



Institut français de recherche scientifique
pour le développement en coopération

Centre
de
Montpellier

ANALYSE PRÉLIMINAIRE
PAR ISOENZYMES ET RAPD
DE LA VARIABILITÉ DES SOUCHES
DE *LEISHMANIA INFANTUM*
ISOLÉES CHEZ DES PATIENTS VIH (+)

Marie-Thérèse BAÏXENCH

Marie-Thérèse BAÏXENCH

ANALYSE PRÉLIMINAIRE
PAR ISOENZYMES ET RAPD
DE LA VARIABILITÉ DES SOUCHES
DE *LEISHMANIA INFANTUM*
ISOLÉES CHEZ DES PATIENTS VIH (+)

Les opinions exprimées dans ce document
n'engagent que la responsabilité de leurs auteurs

Ce travail de recherche a été effectué au sein de l'UMR CNRS-Orstom n° 9926 "Génétique moléculaire des parasites et des vecteurs" (UR des maladies infectieuses et parasitaires; département Eau et Santé) du centre de recherche Orstom de Montpellier sous la direction du Dr Michel Tibayrenc, directeur de l'UR, pour l'obtention par Marie-Thérèse Baïxench du diplôme d'études approfondies de parasitologie de l'université des sciences et techniques du Languedoc-Montpellier II, le 4 juillet 1994.

UNIVERSITE LILLE II

**Diplôme d'Etudes Approfondies
de Parasitologie**

Mémoire de stage

**Analyse préliminaire par isoenzymes et RAPD
de la variabilité de souches de
Leishmania infantum isolées chez des patients VIH (+).**

présenté par

Marie Thérèse BAIENCH

le 4 Juillet 1994

Laboratoires d'accueil :

- Unité Mixte de Recherche ORSTOM/CNRS 9926 : Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs, Montpellier.
- Laboratoire de Parasitologie Médicale et d'Ecologie Humaine, Faculté de Médecine Toulouse-Purpan.

Responsable de stage : Dr M Tibayrenc.

TABLE DES MATIERES

RESUME1
SUMMARY2
INTRODUCTION3
GENERALITES4
I - Le parasite4
II - Le foyer méditerranéen4
III - Leishmaniose : infection opportuniste5
IV - Co-infections leishmaniose-VIH5
MATERIEL ET METHODES6
I - Parasites6
II - Méthodes.....	..6
1 - Culture6
2- Electrophorèse isoenzymatique8
2-1: Principe8
2-2: Technique.....	..9
3- Amplification par amorces aléatoires ou RAPD.....	10
3-1 : Principe	10
3-2: Extraction de l'ADN génomique.....	10
3-3 : Amplification	10
4- Méthodes d'analyse	11
4-1: Evaluation et visualisation des distances génétiques	11
4-2: Analyse de génétique des populations	12
RESULTATS	14
I - Résultats pour l'ensemble des souches étudiées	14
1 - Isoenzymes.....	14
2 - RAPD.....	14
3 - Relations phylogénétiques	14
4 - Corrélation entre les 2 techniques.....	14

II- Souches <i>L. infantum</i> isolées chez des sujets VIH (+) (22 souches)....	15
1: Variabilité génétique de l'échantillon.....	15
1-1 - Isoenzymes.....	15
1-2- RAPD.....	15
2 : Analyse de génétique des populations	15
2-1 : Analyse du déséquilibre de liaison	15
2-2 - Analyse de la ségrégation	16
3 : Relations phylogénétiques	16
3-1- Isoenzymes.....	16
3-2- RAPD.....	16
DISCUSSION.....	20
I - Analyse de génétique des populations	20
II - Polymorphisme mis en évidence. Résolution des techniques	21
III - Valeur du marquage RAPD - Caractères synapomorphes.....	22
PROJET.....	24
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	27
ANNEXE 1 : Résultats obtenus par l'électrophorèse des isoenzymes.....	32
ANNEXE 2 : Résultats obtenus par RAPD	33

RESUME

22 souches de *Leishmania infantum* isolées de patients VIH (+) dans le Sud de la France, en Italie, en Espagne et en Corse ont été analysées par électrophorèse des isoenzymes multilocus sur acétate de cellulose et par amplification de l'ADN par amorces aléatoires (RAPD). Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus pour des souches de référence appartenant à la même espèce ou à des espèces différentes.

Tant les isoenzymes que les RAPD ont montré un pouvoir de résolution plus fort que celui des méthodes employées jusqu'ici. En particulier, il a été possible de subdiviser le zymodème MON-1 en plusieurs génotypes additionnels, ce qui permettra d'affiner les études épidémiologiques et pathogéniques faisant appel au typage des souches. Cependant, la variabilité des souches isolées de patients VIH (+) s'est révélée très faible.

Chez ces mêmes souches, il n'a pas été possible de mettre en évidence d'écart probant par rapport aux prédictions panmictiques. Il n'est pas possible à l'heure actuelle de savoir si ce résultat est imputable à des échanges sexuels fréquents ou, plus simplement, au fait que la faible variabilité de ces souches diminue la résolution des tests statistiques.

Cette étude a confirmé la valeur du RAPD comme marqueur phylogénique (excellente concordance avec les données enzymatiques), et a permis d'identifier plusieurs fragments RAPD dont la spécificité phylogénique pourra être mise à profit pour élaborer des sondes spécifiques d'espèces ou de souches.

SUMMARY

22 *Leishmania infantum* stocks isolated from HIV (+) patients in Southern France, Italy, Spain and Corsica have been analysed by Cellulose Acetate Multilocus Enzyme Electrophoresis and Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD). These results have been compared to those obtained on reference stocks belonging either same species or to different species.

Isozymes as well as RAPD proved to have a higher resolution than the methods formerly used. Specifically, it has been possible to subdivide the MON-1 zymodeme into some additional genotypes, which will make it possible to refine those epidemiological and pathogenical studies that rely upon strain typing. Nevertheless, the variability of stocks taken from VIH (+) patients remained very low.

In these stocks, it has been impossible to evidence any telling departure from panmictic expectations. It is presently impossible to decide whether this result is explainable by frequent sexual exchanges, or more simply, by the fact that the limited variability of these stocks lowers the resolution of the statistical tests.

This study confirmed the validity of RAPD as phylogenetic markers (excellent parity with isoenzyme data), and made it possible to identify several RAPD fragments which phylogenetic specificity can be taken advantage of to design probes specific of species or strains.

INTRODUCTION

La structure des populations de protozoaires en général, et des *Leishmania* en particulier, fait actuellement l'objet de débats (1-2-3-4). La question débattue concerne les impacts respectifs de la reproduction sexuée (au sens large du terme : toute modalité d'échanges génétiques) et de la propagation uniparentale sur la structure des populations naturelles de parasites. Si les échanges génétiques sont très fréquents (modèle potentiellement "panmictique"), les génotypes parasitaires sont instables, ne durent que le temps d'une génération, et ne peuvent donc être utilisés comme marqueurs épidémiologiques. Si au contraire, la propagation uniparentale est prépondérante ("modèle clonal"), les génotypes se comportent comme des clones naturels, stables dans l'espace et le temps. Ils peuvent être utilisés comme marqueurs épidémiologiques.

Le modèle clonal ne stipule pas que la recombinaison est absente, mais seulement qu'elle est rare. La question de l'évaluation de la "dose de sexe" est primordiale : ce paramètre conditionne la stabilité des génotypes parasitaires et donc leur importance épidémiologique.

Dans le cadre de ce débat, l'association *Leishmania*/VIH (virus de l'immunodéficience humaine) apporte un cas de figure potentiellement riche en informations. En effet, une hypothèse de travail plausible est que la structure des populations parasitaires est considérablement modifiée par l'immunodépression : des génotypes parasitaires normalement éliminés par les défenses immunitaires parviendraient à se développer chez les patients VIH (+). La population parasitaire chez ces patients constituerait donc un reflet plus fidèle de la variabilité génétique réelle du parasite étudié.

Le but principal de ce travail a été d'explorer la structure génétique des populations de *Leishmania infantum* chez des patients VIH (+). Accessoirement, ce travail a recherché des moyens de caractérisation génétique des souches de cette espèce plus résolutifs que ceux employés jusqu'à présent.

GENERALITES

I - Le parasite :

Les leishmanioses sont des parasitoses provoquées par des protozoaires du genre *Leishmania* (ordre des *Kinetoplastida*, famille des *Trypanosomatidae*) et transmises par des insectes diptères hématophages : les phlébotomes. Ces affections présentent des formes cliniques diverses qui diffèrent sensiblement par leur gravité. Leur aire de répartition englobe tous les continents sauf l'Australie et l'Antarctique.

L'agent pathogène existe sous 2 formes. La forme promastigote est retrouvée dans le tube digestif du vecteur, elle est extracellulaire et mobile, c'est la forme infestante transmise par la piqûre de l'insecte. La forme amastigote est retrouvée chez l'hôte vertébré (Homme, Canidés,...), elle est intracellulaire et parasite les cellules monocytaires (monocytes, macrophages, histiocytes).

Les différentes espèces de leishmanies sont morphologiquement indiscernables. Leur classification a reposé sur des critères extrinsèques (épidémiologie, expression clinique). Elle a été confirmée ultérieurement par l'analyse de critères intrinsèques (la caractérisation par électrophorèse des isoenzymes est la technique la plus couramment utilisée) (5).

Leishmania infantum, espèce étudiée dans ce travail, a été définie d'abord comme l'agent de la leishmaniose viscérale infantile dans les régions du pourtour de la Méditerranée. L'identité de ce taxon a été, par la suite, corroborée par le marquage isoenzymatique (5).

II - Le foyer méditerranéen :

Il englobe tout le littoral méditerranéen. En France, les principaux foyers sont la Provence-Côte d'Azur, les Cévennes, le foyer catalan et la Corse. Les Canidés (le chien essentiellement) constituent le réservoir. *L. infantum* détermine des leishmanioses viscérales et cutanées. Sur la base d'études isoenzymatiques, 20 zymodèmes différents ont été retrouvés chez l'homme (5-6-7). Parmi ceux-ci, la différenciation en zymodèmes viscérotropes et dermatropes est généralement admise (8).

