

# DIFFERENCIATION DES ESPECES RESPONSABLES DE LEISHMANIOSE CUTANEE PAR UNE AMPLIFICATION PCR DU GENE CODANT POUR LA DIPEPTIDYL PEPTIDASE III

H. KBAIER-HACHEMI<sup>1\*</sup>, M. BARHOUMI<sup>1\*</sup>, A.S. CHAKROUN<sup>1</sup>,  
M. BEN FADHEL<sup>1</sup> ET I. GUIZANI<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'Epidémiologie et d'Ecologie Parasitaire/LR00SP04 - "Programme de recherche en génomique et biotechnologie appliquées aux maladies parasitaires", Institut Pasteur de Tunis, 13 place pasteur, BP 74, 1002 Tunis, Tunisie.

\* Contribution égale

\*\* Auteur Correspondant: Tél : +21671844 171; Fax : +21671 791 833 ; E-mail : ikram.guizani@pasteur.rns.tn

## RESUME

Les leishmanioses sont des maladies vectorielles, parasitaires dues à l'infection par des protozoaires flagellés du genre *Leishmania*, incluant des atteintes viscérales ou cutanées. La leishmaniose cutanée (LC) correspond à un groupe de maladies en raison de la variabilité des manifestations cliniques impliquant un large éventail d'espèces *Leishmania*. En Tunisie, trois formes différentes ont été décrites causées par *L. infantum*, *L. major* et *L. tropica*. Au cours de ce travail, nous avons évalué le potentiel de sites polymorphes dans le gène codant pour la dipeptidyl peptidase III (DPP III) pour différencier entre les différentes espèces de *Leishmania* en général, et particulièrement celles rencontrées en Tunisie. Un couple d'amorces sens et reverse amplifiant une séquence de 664 pb du gène DPP III a été défini au niveau de régions comportant des mutations ponctuelles : 2 situées dans l'amorce sens et 1 au niveau de l'amorce reverse pour amplifier des ADNs d'isolats représentatifs de diverses espèces de parasites telles que *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. arabica*, *L. aethiopica* et *L. tarentolae*. L'amplification a été positive chez toutes les espèces *Leishmania* testées à l'exception de *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. archibaldi*, *L. donovani*, et *L. tarentolae*. En considérant les espèces cutanéotropes rencontrées en Tunisie, l'amplification a été positive chez les deux espèces *L. tropica* et *L. major* et négative dans le cas de *L. infantum*. Ce pouvoir de discrimination entre *L. infantum* et le couple *L. tropica*/*L. major* constitue une première démarche dans la taxonomie des espèces cutanéotropes prévalant en Tunisie.

**Mots clés:** Leishmaniose cutanée, polymorphisme ADN, DPP III.

## SUMMARY

*Leishmaniasis* are a group of vector-born, parasitic diseases caused by protozoan of the *Leishmania* genus, that includes visceral or cutaneous forms. Cutaneous leishmaniasis (CL) refers to a group of diseases because of the variability of clinical manifestations, caused by a large number of *Leishmania* species. In Tunisia, three different forms of CL are encountered, having different causal agents *L. infantum*, *L. major* and *L. tropica*. For the purpose of this study, we assessed the potential of polymorphic sites in dipeptidyl peptidase III (DPP III) encoding gene to differentiate among *Leishmania* species encountered in Tunisia. A pair of forward and reverse primers amplifying a 664 bp DPP III sequence were designed in regions including 2 mutations in the forward primer and 1 in the reverse, and were used to amplify DNA from diverse species of *Leishmania* parasites including *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. arabica*, *L. aethiopica* and *L. tarentolae*. Amplification was positive for all tested *Leishmania* species except for *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. archibaldi*, *L. donovani* and *L. tarentolae*. In case of cutaneous *Leishmania* species encountered in Tunisia, amplification was positive for both *L. tropica* and *L. major* and negative in case of *L. infantum*. This ability to differentiate *L. infantum* from *L. tropica*/*L. major* constitutes a first step in the taxonomy of cutaneous species prevalent in Tunisia.

**Key words:** Cutaneous leishmaniasis, DNA polymorphism, DPP III.

## INTRODUCTION

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires dues à des protozoaires flagellés du genre *Leishmania* (*L*) et transmises par la piqûre d'un insecte vecteur, le phlébotome. Elles forment un groupe de maladies diverses allant de formes cutanées bénignes autorésolutives aux formes viscérales fatales en l'absence de traitement<sup>1</sup>.

Les leishmanioses cutanées (LC) sont causées par plusieurs espèces de leishmanies, pour la plupart d'origine zoonotique. Leur diagnostic repose sur la mise en évidence du parasite sur des frottis effectués à partir des lésions. L'identification des espèces fait appel à des techniques biochimiques (électrophorèse des isoenzymes, qui reste la technique de référence) et moléculaires (RFLP, PCR, ...) <sup>2</sup>.

