

UNE VARIANTE DU DDRT-PCR UTILISANT DES AMORCES MINI-EXON ANCREES POUR L'IDENTIFICATION DE SEQUENCES DIFFERENTIELLEMENT EXPRIMEES CHEZ *LEISHMANIA INFANTUM*

L. TURKI-MANNOUBI¹, H. KBAIER-HACHEMI¹, M. BARHOUMI¹,
A.S. CHAKROUN¹ ET I. GUIZANI^{1*}

¹ Laboratoire d'Epidémiologie et d'Ecologie Parasitaire / LR00SP04 - «Programme de recherche en génomique et biotechnologies appliquées aux maladies parasitaires», Institut Pasteur de Tunis, 13, Place Pasteur, BP 74, 1002 Tunis-Belvédère, Tunisie.

* Auteur correspondant: Tél: + 21671791833; Fax: +21671844171; E-mail: ikram.guizani@pasteur.rns.tn

RESUME

Leishmania infantum (L.i) est responsable de leishmaniose viscérale (LV) ou de leishmaniose cutanée (LC). Des études précédentes faites au Honduras n'ont pas montré de différences dans les profils d'expression de differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction (DDRT-PCR) entre les parasites LV et LC de *Leishmania infantum*. Dans le but de comparer l'expression entre des isolats de L.i. en Tunisie, une variante de cette technique adaptée d'un kit commercial a été développée impliquant des amorces aléatoires et mini-exon ancrées pour isoler et identifier des ADNc différenciellement affichés. Pour évaluer l'efficacité de cette variante, 34 combinaisons ont été appliquées à 2 dilutions consécutives d'ADNc, qui proviennent de cultures de promastigotes en fin de phase exponentielle de croissance de deux isolats Tunisiens, un viscéral (LV50) et un cutané (DREPI4). Le choix de ce matériel assure l'observation des différences parmi les ADNc étant donné les travaux précédents chez cette espèce. Les profils d'amplification ont été comparés et analysés relativement au nombre et au phénotype des bandes affichées observées parmi les différents profils d'amplification qui ont été très similaires chez les 2 ADNc; 26 combinaisons ont généré un total de 6.8% de bandes différenciellement affichées ayant des intensités variables ou étant présentes/absentes, dans des proportions comparables dans les 2 isolats. Les analyses ont aussi démontré des différences dans l'efficacité de l'amplification de quelques amorces, soulignant l'impact qualitatif et quantitatif de la proximité relative des sites d'amorçages sur les profils obser-

SUMMARY

Leishmania infantum (L.i) is responsible for visceral (VL) or cutaneous (CL) leishmaniasis. Previous studies done in Honduras by differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction (DDRT-PCR) failed to demonstrate differences in expression profiles among L. infantum VL and CL parasites. For purpose of comparing expression among L. infantum isolates in Tunisia, a variant of this technique adapted from a commercial kit was developed involving pairs of random and anchored mini-exon primers for isolation and identification of differentially displayed cDNAs. To assess the efficiency of this variant, 34 pairs were applied to 2 consecutive dilutions of cDNAs from promastigotes at end of in vitro exponential growth of 2 visceral (LV50) and cutaneous (DREPI4) isolates from Tunisia, thus increasing chance for observing differences among the cDNAs. Profiles were compared and analyzed as regards number and phenotype of bands displayed in 4 types of highly similar amplification profiles among the 2 cDNAs; 26 primer pair combinations generated in total 6.8% differentially displayed bands that had variable intensities or were present/absent, in comparable proportions in the 2 isolates. Analysis further demonstrated differences in amplification efficiency of some primers, emphasizing on qualitative and quantitative impact of relative proximity of the priming sites. Nine present/absent bands were cloned, sequenced and analyzed in silico. Mismatches at priming sites

vés. Neuf bandes présentes/absentes ont été clonées, séquencées et analysées *in silico*. Les misappariements aux sites d'amorçage semblent être à la base de l'amplification de telles bandes. Seulement cinq produits ont pu être référés à des gènes annotés. Parmi les gènes identifiés, nous énumérons l'histone H4, en grande partie connue pour être différentiellement exprimée parmi les stades de L.i, et «NTF2-like» pour lequel une surexpression a été ici confirmée dans un des ADNc. Pour conclure, la variante développée pourrait être utilisée dans des analyses d'expression chez *Leishmania*, avec toutefois une attention particulière au sujet des faux positifs.

Mots-clés: *Leishmania infantum*, DDRT-PCR, leishmaniose viscérale, leishmaniose cutanée, ADNc.

INTRODUCTION

Les leishmanioses sont des maladies vectorielles parasitaires à large distribution géographique, dues à l'infection par des protozoaires flagellés, appartenant au genre *Leishmania*¹. Les leishmanioses se regroupent sous trois grandes formes cliniques: cutanée, cutanéomuqueuse et viscérale. Au moins 20 espèces de parasites sont pathogènes pour l'homme. Différentes espèces peuvent causer des formes de maladies similaires (ex. la leishmaniose cutanée). Inversement, une même espèce de leishmanie, telle que *Leishmania infantum*, peut causer des lésions aussi diverses qu'une leishmaniose viscérale ou une leishmaniose cutanée².

Cette diversité de manifestations cliniques est due à des mécanismes assez complexes régulant l'évolution de l'infection. Différents facteurs interviennent dans les manifestations leishmaniennes notamment les facteurs environnementaux, les facteurs liés à l'hôte et les facteurs intrinsèques au parasite. Pour identifier de tels facteurs, diverses approches peuvent être considérées. Parmi celles-ci, le *differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (DDRT-PCR) est une technique permettant un criblage rapide des populations d'ARN différentes entre deux échantillons biologiques différents³.

