



Institut français de recherche scientifique
pour le développement en coopération

Centre
de
Montpellier

VALEUR DES FRAGMENTS RAPD
(RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)
POUR L'IDENTIFICATION DE L'ESPÈCE
LEISHMANIA INFANTUM,
AGENT DE LA LEISHMANIOSE
VISCÉRALE

Johanne BIANCIOTTO

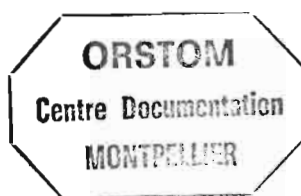
A 41.939 ex.1

Document ORSTOM Montpellier, 1994, n° 3

Johanne BIANCOTTO

VALEUR DES FRAGMENTS RAPD
(RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)
POUR L'IDENTIFICATION DE L'ESPÈCE
LEISHMANIA INFANTUM,
AGENT DE LA LEISHMANIOSE

19 JUIL. 1995



Montpellier ORSTOM 1994

52
PHZEIS
BIA

F41939

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'unité mixte de recherche CNRS-ORSTOM n° 9926 «Génétique moléculaire des parasites et des vecteurs» (U.R. 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'unité, pour l'obtention par Johanne Biancotto de la maîtrise de Biochimie de l'Université des sciences et techniques du Languedoc-Montpellier II, le 24 juin 1994.

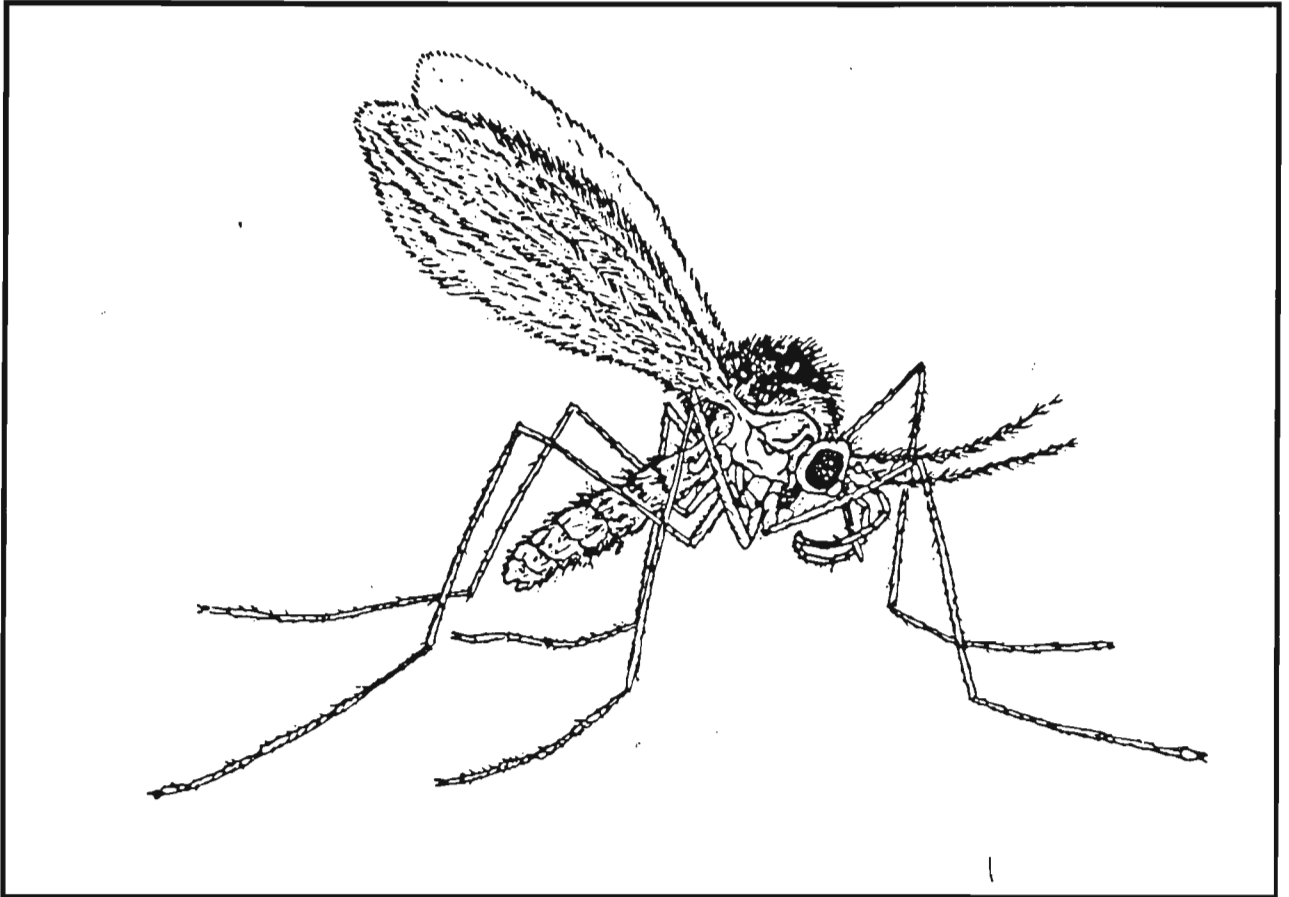
Sommaire

I Introduction.....	1
1.1. Généralités	
1.2. Situation du sujet	
1.3. Objectifs.....	2
II Matériel et méthodes	
2.1. Matériel biologique	
2.2. La technique RAPD.....	3
2.2.1. Principe	
2.2.2. Réactifs	
2.2.3. Appareil et programme d'amplification	
2.2.4. Amplification	
2.2.5. Méthodes de révélation	
a/ Gel d'agarose.....	4
b/ Gel de polyacrylamide	
2.3. Purification de fragments d'ADN à partir de gel de polyacrylamide.....	5
2.4. Dosage de l'ADN.....	6
2.5. La technique RFLP	
2.5.1. Principe	
2.5.2. Réactifs	
2.5.3. Digestion enzymatique	
III Résultats	
3.1. Analyse des RAPD	
3.2. Analyse des RFLP.....	7
IV Discussion.....	9
V Conclusion.....	10

Résumé

Ce travail a pour but d'isoler une sonde moléculaire capable d'identifier un protozoaire parasite appelé *Leishmania infantum* responsable de la leishmaniose humaine, maladie sévissant sur le pourtour Méditerranéen, en Amérique du sud et en Asie.

L'ADN génomique de dix souches de *L. infantum* est amplifié grâce à une courte amorce (RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA). Une bande commune aux dix souches est observée sur gel d'agarose ; Une migration sur gel de polyacrylamide révèle un dédoublement de la bande. Après extraction de ces deux bandes du gel de polyacrylamide, une analyse des profils de restriction en RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) révèle un polymorphisme de séquences.



Phlebotome de l'ordre des Diptères, vecteur responsable de la propagation de *Leishmania infantum* (2).

I Introduction

1.1. Généralités

Le laboratoire de Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs de l'ORSTOM (Montpellier) a ciblé ses recherches sur les protozooses tropicales humaines et animales. La thématique du laboratoire repose sur l'étude de la génétique des populations et l'Evolution des principaux protozoaires parasites :

- . *Trypanosoma cruzi*, responsable de la maladie de Chagas.
- . les trypanosomes africains, responsables des trypanosomoses humaine et animale
- . les leishmanies, responsables des leishmanioses.
- . *Plasmodium falciparum*, responsable du paludisme humain.

et des insectes vecteurs qui transmettent ces parasites.