En Tunisie, il existe 3 formes de LC qui se distinguent par leur distribution géographique, leur aspect clinico-épidémiologique, leur agent causal, ainsi que par leur profil sérologique <sup>3, 4</sup>. La leishmaniose cutanée sporadique (LCS) due à *L. infantum* <sup>5</sup> sévit dans les régions septentrionales <sup>3</sup> et centrales <sup>4</sup> du pays. Les zymodèmes impliqués sont principalement les zymodèmes MON-01 et MON-24 <sup>6</sup>. L'aire de distribution de la LC due à *L. infantum* se confond avec celle de la leishmaniose viscérale (LV) causée par des zymodèmes viscérotropes de la même espèce. La leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) dont l'agent causal est *L. major* MON-25, sévit à l'état endémo-épidémique dans les régions arides et semi-arides du Centre et du Sud-Ouest du pays <sup>7</sup>, mais elle a été aussi rencontrée dans des foyers du Nord-Ouest <sup>8</sup>. La leishmaniose cutanée chronique (LCC), due à *L. tropica* zymodème MON-08 (*L. killicki*) évolue classiquement au sein de micro-foyers situés dans les régions montagneuses pré-désertiques du Sud-Est du pays <sup>9</sup>. Cependant, la distribution de ces trois formes est actuellement marquée par une extension en dehors des foyers classiques. En effet, des cas de la LCS à *L. infantum* ont été rapportés dans le Centre du pays <sup>4, 5, 6, 7</sup>; *L. killicki* a été signalé dans le Centre, le Sud-Ouest <sup>10</sup> et le Nord-Ouest <sup>9</sup> du pays; alors que la LCZ à *L. major* s'est étendue d'abord au Sud-Est puis au Nord du pays <sup>7</sup>. Face à cette nouvelle situation créée par l'extension des foyers et l'émergence de nouveaux foyers, l'identification et la différenciation entre les différentes espèces en cause revêtent un intérêt tout particulier. La PCR est très adaptée à cet objectif <sup>4, 12, 13, 14, 15, 16</sup>.

Dans le présent travail, nous avons exploité le potentiel de mutations au sein du gène codant pour la dipeptidyl peptidase III (DPP III) pour la conception d'amorces permettant dans un test PCR, d'amplifier une séquence du gène. Nous avons évalué le pouvoir discriminatif des amorces conçues en testant l'ADN de différents isolats représentatifs des espèces suivantes : *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tarentolae*, *L. chagasi*, *L. arabica*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. major* et *L. archibaldi*. L'objectif de notre étude est d'utiliser le test pour la différenciation entre les trois espèces de leishmanies cutanéotropes rencontrées en Tunisie.

## MATERIEL ET METHODES

### ISOLATS ET ADN

Cinquante trois (53) échantillons d'ADN ont été utilisés au cours de ce travail. Ils ont été extraits selon la méthode adoptée par Guizani et al. <sup>17</sup>, à partir de promastigotes de cultures en phase logarithmique de croissance provenant d'isolats appartenant à 9 espèces de leishmanies (Tableau I). L'identification de ces isolats a été effectuée par typage isoenzymatique comme décrit précédemment <sup>18</sup> ou par typage moléculaire au moyen de sondes révélant des profils spécifiques d'espèces <sup>17</sup>.

### ANALYSE BIOINFORMATIQUE

Les séquences nucléotidiques (LmjF05.0960 et LinJ05\_V3.0960) et protéiques du gène DPP III des deux isolats de référence *L. major* Friedlin LmjF (MHOM/IL/81/Friedlin) et *L. infantum* clone JPCM5 (MCAN/98/LLM-877) ont été extraites à partir des bases de données genedb ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)), et alignées par les logiciels d'alignement multiple ClustalX et CLC. Une région comportant plusieurs différences entre les deux espèces a été identifiée et le programme genefisher (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/>) a permis de concevoir des amorces encadrant cette région, qui portent elles-même des polymorphismes. Leur structure secondaire a été vérifiée par le logiciel MacDNAsis (Hitachi Software). Ces amorces DPP F (sens) (5'TTTACATTACCCCTCGCGCG3') et DPP R (anti-sens) (5'TAAATTGCAATGGTGCGGCC3') amplifient une séquence de 664 pb du gène codant pour la DPP III. La cartographie de ces amorces effectuée sur l'alignement des séquences du gène DPP III de *L. major* et de *L. infantum* est illustrée sur la figure 1.

