



Institut français de recherche scientifique
pour le développement en coopération

Centre
de
Montpellier

RECHERCHE D'UN MARQUEUR
MOLÉCULAIRE SPÉCIFIQUE DE L'ESPÈCE
TRYPANOSOMA CRUZI
PAR LA MÉTHODE DES RAPD
(Random amplified polymorphic DNA)

Nathalie DUTRAIT

Laboratoire de génétique moléculaire des parasites et des vecteurs
UMR CNRS-ORSTOM n°9926

Fonds Documentaire

19 OCT. 1995

Core 31

A 46580 EXA

Nathalie DUTRAIT

RECHERCHE D'UN MARQUEUR MOLÉCULAIRE SPÉCIFIQUE
DE L'ESPÈCE *TRYPANOSOMA CRUZI*
PAR LA MÉTHODE DES RAPD
(Random amplified polymorphic DNA)

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 Nathalie Dutrait du diplôme d'études approfondies de biologie-santé de l'université des sciences et techniques du Languedoc-Montpellier I, le 2 septembre 1994.

© Orstom, 1994, Centre de Montpellier

**Université des Sciences et Techniques
du Languedoc - Montpellier II**

Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie-Santé

Mémoire de Stage

Année 1993-1994

**Recherche d'un marqueur moléculaire
spécifique de l'espèce *Trypanosoma cruzi*
par la méthode des RAPD
(Random Amplified Polymorphic DNA)**

soutenu le 7 Septembre 1994

par

Nathalie Dutrait

**UMR CNRS-ORSTOM n°9926 :
Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs
Centre de Recherche ORSTOM de Montpellier
Directeur de stage : Michel Tibayrenc**

Recherche d'un marqueur moléculaire spécifique de l'espèce *Trypanosoma cruzi* par la méthode des RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA).

La maladie de Chagas est une infection due à un protozoaire flagellé de la famille des kinétoplastidés, *Trypanosoma cruzi*, transmise par des insectes hématophages de la famille des reduviidés. Cette endémie représente un des problèmes majeurs de santé publique en Amérique Latine. En effet, l'OMS estime que 16 à 18 millions d'individus sont infectés, et que 90 millions d'individus sont exposés à cette maladie dans cette région du Monde¹. Dans la forme chronique de cette maladie, les formes parasitaires sont rares, ce qui rend malaisé le diagnostic. Il est difficile de savoir si une sérologie positive constitue une simple cicatrice immunologique, ou si elle signe la présence effective de trypanosomes chez le patient². Il est donc important d'élaborer de nouveaux outils moléculaires capables de détecter le parasite lui-même, et de le différencier d'autres parasites voisins, comme *Trypanosoma rangeli*, une espèce non pathogène. La détection et l'identification du parasite sont nécessaires, non seulement chez l'homme, mais également chez l'insecte vecteur (études épidémiologiques).

L'élaboration d'une méthode d'identification moléculaire spécifique de *T. cruzi* (donc valable pour toutes les souches de ce parasite) est compliquée par le fait que cette espèce présente un polymorphisme génétique considérable. Ceci a été mis en évidence en particulier par le laboratoire d'accueil, grâce à la technique des isoenzymes^{3,4}. Plus récemment, Tibayrenc et al. (1993)⁵ ont appliqué la nouvelle technique des RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) à l'étude du polymorphisme génétique des protozoaires parasites, et en particulier, de *T. cruzi*.

L'amplification de l'ADN par amorces aléatoires, RAPD^{6,7} apporte théoriquement un marquage au niveau de résolution quasi-illimité. En effet, le principe est d'amplifier l'ADN des organismes étudiés, non pas à l'aide d'amorces spécifiques de séquence connue, mais avec des amorces dont la séquence est déterminée arbitrairement. Pour une série d'individus donnée, chaque amorce détermine un polymorphisme donné (analysé sur gels d'agarose colorés au bromure d'éthidium). Il y a actuellement 800 amorces différentes commercialisées. Des séquences de 10 paires

de bases sont généralement utilisées, dans des conditions d'amplification de faible stringence.