L'approche DDRT-PCR a été utilisée pour mettre en évidence des différences d'expression génique entre formes virulentes ou atténuées de *L. amazonensis*⁴ ou entre divers stades de *L. braziliensis*⁵, *L. major*⁶, *L. mexicana*⁷ ou *L. panamensis*⁸. Cette approche a aussi été appliquée pour identifier des transcrits

seem to underlie amplification of such bands. Only five products could be referred to annotated gene. Among the genes identified, we list histone H4, largely known to be differentially expressed among L.i stages, and "NTF2-like" for which over-expression in one cDNA was here confirmed. To conclude, the variant developed could be used further in Leishmania expression analysis with appropriate cautions about false positives.

Key words: *Leishmania infantum*, DDRT-PCR, visceral leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis, cDNA.

différentiellement exprimés entre isolats de *L. major* associés à des présentations cliniques différentes⁹. Son application à des parasites *L. chagasi*, espèce synonyme de *L. infantum*, responsables de leishmaniose cutanée ou viscérale au Honduras n'a pas montré de différences parmi ces isolats mais a démontré la présence des différences entre eux et des isolats méditerranéens causant la LV en Tunisie et la LC en France¹⁰. Cette similitude des profils au Honduras est corrélée avec la similitude génétique des parasites; l'observation de différences corrélées avec l'origine géographique, souligne l'importance d'aborder l'identification de facteurs intrinsèques de *L. infantum* au sein d'une même aire de transmission. Dans le cadre de l'étude comparative de l'expression chez des isolats *Leishmania infantum* responsable de leishmaniose viscérale (LV) ou de leishmaniose cutanée (LC) en Tunisie, notre objectif fut de développer une approche en DDRT-PCR originale exploitant la présence d'un mini-exon au niveau des transcrits de *Leishmania* où l'efficacité des protocoles mis en place se mesurerait par l'observation de transcrits différentiellement affichés.

Le principe du DDRT-PCR consiste à amplifier au moyen d'amorces aléatoires par la méthode de PCR des séquences d'ADNc obtenues par transcription inverse d'une population d'ARNm. Les fragments d'ADNc amplifiés sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et les bandes différentiellement affichées sont découpées, réamplifiées, clonées et séquencées pour identifier les séquences

correspondantes. Cette technique permet de réaliser au même moment, une analyse des gènes sur- et sous-exprimés au sein des deux populations d'ADNc. La transcription chez *Leishmania* est polycistronique et les transcrits spécifiques aux gènes sont obtenus par un phénomène de trans-épissage consistant en l'adjonction à l'extrémité 5' de chaque ARNm monocistronique en amont de la région 5'UTR non traduite, d'une séquence ribonucléotidique encapsulée de 39 nucléotides appelée *spliced leader* (SL) ou mini-exon. Contrairement à ce que suggère son nom, cette séquence "mini-exon" n'est pas traduite mais elle est nécessaire à la traduction de tous les ARN messagers. Ce trans-épissage est couplé à la polyadénylation des transcrits¹¹.

La variante, développée ici, consiste donc à amplifier des ADNc synthétisés à partir d' oligodT par des paires d'amorces constituées par un mini-exon ancré et par une séquence arbitrairement définie. Cela a l'avantage d'amplifier des transcrits qui chevauchent les régions codantes des gènes plutôt que les régions intergéniques. Par ailleurs, cette variante n'ayant jamais été appliquée à *Leishmania* et comme les travaux antérieurs n'ont pas montré de différences entre isolats *L. infantum* d'une même origine géographique (le Honduras) pour maximiser les chances d'observer des bandes différenciellement affichées nous avons eu recours à des promastigotes de culture en fin de phase exponentielle où différentes formes de parasites sont présentes. Nous décrivons ici les résultats de cette analyse qui a permis de confirmer l'utilité de cette variante pour la détection de bandes différenciellement affichées chez *L. infantum*.

MATERIEL ET METHODES

PARASITES

Pour cette étude, deux isolats de *L. infantum* (MHOM/TN/96/DREP14; zymodème MON-24) et (MHOM/TN/94/LV50; zymodème MON-01) ont été utilisés: l'isolat LV50 induisant une leishmaniose viscérale (LV) tandis que l'isolat DREP14 induit une leishmaniose cutanée (LC). Au cours de ce travail, les parasites ont été décongelés et cultivés à une température de 26°C sur du milieu biphasique à base de sérum de lapin coagulé afin d'obtenir une culture riche en parasites. Ces derniers ont été ensuite transférés en milieu liquide Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich, USA) additionné de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min, de L-glutamine

(2mM), de pénicilline (100U/ml) et de streptomycine (100µg/ml).

EXTRACTION D'ARN ET TRAITEMENT

A LA DNaseI

L'ARN total a été extrait à partir de 2.10⁸ parasites issus de cultures récoltées en fin de phase logarithmique de croissance. Le culot parasitaire a été resuspendu dans 1ml de réactif TRIZOL (GIBCO BRL, USA), et ensuite homogénéisé puis incubé à température ambiante pendant 5min. 200µl de chloroforme ont été ajoutés par millilitre de TRIZOL. L'extrait est ensuite mélangé puis incubé pendant 3 min à température ambiante. Après une centrifugation à 12000g pendant 15min à 4°C, la phase aqueuse est récupérée. L'ARN est précipité par l'ajout de 500 µl d'isopropanol; après une incubation de 10min à température ambiante, les échantillons d'ARN sont centrifugés à 12000g pendant 15min à 4°C, les culots sont lavés avec de l'éthanol 75%, séchés et resuspendus dans l'eau traitée au DEPC, puis incubés à 65°C pendant 10min pour faciliter leur solubilisation.

Un traitement à la déoxyribonucléase I (DNase I- RNase free, Boehringer Mannheim, Allemagne) a suivi l'étape d'extraction garantissant ainsi l'absence de toute contamination par l'ADN génomique dans ces échantillons. La concentration de l'ARN a été mesurée par spectrophotométrie à 260nm, la présence et la qualité de l'ARN total ont été examinées sur un gel d'agarose à 1.2%. La présence des bandes d'ARN ribosomales 18S, 24S α et 24S β souligne une bonne qualité de l'ARN.