**Tableau I: Liste des différents isolats utilisés et résultats de la PCR DPP III développée dans ce travail.**

Code OMS <sup>a</sup>	Code <sup>b</sup>	Espèce <sup>c</sup>	Zymodème <sup>d</sup>	Forme clinique <sup>e</sup>	PCR <sup>f</sup>
MHOM/TN/96/Drep 05	Drep 05	<i>L. infantum</i>	MON-1	LC	-
MHOM/TN/96/Drep 08	Drep 08	<i>L. infantum</i>	MON-1	LC	-
MHOM/TN/97/Drep 11	Drep 11	<i>L. infantum</i>	MON-24	LC	-
MHOM/TN/97/Drep 13	Drep 13	<i>L. infantum</i>	MON-24	LC	-
MHOM/TN/97/Drep 14	Drep 14	<i>L. infantum</i>	MON-24	LC	-
MHOM/TN/98/Drep 17	Drep 17	<i>L. infantum</i>	NT	LC	-
MHOM/FR/84/LEM649	LEM499	<i>L. infantum</i>	MON-29	LC	-
MHOM/FR/91/LEM2235	LEM2235	<i>L. infantum</i>	MON-29	LC	-
MHOM/TN/80/IPT1	IPT1	<i>L. infantum</i>	MON-1	IV	-
MHOM/FR/84/LEM649	LEM649	<i>L. infantum</i>	MON-1	IV	-
MHOM/FR/85/LEM716	LEM716	<i>L. infantum</i>	MON-1	IV	-
MHOM/TN/93/IV10	LV10	<i>L. infantum</i>	MON-80	IV	-
MHOM/TN/94/IV42	LV42	<i>L. infantum</i>	MON-1	IV	-
MHOM/TN/94/IV49	LV49	<i>L. infantum</i>	MON-24	IV	-
MHOM/TN/94/IV50	LV50	<i>L. infantum</i>	MON-1	IV	-
MHOM/BR/74/PP75	PP75	<i>L. chagasi</i>	MON-1	IV	-
MHOM/KE/75/H9	LEM496	<i>L. donovani</i>	MON-32	IV	-
MHOM/ET/84/Addis 164	LEM 980	<i>L. donovani</i>	MON-83	IV	-
MHOM/ET/72/GEBRE1	LEM 1005	<i>L. archibaldi</i>	MON-82	IV	-
MCAN/IN/71/DBKM	DBKM	<i>L. tropica</i>	MON-62	NA	+
MHOM/IL/00/Gabaï 159	Gabaï 159	<i>L. tropica</i>	LON-9	LC	+
MHOM/IL/00/Singer	Singer	<i>L. tropica</i>	MON-54	LC	+
MHOM/IQ/76/BAG 9	Bag 9	<i>L. tropica</i>	MON-53	LC	+
MHOM/AF/82/K001	K001	<i>L. tropica</i>	MON-58	LC	+
MHOM/SU/74/SAF K27	K27	<i>L. tropica</i>	MON-60	LC	+
MHOM/IQ/73/A Sinaï III	A Sinaï III	<i>L. tropica</i>	LON-11	ICR	+
-	Ackerman	<i>L. tropica</i>	-	-	+
MRAT/IQ/73/Adhanis I	Adhanis I	<i>L. tropica</i>	MON-5	NA	+
MHOM/IQ/73/Bumm 30	Bumm 30	<i>L. tropica</i>	LON-17	IV	+
MHOM/IL/78/Rachnan	Rachnan	<i>L. tropica</i>	MON-60	LC	+
MHOM/IQ/65/L75	L75	<i>L. tropica</i>	MON-6	LC	+
MHOM/GR/00/LA28	LA28	<i>L. tropica</i>	LON-16	LC	+
MHOM/TN/06/CJ	CJ	<i>L. tropica</i>	NT	-	+
MHOM/TN/06/AM	AM	<i>L. tropica</i>	NT	-	+
MPSA/SA/84/Jisha 238	Jisha 238	<i>L. arabica</i>	LON-64	NA	+
MHOM/ET/72/L100	L100	<i>L. aethiopica</i>	MON-14	LC	+
MHOM/IL/80/Friedlin	LEM 3171	<i>L. major</i>	MON-103	LC	+
MHOM/TN/90/FMH	FMH	<i>L. major</i>	NT	LC	+
MPSA/TN/87/Ron 114	Ron 114	<i>L. major</i>	MON-25	NA	+
MPSA/TN/87/Ron 44	Ron 44	<i>L. major</i>	MON-25	NA	+
MPSA/TN/87/Ron 99	Ron 99	<i>L. major</i>	MON-25	NA	+
MPSA/TN/87/Ron 101	Ron 101	<i>L. major</i>	MON-25	NA	+
MPSA/TN/87/Ron 102	Ron102	<i>L. major</i>	MON-25	NA	+

MMER/IN/73/GTBM	G T B M	<i>L. major</i>	MON-23	NA	+
ISAL/IN/73/STDBM	S D T B M	<i>L. major</i>	LON-6	NA	+
MHOM/SA/86/PSM-3125	3 1 2 5	<i>L. major</i>	MON-26	LC	+
MHOM/IL/83/IL32	1 L 3 2	<i>L. major</i>	MON-68	LC	+
MHOM/IL/83/IL24	1 L 2 4	<i>L. major</i>	MON-66	LC	+
MPSA/TN/89/Psa4	P s a 4	<i>L. major</i>	NT	NA	+
MPSA/TN/89/Psa5	P s a 5	<i>L. major</i>	NT	NA	+
MPSA/TN/89/Psa6	P s a 6	<i>L. major</i>	NT	NA	+
MPSA/TN/89/Psa8	P s a 8	<i>L. major</i>	NT	NA	+
IMIN/IT/86/MIN1	M I N 1	<i>L. tarentolae</i> *	-	NA	-

TN: Tunisie, FR: France, IN: Inde, IL: Israël, IQ: Iraq, AF: Afghanistan, SU: USSR, GR: Grèce, KE: Kenya, ET: Ethiopie, SA: Arabie Saoudite, IT: Italie, BR: Brésil, LC: Leishmaniose cutanée, LCR: Leishmaniose cutanée récidivante, LV: Leishmaniose viscérale, NT: non typé, NA: ne s'applique pas.

a : Code OMS de l'isolat et indique l'ôte/le pays/l'année de l'isolement/le code.

b : indique le code de l'isolat.

c : indique l'espèce à laquelle appartient l'isolat définie par typage isoenzymatique<sup>18</sup> ou typage ADN par RFLP génomique<sup>17</sup>. (\*) : espèce identifiée et fournie par le centre de typage de Rome.

d : indique l'appartenance zymodémique de l'isolat par typage isoenzymatique selon Rioux et al.<sup>18</sup>.

e : indique l'origine clinique humaine de l'isolat. Cette classification ne s'applique pas aux isolats obtenus d'animaux ou d'insectes (NA).

f : indique le résultat de la PCR DPP III : + : positif ; - : négatif.