La technique RAPD a montré une reproductibilité satisfaisante dans le cas des protozoaires parasites^{5,8}. Comme pour les isoenzymes, un polymorphisme considérable a été mis en évidence chez *T. cruzi*. Cependant, certaines amorces ont montré, en gel d'agarose, un profil monomorphe pour toutes les souches de *T. cruzi* testées. C'est en particulier le cas du fragment généré par l'amorce A8. Ce produit d'amplification, que nous désignerons dans la suite de ce mémoire par l'expression abrégée : "fragment A8", a une taille d'environ 750 paires de bases. Il est présent chez toutes les souches de *T. cruzi* testées par Tibayrenc et al. (1993), et ne se retrouve dans aucune des autres espèces parasitaires testées (*Trypanosoma rangeli*, *T. brucei*, *Leishmania* spp., *Plasmodium falciparum*). La seule exception notable est *T. cruzi marenkellei*, un parasite isolé de chauves-souris en Amérique latine, qui est morphologiquement indistinguable de *T. cruzi*, et dont le pouvoir pathogène chez l'Homme est inconnu.

Le fragment A8 constitue donc potentiellement un marqueur spécifique de l'espèce *T. cruzi* ; il fait littéralement abstraction de la variabilité génétique considérable du parasite, puisqu'il est monomorphe chez toutes les souches étudiées. Cependant, il est nécessaire d'approfondir le résultat préliminaire obtenu par Tibayrenc et al. (1993).

Le but du présent travail était à la fois appliqué et fondamental : il s'agissait, d'une part, de mieux évaluer la valeur du fragment A8 comme marqueur d'espèce, d'autre part, d'explorer sa structure en vue d'éventuelles études phylogéniques. Pour cela, nous avons suivi la démarche suivante :

(i) vérification du résultat obtenu pour l'amorce A8 par Tibayrenc et al. (1993) sur une batterie de 6 souches de *T. cruzi*, plus une souche de *T. cruzi marenkellei*;

(ii) étude de la structure moléculaire de ce fragment, par des techniques plus résolutive que l'électrophorèse en gel d'agarose (électrophorèse en gel de polyacrylamide, RFLP), afin de voir dans quelle mesure l'apparent monomorphisme vu en gel d'agarose ne cache pas en fait un polymorphisme de séquence.

(iii) hybridation du fragment A8 d'une des souches avec ceux des autres souches pour tester leur homologie, et donc, la valeur potentielle de ce fragment comme marqueur de l'espèce, valable pour toutes les souches;

(iv) clonage du fragment pour l'amplifier, ce qui permettra d'une part, de l'utiliser comme sonde, d'autre part de le séquencer.

MATERIEL & METHODE

Matériel biologique. Six souches de *T. cruzi*, clonées au laboratoire, ont été choisies dans le but d'être représentatives de la variabilité génétique totale de l'espèce. (Figure 1 et Tableau I)

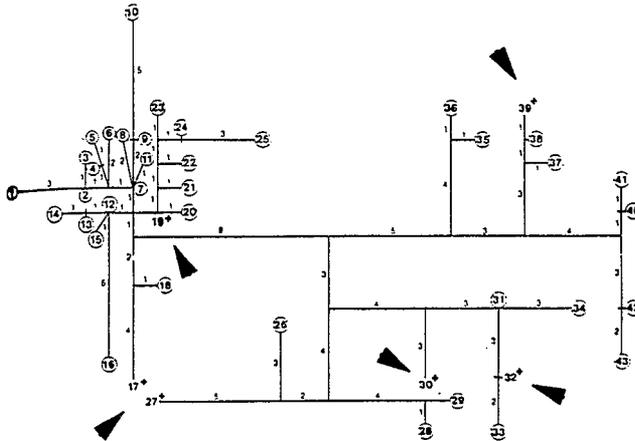


Figure 1 : Réseau de Wagner (d'après 3) décrivant les relations phylogéniques des 43 zymodèmes de *T. cruzi* identifiés sur la base de 15 loci isoenzymatiques. Le long des branches de l'arbre, entre chaque intersection est indiqué le nombre de pas évolutifs, permettant de quantifier les relations phylogéniques entre les génotypes. Les lignées choisies pour notre étude () reflètent une diversité qui permettra de comparer des clones plus ou moins éloignés dans l'évolution. Les clones 19 et 39 correspondent à des clones "majeurs": majoritairement représentés en Amérique du Sud.