PURIFICATION DES ARNm ET SYNTHESE

DE L'ADNc

Les ARNm sont purifiés à partir d'ARN totaux traités à la DNase, par passages sur colonnes oligo(dT)-cellulose à l'aide du kit *mRNA purification* (Amersham-Pharmacia). A deux microgrammes de l'ARNm sont ajoutés 2µM d'amorce oligo(dT)₁₅₋₁₈ (Promega), 1µl de dNTPs (0.5µM chacun) et 9.4µl d'eau RNase-free. Ce mélange est incubé à une température de 60°C pendant 15min suivi d'un refroidissement rapide à 0°C. Au mélange sont additionnés 4µl de tampon 5X RT (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15mM MgCl₂) et 1µl Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (200U/µl) (MMLV/RT, Invitrogen). Les fragments d'ADNc sont ainsi synthétisés après incubation à 42°C pendant 50min. La réaction est portée à une température de

70°C pendant 15min pour inactiver la reverse transcriptase; la qualité de l'ADNc synthétisé est contrôlée par une amplification par PCR d'un fragment à la taille attendue de 808pb correspondant à un fragment du gène de la α -tubuline qui est exprimé de manière constitutive chez les formes promastigotes ^{12, 13}.

REACTIONS DE DIFFERENTIAL DISPLAY RT-PCR

Les ADNc synthétisés ont été amplifiés par PCR en présence d'amorces P et ME (Tableau I) en utilisant les composants du kit *Delta™ Differential Display* (Clontech laboratories, USA). Les amorces correspondent à 9 amorces P aléatoires provenant du kit Clontech et une sélection de 8 amorces ME (pour mini-exon) composées des 23 nucléotides de l'extrémité 3' du mini-exon auxquels nous avons ajouté une ancre dinucléotidique (Tableau I). Deux dilutions d'ADNc (a et b étant respectivement les dilutions 1/10 et 1/40 d'ADNc) ont été utilisées afin de vérifier que la différence dans l'intensité de la bande choisie,

est sensible à l'effet de dilution de l'ADNc. Des réactions de DDRT-PCR ont été effectuées dans un mélange réactionnel de 20 μ l contenant 1 μ l d'ADNc dilué a ou b, 20 μ M de l'amorce P, 20 μ M de l'amorce ME, 1X de tampon PCR, 50 μ M de chaque dNTPs et de 1 μ l de α -[³⁵S] dATP (1000 Ci/mmmole) (Amersham-Pharmacia), 1X de l'ADN polymérase Advantage KlenTaq (Advantage cDNA PCR Kit, Clontech laboratories). L'amplification est réalisée dans un thermocycleur (Perkin-Elmer 2400) selon le programme suivant : 1 cycle (5 min à 94°C, 5 min à 40°C et 5 min à 68°C) et 2 cycles (30 sec à 94°C, 30 sec à 40°C et 5 min à 68°C) 23 cycles (20 sec à 94°C, 30 sec à X°C (cette température est fonction de l'amorce ME (Tableau I)), 2min à 68°C) et 1 élongation finale de 7 min à 68°C. Les ADNc amplifiés sont séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide dénaturant à 6%. Après l'électrophorèse, le gel est séché sur du papier Whatmann 3 MM puis ensuite exposé à -70°C à des films autoradiographiques Biomax MR (Eastman Kodak, Rochester, NY).

Tableau I: Les amorces oligonucléotidiques utilisées au cours des réactions de DDRT-PCR.

Nom de l'amorce	Séquence: (5' - 3')	T (°C)*
ME1	GTATCAGTTTCTGTACTTTATTGCA	48
ME2	GTATCAGTTTCTGTACTTTATTGCT	46
ME3	GTATCAGTTTCTGTACTTTATTGCC	49
ME4	GTATCAGTTTCTGTACTTTATTGGA	47
ME5	GTATCAGTTTCTGTACTTTATTGGC	49
ME6	GTATCAGTTTCTGTACTTTATTGAT	44
ME8	GTATCAGTTTCTGTACTTTATTGAC	44
ME10	GTATCAGTTTCTGTACTTTATTGTC	44
P1	ATTAACCCCTCACTAAATGCTGGGA	-
P2	ATTAACCCCTCACTAAATCGGTCATAG	-
P3	ATTAACCCCTCACTAAATGCTGGTGG	-
P4	ATTAACCCCTCACTAAATGCTGGTAG	-
P5	ATTAACCCCTCACTAAAGATCTGACTG	-
P6	ATTAACCCCTCACTAAATGCTGGGTG	-
P7	ATTAACCCCTCACTAAATGCTGTATG	-
P8	ATTAACCCCTCACTAAATGGAGCTGG	-
P9	ATTAACCCCTCACTAAATGTGGCAGG	-
P10	ATTAACCCCTCACTAAAGCACCGTCC	-

* indique la température appliquée au cours de la réaction de DDRT-PCR qui est fonction de l'amorce ME employée. Les amorces mini-exon (ME) conçues lors de ce travail sont composées de la partie 3' du mini-exon représenté en gras par 23 nucléotides auxquels est ajoutée une ancre constituée par deux nucléotides, indiqués en italique. Les amorces P proviennent du kit *Delta™ Differential Display* (Clontech laboratories, USA). Elles diffèrent entre elles par les 8 à 10 nucléotides 3' terminaux indiqués en italique.

Les ADNc différenciellement exprimés sont visualisés par autoradiographie. Le film est soigneusement orienté sur le gel séché puis les bandes sélectionnées comme différenciellement affichées sont poinçonnées par des aiguilles à chacune de leur extrémité, découpées du gel avec une lame de scalpel et incubées à 100°C dans un microtube contenant 40 µl d'eau distillée pendant 5 min puis refroidies. 7 µl de chaque ADN élué est réamplifié par PCR dans une réaction de 50 µl avec les mêmes paires d'amorces utilisées au cours des réactions du DDRT-PCR, le programme d'amplification est le suivant: 20 cycles (94°C pour 1 min, 60°C pendant 1 min et 68°C pendant 2 min).

