2500 µl
Coût d'extraction	4.42 €	1.8 €	1 €	1.5 €

3-4- Autres paramètres

D'autres paramètres peuvent constituer une base de comparaison de ces méthodes. Le tableau 3 en résume les plus importants

Tableau. 3. Différents paramètres de comparaison entre les méthodes d'extraction

	M. Saline	M. Phénol	Kit Promega	Kit Invitrogen
Technologie utilisée	Solutions	Solutions	Solutions	Magnétique
Volume initial de sang	2 500 µl Ne convient qu'à des prélèvements importants de sang	500 µl Convient pour les espèces dont on ne peut pas prélever un volume important de sang	300 µl Convient pour les espèces dont on ne peut pas prélever un volume important de sang	50 – 100 µl Convient pour les volumes de sang très limités
Elasticité d'utilisation	Utilisation pour tous types de tissus, espèces...	Utilisation pour tous types de tissus, espèces...	Spécifique au type de tissu, quantité de sang...	Spécifique au type de tissu, quantité de sang...
Nombre d'échantillons traités à la fois	Nombre limité vu le grand nombre de manipulations	Nombre limité vu le grand nombre de manipulations	Possibilité de traiter plus d'échantillons, moins de manipulations	Support fourni qui permet de manipuler jusqu'à 96 échantillons à la fois
Temps d'extraction	24 h	24 h	3 h	2 h
Erreur	Grand nombre d'interventions donc l'erreur dépend entièrement du niveau d'expérience de l'expérimentateur	Grand nombre d'interventions donc l'erreur dépend entièrement du niveau d'expérience de l'expérimentateur	Diminuer le risque d'erreur en diminuant le nombre d'interventions	Diminuer le risque d'erreur en diminuant le nombre d'interventions
Durée de conservation des produits d'extraction	Les solutions utilisées peuvent être conservés plus que 2 ans	Les solutions utilisées peuvent être conservés plus que 2 ans	6 mois	6 mois

4- Discussion

De nombreux protocoles d'isolement d'ADN génomique ont été optimisés pour des échantillons de sang (Budowle et al., 2009 ; Elgort et al., 2004 ; Nasiri et al., 2005 ; Pachot et al., 2007); qui ont été vérifiées pour être reproductibles et a donné de l'ADN de qualité suffisante pour l'analyse génétique (Pachot et al., 2007). Cependant, dans la plupart de ces méthodes, on utilise des enzymes (telles que la protéinase K) ou des produits toxiques (solvants organiques). Il y a seulement quelques méthodes qui sont non enzymatiques et n'emploient pas de « dangereux » solvants organiques (Lahiri et al., 1991), par conséquent, les protocoles standards pour l'extraction d'ADN prennent beaucoup de temps. Étant donné que ces enzymes sont chers, et la plupart des matériaux qui sont utilisés couramment sont toxiques, il est raisonnable de recourir à une procédure d'extraction d'ADN efficace qui ne subit pas ces étapes.

L'analyse spectrophotométrique pour A260/280 a donné une moyenne d'environ 1.8 indique que l'ADN extrait est exempt de contamination par des protéines. Selon les moyennes estimées pour le degré de pureté de l'ADN, on trouve que la meilleure qualité de l'ADN est obtenue par les méthodes du Phénol Chloroforme et du kit Invitrogen. Le kit Invitrogen est un kit magnétique se basant sur l'activité des perles magnétiques qui se collent sélectivement à l'ADN avec une haute précision. Cette méthode semble très efficace. L'ADN obtenu est libre de toute contamination par les protéines ou par les ARN (en moyenne). Bien qu'elle soit infime, la quantité d'ADN isolée par ce kit est pure sans avoir d'importantes variabilités entre les différents échantillons. La méthode du Phénol chloroforme est une méthode qui se base sur des purifications répétées de l'ADN (par Phénol pur, puis Phénol Chloroforme puis Chloroforme-alcool isoamylique). Ainsi, les protéines sont efficacement éliminées. Cependant, la séparation de la phase contenant