Espèces	Génotypes	Stocks	Hôtes
<i>T. cruzi</i>	17	X10 C1 1	Homme
<i>T. cruzi</i>	19	P209 C11	<i>T. infestans</i>
<i>T. cruzi</i>	27	CanIII C11	Homme
<i>T. cruzi</i>	30	Esm Z2	Homme
<i>T. cruzi</i>	32	TU18 C12	<i>T. infestans</i>
<i>T. cruzi</i>	39	SC43 C11	<i>T. infestans</i>
<i>T. cruzi marenkellei</i>		B3	Chauve-souris

Tableau I : Stocks étudiés.

Extraction de l'ADN. L'ADN génomique est extrait à partir de culots parasites conservés à -70°C . L'extraction comprend trois phases : lyse des cellules, extraction des protéines et précipitation de l'ADN. Le culot est mis en suspension dans un tampon de lyse (Tris-HCl pH 8, 10 mM ; EDTA, 1 mM ; SDS 1%) et incubé une nuit à 55°C en présence de protéinase K (100 $\mu\text{g/ml}$). Les protéines sont éliminées par deux extractions phénol/chloroforme/alcool-isoamylique puis l'ADN est précipité par de

l'acétate de sodium 0,3M et de l'éthanol à 70% froid (-20°C). Après séchage sous vide, le culot est mis en suspension dans de l'eau stérile Milli Q^R. La concentration en ADN est évaluée par spectrophotométrie à une longueur d'onde $\lambda = 257 \text{ nm}$ (1 DO = 50 $\mu\text{g/ml}$). Après chaque extraction, un contrôle de la qualité de l'ADN est effectué sur gel d'agarose 0,8%.

RAPD. 10 ng d'ADN génomique sont amplifiés dans un volume final de 100 μl de milieu réactionnel (Tris-HCl pH 8,3 10 mM ; MgCl_2 (6 H_2O) 1,5 mM ; KCl 50 mM ; gélatine 100 $\mu\text{g/ml}$; amorce A8 0,2 μM ; dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 100 μM chacun) en présence de 1,5 UI de Taq DNA polymérase (Boehringer Mannheim, France). Chaque cycle comprend trois phases : 1 min à 94°C , 1 min à 36°C , 2 min à 72°C . Les 45 cycles sont complétés par une phase d'élongation de 7 min à 72°C . Une réaction d'amplification témoin sans ADN parasite est systématiquement faite en parallèle à chaque série d'amplifications.

Migration en gel d'agarose. Les produits d'amplification sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gel d'agarose à 1,6% dans du tampon TAE (Tris-acétate pH 7,4 0,04 M ; EDTA 1 mM) en présence de bromure d'éthidium 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (BET).

Migration en gel de polyacrylamide. La migration des produits d'amplification est réalisée, d'autre part, dans un gel de polyacrylamide 5% dans du tampon TBE (Tris-borate pH 7,5 0,045 M ; EDTA 1 mM). La révélation a été faite par une coloration à l'argent, ou à l'aide de BET.

Purification des fragments RAPD à partir de gel d'agarose ou de polyacrylamide. L'extraction des fragments à partir d'un gel d'agarose est réalisée par Squeeze Freeze, ou méthode à la laine de verre borosilicatée. L'extraction à partir d'un gel de polyacrylamide est réalisée par la méthode de Maxam & Gilbert 1977 appelée "Crush & soak". Après extraction, on réalise une purification par précipitation à l'éthanol.

RFLP. Le fragment amplifié de 750 paires de bases environ, purifié à partir de gel de polyacrylamide, subit de nouveau l'amplification PCR par l'amorce A8. Le produit d'amplification (300 ng environ) est alors digéré par différents enzymes de restriction, dans 20 μl de milieu réactionnel spécifique de l'enzyme, à 37°C pendant au moins 2 heures. Les fragments de restriction

sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose.

Southern blot. Après migration sur gel d'agarose à 1,6%, les fragments amplifiés des souches de *T. cruzi* étudiées dans le présent travail et de *T. cruzi marenkellei* sont transférés sur membrane nylon selon le protocole préconisé par le fournisseur (Amersham).

