

Extraction de l'ADN résiduel: obstacle et palier à franchir pour l'investigation de la qualité de l'huile d'olive

Extraction of residual DNA: a hurdle and a step forward for the investigation of olive oil quality

Rayda Ben Ayed^{1*}, Ahmed Rebai¹

¹ Laboratory of Molecular and Cellular Screening Processes, Center of Biotechnology of Sfax, University of Sfax, Sidi Mansour Road, P.O. Box 1177, 3018, Sfax, Tunisia.

* Auteur correspondant: Docteur Rayda Ben Ayed, raydabenayed@yahoo.fr

RÉSUMÉ. La détermination de la qualité de l'huile d'olive via des outils moléculaires se base principalement sur l'extraction et l'obtention d'un ADN en quantité et qualité suffisantes. Cependant cette tâche se trouve confrontée à plusieurs difficultés et différents obstacles notamment la présence de nucléases dans l'huile d'olive qui engendrent la dégradation de l'ADN, mais aussi de composés phénoliques et des polysaccharides inhibant l'activité de l'ADN polymérase au cours des réactions d'amplification par PCR, en plus de la durée de stockage des échantillons qui affecte également la qualité de l'ADN résiduel. Nous essayons au cours de cette synthèse de passer en revue les différentes tentatives et techniques d'obtention d'ADN résiduel, avant de terminer avec la description du protocole que nous proposons.

ABSTRACT. The determination of olive oil quality using molecular tools is mainly based on the extraction and obtaining of DNA in sufficient quantity and quality. However, this task faces several difficulties and obstacles, including the presence of nucleases in olive oil that cause DNA degradation, but also phenolic compounds and polysaccharides that inhibit the activity of DNA polymerase during PCR reactions, in addition to the storage time of samples that also affects the quality of residual DNA. In this synthesis, we try to review the different attempts and techniques to obtain residual DNA, before ending with the description of the protocol we propose.

MOTS-CLÉS. ADN résiduel, Huile d'olive, Qualité, authenticité des aliments.

KEYWORDS. Residual DNA, Olive oil, Quality, food authenticity.

Introduction

Le domaine oléicole demande une rénovation qui passe par une phase d'identification des principales variétés. L'identification visuelle avec les descripteurs classiques (arbre, feuille, fleur, fruit) et les analyses de la composition chimique et des métabolites secondaires ne peuvent pas fournir des résultats fiables et définitifs pour la traçabilité de l'huile d'olive [1]. Leur limite provient de l'influence du milieu et de la similitude entre certaines variétés. Par ailleurs, les démarches de qualité impliquent l'identification des cultivars et la traçabilité des produits. Les techniques moléculaires sont demandées pour sécuriser ces démarches.

La caractérisation génétique semble être la méthode la plus appropriée pour identifier le cultivar à partir duquel l'huile d'olive a été extraite. En fait, l'ADN de l'huile n'est pas affecté par l'environnement et il est identique à l'ADN de l'arbre mère. Cependant, d'autres extra allèles peuvent être détectés dans l'huile, qui ne correspondent pas aux allèles de l'arbre mère mais à ceux du pollinisateur, et sont portés par l'embryon qui se trouve à l'intérieur du noyau de l'olive [2].

Dans le domaine d'authenticité des aliments, l'utilisation des technologies basées sur l'ADN répond aux critères de fidélité et fiabilité recherchés par les consommateurs. Ces techniques permettent l'utilisation des marqueurs moléculaires en utilisant particulièrement la réaction de PCR. En effet, les marqueurs moléculaires tels que les Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD),

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) et Simple Sequence Repeat (SSR) sont très utilisés pour étudier la traçabilité de l'huile d'olive. L'efficacité de ces marqueurs dans l'étude de la traçabilité des huiles d'olive dépend de la qualité et de la quantité de l'ADN résiduel extrait.

Pour cela, nous avons optimisé une méthode d'extraction d'ADN à partir d'huile d'olive. Dans cette partie nous nous sommes intéressés, dans une première étape, à maîtriser l'extraction de l'ADN résiduel à partir des échantillons d'huiles d'olive.