III - Leishmaniose : infection opportuniste :

L'existence de leishmanioses latentes est aujourd'hui un fait admis. Le nombre de sujets asymptomatiques serait de 5 pour 1 cas déclaré (9).

Le développement des thérapeutiques immunodépressives et surtout l'extension de l'épidémie du SIDA ont révélé le caractère opportuniste de la leishmaniose. Pour ces patients, la maladie peut être due à la réactivation d'une infection latente (10). Le facteur de risque majeur est l'immunodépression cellulaire associée au déficit de production d'interféron- γ (11-12).

IV - Co-infections leishmaniose-VIH :

La première observation de co-infection *Leishmania*-VIH (virus de l'immunodéficience humaine) a été publiée par De la Loma et al. en 1985 (13). Depuis, le nombre de publications rapportant ce type de cas s'est multiplié. Elles concernent principalement 3 pays : l'Espagne (14), la France (15), et l'Italie (6). Dans cette zone, la prévalence de la leishmaniose viscérale pour la population VIH (+) a été évaluée entre 1 et 5% (14). Pour ces patients, les formes cliniques sont souvent atypiques, parfois pauci-symptomatiques, avec possibilité de localisations inhabituelles (tube digestif, poumon); les rechutes sont fréquentes (16-17-18). Le diagnostic est souvent difficile malgré la richesse de formes parasitaires circulantes (19-20) : les sensibilités de l'examen direct et de la culture de moelle osseuse ont été estimées respectivement à 71% et 75% (21).

La caractérisation des souches a montré une situation nouvelle : leur variabilité est supérieure à celle rencontrée chez le sujet immunocompétent avec possibilité de viscéralisation pour les souches dermatropes et apparition de nouveaux zymodèmes (MON-136 et MON-183) (6-7). Ceci va dans le sens de l'hypothèse de travail exposée dans l'introduction.

MATERIEL ET METHODES

I - PARASITES :

L'étude a porté sur 22 souches de *L. infantum* (tableau I) isolées à partir de prélèvements de moelle osseuse de patients HIV (+) ayant présenté une leishmaniose viscérale. Elles ont été isolées dans 4 laboratoires hospitaliers (Marseille, Toulouse, Nice et Montpellier) entre 1991 et 1994. Le lieu probable de la contamination a été déterminé par l'interrogatoire des patients.

Treize souches de référence ont été incluses dans ce travail : 5 souches de *L. infantum* comprenant 2 zymodèmes viscéraux (MONTPELLIER (MON)-1, MON-28) et 3 zymodèmes dermatropes (MON-24, MON-29, MON-33); et 7 souches de leishmanies de l'Ancien Monde (*L. major*, *L. tropica*, *L. donovani*) et du Nouveau Monde (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. chagasi*) (tableau II). L'introduction d'espèces différentes de *L. infantum* visait à constituer des "outgroups" pour élaborer des phylogénies plus fiables.

Aucune souche n'a été préalablement clonée.

II - METHODES :

1 - Culture : les souches décongelées ont été mises en culture à 25°C sur le milieu biphasique NNN (phase solide : 90% de gélose, 10% de sang de lapin frais décomplémenté et 10 000 UI/ml Pénicilline G; phase liquide : 80% de milieu RPMI 1640, 20% de sérum de veau foetal décomplémenté). Lorsque les cultures ont été riches en formes promastigotes, elles ont été mises en culture en milieu axénique RPMI 1640 contenant du sérum de veau foetal décomplémenté (20%), de la glutamine (2mM) et de la Pénicilline G (10 000 UI/ml). Les cultures de masse ont été pratiquées par addition progressive de milieu de culture jusqu'à un volume de 200 ml. Les parasites ont été récoltés par centrifugation (1800 g; 30 min; +4°C), lavés 3 fois avec du tampon PBS et centrifugés (1800 g les 2 premiers lavages et 5000 g au dernier lavage). Les culots secs ont été pesés et congelés à -70°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau I : Souches de *L. infantum* isolées chez des patients VIH (+)

STOCK	Date d'isolement	Laboratoire d'isolement	Lieu probable de contamination	Zymodèmes*
LEM 2298	1991	Montpellier	Valencia	MON-183
LEM 2355	1991	Toulouse	Valencia	MON-183
LEM 2572	1992	Toulouse	Italie	MON-1
LEM 2301	1992	Toulouse	Marseille	MON-1
LEM 2667	1993	Toulouse	Madrid	MON-1
LPN 83	1992	Nice	Corse	MON-1
LPN 92	1993	Nice	Nice	MON-1
LPN 94	1993	Nice	Nice	MON-1
LPN 99	1993	Nice	Nice	MON-1
M 6	1990	Marseille	Marseille	NC**
M 10	1990	Marseille	Marseille	NC
M 5	1992	Marseille	Marseille	NC
M 2	1993	Marseille	Marseille	NC
M 3	1993	Marseille	Marseille	NC
M 4	1993	Marseille	Marseille	NC
M 7	1993	Marseille	Marseille	NC
M 8	1993	Marseille	Marseille	NC
M 9	1993	Marseille	Marseille	NC
M 11	1993	Marseille	Marseille	NC
M 12	1993	Marseille	Marseille	NC
M 13	1993	Marseille	Marseille	NC
M 1	1994	Marseille	Marseille	NC

* Caractérisation effectuée par le Laboratoire d'Ecologie Médicale de la Faculté de Médecine de Montpellier I, centre de référence OMS.

** Non connu

Tableau II : Souches de référence

Espèce	Code International	Zymodèmes
<i>Leishmania infantum</i> LEM 75	MHOM/FR/78/LEM75	MON-1
<i>Leishmania infantum</i> LEM 2205	MHOM/ES/90/BCN61	MON-28
<i>Leishmania infantum</i> LEM 307	MHOM/ES/81/BCN1	MON-29
<i>Leishmania infantum</i> LEM 356	MHOM/FR/82/LEM356	MON-33
<i>Leishmania infantum</i> LEM 417	MHOM/DZ/82/LIPA59	MON-24
<i>Leishmania donovani</i>	MHOM/ET/67/LRC-L133	NC
<i>Leishmania chagasi</i>	MHOM/BR/74/PP75	NC
<i>Leishmania tropica</i>	MHOM/SU/74/SAF-K27	NC
<i>Leishmania major</i>	MHOM//SU/73/5ASKH	NC
<i>Leishmania braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M 2903	NC
<i>Leishmania guyanensis</i>	MHOM/BR/78/M 5378	NC
<i>Leishmania amazonensis</i>	MHOM/BR/73/M 2269	NC

Les études isoenzymatiques et moléculaires ont été pratiquées à partir d'un **même** culot parasitaire, ce qui est essentiel pour des comparaisons fiables. Les culots parasitaires ont été repris par un volume de stabilisateur d'enzyme (dithiothréitol 1mM; acide amino-caproïque 1mM; EDTA pH 8, 1mM) égal au poids du culot sec. Après lyse partielle (20 min; +4°C), les parasites ont été centrifugés (5000 g; +4°C) : le surnageant a été utilisé pour l'étude des isoenzymes et le culot pour l'étude moléculaire. Les 2 fractions ont été conservées à -70°C.

2 - Electrophorèse isoenzymatique :

2-1 : Principe : Les enzymes sont des protéines amphotères présentant une ionisation différente selon le pH du milieu. Sous l'action d'un champ électrique, on observe

des bandes de mobilité différente. Ces écarts de migration sont dus à une différence de la charge électrique globale des protéines (elle correspond à l'addition de la charge électrique des différents acides aminés constituant sa structure primaire).

La structure primaire d'une protéine est le résultat direct de la séquence des gènes qui codent pour elle. En règle générale, la variabilité isoenzymatique représente un moyen de sondage fiable de la variabilité génétique. Cependant, certaines différences de migration peuvent être dues à des modifications post-traductionnelles de la protéine. Par ailleurs, de nombreuses mutations n'aboutissent pas à des modifications de charge électrique des protéines impliquées et demeurent donc muettes à l'électrophorèse. La technique isoenzymatique permet de détecter un tiers des mutations ponctuelles (22).

Pour les organismes dont la ploïdie est connue, une interprétation allélique (détermination du génotype) peut être déduite du phénotype observé.

2-2 : Technique : Elle a été pratiquée sur plaques d'acétate de cellulose (Helena, Beaumont, Texas, USA) selon les techniques décrites par Abderrazak et al. (23). Quinze systèmes enzymatiques ont été étudiés : aconitase hydratase (ACON : E.C.4.2.1.3.), alanine aminotransférase (ALAT : E.C.2.6.1.2.), glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD : E.C.1.1.1.49.), glucose-phosphate isomérase (GPI : E.C.5.3.1.9.), aspartate aminotransférase (GOT : E.C.2.6.1.1.), isocitrate déshydrogénase (IDH: E.C.1.1.1.42.), malate déshydrogénase (MDH : E.C.1.1.1.37.), enzyme malique (ME : E.C.1.1.1.40.), mannose-phosphate isomérase (MPI : E.C.5.3.1.8.), nucléoside hydrolases 1 et 2 (NH1 et NH2 : E.C.2.4.2.), phosphogluconate déshydrogénase (6PGD : E.C.1.1.1.44.), phosphoglucomutase (PGM : E.C.2.7.5.1.), peptidases 1 et 2 (PEP1 et PEP2 : E.C.3.4.13.). Par rapport aux techniques originelles, les modifications suivantes ont été apportées afin d'améliorer la lecture des plaques : l'extrait enzymatique a été dilué au 1/6 pour la GPI; le tampon d'imbibition pour les peptidases a été dilué au 1/2.