CLONAGE ET SEQUENÇAGE DES PRODUITS PCR

Les fragments d'ADNc isolés et réamplifiés ont été purifiés sur un gel d'agarose en utilisant le kit *QIAgen Extraction* (Qiagen-France) puis ont été insérés dans le plasmide pMOS en utilisant le kit pMOS*Blue* blunt Ended Cloning suivant les recommandations du fournisseur (Amersham HVD-Grèce). Les cellules compétentes MOS*Blue* transformées sont cultivées sur du milieu Luria Bertani (LB) agar contenant 50 µg/ml d'ampicilline, 50 µg/ml d'X-Gal et 100 mM d'IPTG. Les colonies contenant le plasmide recombinant ont été criblées par la technique *colony*-PCR. Les plasmides recombinants ont été purifiés en utilisant le kit *miniprep* (Qiagen, Hilden, Allemagne). Les inserts ont été séquencés en utilisant les amorces présentes sur le vecteur pMOS: T7 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3') et U19 (5'-TTTCCAGTCACGACGT-3') à l'aide du kit ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Perkin-Elmer) sur un séquenceur automatique DNA sequencer ABI 377 (Perkin-Elmer).

ANALYSE *IN SILICO* DES TRANSCRITS SELECTIONNES

Les séquences ont été nettoyées à l'aide du logiciel Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.gov/VecScreen/VecScreen.html>), puis ont été analysées par le programme BLAST sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST.cgi>) et omniBLAST sur le site GeneDB (<http://www.genedb.org>) visant à rechercher une homologie à ces séquences dans les bases de données. L'annotation et la localisation génomique des séquences ont été visualisées au moyen du logiciel Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/SoftwareArtemis>)¹⁴.

REACTIONS DE RT-PCR ET QUANTIFICATION DES SIGNAUX

Dans le but de confirmer l'expression différentielle du gène NTF2 identifié par DDRT-PCR et de quantifier son niveau d'expression, une technique de reverse transcription polymérase chain reaction semi-quantitative (RT-PCR) a été réalisée sur les ADNc issus d'isolats ciblant le gène codant NTF2 et le gène contrôle de l' α -tubuline avec les amorces respectives NTF2F: 5'-GTCCATAACAACGGAATCGAA-3'; NTF2R: 5'-ATACCAGGAACCTGCGACTG-3' et TUBF: 5'-ATGCGTGAGGCTATCTGCATC-3'; TUBR: 5'-GTCAGCACGAAGTGGATGCGC-3'. Les 5 µl des réactions de PCR contiennent 1 µl d'ADNc de parasites ou 50 ng d'ADN génomique (comme contrôle positif), 200 µM de chaque dNTP, 10X de tampon (Amersham HDV-Grèce), 30 pmol d'amorces sens et antisens et 1,5 unités de Taq polymérase (Amersham HDV-Grèce).

Après une dénaturation initiale de 3 min à 94°C les cycles sont: 25X (1 min à 94°C, 30 sec à 55°C, 2 min à 72°C) pour les amorces NTF2 suivie d'une élévation finale de 2 min à 72°C; 25X (1 min à 94°C, 1 min à 53°C, 2 min à 72°C) pour les amorces TUB suivie également d'une élévation finale de 2 min à 72°C. Les produits PCR ont été analysés sur gel d'agarose 1% contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. L'analyse a été faite en triplicate à partir de trois sets d'ADNc différents provenant soit du même culot parasitaire ou d'un culot parasitaire différent. La PCR α -tubuline a été faite plusieurs fois pour s'assurer du maintien de la qualité des ADNc.

Les photographies polaroids des gels d'agarose de toutes les expériences ont été scannées et l'intensité de la bande a été analysée en utilisant le programme imageJ de NIH (version 1.4) (<http://www.rsb.info.nih.gov/ij/>). L'analyse statistique a été faite en utilisant un logiciel d'analyse statistique S plus (version 6.2) en appliquant le test *paired t-test* pour comparer le logarithme de l'intensité de la bande entre les isolats. Ce test compare la différence des moyennes avec zéro. Il est calculé selon l'équation suivante :

$$t = \frac{\bar{d}}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

où d est la moyenne de différence, s est la variance des échantillons, n et t représentent respectivement la taille de l'échantillonnage et le *student* test.

RESULTATS

PLUSIEURS TYPES DE PROFILS D'AMPLIFICATION SONT OBSERVES

Une nouvelle variante de la technique de DDRT-PCR a été envisagée pour l'amplification d'ADNc de *Leishmania*, et plus particulièrement de *L. infantum*. Nous avons utilisé au total 34 combinaisons d'amorces (MEnPm) pour amplifier des ADNc synthétisés à partir d'ARNm provenant de promastigotes en fin de phase logarithmique de croissance issus de cultures de 2 isolats DREP14, d'origine cutanée et LV50 d'origine viscérale. Les

produits amplifiés ont été séparés sur un gel de polyacrylamide à 6% en condition dénaturante puis analysés par autoradiographie comme illustrée sur la figure 1, les profils observés avec chaque combinaison d'amorce sont très différents de tous les autres même ceux engageant une même amorce. Ces profils sont très similaires entre les 2 isolats avec cependant des différences objectivées par la présence de bandes différemment affichées (ou tags) qui sont de type «présente/absente», ou ayant une intensité variable sensible à l'effet de dilution.