## REACTION PCR

La réaction d'amplification par PCR au moyen des amorces DPPF et DPPR a été réalisée dans un volume réactionnel de 50 µl en présence de 20 ng de l'ADN des isolats listés dans le tableau I. Le mélange réactionnel comporte également le tampon d'amplification fourni avec l'enzyme (1X), les désoxynucléotides dATP, dCTP, dGTP, dTTP (200 µM chacun), les amorces sens et anti-sens (0,03 µM chacune), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) et l'enzyme Go Taq DNA polymérase (1,5 U) (Promega). Le volume final a été ajusté par addition d'eau bidistillée autoclavée et filtrée.

L'amplification s'est déroulée dans un thermocycleur (Gene Amp PCR, System 2400, Perkin Elmer) selon le programme finalisé comme suit: dénaturation initiale pendant 3 min à 94°C suivie de 30 cycles comportant une étape de dénaturation pendant 1 min à 94°C, une étape d'hybridation des amorces pendant 1 min à 64°C et une étape d'élongation de 2 min à 72°C. Une étape d'élongation finale pendant 5 min à 72°C vient compléter le programme PCR. Les produits PCR ont été ensuite visualisés sous ultra-violet après électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % dans le tampon TAE 1X en présence de 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (BET).

## RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) GENOMIQUE

Huit (8) µg de l'ADN génomique d'une sélection de 15 isolats (Drep 5, Drep 8, Drep 11, Drep 14, Drep 16, Drep 17, IPT1, LV10, LV49, LV50, DBKM, FMH,

LEM496, LEM1005 et Jisha 238) représentatifs des espèces *L. infantum* (origines cutanée ou viscérale), *L. tropica*, *L. major*, *L. donovani*, *L. archibaldi* et *L. arabica* ont été digérés par l'enzyme de restriction PstI dans un volume réactionnel de 50 µl. Le tampon de l'enzyme a été utilisé à une concentration finale de 1X. La réaction de digestion s'est déroulée pendant une nuit à 37°C. Les produits de digestion ont été ensuite séparés sur gel d'agarose 0,7 % dans du tampon TAE 1X en présence de 0,5 µg/ml de BET, et transférés sur membrane de Nylon Hybond N+ (Amersham) selon la technique de southern blotting<sup>19</sup> comme décrit auparavant<sup>17</sup>.

## PREPARATION, MARQUAGE DE LA SONDE DPP III ET HYBRIDATION

Une PCR ciblant le fragment de 664 pb du gène de la DPP III a été réalisée sur ADN de l'isolat de référence LmjF (MHOM/IL/81/Friedlin). Les amplicons ont été ensuite séparés sur gel d'agarose 1 % et la bande correspondant à la taille attendue a été découpée du gel, puis purifiée en utilisant la trousse «QIAquick gel extraction kit» (QIAGEN) selon les recommandations du fabricant. La bande purifiée a été ensuite marquée par du α<sup>32</sup>P-dCTP par la technique d'amorçage au hasard (Random primed DNA labelling) selon les recommandations du fournisseur (Amersham). La sonde a été dénaturée et incubée pendant 30 min à 37°C en présence d'un mélange d'hexanucléotides, de dNTPs dont le dCTP

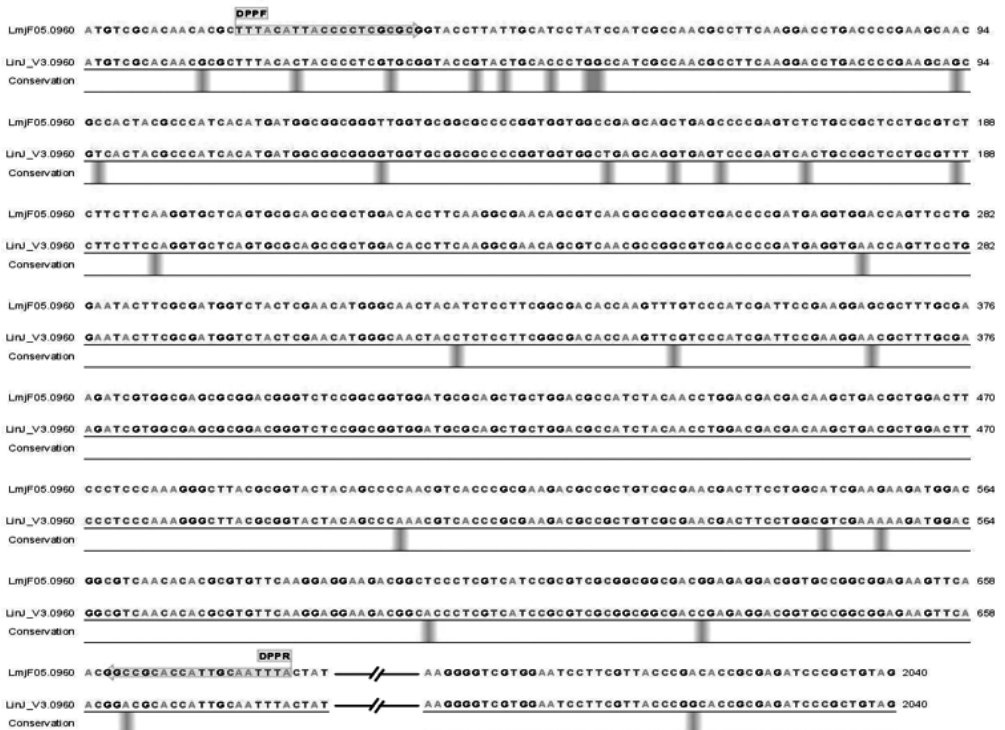
radioactif et du fragment de klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli*. Les nucléotides non incorporés ont été éliminés par passage de la sonde sur colonne de résine séphadex G-50 (Amersham) suivi d'une centrifugation à 735 g pendant 2 min au terme de laquelle la sonde marquée a été récupérée et utilisée pour révéler les ADN transférés sur la membrane de Nylon. Pour ceci, une étape de préhybridation de la membrane a été réalisée pendant 2h à 65°C, dans une solution comportant du SSC 6X, une solution Denhart's 5X, du SDS à 0,5 % et 20 µg d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé et gardé dans la glace. Ensuite, la sonde marquée a été dénaturée par chauffage à 100°C et refroidissement brusque sur la glace, et rajoutée au tampon de préhybridation. L'ensemble, sonde marquée et membrane de nylon a été incubé pendant une nuit à 65°C. Le lendemain, une série de lavages a été réalisée à 65°C. Les deux premiers lavages ont été effectués respectivement dans du SSC 2X et SSC 1X