A la fin de la migration, la révélation des bandes protéiques s'est faite sur milieu solide : l'interaction de l'extrait enzymatique avec le substrat inclus dans un gel d'agarose (1,2%) a entraîné l'apparition de bandes. Elles ont été codées selon leur vitesse de migration : l'électromorphe le plus rapide a été noté 1; le deuxième, 2; et ainsi de suite. Les souches présentant les mêmes électromorphes pour l'ensemble des enzymes testées ont constitué un zymodème.

3 - Amplification par amorces aléatoires ou RAPD (Random Amplification Polymorphism DNA) :

3-1 : Principe : il est basé sur la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction). A la différence de la technique PCR classique, le RAPD repose sur l'utilisation d'amorces dont la séquence (10 paires de bases) est déterminée de façon aléatoire; les conditions d'appariement sont rendues moins stringentes (24-25). Au cours de l'amplification, l'amorce s'hybride à des séquences complémentaires sur les 2 brins de l'ADN dénaturé; la Taq polymérase synthétise les brins complémentaires de l'ADN ainsi encadré. Cette méthode génère des fragments dont le polymorphisme peut être analysé sur gels d'agarose.

La résolution du RAPD est potentiellement très grande. En effet, le nombre d'amorces différentes pouvant être utilisées est lui-même virtuellement illimité (800 amorces sont actuellement commercialisées). Dans le cas des protozoaires parasites, chaque amorce détermine un polymorphisme spécifique pour une série de souches données (26).

3-2 : Extraction de l'ADN génomique : elle a comporté 3 étapes :

a) la lyse des parasites : les culots parasitaires ont été incubés dans 400 μ l de tampon de lyse (Tris-HCl pH 8, 10mM; EDTA 1mM; SDS 1% (P/V)) à 56°C pendant 1 nuit en présence de protéinase K (100 μ g/ml).

b) la déprotéinisation : l'ADN a été extrait par 2 extractions au phénol et 2 extractions au chloroforme (V/V) (centrifugations à 12 000g; 5 min; +4°C).

c) la précipitation de l'ADN à l'éthanol à -70°C pendant 1 h.

Après séchage et dissolution dans l'eau Milli Q stérile, la concentration d'ADN a été dosée par spectrophotométrie (pic maximal d'absorption de l'ADN à 257 nm; 1 unité de DO représentant une concentration de 50 μ g/ml). L'ADN en solution a été conservé à -20°C, des solutions à 100ng/ml ont été préparées et conservées à +4°C.

3-3 : Amplification : elle a été effectuée selon la technique décrite par Williams et al. (25). Les 7 amorces utilisées ont été celles définies par Operon Technologies et testées par Tibayrenc (26):

A1 : CAGGCCCTTC; **A2** : TGCCGAGCTG; **A4** : AATCGGGCTG; **A5** : AGGGGTCTTG;
A7 : GAAACGGGTG; **A10** : GTGATCGCAG; **A12** : TCGGCGATAG.

Les amplifications ont été réalisées sur un thermocycleur automatique à couvercle chauffant (PTC-100). Le programme d'amplification comprenait 45 cycles de 3 segments chacun : dénaturation (1min à 94°C), appariement (1min à 36°C) et synthèse (2 min à 72°C); terminé par 1 cycle final d'élongation (7min à 72°C). Vingt ng d'ADN ont été amplifiés dans 100 µl de milieu réactionnel : Tris-HCl pH 8,3, 10mM; MgCl₂(6H₂O) 1,5mM; KCl 50mM; dNTP : 0,1mM de chaque; amorce : 5nM; Taq polymérase (Boehringer Mannheim) : 1,5 unités. Les échantillons ont été maintenus à +4°C jusqu'à leur analyse. Les produits amplifiés ont été séparés selon leur taille sur gel d'agarose (1,6%), à 120 volts. Ils ont été visualisés sous lumière UV en présence de bromure d'éthidium (0,5 µg/ml).

Chaque fragment d'ADN a été codé : le plus lent, correspondant au fragment le plus lourd, a été nommé 1; le deuxième, 2; et ainsi de suite. L'intensité du signal a été estimée sur une échelle de 3 (3 pour les bandes majeures). Les souches présentant les mêmes profils (en ne tenant pas compte de l'intensité des bandes) pour l'ensemble des amorces testées ont été classées dans un même rapdème.

4 - Méthodes d'analyse :

4-1 : Evaluation et visualisation des distances génétiques :

Deux indices de distance ont été utilisés pour établir les degrés de dissemblance entre les zymodèmes et les rapdèmes.

La distance de Jaccard (27) ne recense que la présence ou l'absence de bandes, sans tenir compte de leur intensité. Elle se calcule selon la formule:

$$D_j = 1 - (C / 2N - C)$$

dans laquelle C est le nombre de bandes communes entre 2 génotypes; N est le nombre total de bandes dans les 2 génotypes comparés. La distance de Jaccard a été utilisée pour les données isoenzymatiques et RAPD.

L'autre distance a été uniquement utilisée pour les résultats RAPD. Elle prend en compte non seulement la présence de bandes, mais également leur intensité. Il est probable que cette dernière ait une certaine importance phylogénique dans le cas de données moléculaires. Cette distance (28) est basée sur la formule $D = 1 - S_{AB}$ avec :

$$S_{AB} = \frac{\sum_{i=1}^k (a_i + b_i - |a_i - b_i|)}{\sum_{i=1}^k (a_i + b_i)}$$

dans laquelle a_i et b_i sont les intensités (codées de 1 à 3) des bandes i dans les profils A et B respectivement, et k le nombre de bandes.

Les 2 types de distances ont été calculés sur ordinateur : la distance de Jaccard a été évaluée grâce au logiciel Taxonomie (29). La deuxième distance a été calculée grâce à un nouveau logiciel élaboré au sein de l'UMR ORSTOM/CNRS 9926 (Tibayrenc).

Pour les 2 types de distances, des dendrogrammes UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages) (30) ont été élaborés. Ils constituent un résumé visuel des matrices des distances.

4-2 : Analyse de génétique des populations :

Les 2 conséquences de la reproduction sexuée sont la ségrégation des allèles à un locus donné et la recombinaison des génotypes d'un locus à l'autre. L'absence de l'une ou de l'autre sont des arguments indirects en faveur d'obstacle au flux génique (ou écart à la panmixie). Dans tous les tests, la panmixie est prise comme hypothèse nulle, car c'est la seule situation dont les prédictions statistiques théoriques soient clairement codifiées. Les analyses permettant de rejeter l'hypothèse panmictique sont des tests statistiques étudiant les phénomènes de recombinaison et de ségrégation (2).

La ségrégation est explorée par la statistique classique de Hardy-Weinberg. Soit un gène auquel ségrègent 2 allèles a et b . La fréquence de a est p , celle de b est $q = 1 - p$. La loi de Hardy-Weinberg prédit que, dans une population panmictique, les fréquences des 3 génotypes possibles : a/a , a/b et b/b seront respectivement de p^2 , $2pq$ et q^2 . Les tests de ségrégation présentent l'inconvénient de nécessiter que le degré de ploïdie soit connu, que les allèles et les loci aient été individualisés et que l'organisme ne soit pas haploïde.

Les tests de recombinaison permettent de s'affranchir totalement de ces impératifs, ce qui les rend extrêmement robustes (2-3-26). Dans une population panmictique, la

fréquence théorique d'un génotype multilocus est égale au produit des fréquences observées des génotypes unilocus qui la constituent. L'association non aléatoire de 2 loci constitue un déséquilibre de liaison. Une série de tests complémentaires explorant différentes facettes du déséquilibre de liaison ont été conçus et informatisés en Turbo-Pascal (2).

- test d1: il calcule la probabilité (par analyse combinatoire) d'obtenir, par hasard et dans une population panmictique, un génotype multilocus donné avec un effectif égal ou supérieur à celui qui est observé dans l'échantillon observé.

- test d2 : il calcule, à partir des fréquences unilocus observées, la probabilité d'obtenir un génotype multilocus quelconque avec une fréquence égale ou supérieure à celle du génotype multilocus le plus fréquent dans la population étudiée.

- test e : il calcule la probabilité d'obtenir un nombre de génotypes multilocus différent égal ou inférieur à ce qui est effectivement observé dans la population.

- test f : il calcule la probabilité d'obtenir un niveau de déséquilibre de liaison supérieur ou égal à celui observé dans la population étudiée.

Les tests d2, e et f reposent sur des simulations Monte Carlo (1000 simulations).

- test g : il repose sur la corrélation observée entre marqueurs génétiques différents dans une population donnée. Il s'agit d'un cas particulier de déséquilibre de liaison.

Dans le cas des RAPD, une interprétation spéciale doit être menée (26). En effet, en l'absence d'expériences de croisements, cette technique ne permet pas d'individualiser les loci. Cependant, la probabilité que 2 amorces différentes révèlent le polymorphisme d'un même locus est considérée comme négligeable (McClelland, communication personnelle). La variabilité mise en évidence par des amorces différentes concerne des loci indépendants. Les tests de recombinaison peuvent donc être pratiqués. Pour une amorce donnée, chaque profil différent est assimilé à un génotype élémentaire unilocus distinct dont la composition en allèles et loci demeure hypothétique. Une série d'amorces révélera des génotypes composites dont la fréquence théorique est égale au produit des fréquences observées des génotypes élémentaires qui les composent.

RESULTATS

Tous les résultats se sont révélés reproductibles pour les 2 techniques utilisées.

I - Résultats pour l'ensemble des souches étudiées:

1 - Isoenzymes : Seize loci enzymatiques ont été mis en évidence (présence de 2 loci pour le système enzymatique NH1 : *Nh1a* et *Nh1b*). Les 16 loci se sont révélés polymorphes. Pour l'espèce *L. infantum*, une interprétation allélique des profils obtenus a été possible seulement avec la *Pep1* (enzyme monomérique (31)); pour toutes les autres enzymes, elle a été impossible (présence d'une bande unique le plus fréquemment ou de profils complexes).

