

Comparaison de matériels biologiques et de méthodes d'extraction pour obtenir de l'ADN chez le Lapin

M. BEN LARBI¹, A. TIRCAZES², K. FEVE³, F. TUDELA⁴, G. BOLET²

¹ Laboratoire des ressources animales et alimentaires, Institut National Agronomique de Tunisie, 43 Avenue Charles Nicole, 1082 Tunis, Tunisie arbi_mana@yahoo.fr

² INRA. UR 631 Station d'Amélioration Génétique des Animaux, BP 52627- 31326 Castanet Tolosan, France

³ INRA UMR 444 Laboratoire de Génétique Cellulaire, BP 52627 31326 Castanet Tolosan, France

⁴: INRA. IE 1322 Pôle Expérimental Cunicole de Toulouse, B.P 52627- 31326 Castanet Tolosan, France

Résumé. Pour obtenir de l'ADN, les matériels biologiques les plus couramment utilisés sont le sang et les biopsies, mais, dans certains cas, il peut être intéressant d'utiliser les poils ou les fèces. Nous avons comparé l'efficacité de différentes méthodes d'extraction d'ADN chez le lapin à partir de ces 4 matériels biologiques sur 24 lapins de la souche INRA 1001. Quel que soit le matériel biologique et la méthode d'extraction, on obtient de l'ADN de lapin. Le sang reste la source d'ADN la plus efficace, avec la méthode d'extraction LGC. Les poils ne permettent d'obtenir que des quantités faibles d'ADN, insuffisantes pour des PCR et parfois dégradées. Il est possible d'extraire de l'ADN de lapin en quantité suffisante à partir de fèces. L'utilisation de ces méthodes non invasives est donc prometteuse, mais les techniques doivent être améliorées et ne peuvent pas remplacer dans l'immédiat les techniques invasives quand ces dernières sont praticables.

Mots-clefs : Lapin, extraction d'ADN, Poils, Fèces

Abstract. Comparison of biological material and extraction methods for DNA extraction in rabbits. Deoxyribonucleic acid (DNA) is usually extracted from blood and biopsies, but in some cases, feces and hairs can be considered as a source of DNA. We compared the applicability of invasive and non-invasive sampling methods for extracting DNA in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), on 24 rabbits from the INRA 1001 strain. Blood, hair, ear biopsies and feces were collected and used with different DNA extraction methods. DNA was obtained for all tissue types and all extraction methods. DNA extraction was shown to be optimal with the LGC blood extraction method. DNA extraction from hair using the LGC protocol and QIAamp® DNA mini kit gave very low quantities of DNA that could not be used for PCR reactions. Enough rabbit DNA can be extracted from feces. The use of such non-invasive samples as a source of genetic material is a promising technique, but these techniques are still too unreliable to altogether replace invasive techniques when the latter are possible.

Key words: Rabbit, DNA extraction, Tissue sampling, Feces, Hair

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. Une spécificité du lapin par rapport aux autres espèces domestiques élevées en France est la présence à l'état sauvage d'animaux appartenant strictement à la même espèce, ce qui offre des possibilités très intéressantes en matière de recherches en génétique (Rogel-Gaillard *et al.*, 2009). Ces recherches impliquent d'étudier l'ADN des animaux, extrait à partir de prélèvement de matériel biologique. Le sang ou des tissus obtenus par biopsie sont classiquement utilisés. Or, ces prélèvements peuvent s'avérer impossibles ou difficiles dans le cas d'animaux sauvages, mais aussi source de stress pour des animaux domestiques. C'est pourquoi nous avons voulu valider l'utilisation d'autres matériels biologiques ne posant pas de problèmes de prélèvement, à savoir les poils et les fèces.

1. Matériel et méthodes

Nous avons utilisé 24 lapins âgés d'environ 90 jours appartenant à la souche INRA1777, élevés en cage grillagée au Pôle expérimental Cunicole (PECTOUL)

du centre INRA de Toulouse. Nous avons prélevé quatre types de matériels biologiques pour ensuite extraire l'ADN.

Prélèvements :

- Du sang a été prélevé dans la veine marginale de l'oreille dans un tube de 5 ml contenant de l'EDTA pour éviter la coagulation. Il a ensuite été stocké à +4°C pendant environ une semaine.

- Deux touffes de poils ont été arrachées sur le dos de chaque animal en utilisant des pinces chirurgicales, qui étaient nettoyées à l'alcool entre chaque prélèvement. Les échantillons ont été stockés à -20°C dans des enveloppes individuelles, gardées dans des sacs en plastique imperméables comme décrit par Roon *et al.* (2003)

- Deux biopsies de 2mm de diamètre ont été réalisées sur chaque animal dans l'oreille en utilisant une pince à biopsie Biopsitec. Elles ont été conservées à -20°C.