Ces parasites sont génétiquement caractérisés par deux méthodes principales : l'électrophorèse des isoenzymes et l'amplification de l'ADN par amorces aléatoires (RAPD) (1).

1.2. Situation du sujet

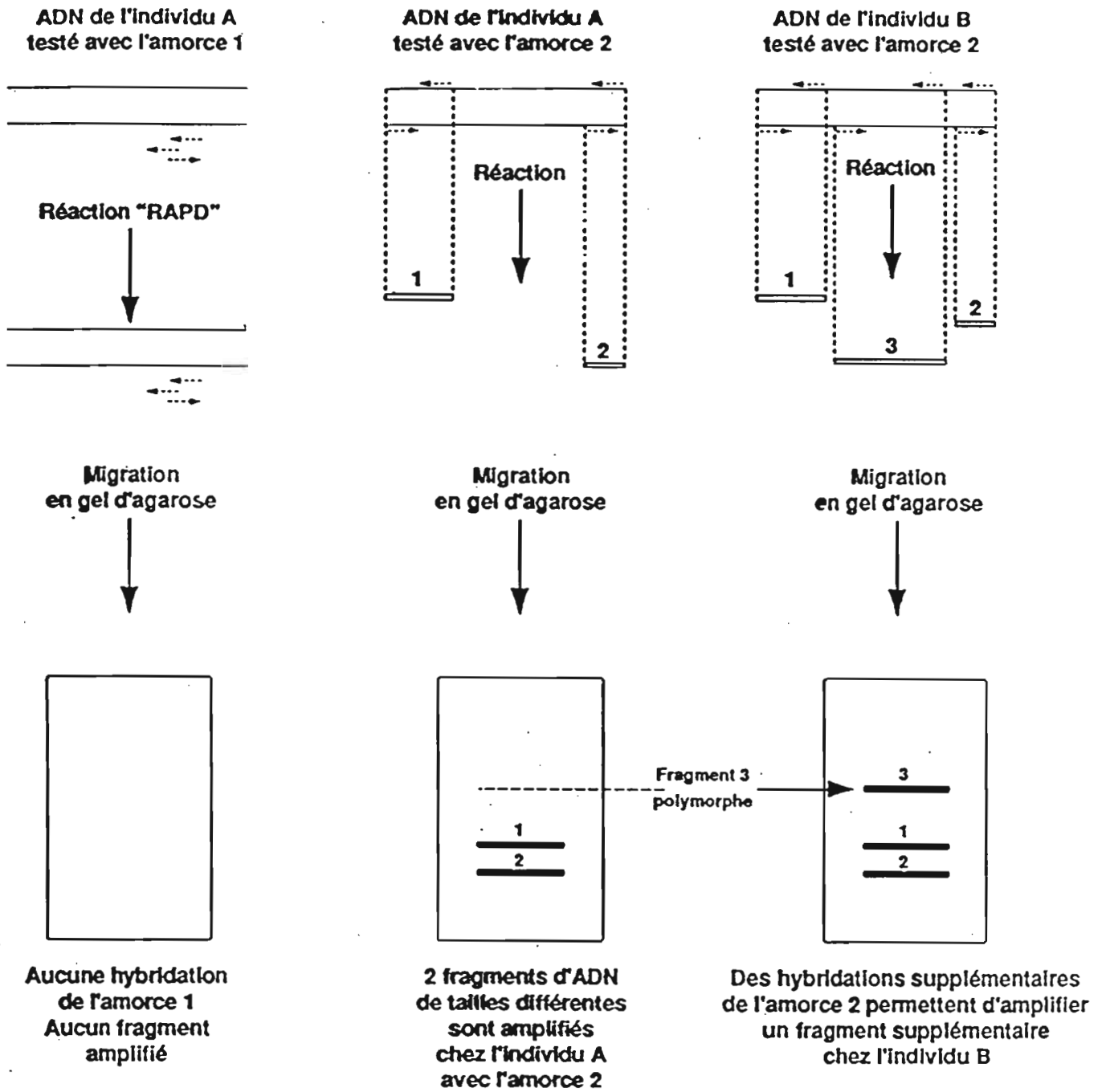
Notre étude porte sur les leishmanies, agents responsables de la leishmaniose humaine. Cette protozoose existe sur tous les continents, exceptés l'Australie et l'Antarctique. Elle pose d'importants problèmes de santé publique. Les leishmanies sont des protozoaires parasites flagellés du genre *Leishmania* appartenant à la famille des *Trypanosomatidae* et à l'ordre des *Kinetoplastida* (selon la classification des *Leishmania* O.M.S. 1990). La classification des leishmanies a été établie sur plusieurs critères :

- épidémiologiques.
- de pathogénicité. Il existe 3 formes majeures : la leishmaniose viscérale, la leishmaniose cutanée et la leishmaniose cutanéomuqueuse.
- de localisation chez le vecteur.
- biochimiques et immunologiques.
- de génétique moléculaire.

Elles sont transmises par des insectes vecteurs hématophages, les phlébotomes (ordre des Diptères). De nombreuses espèces de vertébrés (hommes, canidés, rongeurs, reptiles ...) constituent des hôtes réservoirs du parasite et contribuent à l'entretien des foyers de la maladie (2).

Cette étude porte plus particulièrement sur *Leishmania infantum*, agent de la "leishmaniose viscérale infantile méditerranéenne". C'est donc une espèce de l'Ancien Monde (pourtour du bassin Méditerranéen, Afrique et Asie) qui appartient au complexe *L. donovani* et qui provoque une leishmaniose le plus souvent viscérale mais parfois cutanée. Le chien est son réservoir principal.

Principe du RAPD



Les individus A et B sont polymorphes pour l'amorce 2 testée.

Le fragment 3 est polymorphe chez l'individu B.

Il constitue un marqueur génétique.

En plus de l'espèce *L. infantum*, le complexe *donovani* rattache l'espèce *L. chagasi*, agent de la leishmaniose latino-américaine et *L. donovani*, agent de la leishmaniose indienne. Ces trois espèces sont très difficiles, sinon impossibles à distinguer génétiquement.

1.3. Objectifs

L'objectif de ce travail est d'explorer les possibilités d'isoler une sonde moléculaire capable d'identifier *Leishmania infantum* dans un test diagnostique facile et rapide à mettre en œuvre. Les analyses isoenzymatiques menées sur 15 enzymes ont montré que l'espèce *L. infantum* présentait peu de variabilité (3). Notre étude fait appel à la méthode RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) : c'est une technique dérivée de l'amplification d'ADN en chaîne ou PCR (Polymerase Chain Reaction). Ces deux techniques permettent de synthétiser d'importantes quantités d'ADN spécifiques à partir de très faibles quantités de matériel biologique (4). Contrairement à la PCR classique, qui utilise de longues amorces spécifiques, la méthode RAPD utilise des amorces de 10 paires de bases dont la séquence est choisie de façon arbitraire. La présence ou non de fragments amplifiés dépend de l'existence dans le génome de séquences complémentaires à l'amorce. Le profil d'amplification dépend donc de la séquence de l'amorce et des conditions de réaction (5). Une batterie d'amorces permet ainsi de générer différents profils d'amplification.

Il a été montré (6) que chez les protozoaires parasites, la technique RAPD permet de générer très facilement des fragments "synapomorphes", c'est-à-dire spécifiques d'un groupe de souches données représentant un embranchement phylogénique individualisé (7). On peut ainsi obtenir des fragments spécifiques au niveau de l'espèce, de la sous-espèce ou du génotype individuel.