2 - RAPD : Toutes les amorces ont montré de la variabilité. Les profils observés pour les souches du complexe *donovani* (*L. infantum*, *L. donovani* et *L. chagasi*) ont été très similaires les uns par rapport aux autres, et nettement différenciés de ceux vus avec les autres espèces. De plus, les bandes majeures (intensité 3) générées par les amorces A1, A2, A5, A7, A10 ont été constamment retrouvées pour toutes les souches appartenant au complexe *donovani*. Les profils générés par l'amorce A7 ont été monomorphes pour les souches *L. infantum* (mêmes bandes avec intensité identique).

3 - Relations phylogénétiques : Les souches du complexe *donovani* ont été bien séparées des souches appartenant aux autres espèces (figures 1 et 2). Par RAPD, la pondération de la valeur des bandes en fonction de l'intensité (RAPD-intensité) a réduit les écarts entre les souches appartenant au complexe *donovani* (RAPD : distance génétique maximale entre souches de 0,6; RAPD-intensité : distance maximale de 0,4).

4 - Corrélation entre les 2 techniques : Le coefficient de corrélation a été calculé à partir des matrices de distances établies pour les 34 souches (561 couples de données); il a été de 0,951 (degré de liberté (ddl) = 559; $p < 10^{-4}$) entre données isoenzymatiques et RAPD et de 0,953 ($p < 10^{-4}$) entre les résultats isoenzymes et RAPD-intensité.

II - Souches *L. infantum* isolées chez des sujets VIH (+) (22 souches) :

1 : Variabilité génétique de l'échantillon :

1-1 - Isoenzymes: sur les 16 loci étudiés, 5 loci seulement se sont révélés polymorphes (photos 1 et 2) : *G6pd*, *Gpi*, *Mdh*, *Pep1* et *Alat*; 6 génotypes multilocus ou zymodèmes (Z) ont été définis : Z1 : 16 souches; Z2 : 2 souches; Z3, Z4, Z5 et Z6 : 1 souche chacun. La variabilité génotypique (nombre de génotypes différents / nombre de souches) a été de 0,27.

Pour les souches sympatriques (17 souches du foyer Provence-Côte d'Azur), la variabilité génotypique a été de 0,24 avec 4 génotypes multilocus distincts (13 souches dans le même zymodème).

Le même génotype multilocus Z1 a été retrouvé pour des souches d'origines supposées différentes (Provence-Côte d'Azur, Italie et Corse).

1-2 - RAPD : chaque souche a été caractérisée par un génotype multilocus différent. La variabilité a été produite par 6 amorces (les profils obtenus par l'amorce A7 ont été monomorphes). Seule l'amorce A12 (photo 4) a été variable sur les bandes majeures; elle a différencié 3 souches (M4, M11 et M13). Pour les 5 autres amorces, la variabilité a été créée par la présence ou l'absence de bandes mineures (intensité des bandes 1 ou 2) (photo 3).

2 : Analyse de génétique des populations :

Elle a été réalisée préférentiellement sur l'échantillon composé par les 17 souches provenant du foyer Provence-Côte d'Azur. En effet, pour que ces analyses soient rigoureuses, il faut se rapprocher le plus possible des conditions de sympatrie.

2-1 : Analyse du déséquilibre de liaison :

Aucun test (d1, d2, e, f et g) n'a été significatif sur l'échantillon sympatrique. Pour les données RAPD, l'absence de génotypes répétés a invalidé les tests d1, d2, e; le test f n'a pas été significatif.

Le coefficient de corrélation (test g) est devenu significatif pour les souches de l'échantillonnage VIH (+) dans son ensemble (isoenzymes-RAPD : coefficient de corrélation $(r)=0,142$, $ddl=229$, $p=0,0314$; isoenzymes-RAPD intensité : $r=0,162$, $p=0,0137$). Cependant, dans ce dernier cas, les conditions de sympatrie n'ont pas été respectées, ce qui pose des problèmes d'interprétation (voir discussion).

2-2 - Analyse de la ségrégation (équilibre de Hardy-Weinberg) :

Pour le locus *Pep1*, les fréquences des 2 allèles calculées pour les souches sympatriques ont été de 0,44 (15/34) et de 0,56 (19/34). Quinze hétérozygotes ont été observés; le nombre attendu d'après la loi de Hardy-Weinberg a été de 8,37. L'excès d'hétérozygotes observés a été statistiquement significatif ($\chi^2 = 10,62$; ddl=1; $p < 0,01$).

3 : Relations phylogénétiques :

Les distances génétiques entre les différentes souches de notre échantillon, visualisées par les dendrogrammes construits à partir des données isoenzymes et RAPD, ont été faibles (distances maximales de 0,2) (figure 1 et 2).

3-1 - Isoenzymes : Un groupe comprenant 19 souches sur les 22 constituant l'échantillon (distances génétiques internes à ce groupe inférieures à 0,1) a été différencié (figure 1). Parmi les 7 souches de notre échantillon préalablement identifiées comme appartenant au zymodème MON-1 (tableau I), 3 génotypes distincts du génotype de la souche de référence (LEM 75) ont été retrouvés; 2 génotypes (6/7 souches) ont été placés sur le rameau principal du dendrogramme très proches de la souche de référence. La souche LEM 2667-MON-1 a été individualisée : elle avait été isolée chez une patiente espagnole ayant séjourné dans plusieurs pays d'Amérique latine et d'Afrique. Les souches MON-183 se sont retrouvées dans un zymodème séparé. Seule la souche de référence LEM 2205-MON-28 n'a pas été clairement différenciée; elle a été placée près des souches MON-1.

3-2 - RAPD : Cette méthode d'analyse s'est montrée plus résolutive que les isoenzymes. Cependant, les distances génétiques entre les souches n'ont pas été supérieures à celles observées par cette dernière méthode. Sur le dendrogramme (figure 2), un groupe de 15 souches s'est détaché. Il a réuni toutes les souches MON-1 ainsi que la souche de référence. Les souches MON-183 ont été classées à part sur un même rameau. Par rapport aux données obtenues par l'étude des isoenzymes, 5 souches provenant de Marseille ont été exclues du rameau principal; 3 d'entre elles ont été situées sur le même rameau que la souche de référence MON-28 non différenciée par l'étude isoenzymatique.

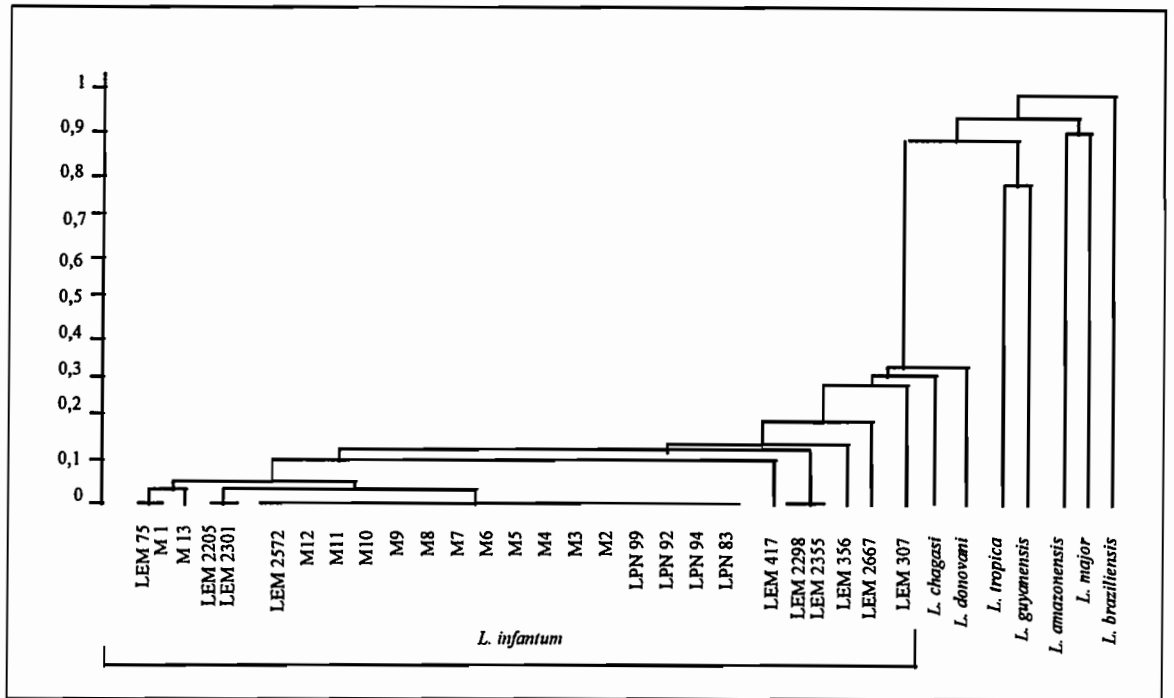


Figure 1 : Dendrogramme construit à partir de la matrice des distances calculée d'après les données de l'électrophorèse des isoenzymes.