pendant 15 min suivis d'un troisième et d'un quatrième lavage respectivement dans du SSC 2X, 0,1% SDS et SSC 1X, 0,1% SDS pendant 30 min chacun.

## RESULTATS

### ALIGNEMENT DES SEQUENCES, ANALYSE GENOMIQUE COMPAREE ET IDENTIFICATION DE SITES POLYMORPHES

Dans le but de développer un outil moléculaire de typage des leishmanies cutanéotropes en Tunisie, les séquences nucléotidiques des gènes codant pour la dipeptidyl peptidase III : LmjF 05.0960 et LinJ05\_V3.0960 provenant respectivement des deux isolats de référence *L. major* Friedlin et *L. infantum* et extraites des bases de données ont été alignées et comparées en utilisant les logiciels Clustal X et CLC (Figure 1). Ces gènes présentent un pourcentage d'homologie de 97 % et 53 mutations ponctuelles qui se répartissent en 35 transitions et 18 transversions.

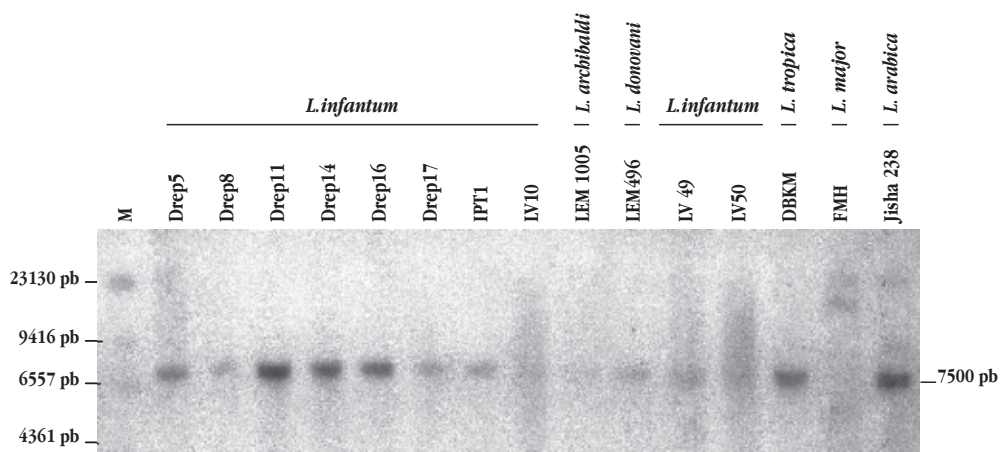


**Figure 1.** Position des amorces DPP F et DPP R sur l'alignement des séquences du gène DPP III de *L. major* (LmjF 05.0960) et *L. infantum* (LinJ 05\_V3.0960) montrant les mutations au niveau de l'amorce sens (2 mutations) et reverse (1 mutation). Les zones grisées désignent les régions et positions polymorphes entre les deux séquences du gène DPP III. Pour des raisons pratiques, seule une portion du gène est entièrement détaillée. -/- : indique la zone omise.