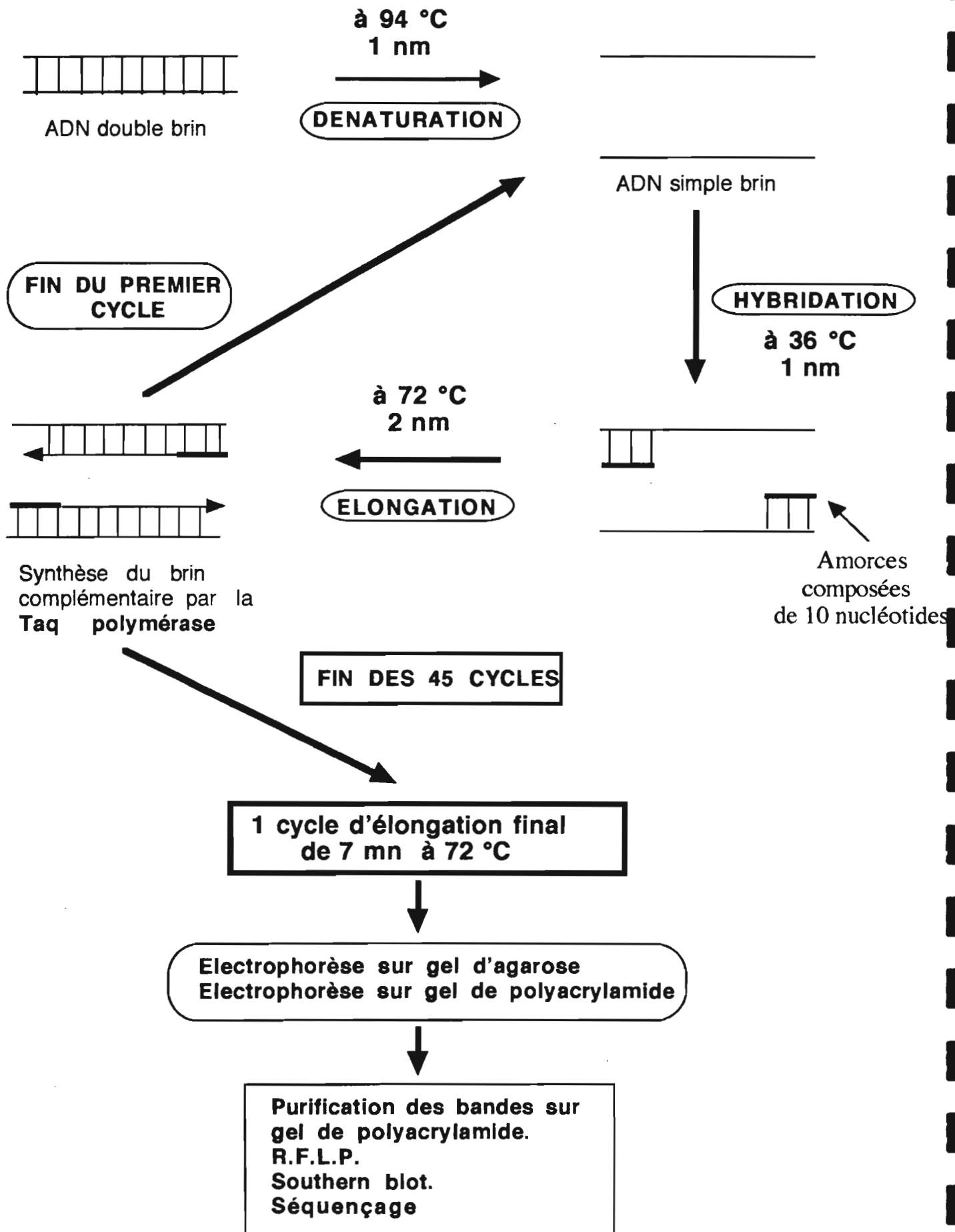
Le but de l'étude était: (i) de vérifier la relative homogénéité génétique de *L. infantum* sur un éventail de 10 souches; (ii) de sélectionner un fragment RAPD répondant à notre objectif (c'est-à-dire donnant une bande d'amplification monomorphe pour toutes les souches testées : fragment synapomorphe commun à toutes les souches de *L. infantum*); (iii) de tester par des techniques complémentaires (gel de polyacrylamide et profils de restriction ou RFLP, (=Restriction Fragment Length Polymorphism) l'homogénéité génétique effective de ce fragment. L'élaboration de la sonde elle-même n'entrait pas dans le cadre du présent travail.

II. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

Sur les dix souches de *Leishmania infantum* utilisées pour ce travail : 6 sont des souches de référence et proviennent de la cryobanque du Laboratoire d'Ecologie Médicale de Montpellier, 4 ont été isolées à Toulouse par le docteur Marie-Thérèse Baixench sur des malades HIV (+). Elles ont été

Principe du RAPD



mises en culture à l'hôpital Purpan de Toulouse. L'ADN utilisé dans ce travail provient de dilutions de 100 ng aimablement fournis par le docteur Baixench.

Le code OMS et l'origine des souches sont détaillés dans le tableau I, annexe 1.

2.2. La technique RAPD :

2.2.1. Principe

L'ADN matrice est amplifié en présence de déoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), d'une seule amorce de 10 bases et de Taq Polymérase, une enzyme capable de polymériser l'ADN à haute température. Après dénaturation de l'ADN, les amorces s'apparient à leur séquence complémentaire sur chacun des 2 brins. La Taq polymérase synthétise le brin complémentaire d'ADN à partir de l'extrémité 5' de l'amorce. Un cycle d'amplification comprend trois phases :

- dénaturation de l'ADN à 94°C,
- appariement des amorces au niveau des séquences complémentaires à 36°C,
- élongation du brin complémentaire par la Taq polymérase à 72°C

2.2.2. Appareil et programme d'amplification :

L'appareil utilisé est le thermocycleur "Programmable Thermal Controller 100" de la société MJ Research. Le programme d'amplification comprend :

- 45 cycles comportant 3 segments :
 - dénaturation de 1 min à 94 ° C
 - appariement de 1 min à 36 ° C
 - élongation de 2 min à 72 ° C
- 1 cycle d'élongation final de 7 min à 72 ° C

2.2.3. Amplification :

Dans le laboratoire, 8 amorces ont été sélectionnées pour les leishmanies dont l'amorce A1 choisie pour cette étude. Sa séquence est la suivante : CAGGCCCTTC (6).

Pour éviter des contaminations par des molécules d'ADN exogène, les manipulations sont effectuées dans des conditions strictes. 20 ng d'ADN sont amplifiés dans 100 µl de milieu réactionnel tampon réactionnel (Tris-HCl 10 mM pH 8.3 ; MgCl₂ (6H₂O) 1,5 mM ; KCl 50 mM; gélatine 100 µg/ml); dNTP 100 µM chacun; Amorce 0,2 µM; Taq polymérase (Boehringer Mannheim) 1,5 U). Un témoin négatif contenant tous les réactifs sauf la matrice ADN est inclus dans chaque série d'amplification pour vérifier l'absence de bandes de taille similaire aux fragments amplifiés.

2.2.4. Méthodes de révélation

Les produits d'amplification peuvent être séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose et sur gel de polyacrylamide.

a/ Gel d'agarose :

Le bromure d'éthidium (BET) permet la détection des fragments d'ADN. Cette molécule possède la propriété de s'intercaler entre les deux brins des acides nucléiques et de constituer avec ces derniers des complexes fluorescents. Les fragments d'ADN amplifiés sont donc séparés, en présence de 0,5 µg/ml de BET sur gel d'agarose à 1,6 %. A ce pourcentage, les fragments amplifiés, qui sont d'une taille comprise entre 200 pb et 3000 pb, sont séparés avec une bonne résolution de l'ordre de 90 pb.