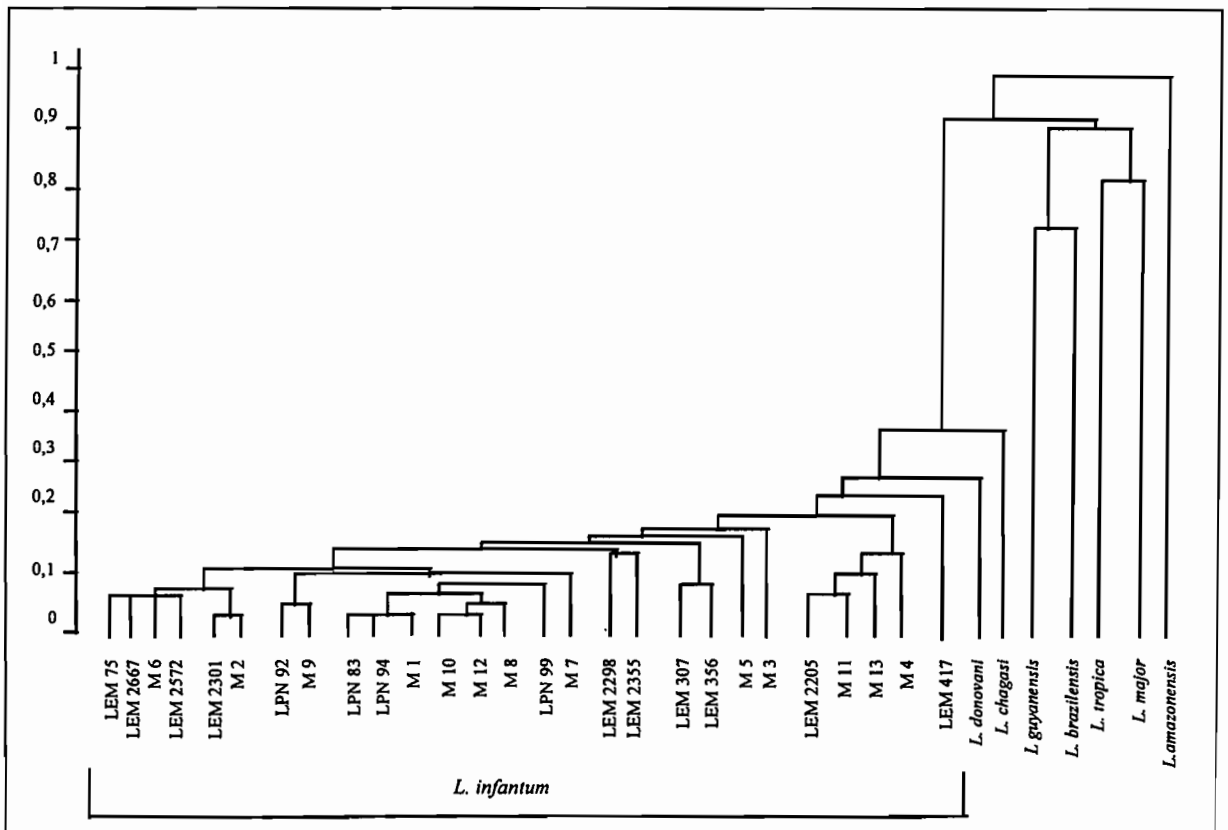


Figure 2 : Dendrogramme construit à partir de la matrice des distances calculée d'après les données RAPD obtenues avec pondération des bandes suivant l'intensité du signal.

Electrophorèse des isoenzymes.

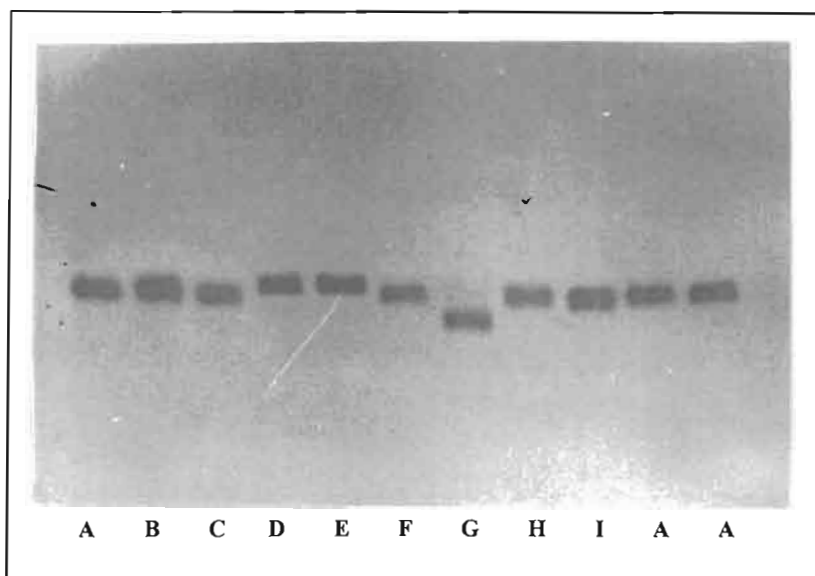


Photo 1 : G6PD

A : LEM 75; B : LEM 2205; C : LEM 2298; D : LEM 307; E : LEM 356; F : LEM 417;
G : LEM 2667; H : LEM 2572; I : LEM 2355

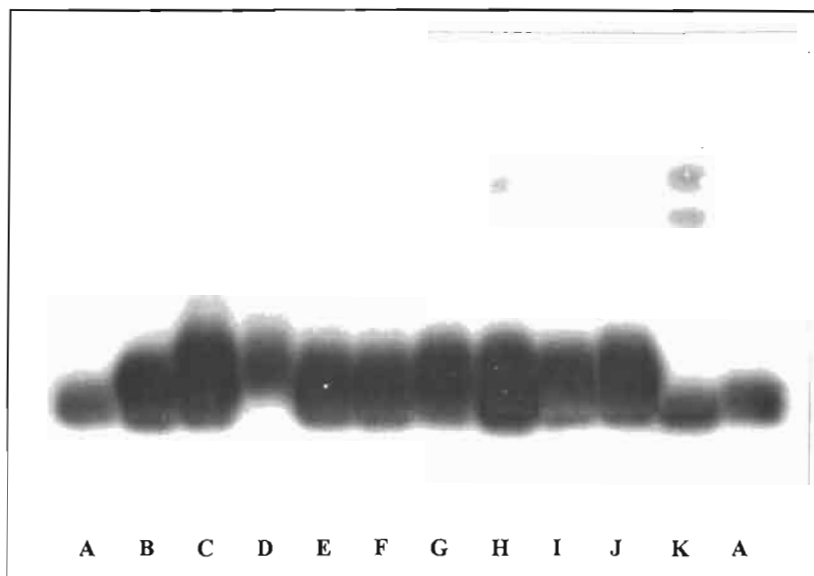
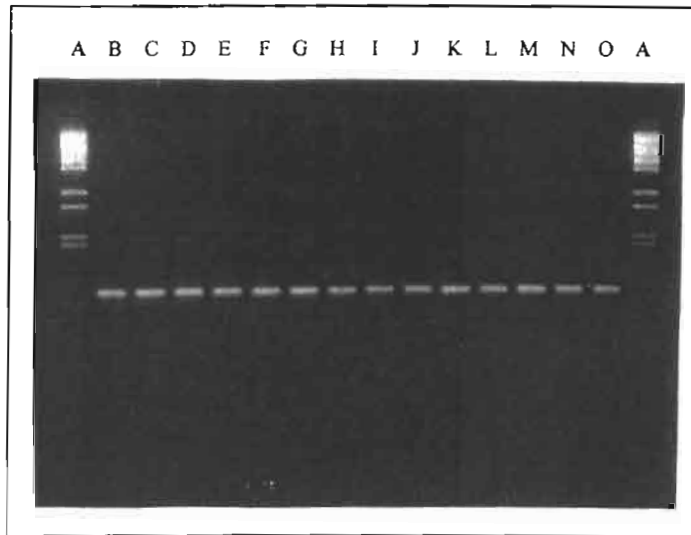


Photo 2 : PEP1

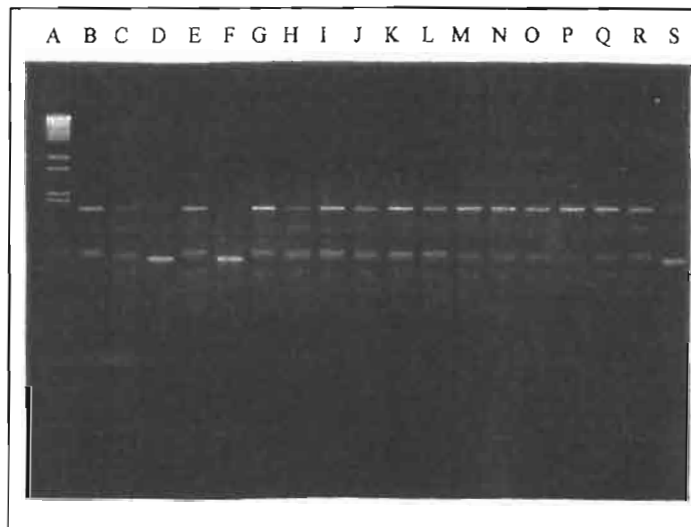
A : LEM 75; B : M 3; C : LEM 2667; D : souche MON-1 de chien; E : M 2; F : M5; G : M 9;
H : M 10; I : M11; J : M12; K : M 13.

RAPD

**Photo 3 : Amorce A1**

A : PM; B : M 5; C : M 11; D : M 10; E : M 9; F : M 8; G : M 7; H : M 6; I : M 4;
 J : M 2; K : M 1; L : M 13; M : LEM 75; N : LEM 307; O : LEM 417.

PM : marqueur de poids moléculaire (ADN de phage lambda digéré par l'enzyme BstEII).

**Photo 4 : Amorce A 12**

A : PM; B : M 2; C : M 3; D : M 4; E : M 5; F : M 11; G : M 12; H : LPN 83; I : LPN 92;
 J : LPN 94; K : LPN 99; L : LEM 2298; M : LEM 2301; N : LEM 2572; O : LEM 2667;
 P : LEM 356; Q : LEM 75; R : LEM 307; S : LEM 2205.

DISCUSSION

Bien que cette analyse ait montré un polymorphisme additionnel au sein des souches considérées jusqu'alors comme identiques (MON-1), une structure proche du monomorphisme a caractérisé notre échantillon de *L. infantum*, en particulier les souches isolées dans le Sud de la France. Les distances génétiques entre souches ont été faibles (distance maximum de 0,2) avec une majorité de souches très proches de la souche de référence MON-1. Notre échantillon était composé principalement de souches provenant de Marseille ou de Nice. Dans ce foyer, seules des souches caractérisées MON-1 ont été isolées antérieurement à partir de l'homme, du chien ou du phlébotome (32). De même, la faible variabilité que nous avons constatée est comparable à la situation observée dans les Alpes Maritimes où 95% des souches isolées chez les patients VIH (+) ont été caractérisées MON-1 (15). Ces résultats sont différents de ceux rapportés en Espagne (14) ou en Italie (6), où près de 50% des patients VIH (+) ont été trouvés porteurs de souches de leishmanies appartenant à des zymodèmes variants dermatropes. Dans le foyer Provence-Côte d'Azur, les cas de leishmanioses cutanées autochtones sont rares (15-16); ce fait pourrait expliquer le relatif monomorphisme de notre échantillon (effet fondateur).