D'autre part, la présence du gène DPP III a été vérifiée par une analyse RFLP sur l'ADN d'isolats cutanés (Drep 05, Drep 8, Drep 11, Drep 14, Drep 16, Drep 17) et viscéraux (IV10, IV49, IV50, IPT1) de *L. infantum*, de l'isolat LEM 1005 de *L. archibaldi*, LEM496 de *L. donovani*, DBKM de *L. tropica*, FMH de *L. major* et Jisha 238 de *L. arabica*. Les résultats de la RFLP génomique ont montré la présence d'une bande de 7,5 kb qui s'hybride avec la sonde DPP III chez tous les isolats testés (Figure 2) confirmant son organisation en copie unique dans le génome de *Leishmania* tel que déduit des bases de données. La différence d'intensité observée entre les différentes espèces s'explique par une différence de charge des échantillons d'ADNs. Le profil différent de l'isolat

FMH de l'espèce *L. major* est dû à une digestion partielle qui a généré deux bandes de grande taille. Des amorces sens (DPP F) et anti-sens (DPP R) ciblant une séquence de 664 pb localisée au niveau d'une région du gène comportant plusieurs sites polymorphes ont été définies à partir de l'alignement des gènes de *L. major* et *L. infantum* sur la base de la séquence du gène de *L. major*. Deux mutations par transition (T-C) touchant les positions 23 et 33 du gène sont situées au niveau de l'amorce sens et une mutation par transversion (A-C) en position 663 du gène est localisée au niveau de l'amorce anti-sens (Figure 1). Ces amorces sont destinées à amplifier une séquence de 664 pb du gène DPP III chez l'espèce *L. major* et non chez *L. infantum*.



**Figure 2.** RFLP génomique par *Pst*I en présence de 8 µg d'ADN génomique d'isolats cutanés (Drep5, Drep 8, Drep 11, Drep 14, Drep 16, Drep 17), viscéraux (IV 10, IV 49 et IV 50) de *L. infantum*, de l'isolat LEM 1005 de *L. archibaldi*, LEM 496 de *L. donovani*, DBKM de *L. tropica*, FMH de *L. major* et de l'isolat de référence IPT 1 de *L. infantum*. M est le «lamda DNA Hind III marker» (promega). L'autoradiographie confirme une organisation en copie unique. La différence d'intensité observée entre les différentes espèces s'explique par une différence de charge des échantillons d'ADNs. Le profil différent de l'isolat FMH de l'espèce *L. major* est dû à une digestion partielle qui a généré deux bandes de grande taille.

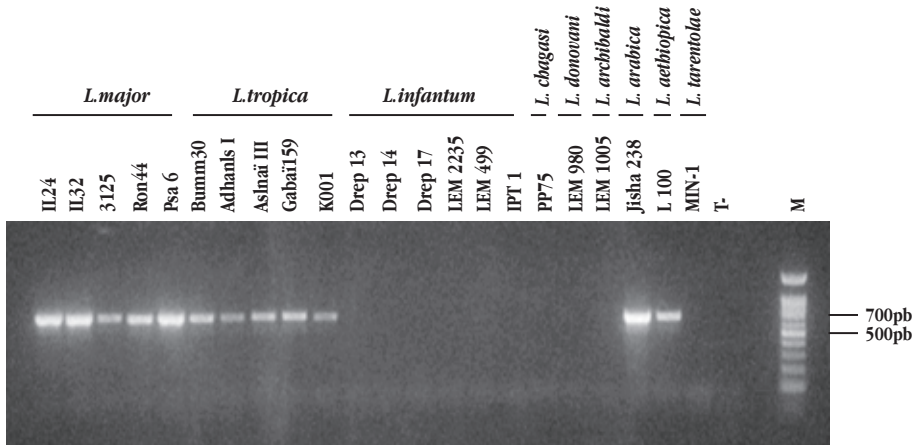
#### EVALUATION DU POLYMORPHISME CHEZ DIFFÉRENTS ISOLATS ET ESPÈCES PAR PCR

L'amplification par PCR au moyen des amorces conçues a été réalisée à partir d'ADNs isolés d'espèces pathogènes pour l'homme rencontrées en Tunisie (*L. infantum*, *L. major* et *L. tropica*) ou dans d'autres régions (*L. donovani*, *L. chagasi*, *L. archibaldi* et *L. aethiopica*), ainsi que d'espèces non pathogènes telles que *L. tarentolae* et *L. arabica*. L'amplification a généré une bande unique à la taille attendue (664 pb) chez les isolats *L. arabica*, *L. aethiopica*, *L. tropica* et *L. major*

Friedlin alors qu'aucun produit n'a été observé chez *L. infantum*, *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. archibaldi* ou *L. tarentolae* (Figure 3). Ces résultats ont été confirmés sur un nombre relativement important d'ADNs d'isolats de *L. infantum* (N = 15) obtenus de cas de LC (N = 8) ou de IV (N = 7), d'isolats de *L. major* (N = 16) et d'isolats de *L. tropica* (N = 15), de diverses origines géographiques incluant la Tunisie. Dans le but de s'assurer de la spécificité des amorces et de l'absence de signaux faussement négatifs, les produits PCR d'une sélection d'isolats ont été transférés sur membrane de Nylon et

hybridés à la sonde DPP III amplifiée à partir de l'ADN de l'isolat Friedlin de *L. major*. Les résultats de l'hybridation des produits PCR après 24 heures

d'exposition ou plus confirment les résultats en BET chez les différentes espèces testées (données non présentées).



**Figure 3.** Profil de l'amplification par PCR du fragment de 664 pb du gène codant pour la dipeptidyl peptidase III en présence de 20 ng d'ADN génomique des isolats IL24, IL 32, 3125, Ron 44, et Psa 6 de *L. major*, Bumm 30, Adhans I, Asinaï III, Gabai 159 et K001 de *L. tropica*, Drep 13, Drep 14, Drep 17, LEM 2235, LEM 499 et IPT1 de *L. infantum*, PP 75 de *L. chagasi*, LEM 980 de *L. donovani*, LEM 1005 de *L. archibaldi*, Jisha 238 de *L. arabica*, L 100 de *L. aethiopica* et Min-1 de *L. tarentolae*. M est le marqueur de taille de 100 pb.