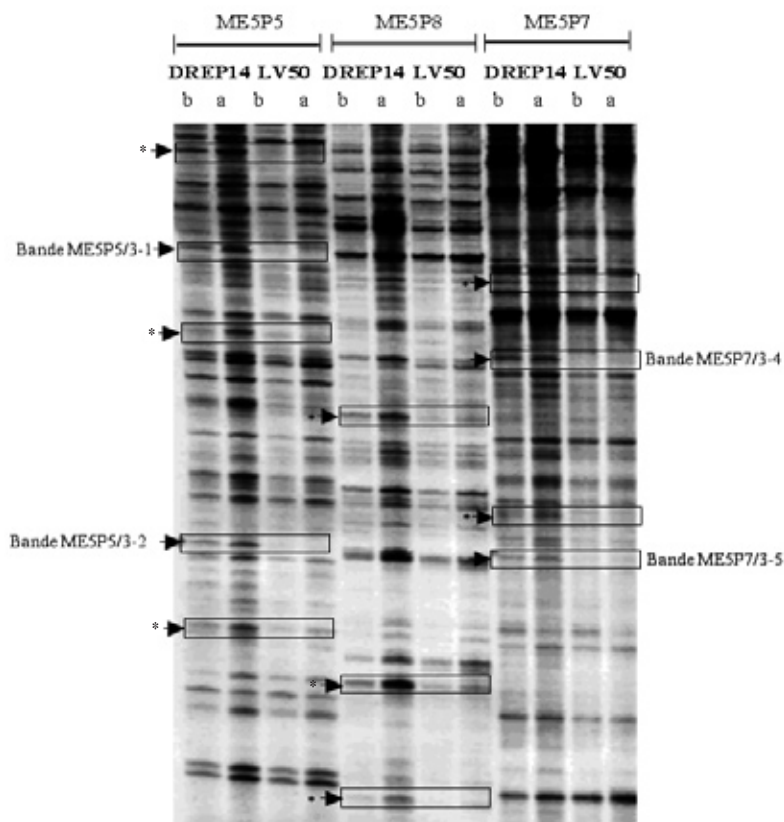


Figure 1. Autoradiographie d'un gel de polyacrylamide 6% de réactions de Differential Display appliquées sur deux isolats cutané LV50 et viscéral DREP14 de *L. infantum* au stade promastigote. La figure illustre à titre d'exemples des comparaisons de profils d'amplification de transcrits obtenus avec des combinaisons d'amorces P et les amorces mini-exon ME. Les combinaisons représentées ici sont ME5P5, ME5P8 et ME5P7. Les bandes d'intérêt différemment affichées sont encadrées sur la figure : parmi ces bandes, 4 ont été sélectionnées (ME5P5/3-1, ME5P5/3-2, ME5P7/3-4 et ME5P7/3-5) qui sont visibles uniquement chez l'isolat cutané DREP14 et 8 bandes à intensité variable sont indiquées par une astérisque (*). (a) et (b) correspondent aux deux dilutions de l'ADNc (1/10 et 1/40). Les flèches indiquent la position des bandes différemment affichées sur le gel. Le code de la bande correspond à la combinaison d'amorces ayant servi à son obtention suivie du numéro qui lui a été attribué. Seules quelques bandes ont été indiquées pour permettre la lisibilité de la figure.

Quatre types de profil d'amplification se dégagent avec les 34 combinaisons testées (Figure 2): 26 d'entre elles révèlent une différence de profil d'amplification entre l'isolat LV50 et DREP14, dont 4 (ME3P2, ME5P3, ME1P4, ME8P7) présentent des différences de type « présence/absence», 12 (ME6P6, ME6P4, ME10P4, ME4P4, ME3P9, ME6P5, ME8P9, ME8P5, ME8P10, ME10P5, ME1P5, ME5P6) génèrent un profil avec des bandes à intensité variable et 10 (ME4P5, ME2P4, ME2P9, ME8P4, ME5P5, ME5P8, ME4P9, ME8P6, ME5P9, ME5P7) présentent les deux types de différences. Les huit autres combinaisons (ME5P4, ME5P2, ME2P5, ME3P1, ME5P1, ME3P4, ME10P6, ME1P9) ont présenté un profil identique entre l'isolat LV50 et DREP14.

DES DIFFERENCES D'AFFICHAGE NOTABLES SONT OBSERVEES ENTRE LES DEUX ISOLATS

Le nombre de bandes totales ainsi que le nombre de bandes différenciellement affichées, ont été comptés et portés sur un diagramme en fonction des isolats (Figure 2). Les 34 combinaisons ont amplifié 1703 bandes au moins (Figure 2), qui se répartissent comme suit : 1587 bandes ont présenté des intensités

comparables entre les deux isolats, soit 93.1% et 116 bandes ont affiché des intensités différentes soit 6.8%.

Les différences d'affichage (*display*) observées pour ces 116 bandes distinguent 2 classes (Figure 2): la première concerne 35 bandes ayant un phénotype de type «présence/absence» (soit 30.2%), et la deuxième représente les 81 autres bandes ayant des intensités variables (soit 69.8%).

Des différences qualitatives entre les profils d'affichage des 2 isolats cultivés ont aussi été observées selon les combinaisons d'amorces utilisées. Certaines ont amplifié des bandes différenciellement affichées uniquement chez l'isolat LC (ME5P5, ME4P9, ME5P9, ME5P7) ou chez l'isolat LV (ME4P5). D'autres ont généré un seul type de bandes : à intensité variable uniquement avec les ADNc de la culture DREP14 (ME6P9, ME4P4, ME3P9, ME6P5, ME8P9, ME8P5) ou avec ceux de la culture LV50 (ME6P4, ME10P4, ME1P5, ME5P6). ME3P2 a généré un profil pauvre en bandes et la seule bande différenciellement affichée a été observée avec LV50. D'autres combinaisons ont amplifié chez les 2 isolats soit des bandes présentes/absentes (ME5P3, ME1P4, ME8P7) soit des bandes à