1. Tentatives d'extraction d'ADN résiduel à partir de l'huile d'olive

Jusqu'à nos jours, toutes les études publiées ont montré que la fiabilité et la reproductibilité des profils obtenus par les marqueurs moléculaires sont déterminées par la qualité de l'ADN extrait à partir de l'huile d'olive [1-5]. En effet, l'extraction de l'ADN à partir d'huile d'olive est une tâche très difficile en raison de sa faible quantité et de sa forte dégradation par les nucléases présentes dans l'huile d'olive [6, 7, 2, 3, 5]. En outre, Testolin et Lain (2005) [3] ont montré que la présence des composés phénoliques et des polysaccharides peut inhiber l'activité des ADN polymérases aboutissant à des amplifications PCR irrégulières. D'autre part, après l'extraction de l'huile, la durée du stockage peut également affecter la qualité de l'ADN pour la traçabilité moléculaire. Pafundo *et al.* (2010) [8] ont observé une diminution significative de la qualité de l'ADN extrait de l'huile d'olive et hautement dégradé après un mois de la production de l'huile.

Spaniolas *et al.* (2008) [9] ont utilisé l'ADN de bactériophage lambda (lambda DNA) comme marqueur pour contrôler la longueur des fragments d'ADN dans l'huile d'olive pendant le temps de stockage. L'ADN du bactériophage lambda est une molécule linéaire d'environ 50 kb, une taille qui similaire à celle de l'ADN présent dans l'huile d'olive. L'ADN extrait à partir d'échantillons d'huile d'olive stockée pendant plusieurs mois est en quantité faible et insuffisante pour l'amplification par PCR. Ainsi la détection de marqueurs polymorphes nécessitant des matrices d'ADN plus courtes que 100 pb pourraient être appliquées pour étudier les empreintes génétiques de l'huile d'olive.

Différentes méthodes d'extraction d'ADN provenant de l'huile d'olive ont été développées par de nombreux auteurs [10-13, 2]. Plusieurs kits commerciaux fournissant des protocoles adaptés, ont été également utilisés dans différentes études [14-16]. Toutes ces études ont confirmé que l'ADN des cultivars récupérable à partir d'huile d'olive extra vierge est de faible quantité et qualité. Les premières recherches ont été effectuées en utilisant l'ADN génomique extrait de drupes. L'ADN avait un bon potentiel pour amplifier correctement les marqueurs RAPD [17]. En utilisant des marqueurs SCAR et AFLP, Busconi *et al.* (2003) [10] ont pu montrer que l'ADN récupéré à partir d'huile d'olive provenait à la fois des organites et du noyau. Pafundo *et al.* (2005) [18] ont tracé la composition variétale des huiles d'olive monovariétales par la technique AFLP, en concluant que l'extraction d'ADN est l'étape la plus importante qui peut affecter la procédure. Pafundo *et al.* (2007) [19] ont réalisé l'amplification de l'ADN isolé à partir d'huile d'olive en utilisant la méthode AFLP. Ils ont aussi développé quelques SCARs pour amplifier avec succès l'ADN extrait de l'huile d'olive. En utilisant les marqueurs SSR, Pasqualone *et al.* (2007) [12] ont démontré que les microsatellites sont utiles pour le contrôle de la présence d'un cultivar spécifique dans une huile AOP (appellation d'origine protégée), vérifiant ainsi l'identité du produit. Cependant, ils n'ont obtenu que le profil des marqueurs de la variété principale dans l'huile et aucun signal n'a été détecté pour les variétés secondaires. Montemurro *et al.* (2008) [20] ont analysé par des marqueurs AFLP dix huiles d'olive monovariétales vierges préparées en laboratoire. Ils ont ainsi pu distinguer toutes les huiles d'olive examinées, bien que le profil AFLP d'huile obtenu ait une correspondance partielle avec le profil AFLP obtenu à partir des feuilles. Martins-Lopes *et al.* (2008) [14] ont évalué l'efficacité des marqueurs moléculaires RAPD, ISSR et SSR pour l'identification variétale d'huile d'olive et la possibilité de leur utilisation à des fins de certification [21,5].