I - Analyse de génétique des populations :

Des conclusions claires sont impossibles à tirer au vu de ces résultats : la plupart n'ont pas été significatifs; les seules indications d'écart à la panmixie ont été la déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg pour le locus *Pep-1*, et la corrélation entre résultats isoenzymatiques et RAPD pour l'ensemble de l'échantillon *L. infantum*.

Le test de Hardy-Weinberg est nettement positif. Cependant, il s'attire toutes les critiques relatives à son emploi dans le cas des protozoaires parasites et des *Leishmania* en particulier. En effet, chez ces organismes, la diploïdie (33-34) n'est qu'une hypothèse de travail qui a été récemment critiquée (35). Il est toutefois intéressant de noter que la déviation à l'équilibre de Hardy-Weinberg a été due à un excès d'hétérozygotes. Si cet écart à la panmixie avait été dû à la distance géographique (avec dérive génique aboutissant à des fréquences alléliques différentes d'une zone à l'autre), on aurait observé au contraire un déficit d'hétérozygotes (effet Wahlund).

Quant à la corrélation observée entre données isoenzymatiques et RAPD, elle a été faite sur des souches collectées dans des conditions de sympatrie non rigoureuses (plusieurs pays). Dans ce cas, le déséquilibre de liaison que signe cette corrélation pourrait être dû non pas à des phénomènes biologiques d'entraves à la recombinaison mais plutôt à des différences de fréquences alléliques entre zones géographiques. L'excès d'hétérozygotes observé pour le locus *Pep-1* semble montrer que ce n'est pas le cas ici. Cependant, l'utilisation du test de Hardy-Weinberg est trop critiquable pour conclure sur ces faits.

De ces résultats, il serait cependant imprudent de conclure que la structure de la population étudiée est sexuée. En effet, l'impossibilité de rejeter l'hypothèse nulle ne constitue jamais une validation de cette hypothèse. Dans le cas de notre échantillonnage, les résultats peuvent s'expliquer par le polymorphisme très bas et le nombre assez faible des souches étudiées. Les tests de génétique des populations, comme toute analyse statistique, sont étroitement dépendants de la richesse du sondage. Dans notre travail, le sondage populationnel, et encore plus génétique, a été très faible. Il est intéressant de remarquer que sur un échantillonnage de *L. infantum* montrant davantage de polymorphisme, les tests de déséquilibre de liaison ont été nettement significatifs (Jimenez et Alvar, communication personnelle).

Une étude complémentaire s'avère donc nécessaire pour conclure sur la structure de cette population. Elle devra utiliser un plus grand nombre de souches, et si possible, des marqueurs capables de révéler une plus grande variabilité. L'étude des minisatellites, capables de montrer une variabilité de 20 à 50 fois supérieure à celle observée par les isoenzymes (36) pourrait répondre à cette attente.

II - Polymorphisme mis en évidence. Résolution des techniques :

La technique d'électrophorèse enzymatique utilisée ici a été plus résolutive que celle habituellement employée pour la caractérisation des souches de *Leishmania* (5). Elle a révélé une microvariabilité au sein du zymodème MON-1, taxon présent dans toutes les régions du pourtour méditerranéen. Ce fait peut facilement être expliqué, d'une part par l'utilisation d'un support différent pour la migration et, d'autre part par l'exploration de systèmes enzymatiques nouveaux. Cette résolution a été, par ailleurs,

accrue par la technique RAPD capable de différencier toutes les souches de notre échantillon. Le zymodème MON-1 apparaît ainsi comme un groupe hétérogène. Ce polymorphisme avait déjà été observé par Pagès et al. sur une étude portant sur les chromosomes (37).

Dans l'hypothèse de travail généralement admise (structure clonale), ce résultat n'a rien d'insolite : les "clones naturels" mis en évidence par une série limitée de marqueurs génétiques ne doivent pas être regardés comme de vrais clones, mais simplement, comme des familles de clones étroitement apparentés entre eux. En augmentant la résolution du marquage génétique, on augmente le nombre de génotypes clonaux mis en évidence. Le concept de "clonet" (38) a été proposé pour désigner, dans une espèce clonale, l'ensemble des souches caractérisées par un ensemble de marqueurs génétiques donnés. Le zymodème MON-1 peut répondre à cette définition.

La résolution génétique accrue obtenue dans le cadre de ce travail permettra d'explorer en profondeur la valeur épidémiologique (répartition) et médicale (spécificité pathogénique) de MON-1. Ce zymodème est considéré comme très ubiquiste (32). Cependant, étant donné l'hétérogénéité révélée, ce fait demande à être affiné. De même, le fait d'identifier des souches MON-1 dermatropes pourrait être imputable à l'existence de génotypes spécifiques au sein de ce zymodème.

Dans le cadre des co-infections *Leishmania*-VIH, Alvar (14) a évoqué le rôle des patients immunodéprimés en tant que réservoir de la parasitose; la transmission d'homme à homme par l'intermédiaire des seringues serait possible entre toxicomanes. Le taxon MON-1 représente globalement 75% des souches isolées chez les sujets immunodéprimés (39). La meilleure résolution génétique obtenue dans le cadre de ce travail permettrait un suivi épidémiologique beaucoup plus fin des génotypes responsables.

III - Valeur du marquage RAPD - Caractères synapomorphes.

Cette étude a confirmé la valeur des marqueurs RAPD pour l'analyse phylogénétique de populations (26-40). La corrélation obtenue entre les 2 techniques d'analyse utilisées dans ce travail (dans l'échantillonnage global comprenant plusieurs espèces) a été excellente. Les profils observés sur gel pour *L. infantum* ont été comparables entre eux et très différents de ceux retrouvés pour les autres espèces. D'autre part, des frag-

ments majeurs spécifiques du complexe *donovani* ou de l'espèce *L. infantum* ont été mis en évidence (caractères "synapomorphes"). Dans un cas (amorce A12), ils ont été reliés à un groupe de souches individualisé.

L'élaboration de sondes à partir des fragments synapomorphes apparaît comme une des applications possibles (41). Cependant, des travaux plus avancés (Bianciotto, données non publiées) ont montré, en utilisant des techniques de séparation plus résolutive (gel de polyacrylamide), qu'une bande unique sur gel d'agarose était en fait composée de plusieurs fragments d'ADN de tailles voisines, ces fragments pouvant être différents selon les souches examinées. Des recherches complémentaires restent donc nécessaires avant de pouvoir utiliser ces marqueurs comme sondes ou pour développer des techniques de PCR spécifiques.

Dans tous les cas, la confrontation des données obtenues au niveau moléculaire avec les données cliniques, épidémiologiques ou thérapeutiques est indispensable. Elle seule peut permettre de juger la valeur épidémiologique et médicale de l'analyse génétique.

PROJET

Titre : Structure des populations de *Leishmania infantum* isolées de patients VIH (+). Implications épidémiologiques.

Directeur : Dr M. Tibayrenc

1 - Thème :

Ce projet représente la suite du travail développé précédemment et dont la problématique a été exposée en introduction. La structure des populations pour l'espèce *Leishmania infantum* est sujette à des controverses. Tibayrenc et al (2) ont proposé, après traitement statistique de données de la littérature, une structure clonale pour *L. infantum*. Blaineau et al (35), en étudiant le caryotype de souches sympatriques ont mis en évidence un équilibre de liaison suggérant des échanges génétiques fréquents.

L'étude de souches de *L. infantum* issues de patients immunodéprimés présente un grand intérêt pour la génétique des populations. L'hypothèse de travail est que certains génotypes parasitaires, éliminés normalement par les défenses immunitaires de l'hôte, pourraient persister et se développer chez les sujets VIH (+). La probabilité de rencontre entre génotypes parasitaires différents et donc d'échanges génétiques serait supérieure dans ce groupe de patients. Ce modèle permettrait d'estimer dans de meilleures conditions la fréquence des phénomènes de recombinaison et leur possible impact sur la structure des populations naturelles.

Il n'a pas été possible de résoudre ces questions dans le travail que nous avons réalisé. Deux raisons peuvent être invoquées pour expliquer ces résultats : (1) l'effectif étudié était insuffisant pour l'analyse d'une population parasitaire aussi peu variable, (2) les techniques mises en oeuvre pour l'étude de la variabilité génétique n'étaient pas assez résolutive dans ce cas particulier d'un taxon très peu polymorphe.

Le présent projet vise donc à pallier les insuffisances de ce travail préliminaire, à savoir (1) échantillonnage des souches trop faible, (2) marquage génétique de résolution insuffisante.

2 - Population étudiée :

Le nombre de souches étudiées sera augmenté. Le recrutement sera élargi à des souches provenant d'hôtes vertébrés différents présents dans un même foyer. Elles seront réparties en 3 groupes : souches isolées chez les patients immunodéprimés, chez les patients immunocompétents (enfants) ou chez le chien. Ce dernier représente le réservoir animal de la leishmaniose. L'incidence de la leishmaniose canine est 250 fois supérieure à celle observée chez l'Homme (16). Les formes cliniques chroniques et une sensibilité partielle aux traitements stibiés observées chez le chien pourraient rapprocher ce groupe de ce qui est observé chez l'immunodéprimé.

Une étude de génétique des populations sera réalisée à l'intérieur de chaque groupe, de manière à établir des comparaisons.