L'agarose est dissous dans du tampon TAE (Tris-acétate/EDTA pH 7,5 : Tris-acétate 0,04 M; EDTA 1mM) par chauffage. Le mélange est porté à ébullition de manière à obtenir une solution homogène. Avant dépôt, 1 µl (10 % (V:V)) de tampon de charge (Bleu de bromophénol 0,25 %; Ficoll 400 15 %) est ajouté à 10 µl d'ADN amplifié. Le bleu de bromophénol permet de suivre la migration (il migre approximativement comme un ADN double brin de 300 pb) et le Ficoll augmente la densité du dépôt et entraîne l'ADN au fond des puits (8).

Deux marqueurs de poids moléculaires permettent de tracer une droite étalon : distance de migration en fonction du logarithme décimal du poids moléculaire. Un des deux est fabriqué au laboratoire. Il provient d'ADN de phage λ digéré par l'enzyme Bst EII (annexe 1, fig 1). La migration est faite à 10 V/cm dans le tampon TAE contenant 0,5 µg/ml BET.

b/ Gel de polyacrylamide :

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide est plus résolutive que sur gel d'agarose : la résolution est de l'ordre de 30 pb.

La solution mère d'acrylamide 30% est préparée de la façon suivante pour 100 ml :

Monomère acrylamide	29	g
N, N'méthylènebiacrylamide	1	g

La préparation est filtrée et conservée à 4°C.

La solution d'acrylamide à 4 % comprend pour 100 ml :

Eau	66	ml
Acrylamide 30%	13,3	ml
Tampon TBE 5X (Tris-borate 0,45 M, EDTA 0,01 M).....	20	ml
Persulfate d'ammonium 10%.....	700	µl
TEMED (N,N,N', N' tétraméthyléthylènediamine).....	60	µl

Le mélange eau-acrylamide 30%-TBE 5X est filtré avec une membrane de 0,22 µm pour

éliminer toutes les impuretés pouvant gêner la polymérisation ou bien créer des imperfections. Il est ensuite dégazé dans une fiole à vide pour éliminer l'oxygène qui est un inhibiteur de la polymérisation. La polymérisation du gel ne s'effectue qu'en présence de persulfate d'ammonium 10% (catalyseur de la polymérisation) et de TEMED (initiateur de la réaction). Ces deux produits sont ajoutés extemporanément (9 et 10). Après polymérisation, la migration est effectuée dans le tampon TBE. Le gel est préalablement soumis à un voltage de 12,5 V/cm de migration pendant 45 min pour éliminer les traces d'acrylamide non polymérisé, de persulfate d'ammonium et de TEMED et rendre le gel plus homogène.

Un tampon de charge (Bleu de bromophénol 0,25 %; xylène cyanol FF 0,25 %; glycérol 30%) est ajouté aux échantillons à déposer. Le xylène cyanol migre deux fois moins vite que le bleu de bromophénol et approximativement comme un ADN double brin de 4 kb. Les échantillons sont déposés sous un volume de 20 μ l (8). La migration est effectuée à 10 V/cm durant 6 h.

Les profils d'amplification sont révélés :

- par coloration au nitrate d'argent (cf annexe 2)
- par exposition aux UV après coloration de 10 min dans du tampon TAE contenant 0,5 μ g/ml de BET.

2.3. Purification de fragments d'ADN à partir de gel de polyacrylamide

Les fragments d'ADN sont découpés sous UV à l'aide d'un scalpel. Les bandes de gel sont déposées dans des microtubes de 2 ml, contenant 500 μ l de tampon d'éluion (Acétate d'ammonium 0,5 M; Acétate de magnésium 10 mM; EDTA (pH=8) 1 mM; SDS 0,1 %). L'EDTA permet d'inhiber les activités enzymatiques telles les DNAses qui pourraient dégrader l'ADN. Le SDS est un détergent favorisant l'éluion de l'ADN hors des mailles du gel de polyacrylamide. Le temps d'exposition à la lumière doit être le plus bref possible afin d'éviter des cassures de l'ADN. Après une nuit d'incubation à 37°C, les surnageants contenant l'ADN sont récupérés. L'éluion complète des ADN découpés est vérifiée en observant sous UV les bandes de polyacrylamide.

L'ADN est précipité en présence d'acétate de sodium 0,3 M et de 2,5 volumes d'éthanol absolu froid durant 3 heures à -70°C. Il est ensuite centrifugés pendant 30 min à 8000 x g. Les culots sont lavés deux fois dans l'éthanol 70% par centrifugation à 8000 x g durant 15 min. Ces lavages successifs éliminent les sels. Le surnageant est éliminé et le culot séché par une centrifugation sous vide. L'ADN est ensuite resuspendu dans de l'eau stérile et conservé à 4°C.

Tout l'ADN récupéré est réamplifié dans les mêmes conditions que précédemment.

Avant réamplification, la concentration des solutions d'ADN est évaluée sur gel d'agarose en comparant les intensités de fluorescence avec un marqueur de poids moléculaire de concentration connue. Les réamplifications des ADN sont faites dans les mêmes conditions décrites ci-dessus. Elles sont vérifiées sur gel d'agarose et de polyacrylamide de la même façon. Les produits obtenus sont rassemblés par souche dans un même tube et précipités comme précédemment. Les solutions sont

Figure 1: Profils d'amplification de l'ADN de *Leishmania infantum* avec l'amorce A1 sur gel d'agarose 1,6%.



Légende : A= 2301 ; B=2572 ; C=2355 ; D= 2667 ; E=2205 ; F=2298 ; G=417 ; H=356 ; I=307 ;
J=75 ; PM=Poids Moléculaire.

alors dosées par spectrophotométrie.

2.4. Dosage de l'ADN

Le spectre d'absorption de la solution d'ADN est établi à des longueurs d'ondes variant de 210 nm à 300 nm. Pour un ADN purifié, on obtient un pic d'absorption maximum de 257 nm à 260 nm. La concentration est calculée à partir de la densité optique : 1 unité de DO représente une concentration de 50 µg/ml d'ADN en double brin. L'ADN en solution est conservé dans de l'eau stérile à -20 °C.

2.5. La technique RFLP

2.5.1. Principe

Cette technique utilise des enzymes de restriction, également appelées endonucléases de restriction qui reconnaissent des séquences de bases spécifiques dans l'ADN en double hélice, et clivent les deux brins du duplex en des points spécifiques. Elles ont été découvertes par Werner Arber, Hamilton Smith et Daniel Nathans (11). Elles permettent donc une analyse au niveau de la séquence des fragments purifiés (12).

2.5.2. Réactifs

Les huit enzymes utilisées sont les suivantes : *Eco* RI, *Pst* I, *Hpa* II, *Alu* I, *Rsa* I, *Hae* III, *Taq* I et *Hha* I. Chacune d'entre elles fonctionne avec un tampon et dans des conditions expérimentales spécifiques (annexe 3, tableau II). La sélection des enzymes est basée en fonction de la séquence du site de coupure. Les enzymes reconnaissant des sites de 4 nucléotides, ont été préférentiellement choisies. Ceci permet d'augmenter la probabilité de coupure du fragment d'ADN étudié. Les enzymes, qui sont très fragiles, doivent être constamment manipulées dans la glace.