Consolandi *et al.* (2008) [13] ont signalé le développement d'un test de génotypage des SNPs semi-automatisé pour vérifier l'origine et l'authenticité de l'huile d'olive extra vierge. Les auteurs ont développé une technique LDR (Ligation Detection Reaction) en utilisant plusieurs SNPs. Ils ont constaté que 13 SNPs choisis avec précision étaient suffisants pour discriminer un panel de 49 cultivars différents [21].

Doveri *et al.* (2006) [11] ont observé une non-concordance entre les profils génétiques de l'huile d'olive et des fruits. Ils ont suggéré que cela pourrait être dû à la contribution de l'ADN du pollinisateur contenu dans l'embryon. Ils ont conclu que l'interprétation des profils d'ADN obtenus à partir de l'huile pour résoudre les problèmes de provenance et l'authenticité doit être faite avec beaucoup de précaution [14]. Il est à noter que, la présence éventuelle d'allèles additionnels dus à la contribution paternelle dans les huiles extraites de fruits entiers, devraient être prise en considération pour l'étude de traçabilité lors de la comparaison des profils d'amplification de feuilles avec la concordance de profils d'huiles [22].

Pafundo *et al.* (2010) [8] ont étudié l'effet de la durée de stockage de l'huile d'olive sur la dégradation de l'ADN purifié. Ils ont observé une corrélation négative entre la durée de stockage et la qualité-quantité d'ADN récupéré. Les auteurs ont montré qu'après un mois de l'extraction d'huile, la dégradation de l'ADN augmente ce qui rend l'étude de la traçabilité plus difficile [21].

Plusieurs méthodes d'extraction d'ADN à partir des échantillons d'huile d'olive ont été tentées et sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1. Résumé des protocoles d'extraction d'ADN utilisés pour des échantillons d'huile d'olive

Méthode	Volume initial d'huile	Type d'échantillon	Références	Avantages	Inconvénients
Méthode d'extraction CTAB modifiée	100 ml	- huile - sédiments	[7]	- Simple - ADN intact avec addition de protéinase K	- Tampons toxiques (chloroforme, β mercaptoéthanol, ...) - Protocole manuel (risque de contamination accru) - Conditions particulières au cours de l'extraction de l'huile d'olive (addition d'enzymes)
Méthode d'extraction CTAB modifiée	50-100 ml	- huile - sédiments	[10, 13]	- Qualité d'ADN acceptable - Amplification PCR	- Tampons toxiques (chloroforme, β mercaptoéthanol, ...) - Baisse d'efficacité avec matériel récalcitrant riche en polyphénols
Hydroxyapatite (HA) biogel (Biorad)	200 ml	- huile - sédiments	[4]	- Amplification microsatellite	- Non destiné à l'usage de routine - Perte d'ADN au cours des étapes de rinçage
GenElute Plant Kit (Sigma)	200-250 ml	- huile - sédiments	[12, 20, 22]	- Procédure simple	- Amplification PCR non fidèle
HA/CTAB	400 ml	- huile - sédiments	[4]	- Amplification microsatellite	- Tampons toxiques (chloroforme, β mercaptoéthanol, ...) - Non destiné à l'usage de routine - Perte d'ADN au cours des étapes