Hybridation. Après une préhybridation effectuée à 65°C pendant 1 heure, la membrane est hybridée en présence de 100 µg/ml d'ADN de sperme de hareng et de 10 ng/ml de sonde radiomarquée (pour une activité spécifique minimale de 10⁸ cpm/µg) à 65°C pendant 16 heures. La sonde utilisée est le fragment A8 de la souche SC 43 représentant le génotype n° 39 (Tableau I), purifié sur colonne (Quick Spin™ Columns Sephadex, Boehringer Mannheim) et marqué au ³²P par Nick translation (Kit BoehringerMannheim). Les lavages sont effectués comme suit : deux lavages dans un tampon SSPE 2X (SSPE 20X : NaCl 3 M, NaH₂PO₄.H₂O 0,15 M, EDTA 2.10⁻² M), SDS 0,1% (15 min, température ambiante), un lavage SSPE 1X, SDS 0,1% (20 min, température ambiante), un lavage SSPE 1X, SDS 0,1% à 65°C et un dernier lavage SSPE 0,1X, SDS 0,1%, à 65°C de 20 min chacun.

Clonage de produit RAPD (double brin). En fin d'amplification, la Taq polymérase rajoute une adénine à l'extrémité 3' des fragments. Pour rendre les extrémités franches, ces fragments (fragments A8 du stock P209) sont soumis à l'activité enzymatique du fragment de Klenow qui va rajouter une thymidine complémentaire. Ces produits sont ensuite phosphorylés en 5' avec la T4 DNA polynucléotide kinase, puis clonés dans le plasmide PUC 19 au site Sma I de la cassette de clonage, préalablement déphosphorylé par la phosphatase d'intestin de veau (CIP) (Boehringer Mannheim).

La ligation est réalisée grâce à la T4 ligase, pendant une nuit à 16 °C, dans un rapport molaire 2/1 (plasmide / insert).

La souche DH5α d'*Escherichia coli* est transformée selon la méthode simplifiée de Hanahan, impliquant le tampon de transformation TFB, le DMSO et le DTT. Les bactéries recombinantes sont sélectionnées sur milieu SOB contenant de l'ampicilline (50 µg/ml), du X Gal (240 µg/ml) et de l'IPTG (200 µg/ml). Les bactéries ayant inséré le plasmide recombinant forment des colonies blanches, à l'opposé des colonies bleues qui correspondent à des bactéries contenant des

plasmides sans insert et exprimant le gène Lac-Z.

RESULTATS

Profils d'amplification sur gels d'agarose et de polyacrylamide. En confirmation des résultats obtenus par Tibayrenc et al. (1993), une bande épaisse de 750 pb est présente dans tous les profils obtenus sur gel d'agarose. Mais la séparation en gel de polyacrylamide, plus résolutive, a mis en évidence deux profils différents : les souches X10 C11 et TU18 C12, représentant les génotypes 17 et 32, présente en effet un seul fragment, mais pour les 4 autres souches de *T. cruzi*, et pour la souche de *T. cruzi marenkellei*, cette bande correspond à une comigration de deux fragment d'ADN. (Figure 2). Parmi ces deux bandes identifiées en gel de polyacrylamide, un fragment de 750 pb est commun à toutes les souches testées dans le cadre du présent travail.

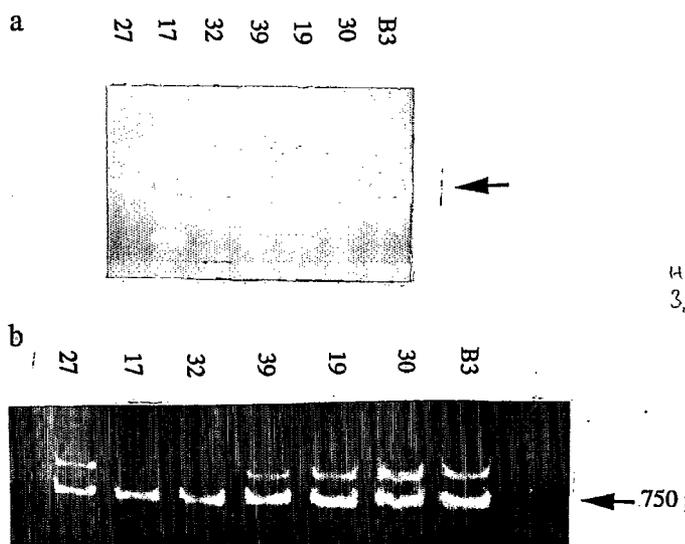


Figure 2 : Migration électrophorétique des produits d'amplification. a) gel d'agarose 1,6%. (1) 27; (2) 17; (3) 32; (4) 39; (5) 19; (6) 30; (7) B3; b) en gel de polyacrylamide à 5%. (1) 27; (2) 17; (3) 32; (4) 39; (5) 19; (6) 30; (7) B3.