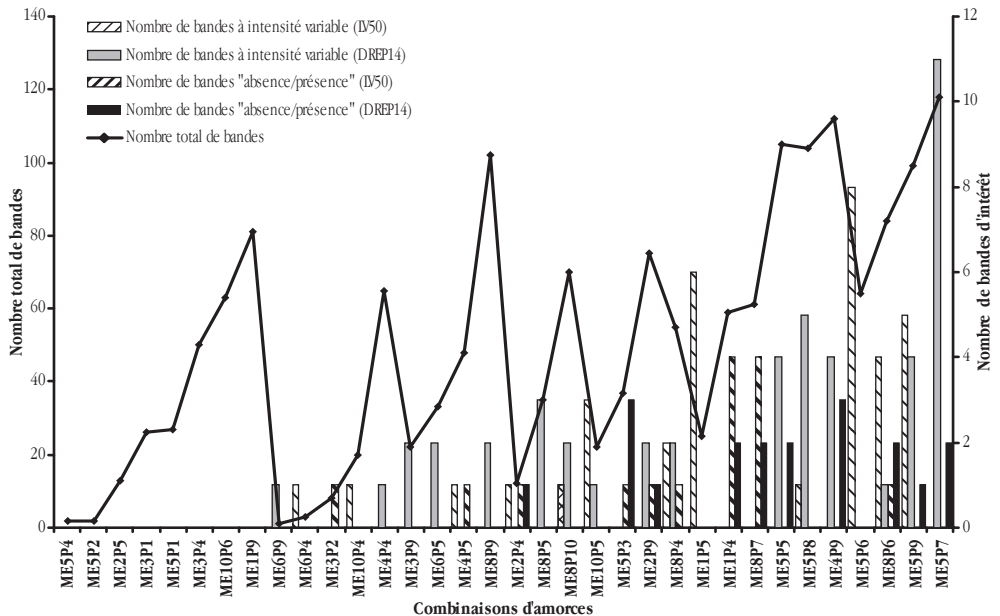


Figure 2. Représentation des résultats des réactions de DDRT-PCR obtenus par combinaisons d'amorces et par isolat. Les 34 combinaisons utilisées ont mené à l'obtention d'un total de 1703 bandes dont 116 bandes d'intérêt. Le nombre de bandes totales et d'intérêt comprenant les bandes à intensité variable et les bandes «absente/présente» a varié respectivement de 1 à 118, de 1 à 13, de 1 à 11, de 1 à 6 en fonction de la combinaison utilisée.

intensité variable (ME8P10, ME10P5). Enfin les 5 combinaisons (ME8P6, ME5P9, ME8P4, ME2P9, ME2P4) ont généré chez les 2 isolats les différents types de bandes différenciellement affichées.

Seule ME8P6 a donné lieu aux 4 types de bandes différenciellement affichées; avec les 4 autres seuls 3 types de bandes sur 4 ont été observés (Figure 2).

Nous avons aussi constaté la présence d'un nombre

de bandes différenciellement affichées supérieur au sein de l'isolat LC par rapport à l'isolat IV. En effet, le nombre total de bandes différenciellement affichées s'élève à 49 pour l'isolat IV contre 67 pour l'isolat LC. Les proportions des deux types de bandes pour chaque isolat ont néanmoins été comparables avec 70% pour les différences d'intensité contre 30% pour la «présence/absence» (Tableau II).

Tableau II: Répartition des bandes différenciellement affichées selon l'isolat de *L.infantum*.

Isolat	Nombre de bandes à intensité variable	Nombre de bandes «présente/absente»	Total
IV50	34 (69.3 %)	15 (30.6 %)	49 (42.3 %)
DREP14	47 (70.1 %)	20 (29.8 %)	67 (57.7 %)
Total	81 (69.8 %)	35 (30.2 %)	116 (100%)

*Les 34 combinaisons d'amorces ont été utilisées au cours des réactions du DDRT-PCR en présence des ADNC issus des isolats viscéral IV50 et cutané DREP14 de *L. infantum* au stade promastigote en fin de phase logarithmique de croissance. Au total, 1703 bandes ont été obtenues dont 116 différenciellement affichées sur les critères de degré d'intensité (81) ou d'absence/présence (35). Les pourcentages sont rapportés soit au nombre total de bandes observées pour chaque isolat (en italique) soit au nombre total de bandes différenciellement affichées observées (soulignées).*

LE CHOIX DES AMORCES ET LEUR ASSOCIATION CONDITIONNE LA QUALITE DES PROFILS ET L'OBSERVATION DES DIFFERENCES D'AFFICHAGE ENTRE LES ISOLATS

Afin de comprendre la part relative de chacune des amorces dans les profils observés, les résultats ont été analysés en portant le nombre des différentes bandes observées sur un tableau croisant les amorces P aux amorces ME (Tableau III). Cette analyse représentée dans le tableau III illustre la part relative de chacune des amorces dans les profils observés.

Lors de ce travail, une amorce ME donnée a été engagée au moins 3 fois dans une réaction de DDRT-PCR alors qu'une amorce P a été utilisée au moins 1 fois. On constate ensuite que toutes les amorces sauf une (P1) ont généré des profils d'amplification comportant de bandes différenciellement affichées. La fréquence de ces profils a varié selon les amorces entre 0.5 et 1 avec une moyenne de 0.77 pour les amorces ME et 0.86 pour les amorces P. Les amorces ME4, ME6, ME8 et P7, engagées dans plus d'une réaction n'ont généré que ce type de profils.

Le nombre moyen de bandes différenciellement affichées ainsi que le nombre moyen de bandes amplifiées au sein d'un profil ont été aussi variables selon les amorces. Le nombre moyen le plus bas de bandes d'intérêt a été observé avec les amorces P2 et ME3 alors que les amorces ME6 et P2 ont donné lieu

au nombre moyen le plus bas de bandes amplifiées. Ces mêmes amorces ont cependant généré des bandes d'intérêt avec une proportion de 10% environ. Le nombre total de bandes amplifiées le plus élevé a été observé avec les amorces ME5, ME8 et P9 chacune générant 23% à 33% des bandes obtenues au total lors de cette étude. Cela peut être associé au fait que ces amorces ont été engagées respectivement dans 11 ou 7 des combinaisons testées. Néanmoins des amorces testées dans 2 combinaisons seulement telles que ME4 ou P6 ont généré chacune près de 12 % des bandes obtenues au total. Les 4 amorces ME4, ME5, ME8 et ME1 ayant les ancres GA, GC, AC et CA ont généré plus de 79 % de bandes amplifiées au total avec plus de 55 bandes obtenues en moyenne par amorce P testée. 73 % des bandes d'intérêt ont aussi été obtenues avec ces amorces. Les 6 amorces P9, P8, P7, P6, P5 et P4 ont généré quant à elles près de 84% du total des bandes amplifiées et environ 93% des bandes d'intérêt. Cependant, pour chacune des amorces ME ou P la proportion de bandes amplifiées ou différenciellement affichées a été variable selon la combinaison où elles sont engagées même celles concernant les 10 amorces les plus prolifiques.