					de rinçage
Polyvinylpolypyrrolidone /CTAB	400 ml	- huile - sédiments	[4]		- Tampons toxiques (chloroforme, β mercaptoéthanol, ...) - Non destiné à l'usage de routine - Pas d'amplification microsatellite
HA/Polyvinylpolypyrrolidone	400 ml	- huile - sédiments	[4]	- Amplification microsatellite	-Non destiné à l'usage de routine -Perte d'ADN au cours des étapes de rinçage
Méthode d'extraction CTAB modifiée	6 ml	- huile	[14]	- Amplification RAPD et SSR	- Tampons toxiques (chloroforme, β mercaptoéthanol, ...) - Rendement faible
Wizard_ Magnetic Food kit (Promega)	40 ml	- huile - sédiments	[4]	- Usage de routine - Amplification microsatellite - Rendement élevé	- Billes magnétiques à éliminer - Etape de purification nécessaire
LB Link-BioTech ExtMan Kit Link-	2 ml	- huile	[3, 23]	- Amplification PCR pour quelques SSR	- ADN non détectable par fluorométrie
Qiagen QIAmp DNA stool kit	0.2-2 ml	- huile	[1, 3, 9, 15, 23]	- Amplification PCR pour quelques SSR	- ADN non détectable par fluorométrie
Méthode officielle suisse pour la lécithine et l'extraction de l'huile	2.5 ml	- huile	[11]		- Faible rendement - Amplification non homogène
GenElute Plant Kit (Sigma), avec	50 ml	- huile	[12]		- ADN dégradé

modifications		- sédiments			- Amplification non homogène
DNeasy Plant mini kit (Qiagen)	1 ml	- huile	[14]	-Amplification RAPD et SSR	- Rendement très faible
Nucleo-Spin Food kit (Macherey Nagel)	2-4.2 ml	- huile	[13, 14]	- Rendement acceptable -Amplification RAPD et SSR	
Nucleo-Spin Plant kit (Macherey Nagel)	1 ml	- huile	[14, 16]	-Amplification RAPD et SSR	- Rendement très moyen
Protocol Hexane	2 ml	- huile	[13, 14, 24]	- Bon rendement - Amplification RAPD et SSR	
Méthode d'extraction CTAB modifiée	1 ml	- huile	[24]	-Rendement moyen	- Tampons toxiques (chloroforme, β mercaptoéthanol, ...)
Méthode CTAB-hexane	1 ml	- huile	[24]	- Simple - Faible rendement	- Tampons toxiques (chloroforme, hexane, β mercaptoéthanol, ...)
Méthode CTAB- hexane-chloroforme	0.5 ml	- huile	[24]	- Bon rendement	- Tampons toxiques (chloroforme, hexane, β mercaptoéthanol, ...)

Sédiments : Dépôt de matériel suite à la décantation de l'huile d'olive.

2. Optimisation d'un nouveau protocole d'extraction d'ADN trace à partir de l'huile d'olive

L'étude de la traçabilité de l'huile d'olive par les méthodes SSRs nécessite la présence de l'ADN au niveau des échantillons des variétés d'huiles étudiées. En effet, l'ADN au niveau des échantillons d'huile existe sous forme de traces dit ADN résiduel (Figure 1), puisque l'huile est un produit obtenu à partir des fruits d'olive après une méthode d'extraction mécanique (broyage, malaxage, centrifugation et décantation).