Analyse des fragments de restriction. Seize enzymes de restriction ont été testés sur le fragment de 750 pb commun à toutes les souches. Cinq enzymes (HaeIII, Hpa II, Hha I, Pst 1, Sau 3A) donnent des profils de restriction différents entre la souche de *T. cruzi marenkellei* d'une part, et les 6 souches de *T. cruzi* d'autre part. Le seul polymorphisme observé au sein de *T. cruzi*, mis en évidence par Rsa I, concerne les génotypes 17 et 19, (Figure 3 et Tableau II).

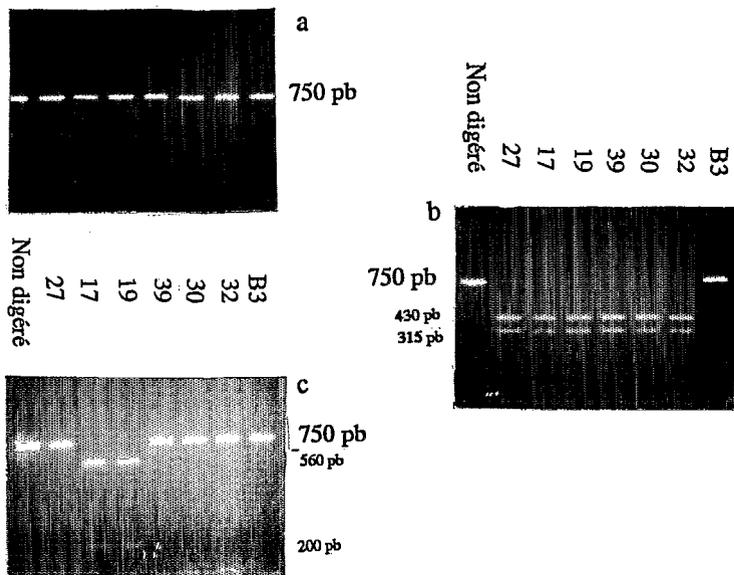


Figure 3 : Profils de restriction. Digestion par EcoRI (a), Pst I (b) et Rsa I (c). Les profils de restriction présentent 3 cas de figures possibles. a) Monomorphisme des profils de restriction obtenus avec Eco RI de *T.cruzi* et *T.cruzi marenkellei*. b) Profils de restriction Pst I différents entre *T.cruzi* et *T.cruzi marenkellei*. c) Polymorphisme au sein de *T.cruzi*, mis en évidence par Rsa I, concernant les génotypes 19 et 17.

Hybridation du southern blot.

L'étude RFLP nous a permis de révéler un polymorphisme de séquence du fragment A8 au sein de *T.cruzi*. L'hybridation, par contre, a pour but de déterminer l'existence d'une homologie de séquence entre les différentes souches du parasite. Le fragment de 750 pb de la souche SC 43 représentant le génotype 39, utilisé comme sonde, s'hybride avec les produits d'amplification des 6 souches de *T. cruzi* et de la souche de *T. cruzi marenkellei*. Mais l'affinité est plus faible pour *T.cruzi marenkellei*. (Figure 4).

Clonage. Le clonage du fragment unique de 750 pb de la souche P209 (représentant le génotype 39) dans PUC 19, a permis l'obtention de 6 plasmides recombinants, sélectionnés par l'activité enzymatique β galactosidase. Après digestion par Eco R I et Sal I, une migration électrophorétique en gel d'agarose nous permet de repérer les clones 3,4,5,7,13 et 21 qui ont intégré l'insert P209, alors que 21 clones ont été sélectionnés par l'activité β galactosidase.

DISCUSSION

Le temps imparti pour le présent travail était trop bref pour pouvoir espérer de mettre au point un marquage moléculaire réellement opérationnel. Le but était simplement de commencer de dégager les bases nécessaires

Enzymes	Digestion	Polymorphisme	Clone/espèce
HaeIII	+	+	<i>T.c.marenkellei</i>
Hpa II	+	+	<i>T.c.marenkellei</i>
Hha I	+	+	<i>T.c.marenkellei</i>
Pst I	+	+	<i>T.c.marenkellei</i>
Sau 3A	+	+	<i>T.c.marenkellei</i>
Rsa I	+	+	17,19
Alu I			
EcoR I			
Acc I	+	-	
BamHI			
Kpn I			
Sal I			
Sma I			
Xba I			
HindIII			
Sca I			

Tableau II : Résultats des RFLP. Le polymorphisme observé est soit entre *T.cruzi* et *T.cruzi marenkellei* (Hae III, Hpa I, Pst I, Sau 3A), soit au sein de *T.cruzi* entre les génotypes 17,19 d'une part et 27,30,32, 39 d'autre part (Rsa I).

pour élaborer ce nouvel outil.