2.5.3. Digestions enzymatiques

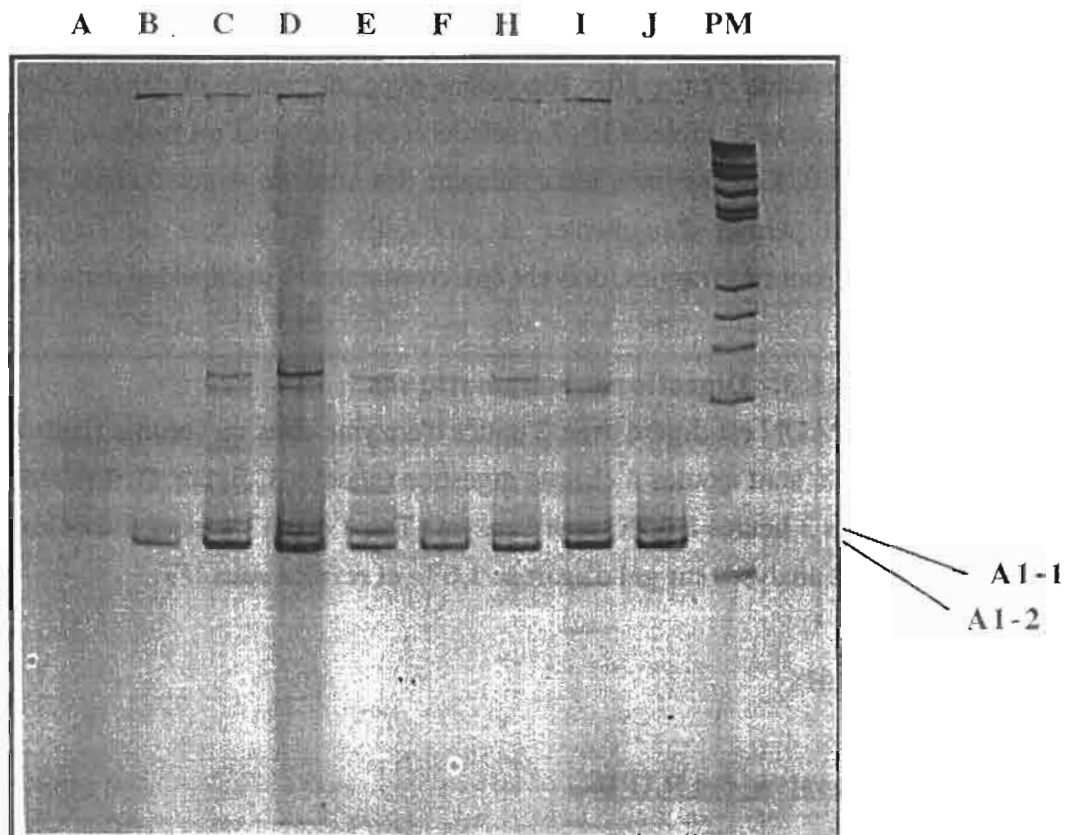
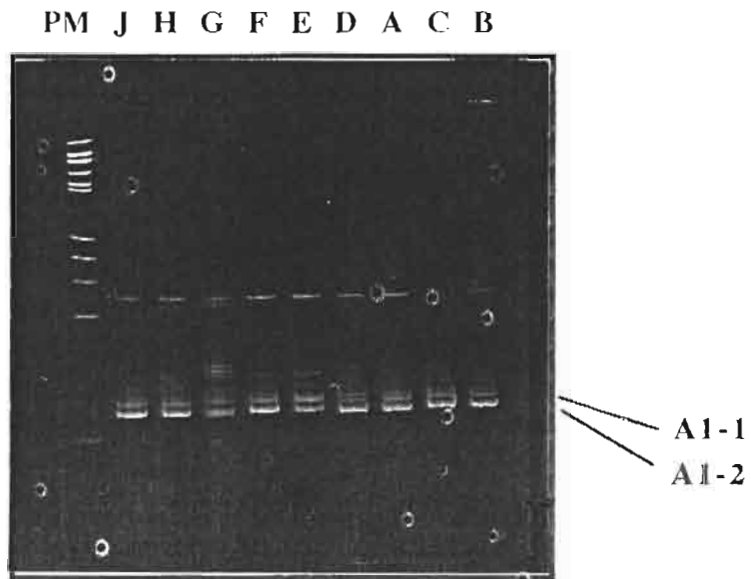
1 µg d'ADN est digéré avec 2 unités d'enzyme dans un volume final de 20 µl. 2 µl de tampon spécifique 10X sont ajoutés à chaque digestion (annexe 3, figure 1). Les mélanges réactionnels sont incubés durant 3 heures à 65°C pour l'enzyme *Taq* 1 et à 37°C pour toutes les autres. Les produits de digestion sont analysés sur gel d'agarose 1,6% et révélés sous UV.

III Résultats

3.1. Analyse des RAPD

Une étude préliminaire en RAPD avait révélé sur gel d'agarose une bande monomorphe de l'espèce *Leishmania infantum* avec l'amorce A1. Nous avons donc vérifié sur dix souches de cette

Figure 2 : Profils d'amplification de l'ADN de *L.infantum* avec l'amorce A1 sur gel de polyacrylamide 4%.
 2A : Coloration par bromure d'éthidium.
 2B : Coloration au nitrate d'argent.



Légende : A= 2301 ; B=2572 ; C=2355 ; D= 2667 ; E=2205 ; F=2298 ; G=417 ; H=356 ; I=307 ; J=75 ; PM=Poids Moléculaire.

même espèce le monomorphisme de ce fragment, d'environ 780 pb (Figure 1).

Un gel de polyacrylamide, plus résolutif que le gel d'agarose, a été réalisé sur les mêmes amplifications. La bande monomorphe obtenue sur gel d'agarose se sépare en de nombreuses petites bandes plus ou moins intenses (Figure 2). La comparaison des profils des différentes souches a ainsi révélé l'existence de deux bandes monomorphes (790 pb et 850 pb). Ces deux fragments ont été extraits et purifiés. Cette manipulation de purification/réamplification a été répétée plusieurs fois car la proximité des deux bandes ne permettait pas d'obtenir des fragments avec un degré de pureté suffisant (Figures 3 et 4). Après précipitation de ces produits de réamplification, une migration sur gel d'agarose a été effectuée pour les dix souches afin de vérifier la purification des bandes. Certains ADN de souches montrent après cette migration de légères contaminations, mais leur intensité de fluorescence par rapport aux bandes étudiées est telle que ces bandes contaminantes étaient suffisamment faibles pour ne pas interférer dans l'analyse des RFLP. Les fragments d'ADN extraits sont ainsi amplifiés de nombreuses fois jusqu'à l'obtention d'une quantité d'ADN suffisante pour pouvoir effectuer les RFLP. La mise au point de ces réamplifications a été longue car la technique d'évaluation sur gel des concentrations faibles est peu fiable.

3.2 Analyse des RFLP

Sur les huit endonucléases testées, *Alu* I, *EcoR* I et *Taq* I n'ont pas coupé les fragments. Pour les cinq autres enzymes utilisées, *Hae* III, *Hpa* II et *Pst* I montrent un profil monomorphe, alors que les deux dernières, *Hha* I et *Rsa* I, génèrent des profils très polymorphes.

Les profils *Hpa* II (Figure 5) et *Pst* I (non mentionnée) montrent une bande plus ou moins intense dont la taille de 780 pb correspond à celle de la bande de la souche témoin 2205 (puits 11) (ADN non digéré). Cette bande peut avoir deux origines : soit elle correspond au fragment original qui n'est pas entièrement digéré (digestion partielle), soit elle correspond à la deuxième bande détectée sur gel de polyacrylamide.