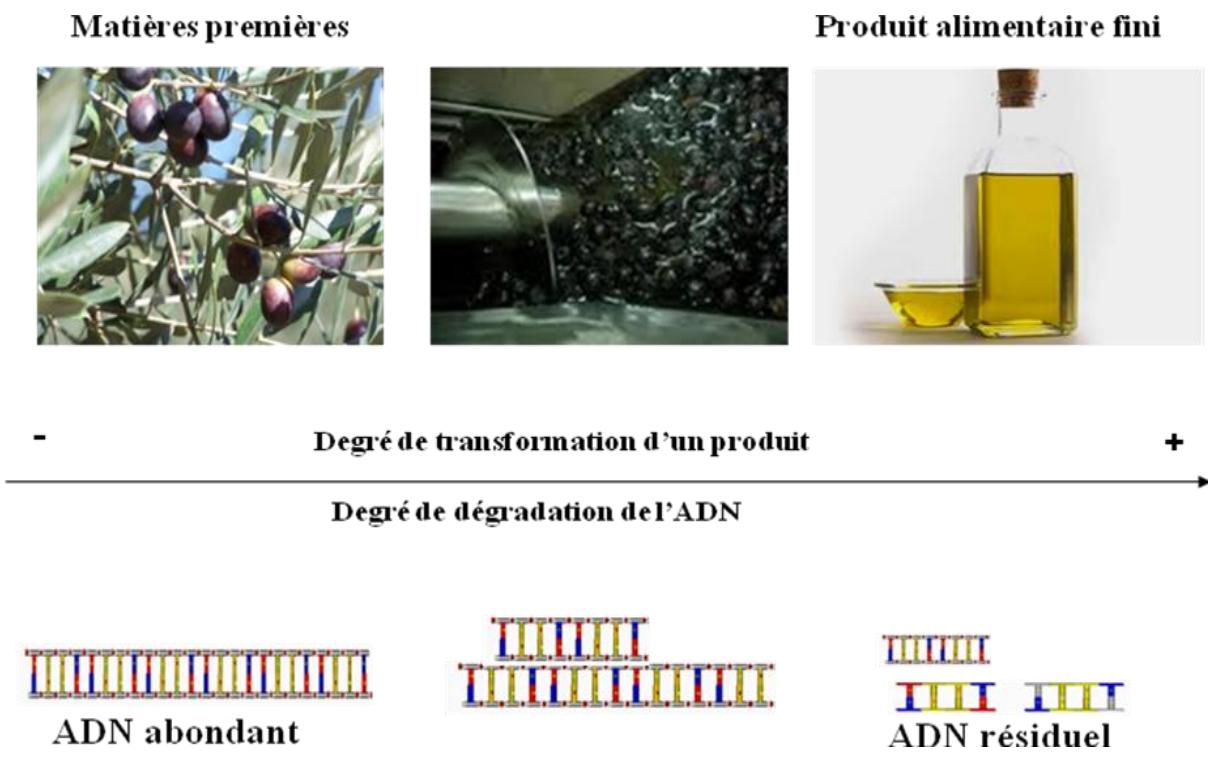


Figure 1. Degré de dégradation de l'ADN lors de l'extraction de l'huile d'olive.

La réussite des SSRs requiert des ADN de bonne qualité. L'étape d'extraction de l'ADN est par conséquent déterminante pour l'accomplissement de nos expériences. Le protocole d'extraction de l'ADN génomique à partir des jeunes feuilles est optimisé par Ben Ayed et al. (2009) [2], tandis que celui à partir de l'huile d'olive est très délicat. En effet, selon certains auteurs [4,5], la présence de composés inhibiteurs ainsi que des ADN dégradés peuvent modifier considérablement la capacité de la Taq DNA polymérase [7, 25]. En plus, Ben Ayed et al. (2009) [2] révèlent que des amplifications non spécifiques peuvent être générées dans le cas de l'utilisation d'un ADN de mauvaise qualité.

Différentes méthodes d'extraction d'ADN à partir des échantillons d'huile d'olive ont été testées (tableau 2). L'ADN a été extrait à partir des échantillons d'huile d'olive en utilisant différents kits et procédés d'extraction. Les performances de ces protocoles ont été évaluées par le succès de l'amplification PCR pour toutes les amorces SSR.

Tableau 2. Protocoles utilisés pour l'extraction d'ADN à partir d'huile.

Procédures d'extraction de l'ADN	Amplification des microsatellites	Références
Protocole en ajoutant de l'eau	Non	--
Wizard kit	Oui (mais inconsistant)	http://www.promega.com
Méthodes CTAB	Non	[10]
Qiagen QIAamp DNA stool	Oui	[2]

Les amplifications PCR étaient non spécifiques avec toutes les méthodes testées. Néanmoins, les résultats les plus reproductibles sont obtenus lorsque l'ADN a été purifié à partir d'huile d'olive à l'aide d'un kit QIAamp DNA stool Kit (Qiagen) en utilisant le protocole (détection de pathogène) (Ben Ayed et al. 2009) avec quelques modifications (augmentation de la durée de l'étape de lyse, 10 minutes à 85°C et augmentation de la vitesse de centrifugation dans toutes étapes à 20000 tours/minute).