- Pour les fèces, une dizaine de crottes, aussi fraîches que possible, étaient récupérées sous la cage de chaque animal. Elles étaient stockées dans des tubes à -20°C. Ensuite, 2 g de matériel biologique ont été prélevés à la surface des crottes avec une lame de scalpel, considérés comme des cellules de l'épithélium intestinal du lapin détachées pendant le transit.

1.1. Extraction de l'ADN

Toutes les extractions et caractérisations d'ADN ont été réalisées au LGC (laboratoire de génétique cellulaire) du centre INRA de Toulouse. Pour le sang, les biopsies et les poils, nous avons utilisé d'une part la méthode LGC, adapté de Miller *et al.* (1988), d'autre part la méthode QIAamp® DNA minikit (Qiagen). L'ADN fécal a été extrait avec le QIAamp® DNA Stool minikit (Qiagen) mis au point pour ce type de matériel biologique. Nous avons aussi utilisé la méthode Chelex® (Gallan *et al.*, 2005) pour les échantillons de poils.

1.2. Evaluation de 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 nm 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 Nanodrop1000® pour tous les échantillons, sauf pour l'ADN des poils extrait avec la méthode Chelex®, qui n'a pas été évalué.

1.3. Mesure de la quantité d'ADN

Onze échantillons de chaque matériel biologique ont été choisis au hasard. Nous avons utilisé le kit Quant-iT®dsDNA Broad-Range Assay (Invitrogen), qui

donne un signal de fluorescence linéaire dans une gamme de 2 à 1000 ng. Pour les quantités plus faibles, nous avons utilisé le kit Quant-iT®dsDNA High Sensitivity Assay (Invitrogen), prévu pour les échantillons contenant de 0,2 à 100 ng d'ADN.

1.4. Caractérisation de l'ADN

La qualité de l'ADN génomique a été analysée par électrophorèse sur gel d'agarose pour ces mêmes 11 échantillons. Pour confirmer que l'ADN extrait provenait bien de cellules de lapin, notamment pour les fèces, nous avons choisi au hasard 12 échantillons d'ADN par matériel biologique, et amplifié l'ADN par PCR avec deux microsatellites de lapin (Sat2 et Sat12, Mougel *et al.*, 1997) puis analysé les produits de PCR par électrophorèse.

1.5. Analyses statistiques

En raison de la non-normalité de la distribution de la quantité d'ADN, nous avons analysé le log de cette variable et la qualité de l'ADN (rapport A260/A280) par analyse de variance avec les effets fixés du type de matériel biologique et de la méthode d'extraction intra-matériel biologique. La signification statistique a été déterminée avec un test F de Fisher et les estimées des moindres carrés des moyennes comparées 2 à 2 par un test de Student (procédure GLM du logiciel SAS).

Figure 1. Gel d'agarose de l'ADN en fonction du matériel biologique et de la méthode d'extraction

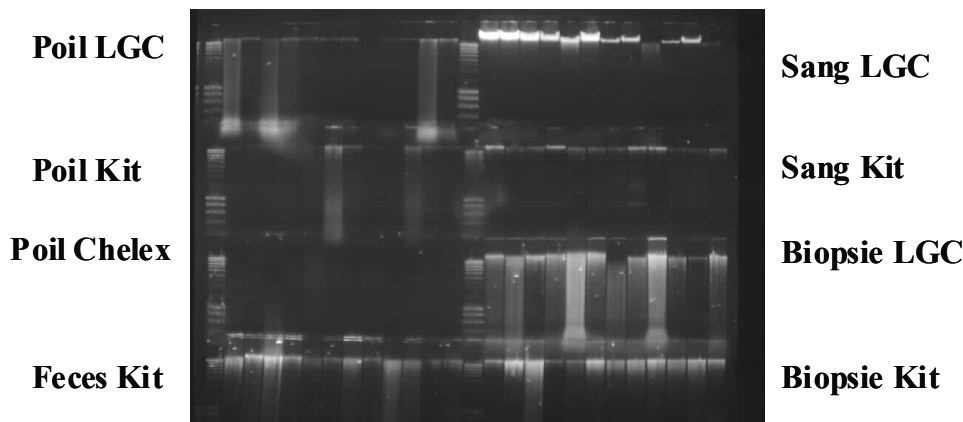
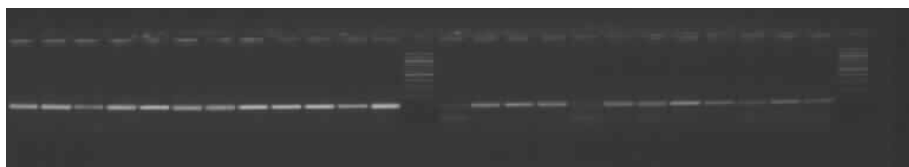