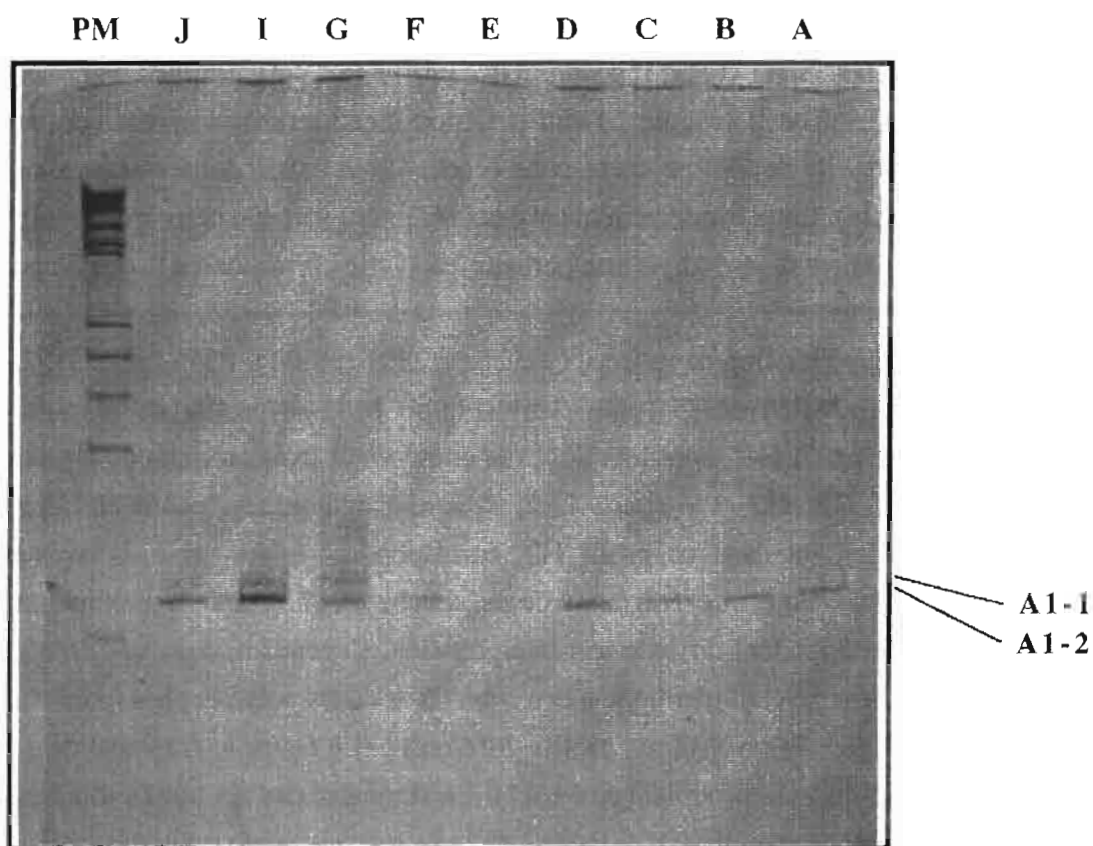
Hha I coupe les fragments de six souches (2301 (puits1), 2355 (puits 3), 2205 (puits 5), 2298 (puits6), 307 (puits 9) et 75 (puits 10)) (Figure 6). Les profils de ces six souches que nous dénommerons "profil H1", sont identiques et comportent trois produits de digestion. Les profils des trois souches 2572, 417, 356 (puits 2, 7, 8) seront dénommés "profil H2". Les bandes de faible intensité apparaissant dans ce profil H2, correspondent à des produits issus de la digestion de fragments contaminants. Le fragment de la souche 2267 (puits 4) montre un profil typique de digestion partielle rendant difficile son interprétation. Cependant, dans une précédente expérience, le profil de cette souche était identique à ceux des six souches polymorphes (puits 1, 3, 5, 6, 9 et 10).

Rsa I (Figure 7) révèle deux profils différents : elle coupe le fragment de quatre souches 2355, 2667, 2298, 75 en trois produits (profil R1). Le fragment des six autres souches est coupé en deux produits (profil R2).

Figure 3 : Profils d'amplification avec l'amorce A1, après purification des deux bandes A1-1 et A1-2, sur gel d'agarose 1,6%.



Figure 4 : Profils d'amplification avec l'amorce A1, après purification des deux bandes A1-1 et A1-2, sur gel de polyacrylamide 4% (coloration au nitrate d'argent).



T=Témoin d'amplification ; A=2301 ; B=2572 ; C=2355 ; D=2667 ; E=2205 ; F=2298 ; G=417 ; I=307 ; J=75 ; PM=Poids Moléculaire.

Figure 5 : Profils de digestion des bandes A1-1 et A1-2 par l'enzyme Hpa II sur gel d'agarose 1,6%.

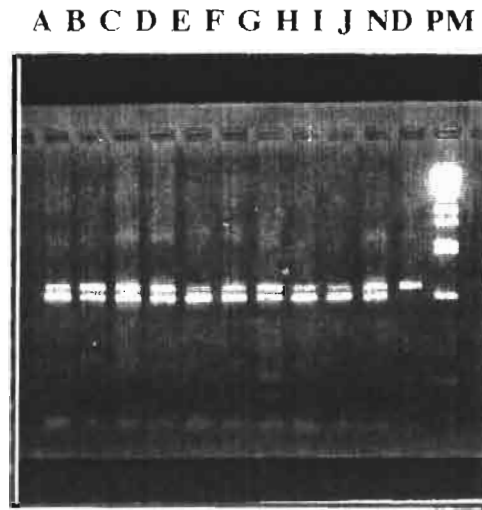
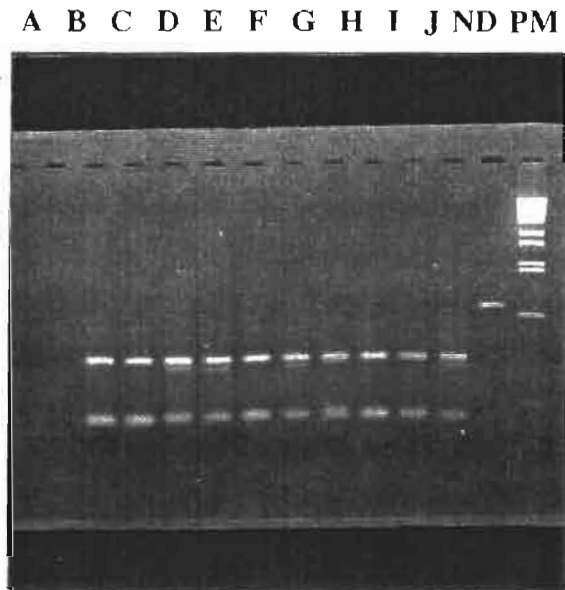


Figure 6 : Profils de digestion des bandes A1-1 et A1-2 par l'enzyme Hha I sur gel d'agarose 1,6%.



Figure 7 : Profils de digestion des bandes A1-1 et A1-2 par l'enzyme Rsa I sur gel d'agarose 1,6%.



A=2031 ; B=2572 ; C=2355 ; D=2667 ; E=2205
 F=2298 ; G=417 ; H=356 ; I=307 ; J=75 ;
 PM=Poids Moléculaire ; ND=Témoin non digéré (2205).

Tableau III : Profils de digestion avec *Hha* I et *Rsa* I.