L'extraction avec le kit commercial QIAamp Stool kit (Qiagen) est une méthode rapide et exige une faible quantité des échantillons d'huile d'olive (200 µl). Elle permet d'obtenir une pureté de l'ADN satisfaisante, mais la concentration est très faible : moins de 10 ng/µl.

En effet, les quantités d'ADN extrait de l'huile d'olive vierge quantifiées par un spectrophotomètre sont très faibles allant de 5 à 10 ng / µl. Nous avons utilisé ce kit pour examiner la falsification de l'huile d'olive avec d'autres huiles de faible grade ou d'origine végétale. L'usage de ce kit pour l'extraction d'ADN à partir des échantillons d'huile d'olive nécessite un volume d'échantillon qui ne dépasse pas 2 ml (entre 0,2 et 2 ml). Toutefois, Giménez *et al.* (2010) ont testé d'autres protocoles d'extraction d'ADN à partir d'échantillons d'huile d'olive (CTAB, l'hexane, CTAB-hexane et CTAB-hexane-chloroforme) en utilisant un volume de 0,5 à 1 ml. Ces auteurs ont remarqué que l'ADN obtenu était très dégradé et de quantité faible.

Conclusions

Dans le domaine d'authentification et traçabilité des aliments, l'utilisation des technologies basées sur l'ADN possède un intérêt répondant aux besoins des consommateurs. Ces techniques permettent l'utilisation des marqueurs moléculaires, notamment SSR (Simple Sequence Repeat) et SNP (Single Nucleotide Polymorphism) en utilisant surtout la réaction PCR. En effet, ces marqueurs moléculaires sont très utilisés pour étudier la traçabilité de l'huile d'olive. L'efficacité de ces marqueurs dans l'étude de la traçabilité des huiles d'olive dépend de la qualité et de la quantité de l'ADN résiduel extrait.

Références bibliographiques

- [1] Muzzalupo, I., Pellegrino, M., Perri, E., (2007) Detection of DNA in virgin olive oils extracted from destined fruits. *Eur. Food Res. Technol.* 224, 469-475.
- [2] Ben-Ayed, R., Grati, N., Moreau, F., Rebaï, A., (2009) Comparative study of microsatellite profiles of DNA from oil and leaves of two Tunisian olive cultivars. *Eur Food Res Technol* 229, 757– 62.
- [3] Testolin, R., Lain, O., (2005) DNA extraction from olive oil and PCR amplification of microsatellite markers. *J. Food Sci.* 70, 108-112.