Figure 2. Amplification de l'ADN extrait des fèces avec le kit (à gauche) et des poils avec la méthode Chelex (à droite)



2. Résultats

2.1. Quantité et qualité d'ADN

Le matériel biologique et la méthode d'extraction ont un effet très significatif sur ces deux paramètres. Même si on ne peut pas strictement comparer la

quantité pour 1 ml de sang, une biopsie de 2 mm, 2g de cellules épithéliales et 2 touffes de poil, on observe que tous les matériels biologiques et toutes les méthodes d'extraction donnent une quantité correcte 25ng d'ADN, mais que la plus grande quantité est obtenue avec le sang et la plus faible avec les poils, en

particulier avec l'extraction avec le minikit QIAamp®. La qualité de l'ADN, caractérisée par un rapport A260/A280 plus élevé que 1,8, est bonne pour tous les échantillons, sauf pour les poils et les biopsies avec la méthode d'extraction LGC, qui donnent des valeurs significativement plus faibles que tous les autres (tableau 1)

Tableau 1. Quantité (qADN) et qualité (A260/A280) de l'ADN en fonction du matériel biologique et de la méthode d'extraction (Estimées des moindres carrés ± écart-type)

Matériel biologique	Extraction ADN	Log qADN	qADN (µg)*	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
Biopsie (2 disques de 2 mm)	LGC	2,35 ^a ±0,27	11,69	1,64 ^{ab} ±0,07
	QIAamp®	1,88 ^a ±0,27	7,43	1,90 ^a ±0,07
Sang (/ml)	LGC	2,27 ^a ±0,27	12,58	2,12 ^a ±0,08
	QIAamp®	1,71 ^a ±0,27	6,52	1,88 ^a ±0,08
Poils (2 touffes)	LGC	1,10 ^b ±0,28	2,27	1,09 ^b ±0,11
	QIAamp®	0,07 ^c ±0,28	1,82	2,55 ^a ±0,11
Fèces (2 g paroi)	QIAamp®	1,81 ^a ±0,27	6,89	2,05 ^a ±0,07

* Les tests statistiques ont porté sur Log qADN. Dans une colonne, les valeurs affectées de lettres différentes sont significativement différentes (P<0,05)

2.2. 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, tous les matériels biologiques permettent d'obtenir de l'ADN. Celui-ci n'est partiellement dégradé que dans le cas de l'ADN extrait des biopsies et des poils par la méthode LGC (Fig. 1).

Les résultats de la PCR montrent que l'ADN extrait est bien de l'ADN de lapin, quel que soit le matériel biologique, et que sa quantité et sa qualité sont suffisantes pour permettre l'amplification (Fig. 2)

3. Discussion

Notre objectif était de déterminer la quantité et la qualité d'ADN extrait de matériels biologiques soit couramment utilisés (sang, biopsie), soit pouvant présenter un intérêt dans certaines conditions (poils, fèces). Quels que soient le matériel biologique et la méthode d'extraction, 2 à 12 µg d'ADN ont été obtenus apr échantillon prélevé. Ainsi, des méthodes de prélèvement non invasives et non stressantes sont envisageables pour obtenir de l'ADN de lapins. Toutefois, il convient de nuancer cette observation en fonction des matériels biologiques.

Cette expérience confirme que l'extraction d'ADN à partir d'une prise de sang est une méthode efficace pour obtenir une grande quantité d'ADN de bonne qualité. Il faut toutefois signaler que, chez le lapin, la

prise de sang à l'oreille est parfois une opération délicate et longue si l'opérateur n'est pas expérimenté.

La biopsie, couramment utilisée dans d'autres espèces comme le porc, donne de bons résultats, tant en ce qui concerne la quantité que la qualité de l'ADN. Cependant, l'électrophorèse met en évidence une dégradation de l'ADN.

Qu'il s'agisse de poils arrachés ou tombés naturellement, de l'ADN ne peut être extrait que si le bulbe est présent (Mainguy *et al.*, 2007). De ce fait, même s'ils sont collectés dans de bonnes conditions, les poils ne procurent en général qu'une très faible quantité d'ADN, de l'ordre de quelques picogrammes (Taberlet *et al.*, 1996, chez l'Ours, Morin *et al.*, 2001, chez le Chimpanzé). Dans notre cas, la quantité est plus importante mais reste significativement inférieure à celle obtenue avec les autres matériel biologiques. Elle ne permet pas de faire les PCR, comme déjà observé apr Fontanesi *et al.* (2007); cependant, le protocole LGC devrait pouvoir être amélioré et constituer une solution pour l'avenir. L'extraction avec la méthode Chelex ne permet pas de quantifier l'ADN, cependant, elle donne de bons résultats d'amplification et elle est peu couteuse.