3 - Méthodologie employée :

La variabilité sera étudiée sur des souches clonées. L'étude des différents clones permettra d'évaluer la variabilité de la population parasitaire chez l'hôte.

Trois approches techniques différentes seront utilisées:

1 - *Electrophorèse d'isoenzymes sur acétate de cellulose* : cette technique a déjà été utilisée dans ce travail. Bien que révélant moins de polymorphisme que les RAPD, elle sera gardée comme méthode de référence ("golden standart").

2 - *RAPD* : Cette technique a également été utilisée au cours de ce travail mais un faible nombre d'amorces a été évalué. Le nombre d'amorces pouvant être utilisées est théoriquement illimité. Il est prévu d'en tester une centaine. Elles seront ensuite sélectionnées en fonction de la variabilité qu'elles généreront. Les amplimères seront analysés sur gel d'agarose et de polyacrylamide. Ce dernier permettra l'analyse de la variabilité additionnelle des fragments apparaissant comme monomorphes en agarose.

3 - *étude des minisatellites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)*. Les minisatellites (42) sont des séquences d'ADN répétitives (motif de base de 11 à 16 nucléotides). Elles sont dispersées dans le génome et génèrent un polymorphisme de répétition. Ce sont des marqueurs codominants permettant l'identification d'allèles (43). L'importante variabilité générée est due à un taux de mutations élevé et à des recombinaisons entre allèles frères (36). Le nombre de minisatellites présents dans

un génome serait proche d'un millier dans l'espèce humaine; certains ont été identifiés (36-42). Leurs séquences sont conservées au cours de l'évolution. Ils ont été mis en évidence dans le genre *Leishmania* (44).

Des études de génétique des populations ont montré que les minisatellites révélèrent une variabilité de 20 à 50 fois supérieure à celle mise en évidence par les isoenzymes (36). Elles ont montré également que les différents minisatellites utilisés étaient génétiquement indépendants (36-44) permettant ainsi une étude multilocus.

La mise en évidence du polymorphisme de répétition nécessite la digestion de l'ADN total par un enzyme de restriction. Après séparation par électrophorèse, dénaturation et transfert sur membrane de nitrocellulose (Southern Blot), les minisatellites sont révélés par hybridation avec des sondes spécifiques.

4 - Collaborations :

Ce travail a débuté dans l'unité de Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs (UMR ORSTOM/CNRS 9926) sous la direction du Dr M Tibayrenc. Cette collaboration sera maintenue.

Les souches de *L. infantum* que nous étudierons devraient provenir du laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Marseille (Professeur Quilici).

5 - Cadre de l'étude : Ce travail sera réalisé au laboratoire de Parasitologie et d'Ecologie Humaine de la Faculté de Médecine de Toulouse-Purpan.

6 - Financement du projet : Le travail général sur *L. infantum* est financé dans le cadre de l'UMR 9926 par un projet communautaire AVICENNE. Du fait que notre projet apportera des éléments utiles pour ce programme CEE, ce fonds sera remis à profit pour lancer l'étude.

Des demandes de crédits additionnelles ont été déposées auprès de plusieurs organismes (Groupement d'Etudes et de Recherche sur les Génomes, Conseil Régional de Midi-Pyrénées, Université Paul Sabatier-Toulouse III).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - Bastien P, Blaineau C, Pagès M. *Leishmania* : sex, lies and karyotypes. *Parasitol Today* 1992;8:174-177.
- 2 - Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa : the population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2414-2418.
- 3 - Tibayrenc M, Kjellberg F, Arnaud J, Oury B, Brenière SF, Dardé ML, Ayala FJ. Are eucaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5129-5133.
- 4 - Walliker D, Beale G, Luzzatto L. When are parasites clonal? *Nature* 1990;348:120.
- 5 - Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990;65:111-125.
- 6 - Gramiccia M, Gradoni L, Troiani M. HIV-*Leishmania* co-infections in Italy. Isozyme characterization of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in HIV patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86:161-163.
- 7 - Pratlong F, Reynes J, Dereure J, Baixench MT, Marchou B, Lefebvre M, Janbon F. Characterization of *Leishmania* isolates from two AIDS patients originating from Valencia, Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87:705-706.
- 8 - Rioux JA, Moreno G, Lanotte G, Pratlong F, Dereure J, Rispaïl P. Two episodes of cutaneous leishmaniasis in man caused by different zymodemes of *Leishmania infantum* s.l. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986;80:1004-1005.
- 9 - Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson WD Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986;154:1003-1011.

- 10 - **Dunan S, Mary Ch, Gambarelli F, Blancard A, Quilici M, Moulin B, Olmer M, Dussol B, Brunet Ph, Berland Y, Duhamel Ch.** Quatre observations de leishmaniose viscérale chez des greffés du rein. Considérations pathogéniques et thérapeutiques. *Méd Mal Infect* 1993;**23**:297-301.
- 11 - **Lortholary O, Christiaens D, Mechali D, Babinet P.** Leishmaniose viscérale et immunodépression. *Ann Med Interne* 1991;**142**:215-217.
- 12 - **Kemp M, Kurtzhals JAL, Kharazmi A, Theander TG.** Interferon-gamma and interleukin-4 in human *Leishmania donovani* infections. *Immunology Cell Biology* 1993;**71**:583-587.
- 13 - **De la Loma A, Alvar J, Martinez-Galiano E, Blazquez J, Alcalá-Munoz A, Najera R.** Leishmaniasis or AIDS? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985;**80**:421-422.
- 14 - **Alvar J.** Leishmaniasis and AIDS co-infection : the spanish example. *Parasitol Today* 1994;**10**:160-163.
- 15 - **Marty P, Le Fichoux Y, Pratlong F, Gari-Toussaint M.** Human visceral leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France : epidemiological characteristics for the period 1985-1992. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;**88**:33-34.
- 16 - **Quilici M, Dunan S, Mary Ch.** La leishmaniose viscérale méditerranéenne dans le Sud-Est de la France. *Sem Hôp Paris* 1989;**65**:2155-2161.
- 17 - **Medrano FJ, Hernandez-Quero J, Jimenez E, Pineda JA, Rivero A, Sanchez-Quijano A, Velez ID, Viciano P, Castillo R, Reyes MJ, Carvajal F, Leal M, Lissen E.** Visceral leishmaniasis in HIV-1-infected individuals : a common opportunistic infection in Spain? *AIDS* 1992;**6**:1499-1503.
- 18 - **Peters BS, Fish D, Golden R, Evans DA, Bryceson ADM, Pinching AJ.** Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS : clinical features and response to therapy. *Quarterly Journal of Medicine* 1990;**283**:1101-1111.
- 19 - **Fillola G, Corberand JX, Laharrague PF, Levenes H, Massip P, Recco P.** Peripheral intramonocytic *Leishmania* in an AIDS patient. *J Clin Microbiol* 1992;**30**:3284-3285.

- 20 - Molina R, Cañavate C, Cercenado E, Laguna F, Lopez-Velez R, Alvar J.** Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV-infected patients using colonized *Phlebotomus perniciosus*. *AIDS* 1994;**8**:277-279.
- 21 - Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Quilici M.** Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1994;**32**:746-749.
- 22 - Lucotte G.** Génétique des populations. Ed. InterEditions, Paris, 1983, 198pp.
- 23 - Abderrazak SB, Guerrini F, Mathieu-Deudé F, Truc Ph, Neubauer K, Lewicka K, Barnabé C, Tibayrenc M.** Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. Dans *Methods in molecular biology, Vol 21 : Protocols in Molecular Parasitology*. Edité par JE Hyde 1993 Humana Press Inc, Totowa, NJ.
- 24 - Welsh J, McClelland M.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Ac Res* 1990;**18**:7213-7218.
- 25 - Williams JGK, Kubelik AR, Kenneth JL, Rafalsky JA, Tingey VS.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Ac Res* 1990;**18**:6531-6535.
- 26 - Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ.** Genetic characterization of six parasitic protozoa : Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:1335-1339.
- 27 - Jaccard P.** Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc Vaudoise Sci Nat* 1908;**44**:223-270.
- 28 - Schmid J, Voss E, Soll DR.** Computer-assisted methods for assessing strain relatedness in *Candida albicans* by fingerprint with the moderately repetitive sequence Ca3. *J Clin Microbiol* 1990;**28**:1236-1243.
- 29 - Serres E, Roux M.** Pratique de la classification automatique : l'exemple des *Leishmania*. Dans "*Leishmania : Taxonomie et phylogénèse*" (JA Rioux, Ed.) 1986, pp. 27-40. IMEEE, Montpellier, France.

- 30 - Sokal RR, Sneath PHA.** Principles of numerical taxonomy. Ed Freeman, San Francisco, CA.
- 31 - Richardson BJ, Baverstock PR, Adams M.** Allozyme electrophoresis. Ed. Academic Press. 1986;410pp.
- 32 - Moreno G.** Les complexes *Leishmania donovani* et *Leishmania infantum*. Implications taxinomiques, biogéographiques et épidémiologiques. A propos de l'analyse enzymatique de 548 souches de l'ancien et du nouveau Monde. Thèse de Doctorat d'Université, Université des Sciences et Techniques du Languedoc. 1989.
- 33 - Maazoun R, Lanotte G, Rioux JA, Pasteur N, Killick-Kendrick R, Pratlong F.** Signification du polymorphisme enzymatique chez les leishmanies. *Ann Parasitol Hum Comp* 1981;**56**:467-475.
- 34 - Tibayrenc M, Cariou ML, Solignac M.** Interprétation génétique des zymogrammes de flagellés des genres *Trypanosoma* et *Leishmania*. *C R Acad Sci Paris* 1981;**292**:623-625.
- 35 - Blaineau C, Bastien P, Pagès M.** Multiple forms of chromosomes I, II, and V in a restricted population of *Leishmania infantum* contrasting with monomorphism in individual strains suggest haploidy or automixy. *Mol Biochem Parasitol* 1992;**50**:197-204.
- 36 - Deka R, Chakraborty R, Ferrell RE.** A population genetic study of six VNTR loci in three ethnically defined populations. *Genomics* 1991;**11**:83-92.
- 37 - Pagès M, Bastien P, Veas F, Rossi V, Bellis M, Wincker P, Rioux JA, Roizès G.** Chromosome size and number polymorphisms in *Leishmania infantum* suggest amplification/deletion and possible genetic exchange. *Mol Biochem Parasitol* 1989;**36**:161-168.
- 38 - Tibayrenc M, Ayala FJ.** Towards a population genetics of microorganisms : the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today* 1991;**7**:228-232.
- 39 - Pratlong F, Marty P, Portus M, Deniau M, Dereure J, Abranches P, Martini A, Lefebvre M, Dedet JP, Rioux JA.** Co-infection *Leishmania*-VIH dans le bassin méditerranéen : caractérisation isoenzymatique de 100 isolats du complexe *Leishmania infantum*. Congrès de la Société Française de Parasitologie. poster 50. Juin 1994.