Il semble donc que certaines ancres et certaines amorces soient plus représentées que d'autres au niveau des transcrits. Il apparaît aussi évident que chaque amorce contribue aux profils obtenus.

Tableau III: Profils résumés observés avec les différentes combinaisons d'amorces utilisées.

Amorces	ME1 (CA)	ME2 (CT)	ME3 (CC)	ME4 (GA)	ME5 (GC)	ME6 (AT)	ME8 (AC)	ME10 (TC)	Total	Moyenne	Proportions de bandes à intérêt (%)
P1	-	-	26, 0, 0, 0	-	27, 0, 0, 0	-	-	-	53, 0, 0, 0	26,5, 0, 0, 0	0
P2	-	-	8, 1, 0, 1	-	2, 0, 0, 0	-	-	-	10, 1, 0, 1	5, 0,5, 0, 0,5	10
P3	-	-	-	-	37, 4, 0, 4	-	-	-	37, 4, 0, 4	37, 4, 0, 4	10,81
P4	59, 6, 0, 6	12, 3, 1, 2	50, 0, 0, 0	65, 1, 1, 0	2, 0, 0, 0	3, 1, 1, 0	55, 5, 4, 1	20, 1, 1, 0	266, 17, 8, 9	33,3, 2,1, 1, 1,1	6,39
P5	25, 6, 6, 0	13, 0, 0, 0	-	48, 2, 1, 1	105, 6, 4, 2	33, 2, 2, 0	35, 3, 3, 0	22, 4, 4, 0	281, 23, 20, 3	40,1, 3,3, 2,9, 0,4	8,19
P6	-	-	-	-	64, 8, 8, 0	-	84, 8, 5, 3	63, 0, 0, 0	211, 16, 13, 3	70,3, 5,3, 4,3, 1	7,58
P7	-	-	-	-	118, 13, 11, 2	-	61, 6, 0, 6	-	179, 19, 11, 8	89,5, 9,5, 5,5, 4	10,61
P8	-	-	-	-	104, 7, 6, 1	-	-	-	104, 7, 6, 1	104, 7, 6, 1	6,73
P9	81, 0, 0, 0	75, 4, 2, 2	22, 2, 2, 0	112, 7, 4, 3	99, 10, 9, 1	1, 1, 1, 0	102, 2, 2, 0	-	492, 26, 20, 6	70,3, 3,7, 2,9, 0,8	5,28
P10	-	-	-	-	-	-	70, 3, 3, 0	-	70, 3, 3, 0	70, 3, 3, 0	4,29
Total	165, 12, 6, 6	100, 7, 3, 4	106, 3, 2, 1	225, 10, 6, 4	558, 48, 38, 10	37, 4, 4, 0	407, 27, 17, 10	105, 5, 5, 0	1703, 116, 81, 35	-	-
Moyenne	55, 4, 2, 2	33, 3, 2, 3, 1, 1, 3	26,5, 0,8, 0,5, 0,3	75, 3,3, 2, 1,3	62, 5,3, 4,2, 1,1	12, 3, 1,3, 1,3, 0	67,8, 4,5, 2,8, 1,7	35, 1,7, 1,7, 0	-	-	-
Proportions de bandes d'intérêt (%)	7.27	7	2.83	4.44	8.60	10.81	6.63	4.76	-	-	-

34 combinaisons d'amorces organisées à partir de 10 amorces Phosphorées P1 à P10 provenant du kit DeltaTM Differential Display (Clontech laboratories, USA) et de 8 amorces mini-exon ancrées. ME contenant une séquence conservée du gène du mini-exon (ME1 à 6, ME8 et ME10) ont été utilisées lors de ce travail. Les deux nucléotides de l'amorce ME servant d'ancrage lors de la réaction de DDRT-PCR sont indiqués entre parenthèses. Les résultats obtenus avec chaque combinaison d'amorce sont portés dans les cases d'intersection du tableau. La combinaison de quatre chiffres portée sur ces cases mentionne en premier lieu, un chiffre indiquant le nombre total de bandes observées par profil suivi du nombre de bandes d'intérêt, puis du nombre de bandes à intensité variable et enfin le nombre de bandes observées suivant le critère de « absence/présence ». Le symbole (-) indique les combinaisons d'amorces non appliquées. Pour chaque amorce, un total et une moyenne sont calculés pour les 4 paramètres mesurés. La dernière ligne et colonne du tableau indique le pourcentage du nombre de bandes d'intérêt pour chaque amorce ME ou P.

La complexité des profils et la présence de bandes différenciellement affichées dépendent donc du choix des amorces et de leur association. En plus de l'abondance relative des transcrits comme principe de base à la réaction de DDRT-PCR, les profils obtenus avec des combinaisons d'amorces dépendent aussi de la proximité relative des séquences d'ancrage de ces amorces.

LE SEQUENÇAGE DES TAGS PRESENTS OU ABSENTS REVELE DES SITES D'AMORÇAGE POTENTIELLEMENT POLYMORPHES

Notre étude s'est focalisée ensuite sur les bandes (ou tags) ayant un phénotype «présent/absent» afin de comprendre le mécanisme ayant permis de les générer. Neuf des 35 bandes observées ont été découpées des gels, réamplifiées par PCR en présence de la combinaison d'amorces leur correspondant, clonées dans le vecteur pMOS et séquencées. Cinq bandes proviennent de l'isolat cutané DREP14 et 4 de l'isolat viscéral LV50.

Les séquences de ces tags ont été purifiées de celles du vecteur et ont été soumises à des recherches d'homologies sur le génome de l'isolat séquencé (MCAN/ES/98/LLM-877) de *Leishmania infantum*. Elles ont toutes généré des hits significatifs. Nous nous sommes intéressés aux sites d'ancrage potentiel des amorces sur les sites génomiques homologues aux tags clonés afin de vérifier si des différences au niveau des sites d'amorçage permettent d'expliquer les phénotypes présents ou absents observés. Les résultats de cette analyse sont portés sur le tableau IV.