	2301	2572	2355	2667	2205	2298	417	356	307	75
<i>Hha</i> I	H1	H2	H1	H1	H1	H1	H2	H2	H1	H1
<i>Rsa</i> I	R2	R2	R1	R1	R2	R1	R2	R2	R2	R1

En résumé, les souches se répartissent en trois schizodèmes (Tableau III) :

- . Schizodème A : souches 2355, 2667, 2298 et 75 (profils H1 et R1),
- . Schizodème B : souches 2301, 2205 et 307 (profils H1 et R2),
- . Schizodème C : souches 2572, 417 et 356 (profils H2 et R2).

L'analyse des RFLP met donc en évidence l'existence d'une hétérogénéité parmi les souches de *L. infantum* qui apparaissaient monomorphes par l'analyse RAPD pour l'amorce A1.

IV Discussion

Notre étude a montré, pour les dix souches de *L. infantum*, des profils monomorphes pour deux fragments d'ADN sur gel d'agarose et de polyacrylamide. Les RFLP ont cependant révélé un polymorphisme. Sur huit enzymes testées, trois n'ont pas digéré l'ADN; trois n'ont pas permis de différencier les souches entre elles, et les deux dernières ont généré des profils hétérogènes. Ces résultats démontrent que les deux fragments ne sont pas parfaitement monomorphes. Le polymorphisme de restriction de fragments d'amplification apparaît donc comme une méthodologie adaptée dans notre cas pour révéler une variabilité intraspécifique. Une étude plus approfondie par d'autres techniques telles que le séquençage, déterminera s'il existe à l'intérieur de ces fragments une séquence monomorphe spécifique de l'espèce *L. infantum*.

De plus les études menées parallèlement, ont montré que le profil monomorphe observé sur les profils RAPD avec l'amorce A1, pour les souches de *L. infantum*, était aussi présente pour trois autres espèces de leishmanies : *L. major*, *L. donovani* et *L. chagasi*. L'analyse phylogénique permet de comprendre l'analogie des profils entre *L. donovani*, *chagasi* et *infantum*. Ces trois espèces font partie du même complexe *donovani* et sont génétiquement assez homogènes (13). De plus, elles ont la particularité d'être souvent responsables de la même pathologie : la leishmaniose viscérale (*L. infantum* est parfois responsable de leishmanioses cutanées mais c'est moins fréquent). Il serait donc intéressant d'élaborer une sonde capable de reconnaître les leishmanies de ce complexe pour des applications épidémiologiques et cliniques. Il n'est pas en effet nécessaire de disposer d'une sonde spécifique de chacune de ces trois espèces puisque celles-ci ont une répartition géographique

très différente :

L. donovani est responsable de la leishmaniose indienne.

L. infantum est responsable de la leishmaniose souvent viscérale et quelques fois cutanée du pourtour méditerranéen.

L. chagasi est responsable de la leishmaniose viscérale en Amérique du sud.

Cependant, l'extension de l'analyse RAPD sur un large échantillon de souches de référence a révélé le même profil pour une souche de *L. major*. Or, des analyses phylogéniques montrent une distance génétique relativement importante entre l'espèce *L. major* et le complexe *donovani*. Il semble donc que le fragment RAPD A1 ait un niveau de spécificité phylogénique plus large que le seul complexe *L. donovani/infantum/chagasi*.

Il n'est pas certain que le polymorphisme révélé par RFLP empêche de générer une sonde spécifique de *L. donovani/infantum*. En effet, une étude similaire menée au laboratoire sur *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas, a montré un cas de figure très similaire. Un fragment RAPD monomorphe dans toute l'espèce a montré un polymorphisme additionnel par RFLP. Cependant, des expériences d'hybridation ont montré que ce fragment s'hybridait correctement à toutes les souches appartenant à l'espèce *T. cruzi*, et seulement à celles-ci. Ce fragment constitue donc, en dépit de son hétérogénéité résiduelle, un candidat valable pour élaborer une sonde spécifique de *T. cruzi*.

La suite de ce travail consistera : (i) à mieux évaluer le niveau de spécificité phylogénique du fragment A1 sur un échantillonnage de souches plus important (en particulier pour vérifier le résultat portant sur *L. major*); (ii) à voir si le fragment A1 s'hybride correctement à toutes les souches du complexe *L. donovani* et à elles seules (en jouant sur les conditions de stringence, on peut espérer que le fragment ne s'hybride pas aux souches *L. major*, phylogéniquement plus éloignées); (iii) à explorer plus en profondeur par séquençage la structure de ce fragment, et en particulier, à rechercher dans les deux fragments révélés en gel de polyacrylamide une séquence monomorphe spécifique du complexe *donovani* seul et d'autres séquences spécifiques de chaque espèce constituant ce complexe.

V Conclusion

Cette étude montre l'intérêt des RFLP dans l'analyse du monomorphisme observé par RAPD avec l'amorce A1 pour la caractérisation génétique de souches de *L. infantum*. Il a pu être ainsi déterminé trois schizodèmes qui prouvent une certaine hétérogénéité de séquence, inapparente sur les profils d'amplification sur gel d'agarose. Le polymorphisme obtenu en RFLP nous permet d'envisager les expériences futures telles que le séquençage pour pouvoir atteindre le but final de ce projet, qui est l'élaboration d'une sonde spécifique du complexe *donovani* ou éventuellement, de chacune des trois espèces de ce complexe.

Bibliographie

- (1) Abderrazak S. B., Guerrini F., Mathieu-Daudé F., Truc P., Neubauer K., Lewicka K., Barnabé C., Tibayrenc M. (1993). Isoenzyme Electrophoresis for Parasite Characterization. *Methods in Molecular Biology*, vol 21, 361-381.
- (2) Cox F.E.G.(1993). *Modern Parasitology*. Blackwell Scientific Publications, 58-62.
- (3) Lanotte G., Rioux J. et Serres E. (1986). Approche cladistique du genre *Leishmania* Ross, 1903. *C. R. Acad. Sci. Paris*, N° 288, 269-285.
- (4) Henry I. (1991). Les outils de la biologie moléculaire : enzymes de restriction, blots, sondes, banques d'ADN et PCR. *Bull Cancer*, N°78, 33-40.
- (5) Fani R., Damania G., Di Serio C., Gallori E., Bazzicalupo M. (1993). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for microorganisms. *Molecular Ecology*, N°2, 243-250.
- (6) Tibayrenc M., Neubauer K., Barnabé C., Guerrini F., Skarecky D., Ayala F. J. (1992). Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 90, 1335-1339.
- (7) Tibayrenc M., Ben Abderrazak S. (1993). Apport de la génétique des populations au problème du typage des souches de parasites. *OCEAC Vol 26*, N°3, 121-126.
- (8) Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning*, vol 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6.11-6.12.
- (9) Dinesh K. R., Lim T. M., Chua K. L., Chan W. K., Phang V. P. (1993). RAPD analysis: An Efficient Method of DNA Fingerprinting in Fishes. *Zoological Science* vol 10, 849-854;
- (10) Laemmli U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- (11) Stryer L. (1992). La biochimie de Lubert Stryer. *Médecine-Sciences*, pp118-119.

(12) Toulmé J. J. (1985). Electrophorèse des acides nucléiques. Applications en taxonomie. Société Zoologique de France, 105-109.

(13) Guerrini F. (1993). Génétique des Populations et Phylogénie des *Leishmania* du Nouveau Monde. Thèse de Doctorat d'Université, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, pp111.