L'étude des fragments de restriction a décelé une faible variabilité au sein de l'espèce *T.cruzi*. Malgré son profil d'amplification similaire à *T.cruzi*, *T.marenkellei* se distingue de façon nette par l'étude RFLP. Ceci est en accord avec les notions phylogéniques généralement admises.

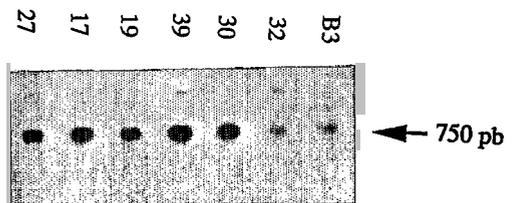


Figure 4 : Hybridation du southern blot en présence du fragment A8/génotype 39 radiomarqué au ^{32}P . 25 ng d'ADN amplifié à partir des stocks correspondants aux génotypes 17, 19, 27, 30, 39, B3, et 5 ng à partir du stock correspondant au génotype 32 ont été déposés sur gel d'agarose 1,6 % puis transférés sur membrane de nylon.

Les résultats obtenus par l'étude RFLP permettent de penser que les séquences des fragments A8 obtenues chez diverses souches de *T. cruzi* et de *T. cruzi marenkellei* pourront être utilisées comme traceurs phylogéniques.

Le polymorphisme montré par les RFLP n'a pas de conséquence au niveau des expériences d'hybridation : la sonde issue du stock SC43 reconnaît chacun des fragments du southern blot avec une bonne affinité, reflétant une grande homologie de séquence entre la sonde et les fragments des autres souches. Ceci est encourageant pour l'utilisation potentielle du fragment A8 comme marqueur d'espèce. Cependant, la spécificité de l'hybridation devra être testée sur l'ADN génomique d'autres espèces (*T. rangeli*, *Leishmania*) afin de vérifier que le fragment A8 ne s'hybride pas à ces autres espèces. Nous n'avons pas eu le temps de mener cette expérimentation dans le

cadre du présent travail. L'homologie apparente existant entre *T. cruzi* et *T. marenkellei* poserait un problème dans l'élaboration d'une sonde spécifique de *T. cruzi*. Cet inconvénient est minimisé par le fait que *T. marenkellei* est un parasite de chauve-souris, qui n'a jamais été trouvé chez l'Homme jusqu'à présent.

Le clonage permettra d'amplifier le fragment en vue de son utilisation comme sonde (après vérification de sa spécificité sur d'autres espèces). Il rendra par ailleurs possible le séquençage de ce fragment, avec deux retombées potentielles: (i) sélection de primers spécifiques pour mise au point d'un diagnostic par PCR de la maladie de Chagas en phase chronique; (ii) élaboration de phylogénies⁹ moléculaires entre différentes souches de *T. cruzi* et de *T. marenkellei*.

Références

- 1 Wallace P. and Herbert G. (1989) A colour atlas of tropical medicine and parasitology. *Ed. ELB*. 48-52.
- 2 Kirchhoff L.V. (1993). Chagas disease. American trypanosomiasis. *Parasitic diseases*, 7, 3.487-507.
- 3 Tibayrenc M., Ward P., Moya A., Alaya F. (1986) Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 115-119.
- 4 Tibayrenc M. & Alaya F. (1988) Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of chagas disease : genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution*, 42 (2), 277-292.
- 5 Tibayrenc M., Neubauer K., Barnabé C., Guerrini F., Skarecky D., Alaya F. (1993) Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1335-1339.
- 6 Welsh J. and McClelland M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18 (24), 7213-7218.
- 7 Willams J G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.C. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (22), 6531-6535.
- 8 Meunier J.R. and Grimont P.A.D. (1993) Factors affecting reproductibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144,373-379.
- 9 Hadrys H., Balick M., Schierwater B. (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*.1, 55-63.