## DISCUSSION

L'objectif de ce travail vise à l'utilisation potentielle de la PCR comme outil de discrimination entre les espèces cutanéotropes de leishmanies prévalant en Tunisie. La PCR est de plus en plus largement utilisée dans le diagnostic et la taxonomie des leishmanioses depuis 1990<sup>20</sup> grâce à sa simplicité, sa sensibilité et sa spécificité<sup>15, 16, 17, 20, 21</sup>. En Tunisie, elle a reçu de nombreuses applications cliniques et épidémiologiques<sup>4, 14, 15</sup>.

Dans notre étude, nous avons mis au point une technique PCR basée sur l'amplification d'un fragment du gène codant pour la DPP III des leishmanies. La DPP III est une zinc-exopeptidase, membre de la famille M49 des métallopeptidases. Chez l'homme, elle fait partie du système modulateur de la douleur grâce à sa forte affinité aux enképhalines mais également du système de défense endogène contre le stress oxydatif<sup>22</sup>. Au niveau du système nerveux central, elle représente l'une des enzymes les plus importantes impliquées dans la dégradation des enképhalines<sup>23</sup>. Le choix d'un tel gène dans le diagnostic précoce de la leishmaniose cutanée repose sur son importance dans la vie du parasite, dans la mesure où il code pour une protéine intervenant

dans le catabolisme des protéines chez le parasite *Leishmania*<sup>24</sup>. En effet, cette protéine a un rôle majeur dans la nutrition en raison de son activité de dépolymérisation<sup>25</sup> par clivage des larges peptides extracellulaires en des peptides plus petits et en acides aminés facilement assimilables par le parasite. Son rôle dans la survie intracellulaire du parasite a été également décrit<sup>26</sup>.

Dans le but d'amplifier le gène codant pour la DPP III, nous avons conçu 2 amorces en exploitant 3 mutations ponctuelles au niveau du site d'amorçage d'une séquence de 664 pb du gène DPP III, qui ont été identifiées après une analyse *in silico* par alignement des séquences du gène de *L. major* et *L. infantum*. Deux de ces mutations correspondent à des transitions au niveau de l'amorce sens et la troisième, à une transversion au niveau de l'amorce anti-sens. Les deux amorces désignées par DPP F et DPP R ont permis l'amplification du gène de *L. arabica*, *L. aethiopica*, *L. tropica* et *L. major* et non celui de *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. donovani*, *L. archibaldi* et *L. tarentolae*. L'analyse en RFLP génomique a confirmé que les PCRs négatives étaient dues à des différences d'amorçage et non à l'absence du gène chez ces dernières espèces.

Ainsi, en considérant les espèces cutanéotropes prévalant en Tunisie, les deux amorces DPP F et DPP R n'ont amplifié que le gène des deux espèces *L. tropica* et *L. major*, à l'exclusion de *L. infantum*. Elle permettent par conséquent de discriminer entre *L. infantum* et le couple *L. tropica* / *L. major*.

Ces résultats, bien que préliminaires, constituent une première approche dans la taxonomie des leishmanies cutanéotropes rencontrées en Tunisie. Ils montrent l'intérêt de l'amplification du gène de la DPP III et des 2 amorces conçues, dans la distinction entre les deux groupes d'espèces testées dans cette étude. Ils demandent à être confirmés par l'étude d'un plus grand nombre d'isolats et complétés par la conception de nouvelles amorces permettant spécifiquement l'amplification du gène de *L. infantum* et la distinction entre *L. major* et *L. tropica*/*L. killicki*. L'étude de ce gène chez les différentes espèces de *Leishmania* est en cours.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié du financement du programme spécial l'UNICEF/PNUD/ Banque Mondiale/OMS en matière de recherche et formation sur les maladies tropicales, TDR (ID: A11032), du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Technologie-Tunisie (Contrat Programme 2004-2008, LR00SP04) et de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA-TC/TUN 6012).