40 - Bañuls AL. Analyse génétique d'isolats naturels sud-américains de *Leishmania* montrant de possibles phénomènes de recombinaison. Diplôme d'Etudes Approfondies de Parasitologie. 1993 Université de Montpellier 33p.

41 - Fani R, Damiani G, Di Serio C, Gallori E, Grifoni A, Bazzicalupo M. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for microorganisms. *Molecular Ecology* 1993;2:243-250.

42 - Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable "minisatellites" regions in human DNA. *Nature* 1985;314:67-73.

43 - Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL, Weatherall DJ, Ponder BAJ. DNA fingerprints and segregation analysis of multiple markers in human pedigrees. *Am J Hum Genet* 1986;39:11-24.

44 - Macedo AM, Melo MN, Gomes RF, Pena SDJ. DNA fingerprints : a tool for identification and determination of the relationships between species and strains of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1992;53:63-70.

ANNEXE 1

ELECTROPHORESE DES ISOENZYMES

		G6PD	GPI	PEP1	PEP2	IDH	MDH	NH1a	NH1b	MPI	GOT	ME	NH2	6PGD	PGM	ACON	ALAT	
SOUCHES DE REFERENCE	LEM 75	2	2	9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
	LEM 417	2	2	7-9	4	4	5-6-7	4	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
	LEM 2205	2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4-7	
	LEM 307	1	3	7-9	4	4	5-6-7	4	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
	LEM 356	1	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
	<i>L. braziliensis</i>	0	5	2	0	0	8	2	0	0	0	0	0	4	0	0	0	5
	<i>L. guyanensis</i>	2	5	3-6	3	2	2-8	1-5	1-3	4	1	2	4	4	3	3	5	
	<i>L. donovani</i>	2-4	2	7-9	4	2-4	5-6-7	1-6	1	3	2	1	1	3	1-3	2	0	
	<i>L. chagasi</i>	2-4	2	7-9	1-4	1-4	5-6-7	6	1	3	2	1	1	3	4	2	4	
	<i>L. amazonensis</i>	4	6	3-5-7	2	3-5	3	4	2	2	0	1	2	1	2	2	1	
	<i>L. major</i>	3-5	4	1-4-8	0	1-5	1-2-6	3-5	2	1	2	3	2	2	2	1	2	
	<i>L. tropica</i>	3	4	5-10	4	2	2-4-6-7	1-4	1	2	1	1	3	4	3	1	3	
	Z 1	LEM 2572	2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4
LPN 83		2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
LPN 94		2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
LPN 92		2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
LPN 99		2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
M 2		2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
M 3		2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
M 4		2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
M 5		2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
M 6		2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
M 7		2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
M 8		2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
M 9		2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
M 10	2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4		
M 11	2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4		
M 12	2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4		
Z 2	LEM 2355	2	1	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
	LEM 2298	2	1	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
Z 3	LEM 2667	4	2	7-9	4	4	5-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4-7	
Z 4	M 1	2	2	9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4	
Z 5	LEM 2301	2	2	7-9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4-7	
Z 6	M 13	2	2	9	4	4	5-6-7	5	1	3	2	1	1	3	3	2	4-6	

RAPD : bandes et intensités (11*3 : bande numéro 11; intensité 3)

	A1	A2	A4	A5	A7	A10	A12
LEM 75	11*3-5*1	7*3-3*1-5*1	13*3-15*2-4*1-9*1	8*3-9*2-1*1-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*2	4*3-10*1
LEM 417	11*3-5*2-6*1-9*1	7*3-5*2-3*1	15*3	8*3-7*2-1*1-9*1-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*2	9*2
LEM 2205	11*3-5*1	7*3-2*1-3*1-5*1	13*3-15*2	8*3-1*2-9*1-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*3	11*3-4*1
LEM 307	11*3-13*1	7*3-5*2-3*1	13*3-15*2	8*3-9*2-1*1-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*2	4*3-9*1
LEM 356	11*3-5*1	7*3-5*2-2*1-3*1-6*1	13*3-15*2	8*3-9*2	5*3-14*2-9*1	8*3-3*2	4*3-9*2
<i>L. braziliensis</i>	2*3-4*2-7*1	9*3-7*1-12*1	2*3-7*3-6*2-12*2	10*3	11*3-15*3-13*2-2*1-5*1-6*1	12*3-13*3-10*1	3*3-2*1
<i>L. guyanensis</i>	10*2-3*1-5*1-11*1-12*1	7*2-10*2-5*1-6*1-12*1-13*1	3*3-7*1	2*3-6*1	12*3-2*2-3*2-13*2-15*2-8*1	7*3-10*2-1*1-5*1-9*1	3*3-1*1
<i>L. donovani</i>	11*3-5*2	7*3-3*1	4*3-15*2	8*3	5*3-14*2-9*1	8*3-3*1	9*2-4*1-10*1
<i>L. chagasi</i>	11*3-1*2-4*1	7*3-2*1-3*1-5*1	5*3-13*2-14*2	8*2	5*3-14*2-3*1-4*1-9*1	8*3-14*2-3*1	4*2
<i>L. amazoniens</i>	14*3	8*2-11*2-1*1-15*1	11*3-8*2	4*3	10*2	1*3	7*3-5*2-6*2
<i>L. major</i>	11*2-1*3-7*1	14*2-4*1	5*2-12*1-14*1	3*1-5*1-15*1	8*2-4*1-7*1	2*2-4*1-6*1-14*1	12*2
<i>L. tropica</i>	10*3-1*1-11*1	15*2-7*1	9*2-1*1-2*1-12*1	11*2	8*2-1*1-16*1-17*1	5*2-9*2-11*2	8*3
LEM 2667	11*3-5*1-6*1	7*3-5*2	13*3-15*2-10*1	8*3-9*2-1*1-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-2*2	4*3-9*1
LEM 2572	11*3	7*3	13*3-15*2	8*3-9*2-1*1-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*3-14*1	4*3-9*1
LEM 2301	11*3-5*1	7*3-5*2-2*1-3*1	13*3-15*2	8*3-1*2-9*2-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*1	4*3-9*1
LEM 2355	11*3	7*3-5*1	13*3-15*2	8*3-9*1-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3	4*3-9*1
LEM 2298	11*3	7*3-2*1-3*1-5*1	13*3-15*2-10*1	8*3-1*1-9*1-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*2	4*2-9*2
LPN 83	11*3-5*2-6*1-8*1	7*3-3*1-5*1	13*3-15*1	8*3-1*2-9*2-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*1	4*1-9*1
LPN 94	11*3-5*2-2*1-6*1-8*1	7*3-3*1	13*3-15*2	8*3-1*2-9*2-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*1	4*2-9*1
LPN 92	11*3-5*2-2*1-6*1-8*1	7*3-2*1-3*1-5*1	13*3-15*1	8*3-9*3-1*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*2	4*3-9*2
LPN 99	11*3-5*2-2*1-6*1-8*1	7*3	13*3-15*2	8*3-9*2-1*1-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*1	4*3-9*2
M 1	11*3-5*2-2*1-6*1-8*1	7*3-3*1-5*1	13*3-15*3	8*3-1*2-9*2-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*1	4*3-9*1
M 2	11*3-2*1-5*1	7*3-2*1-3*1-5*1	13*3-15*2-16*1	8*3-9*2-1*1-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*1	4*2-9*1
M 3	11*3-5*1	7*3-3*1	13*3-15*2	1*3-8*3-9*3-7*2-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3	4*1-10*1
M 4	11*3	7*3-3*1	13*3-15*1	8*3-1*2-9*2-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*1	11*3-4*1
M 5	11*3-5*2-2*1	7*3-3*1	13*3-15*2-16*1	8*3	5*3-14*2-9*1	8*3-3*2	4*3-10*2
M 6	11*3-2*1-5*1	7*3-5*1	13*3-15*2-12*1	8*3-1*2-9*2-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*2	4*3-10*1
M 7	11*3-5*2-2*1-4*1	7*3-3*1	13*3-15*2-12*1	8*3-1*2-9*2-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3	4*3-9*1
M 8	11*3-5*2-2*1	7*3-3*1	13*3-15*2-9*1	8*3-1*2-9*2-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*2	4*3-10*1
M 9	11*3-5*2-2*1-6*1-8*1	7*3-5*1	13*3-15*1	8*3-9*3-1*2-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*3	4*3-10*1
M 10	11*3-5*2-6*1-8*1	7*3-2*1-3*1-5*1	13*3-15*2	8*3-1*2-9*2-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*2	4*3-10*1
M 11	11*3-5*2	7*3-5*1	13*3	8*3-1*1-9*1-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*2	11*3-4*1
M 12	11*3-5*2	7*3-3*1-5*1	13*3-15*2	8*3-1*2-9*2-12*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*2	4*3-9*1
M 13	11*3-5*2-6*1-8*1	7*3-2*1-3*1	13*3	8*3-1*1-9*1	5*3-14*2-9*1	8*3-3*2	11*3-4*1