Durant le passage de la nourriture dans l'intestin, des cellules épithéliales se détachent de la paroi intestinale et s'agglutinent sur la surface des fèces avant d'être éjectés. Aussi l'ADN de ces cellules peut-il être extrait (Mainguy *et al.*, 2007). Cependant, il est en général de faible qualité à cause de sa dégradation, de la présence d'inhibiteurs de PCR ou de contaminants (Baldwin *et al.*, 2010). Cela peut notamment poser un problème chez les herbivores, tels que le lapin, en raison de l'effet inhibiteur sur la PCR de certains composants des plantes (Fernando *et al.*, 2003). Cependant, notre étude nous a permis de l'ADN de bonne qualité en quantité suffisante, en n'utilisant que la paroi extérieure des fèces, en accord avec Wehausen *et al.* (2004). Moyennant cette précaution, cette technique offre donc des perspectives chez le lapin lorsqu'on ne peut pas attraper les animaux ou lorsqu'on souhaite minimiser au maximum le stress. Toutefois, il faut noter que, dans la plupart des cas, les fèces prélevés ne peuvent pas être identifiés individuellement et ne sont donc pas adaptés à certaines études génétiques.

Conclusion

L'utilisation de matériels biologiques prélevables par des méthodes non invasives, tels que les poils ou les fèces, pour l'obtention d'ADN est une perspective récente et prometteuse. Chez les animaux dont la capture est impossible ou risquée, aussi bien pour l'expérimentateur que pour l'animal, c'est la seule façon d'obtenir une information génétique. Cependant, l'extraction d'ADN à partir des poils ou des fèces n'est pas encore assez fiable et répétable pour remplacer totalement l'utilisation du sang ou des tissus par biopsie quand ceux-ci sont disponibles. Il est donc nécessaire d'améliorer et de préciser les techniques de

prélèvement et d'extraction d'ADN sur les poils et les fèces avant de généraliser leur usage.

Références

- BALDWIN H.J., HOGGARD S.J., SNOYMAN S.T., STOW A.J., BROWN C., 2010. Non-invasive genetic sampling of faecal material and hair from the grey-headed flying-fox (*Pteropus poliocephalus*). *Australian Mammalogy*, 32(1): 56-61
- FERNANDO PT, VIDYA NC, PAJAPAKSE C, DANGOLLA A., MELNICK DJ, 2003. Reliable noninvasive genotyping: fantasy or reality. *J. Hered.*, 94: 115-123.
- FONTANESI L., TAZZOLI M., RUSSO V, 2007. Non-invasive and simple methods for sampling rabbit DNA for PCR analysis of melanocortin 1 receptor (MCR) gene mutations: a technical note. *World Rabbit Sci.*, 15:121-126.
- GALLAN M., BALTZINGER C., HEWISON A.J.M., COSSON.J.F, 2005. Distinguishing red and roe deer using DNA extracted from hair samples and the polymerase chain reaction method. *Deer management and research* 33(1): 204-211.
- MAINGUY J., BERNATCHEZ L., 2007. L'analyse de l'ADN sans manipulation des animaux : un outil incontournable pour la gestion et la conservation des espèces rares et élusives. *Le naturaliste canadien*, 31: 51-59.
- MILLER S.A., DYKES D.D., POLESKY H.F., 1988. A sampling salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
- MORIN P.A., CHAMBERS K.E., BOESCH C.H., VIGILANT L., 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from non-invasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology*, 10 : 1835-1844.
- MOUGEL F., MOUNOLOU J.C., MONNEROT M., 1997. Nine polymorphic microsatellite loci in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Anim. Genetics* 28: 58-71.
- ROGEL-GAILLARD, C., FERRAND N., 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.
- ROON, D.A., WAITS L.P., KENDALL K.C., 2003. A quantitative evaluation of two methods for preserving hair samples. *Molecular Ecology Notes*, 3 : 163-166.
- TABERLET, P., GRIFFIN S., GOOSSENS B., QUESTIAU S., MANCEAU V., ESCARAVAGE N., WAITS L.P., BOUVET J., 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res.* 24: 3189-3194.
- WEHAUSEN J.D., RAMEY II R.R., EPPS C.W., 2004. Experiments in DNA extraction and PCR amplification from Bighorn sheep feces: The importance of DNA extraction methods. *J. Heredity*, 95(6):503-509