## REFERENCES

- 1- H.W. Murray, J.D. Berman, C.R. Davies and N.G. Saravia (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, **366** (9496), 1561-1577.
- 2- R. Reithinger, J.C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander and S. Brooker (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.*, **7** (9), 581-596.
- 3- R. Ben-Ismail, D.F. Smith, P.D. Ready, A. Ayadi, M. Gramiccia and A. Ben-Osman, M.S. Ben-Rachid (1992). Sporadic cutaneous leishmaniasis in north Tunisia: identification of the causative agent as *Leishmania infantum* by the use of a diagnostic deoxyribonucleic acid probe. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86** (5), 508-510.
- 4- M. Ben Said, S. Guerbouj, F. Saghrouni, A. Fathallah-Mili and I. Guizani (2006). Occurrence of *Leishmania infantum* cutaneous leishmaniasis in central Tunisia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **100** (6), 521-526.
- 5- K. Aoun, A. Bouratbine, Z. Harrat, I. Guizani, M. Mokni, S. Bel Hadj Ali, A. Ben Osman, M. Belkaïd, K. Dellagi and R. Ben Ismaïl (2000). Epidemiologic and parasitologic data concerning sporadic cutaneous leishmaniasis in northern Tunisia. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **93** (2), 101-103.
- 6- S. Belhadj, F. Pratlong, M. Hammami, K. Kallel, J.P. Dedet and E. Chaker (2003). Human cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in the Sidi Bourouis focus (Northern Tunisia): epidemiological study and isoenzymatic characterization of the parasites. *Acta. Trop.*, **85** (1), 83-86.
- 7- K. Kallel, F. Pratlong, S. Belhadj, F. Cherif, M. Hammami, J.P. Dedet and E. Chaker (2005). Cutaneous leishmaniasis in Tunisia: results of the iso-enzymatic characterization of 71 strains. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **99** (1), 11-19.
- 8- K. Kallel, F. Pratlong, N. Haouas, E. Kaouech, S. Belhadj, S. Anane, J.P. Dedet, H. Babba and E. Chaker (2008). Isoenzymatic variability of *Leishmania infantum* in Tunisia concerning 254 human strains. *Acta. Trop.*, **106** (2), 132-136.
- 9- N. Haouas, N. Chargui, E. Chaker, M. Ben Said, H. Babba, S. Belhadj, K. Kallel, F. Pratlong, J.P. Dedet, H. Mezhoud and R. Azaiez (2005). Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Tunisia: presence of *Leishmania killicki* outside its original focus of Tataouine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **99** (7), 499-501.
- 10- K. Kallel, N. Haouas, F. Pratlong, E. Kaouech, S. Belhadj, S. Anane, J.P. Dedet and H. Babba, E. Chaker (2008). Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* MON-24 in Tunisia: extension of the focus to the center of the country. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **101** (1), 29-31.
- 11- A. Bouratbine, K. Aoun, M. Gharbi, N. Haouas, J. Zaroui, Z. Harrat, H. Baba and M.A. Darghouth (2005). Epidemiological, clinical and parasitological data about canine leishmaniasis in Tunisia. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **98** (5), 359-362.
- 12- E.M. Elamin, I. Guizani, S. Guerbouj, M. Gramiccia, A.M. El Hassan, T. Di Muccio, M.A. Taha and M.M. Mukhtar (2008).



- Identification of *Leishmania donovani* as a cause of cutaneous leishmaniasis in Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **102** (1), 54-57.
- 13- **S.K. Arora, S. Gupta, S. Bhardwaj, N. Sachdeva and N.L. Sharma** (2008). An epitope-specific PCR test for diagnosis of *Leishmania donovani* infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **102** (1), 41-45.
  - 14- **R. Hanafi, M. Barhoumi, S.B. Ali and I. Guizani** (2001). Molecular analyses of Old World *Leishmania* RAPD markers and development of a PCR assay selective for parasites of the *L. donovani* species Complex. *Exp. Parasitol.*, **98**(2), 90-99.
  - 15- **N. Chargui, P. Bastien, K. Kallel, N. Haouas, F.M. Akrouf, A. Masmoudi, J. Zili, E. Chaker, A.D. Othman, R. Azaiez, L. Crobu, H. Mezhoud and H. Babba** (2005). Usefulness of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **99**(10), 762-768.
  - 16- **M. Brecelj, F. Pikelj, F. Gubensek and G. Anderluh** (2000). Polymerase chain reaction as a diagnostic tool for detecting *Leishmania*. *Infection*, **28** (2), 111-113.
  - 17- **I. Guizani, G.J. Van Eys, R.B. Ismail and K. Dellagi** (1994). Use of recombinant DNA probes for species identification of Old World *Leishmania* isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **50** (5), 632-640.
  - 18- **J.A. Rioux, G. Lanotte, E. Serres, F. Pratlong, P. Bastien and J. Perieres** (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **65** (3), 111-125.
  - 19- **J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  - 20- **M.R. Rodgers, S.J. Popper and D.F. Wirth** (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol.*, **71** (3), 267-275.
  - 21- **F.S. Oliveira, C. Pirmez, M.Q. Pires, R.P. Brazil and R.S. Pacheco** (2005). PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.*, **129** (3-4), 219-227.
  - 22- **B. Salopek-Sondi, B. Vukelić, J. Spoljarić, S. Simaga, D. Vujaklija, J. Makarević, N. Jajcanin and M. Abramić** (2008). Functional tyrosine residue in the active center of human dipeptidyl peptidase III. *Biol. Chem.*, **389** (2), 163-167.
  - 23- **J. Hashimoto, Y. Yamamoto, H. Kurosawa, K. Nishimura and T. Hazato** (2000). Identification of dipeptidyl peptidase III in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273** (2), 393-397.
  - 24- **S. Besteiro, R.A. Williams, G.H. Coombs and J.C. Mottram** (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.*, **37** (10), 1063-1075.
  - 25- **A.L. Santos, R.M. Soares, C.S. Alviano and L.F. Kneipp** (2008). Heterogeneous production of metallo-type peptidases in parasites belonging to the family Trypanosomatidae. *Eur. J. Protistol.*, **44** (2), 103-113.
  - 26- **E. Prina, J.C. Antoine, B. Wiederanders and H. Kirschke** (1990). Localization and activity of various lysosomal proteases in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. *Infect. Immun.*, **58** (6), 1730-1737.