- [4] Breton, C., Claux, D., Metton, I., Skorski, G., Berville, A., (2004) Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil samples to identify cultivar SSR alleles in commercial oil samples: possible forensic applications. *J. Agric. Food Chem.* 52, 531-537.
- [5] Ben-Ayed, R., Grati, N., Sans-Grout, C., Moreau, F., Rebai, A., (2012) Characterization and authenticity of virgin olive oil (*Olea europaea* L.) cultivars by microsatellite markers. *Eur Food Res and Tech* 234, 263– 71.
- [6] De la Torre, F., Bautista, R., Cànovas, F.M., Claros, G., (2004) Isolation of DNA from olive oil and sediments: application in oil fingerprinting. *J. Food Agric. Environ.* 2, 84-89.
- [7] Muzzalupo, I., Perri, E., (2002) Recovery and characterization of DNA from virgin olive oil. *Eur. Food Res. Technol.* 214 (6), 528-531.
- [8] Pafundo, S., Busconi, M., Agrimonti, C., Fogher, C. & Marmiroli, N., (2010) Storage-time effects on olive oil DNA assessed by Amplified Fragments Length Polymorphisms. *Food Chemistry* 123, 787–793.
- [9] Spaniolas, S., Bazakos, C., Ntourou, T., Bihmidine, S., Georgousakis, A. & Kalaitzis, P., (2008) Use of lambda DNA as a marker to assess DNA stability in olive oil during storage. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 175-179.
- [10] Busconi, M., Foroni, C., Corradi, M., Bongiorni, C., Cattapan, F., Fogher, C., (2003) DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food Chem.* 83, 127-134.
- [11] Doveri, S., O'sullivan, D.M., Lee, D., (2006) Non-concordance between Genetic Profiles of Olive Oil and Fruit: a Cautionary Note to the Use of DNA Markers for Provenance Testing. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9221-9226.
- [12] Pasqualone, A., Montemurro, C., Summo, C., Sabetta, W., Caponio, F., Blanco, A., (2007) Effectiveness of Microsatellite DNA Markers in Checking the Identity of Protected Designation of Origin Extra Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* 55 (10), 3857–3862.
- [13] Consolandi, C., Palmieri, L., Severgnini, M., Maestri, E., Marmiroli, N., Agrimonti, C., Baldoni, L., Donini, P., De Bellis, G., Castiglioni, G., (2008) A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR-universal array analysis. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 1429–1438.
- [14] Martins-Lopes, P., Gomes, S., Santos, E., Guedes-Pinto, H., (2008) DNA Markers for Portuguese Olive Oil Fingerprinting. *J. Agric. Food Chem.* 56 (24), 11786-11791.
- [15] Spaniolas, S., Bazakos, C., Awad, M. & Kalaitzis, P., (2008a) Exploitation of the chloroplast trnL (UAA) intron polymorphisms for the 554 authentication of plant oils by means of a Lab-on-a-chip capillary electrophoresis system. *J. Agric. Food Chem.* 16, 6886–6891.
- [16] Pafundo, S., Busconi, M., Agrimonti, C., Fogher, C. & Marmiroli, N., (2010) Storage-time effects on olive oil DNA assessed by Amplified Fragments Length Polymorphisms. *Food Chem.* 123, 787–793.
- [17] Cresti, M., Linskens, H.F., Mulcahy, D.L., Bush, S., di Stilio, V., Xu, M.Y., Vigani, R. & Cimato, A., (1997) Comunicación preliminar sobre la identificación del DNA de las hojas y el aceite de oliva de, *Olea Europaea. Olivae.* 69, 36-37.
- [18] Pafundo, S., Agrimonti, C., Marmiroli, N., (2005) Traceability of Plant Contribution in olive oil by Amplified Fragment Length Polymorphisms. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6995-7002.
- [19] Pafundo, S., Agrimonti, C., Maestri, E. & Marmiroli, N., (2007) Applicability of SCAR markers to food genomics: olive oil traceability. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6052– 6059.
- [20] Montemurro, C., Pasqualone, A., Simeone, R., Sabetta, W., Blanco, A., (2008) AFLP molecular markers to identify virgin olive oils from single Italian cultivars. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 1439–1444.
- [21] Bracci, T., Busconi, M., Fogher, C. & Sebastiani, L., (2011) Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis, *Plant Cell. Rep.* DOI 10.1007/s00299-010-0991-9.
- [22] Alba, V., Sabetta, W., Blanco, A., Pasqualone, A. & Montemurro, C., (2009) Microsatellite markers to identify specific alleles in DNA extracted from monovarietal virgin olive oils. *Eur. Food Res. Techno.* DOI 10.1007/s00217-009-1062-8.
- [23] Rabiei, Z., Tahmasebi Enferadi, S., Saidi, A., Patui, S. & Vannozzi, G.P., (2010) SSRs (Simple Sequence Repeats) amplification: a tool to survey the genetic background of olive oils. *Iranian Journal of Biotechnology.* 8(1), 24 – 31.
- [24] Giménez, M.J., Pistón, F., Martín, A. & Atienza, S.G. (2010) Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication. *Food Chem.* 118, 482–487.
- [25] Ben-Ayed, R., Grati, N., and Rebai, A., (2013) An overview of the authentication of olive tree and oil. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12(2), 218–227.