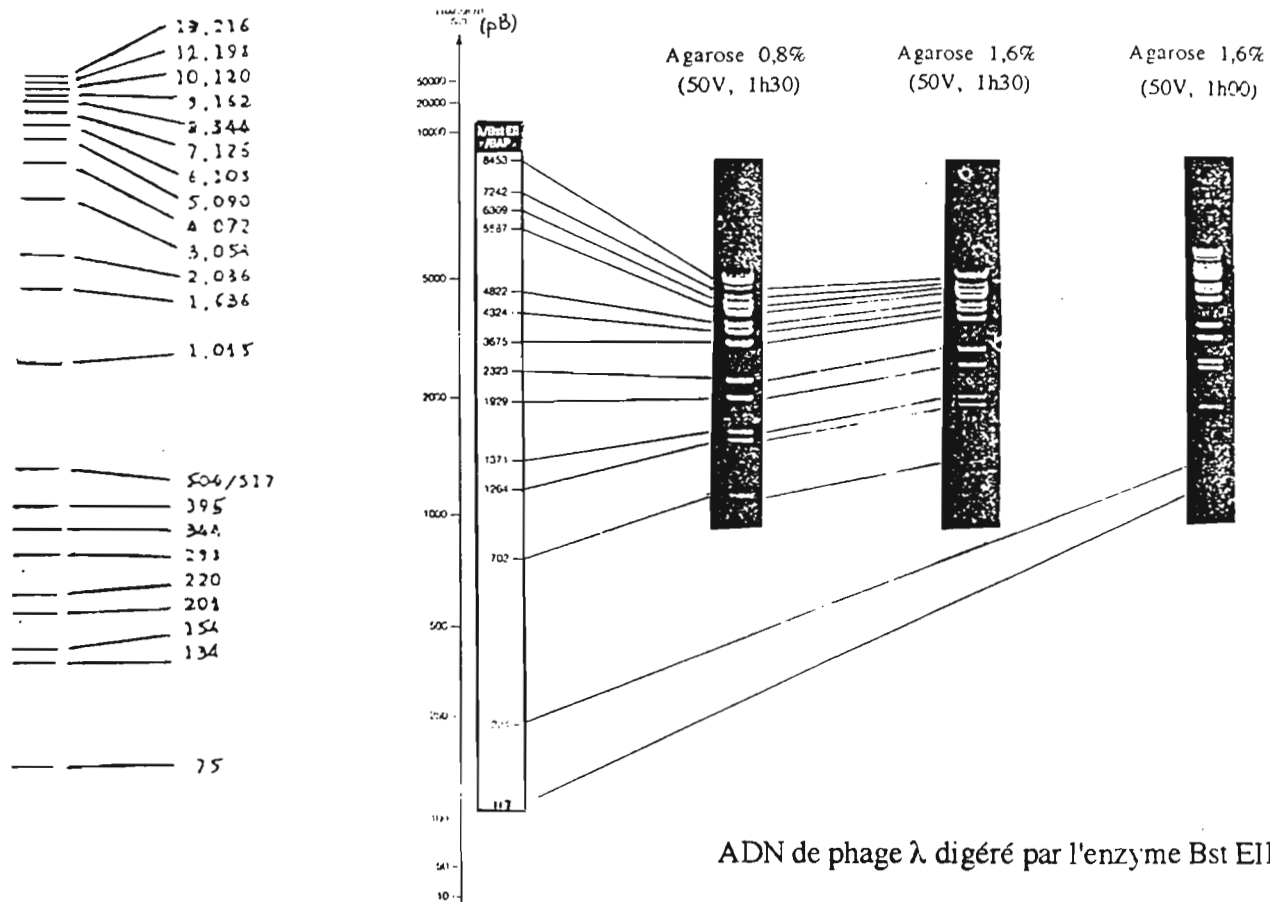
Annexe 1

Tableau I : code OMS et origine des souches

STOCK	Code OMS	Lieu d'isolement	Lieu probable de contamination	HIV	Zymodème MON-*
LEM 75	MIIOM/FR/78/LEM75	Béziers		(-)	MON-1
LEM 307	MIIOM/ES/81/BCN1	Montserrat		(-)	MON-29
LEM 417	MIIOM/DZ/82/LIPA59	Algérie		(-)	MON-24
LEM 356	MIIOM/FR/82/LEM356	Amélie les bains		(-)	MON-33
LEM 2205	MHOM/ES/90/BCN61	Barcelone		(-)	MON-28
LEM 2298	MIIOM/ES/91/LEM2298	Montpellier	Valencia	(+)	MON-183
LEM 2355	MIIOM/ES/91/LBM10	Toulouse	Valencia	(+)	MON-183
LEM 2572	MIIOM/IT/92/LBM14	Toulouse	Milan	(+)	MON-1
LEM 2301	MIIOM/FR/92/LBM12	Toulouse	Marseille	(+)	MON-1
LEM 2667	MIIOM/ES/93/LBM17	Toulouse	Madrid	(+)	MON-1

* Souches caractérisées par le Laboratoire d'Ecologie Humaine de la Faculté de Médecine de Montpellier (centre référence OMS).

Fig 1 : Marqueurs de poids moléculaire utilisés.



Annexe 2

COLORATION DES GELS AU AgNO_3

Mettre des gants avant de manipuler les gels, les laver à l'eau pour chaque changement de bains (évite la présence de traces de doigts sur le gel après coloration) et les garder jusqu'à la fin.

Acide Trichloroacétique (12 %)	100 ml	60 min
Méthanol (5 %)		3 x 20 min
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,004 %) 100 ml (à préparer juste avant emploi)		1 min
Rincer à l'eau distillée <u>3 fois</u> .		
AgNO_3 (0,2 %)	100 ml	
HCHO	75 ml	20 min
(à préparer juste avant emploi)		
Rincer à l'eau distillée <u>2 fois</u> .		
Na_2CO_3 (3 %)	200 ml	
HCHO	100 ml	<u>Révélation</u>
2 grains de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (à préparer juste avant emploi)		
Rincer à l'eau distillée <u>2 fois</u> .		
CH_3COOH (5 %)	100 ml	10 min
Méthanol (5 %)		15 min

Annexe 3

Tableau I : Conditions de digestion des endonucléases.

Enzymes	Sites de coupures	Tampon	Tampon en μ l	Enzymes en unités	Température de digestion
EcoR I	G*AATTC	1	2	2	37°C
Pst I	CTGCA*G	2	2	2	37°C
Hpa II	C*CGG	6	2	2	37°C
Hae III	GG*CC	2	2	2	37°C
Hha I	GCG*C	2	2	2	37°C
Alu I	AG*CT	3	2	2	37°C
Rsa I	GT*AC	5	2	2	37°C
Taq I	T*CGA	4	2	2	65°C

Fig 1 : Tampons de digestion des différentes endonucléases

Tampon 1 : Tris-HCl 50 mM ; NaCl 100 mM ; MgCl₂ 10 mM ; Dithioerythritol 1 mM ; pH 7,5.

Tampon 2 : Tris-HCl 50 mM ; NaCl 50 mM ; MgCl₂ 10 mM ; pH 8,0.

Tampon 3 : Tris-acétate 33 mM ; K-acétate 66mM ; Mg-acétate 10 mM ; Dithioerythritol 0,5 mM ; pH 7,9.

Tampon 4 : Tris-HCl 10 mM ; NaCl 100mM ; MgCl₂ 5 mM ; 2-Mercaptoéthanol 1mM ; pH 8,0.

Tampon 5 : Tris-HCl 10 mM ; MgCl₂ 10 mM ; Dithioerythritol 1 mM ; pH 7,5.

Tampon 6 : Tris-HCl 10 mM ; MgCl₂ 10 mM ; 2-Mercaptoéthanol 10 mM ; pH 7,5.