l'ADN au cours de ces purifications, est une opération délicate. Si on interfère la phase intermédiaire, on prélève des protéines, si on s'éloigne trop de cette phase, on risque d'éliminer des quantités d'ADN. Finalement, l'ADN isolé est d'une bonne qualité pour tous les échantillons. Le taux d'erreur semble minimisé, ainsi que l'écart entre les spécimens. L'ADN obtenu par méthode saline est de mauvaise qualité, il est fortement contaminé par les protéines (moyenne inférieure à 1.6), ce qui indique un taux d'erreur élevé. La qualité de l'ADN issu de l'extraction par kit Promega est optimale et peut être considérée comme acceptable. Les méthodes présentent donc des différences significatives pour la concentration mais pas pour la pureté de l'ADN. Concernant les coûts, celle des méthodes classiques sont rapprochés: pour 500µl de sang, le coût d'extraction par méthode saline revient à 1.5€. Ce sont des méthodes élastiques, leurs coûts restent raisonnables surtout pour des volumes de sang importants. Le coût d'extraction par kit Promega est égal à 2,5 le coût d'extraction par PCI (en comparant aussi les volumes de sang initiaux). C'est un coût élevé pour les résultats comparables que donnent les deux méthodes. Le kit Invitrogen offre la possibilité exclusive d'extraire l'ADN à partir d'un volume très limité de sang, mais avec un prix très élevé. Si des volumes de sang supérieurs à 200 µl sont disponibles, l'utilisation de ce kit n'est plus nécessaire. La société Invitrogen propose aussi des kits d'extraction à partir de volumes supérieurs avec des prix plus raisonnables (ou aussi inférieurs, jusqu'à 10 µl).

5- Conclusion

Les résultats obtenus à partir de cette étude ont permis de l'efficacité de l'extraction ne dépend pas de la méthode utilisée. Une application appropriée du protocole permet d'avoir une haute efficacité. Les méthodes d'extraction ne présentent pas une différence importante au niveau de l'ADN obtenu, ni en terme de concentration ni en terme de pureté. Les coûts d'extraction par méthode des kits sont très élevés comparés à ceux des méthodes classiques. Par conséquent, on peut conclure que chacune de ces méthodes fait gagner l'opérateur sur certains détails. En effet, l'utilisation des kits permet de gagner en termes de temps ou de volume de sang disponible, alors que le point fort des méthodes classiques est sans doute leur coût largement

inférieur à celui des kits commercialisés. Toutefois, il est important de remarquer que le nombre limité des échantillons de cette expérience ne permet pas de conclure sur la fiabilité des méthodes d'extraction de l'ADN utilisées. Pour les résultats de l'ADN obtenu, la variable décisive, peu importe la méthode, reste l'opérateur. Toutes ces méthodes sont fiables. Toutefois, c'est de la maîtrise de la technicité que dépendent les résultats. Disponibilité du temps, nombre d'opérations d'extraction effectuées, matériel initial disponible ainsi que d'autres critères déterminent le choix de la méthode d'extraction. C'est la balance entre les besoins et les moyens qui déterminent le choix pertinent.

6- Références

- Angelini A, Di Febbo C, Rullo A, Di Ilio C, Cuccurullo F and Porreca E (2000)** New method for the extraction of DNA from white blood cells for the detection of common genetic variants associated with thrombophilia. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 32(4), 180-183.
- Ben Larbi M., Tircazes A., Feve K., Tudela F and Bolet G (2012)** Reliability of non-invasive tissue sampling methods for DNA extraction in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *World Rabbit Sciences* (2012) 20:117-124
- Budowle B and Van Daal A (2009)** Extracting evidence from forensic DNA analyses: Future molecular biology directions. *Biotechniques*, 46(5), 342-350.
- Elgort MG, Herrmann MG, Erali M, Durtschi JD, Voelkerding KV and Smith RE (2004)** Extraction and amplification of genomic DNA from human blood on nonporous aluminum oxide membranes. *Clin Chem*, 50(10), 1817-1819.
- Lahiri DK and Nurnberger Jr JI (1991)** A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, 19(19), 5444.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF (1988)** A sampling salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 16: 1215.
- Nasiri H, Forouzandeh M, Rasaei MJ and Rahbarizadeh F (2005)** Modified salting out method: high yield, high quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *J Clin Lab Anal*, 19(6), 229-232.
- Pachot A, Barbalat V, Marotte H, Diasparra J, Gouraud A, Mouglin B (2007)** A rapid semi automated method for DNA extraction from dried-blood spots: application to the HLA-DR shared epitope analysis in rheumatoid arthritis. *J Immunol Methods*, 328(1-2), 220-225.
- Rogel-Gaillard C, Ferrand N and Hayes H (2009)** Rabbit, pp. 165-230 in *Genome Mapping and Genomics in Domestic Animals*, edited by C. Kole and N. Cockett. Springer Berlin Heidelberg.