Tous les tags clonés ont généré un hit significatif sur le génome de *Leishmania infantum*. Sur les 15 extrémités séquencées et comparées, 9 correspondent aux sites d'ancrage ME et 6 aux sites P. Cinq ancres ME et 5 ancres P ont présenté des misappariements avec les séquences homologues du génome de l'isolat séquencé, qui constituent donc des sites potentiellement polymorphes parmi les différents isolats de *Leishmania infantum*. Ces polymorphismes semblent indépendants de l'origine clinique de l'isolat. La distance séparant l'ancre mini-exon de l'ATG codant s'étend de 27 à 165 nucléotides. Concernant, la taille de la séquence nucléotidique d'ancrage de l'amorce aléatoire P, celle-ci varie de 5 à 9 nucléotides pour une amorce à la base composée de 25 à 26 nucléotides qui inclut une ancre variable de 9 à 10 nucléotides.

PARMI LES TAGS PRESENTS/ABSENTS SELECTIONNES, ON IDENTIFIE DES ERREURS PROBABLES D'AMORÇAGE ET DES SEQUENCES DIFFERENTIELLEMENT EXPRIMEES

Les 9 séquences obtenues ont été analysées par les programmes BLAST et Artemis utilisant la base de données GeneDB du projet génome de *L. infantum* (MCAN/ES/98/LLM-877) (<http://www.genedb.org>) afin de les identifier et de déduire leur annotation (Tableau V). Les pourcentages d'homologie de l'ensemble des tags ont varié de 95 à 100 %. La taille des fragments appariés *in silico* a varié de 111 à 672 pb (Tableau V).

Huit séquences correspondant chacune à un site génomique sont présentes sur 7 chromosomes. La 9^{ème}, constituée par le tag 9-2 a reconnu 8 sites génomiques, éparpillés sur 7 chromosomes. Au total, 16 sites génomiques répertoriés sur 14 chromosomes correspondent aux 9 séquences. Les tags 9-12 et 9-1 sont cartographiés sur un même chromosome. La présence de mini-exon est confirmée au niveau de tous les tags, néanmoins 5 séquences seulement sur les 9 correspondent à des séquences annotées comme étant codantes.

Les résultats ont montré pour les 5 tags isolés à partir de l'isolat cutané DREP14 que 4 correspondent à des séquences codantes alors que le 5^{ème} (tag 9-1) a chevauché une région non annotée comme codante. Concernant les tags isolés à partir de LV50: le tag 9-10 chevauche un gène alors que les 3 autres ont chevauché des régions non annotées (Tableau V).

Le tag 9-2 qui a généré 8 hits correspond à un gène répété, dispersé, et comporte la séquence codante complète du gène histone H4 ainsi qu'une portion de séquence située entre le mini-exon et le codon d'initiation, retrouvée uniquement sur le hit du chromosome 36 mais absente chez les 6 autres chromosomes. La valeur de *E-value* la plus faible est aussi obtenue pour la séquence du chromosome 36 qui correspond ainsi très probablement à l'ADNc sélectionné (Tableau V). Il est un fait admis que les histones H4 subissent une régulation de leur expression génique au cours des stades de développement du parasite *Leishmania*. Il est possible de considérer que nous avons sélectionné par DDRT-PCR un gène qui est différenciellement exprimé entre stades du parasite, ce qui est compatible avec le choix d'utiliser des cultures en fin de phase exponentielle de croissance.

Tableau IV. Sites d'amorçage sur le génome de *Leishmania infantum* (MCAN/ES98/ILM-877).

Code du tag ^a	Sélection DREF14/IV50	Code de l'amorce mini-exon ME ^b	Code de l'amorce P ^c	Ancre de l'amorce ME ^d	Site d'ancrage génomique ^e	Distance entre l'amorce mini-exon ME et le codon d'initiation ATG (nt) ^f	Séquence nucléotidique du site d'ancrage de l'amorce P sur le génome séquencé de <i>Leishmania infantum</i> ^g	Nombre de nucléotides de l'amorce P constituant l'ancre ^h
1-2	-/+	ME5	P3	GC	GC	-	NGCTGGTGG	8/9
3-6	+/-	ME5	P9	GC	GC ^{**}	27	NNTGGCAGG	7/9
9-1	+/-	ME8	P6	AC	AA ^{**}	-	-	-
9-2	+/-	ME8	P6	AC	AC [*]	67	-	-
9-3	-/+	ME8	P6	AC	GC ^{**}	-	NGCTGGGTG	8/9
9-4'	-/+	ME8	P7	AC	AC	-	-	-
9-5	+/-	ME8	P7	AC	GC ^{**}	165	TGCTGTATG	9/9
9-10	-/+	ME4	P5	GA	GA	152	NNTCTGACTG	8/10
9-12	+/-	ME4	P9	GA	CA ^{**}	118	NNNGCAGG	5/9

a indique le nom de code de la bande sélectionnée sur les gels de DDRT-PCR.
b indique le code de l'amorce mini-exon ME ayant servi à l'amplification du tag au cours de la réaction de DDRT-PCR.
c indique le code de l'amorce aléatoire P ayant servi à l'amplification du tag.
d indique les deux nucléotides terminaux composant l'ancre de l'amorce mini-exon ME au cours des réactions de DDRT-PCR.
e indique le site d'ancrage *in silico* de l'amorce mini-exon ME sur le génome de l'isolat séquencé de *Leishmania infantum* (MCAN/ES98/ILM-877).
f indique la distance en nucléotides séparant l'amorce mini-exon du codon d'initiation ATG sur les transcrits.
g correspond à la séquence nucléotidique du site d'ancrage de l'amorce P sur le génome séquencé de l'isolat (MCAN/ES98/ILM-877).
h nombre de nucléotides constituant le site d'ancrage potentiel de l'amorce P sur le génome séquencé de l'isolat (MCAN/ES98/ILM-877).
En fait, seule la partie variable de l'amorce P est engagée dans la réaction.
* site d'amorçage avec le score (bits) le plus élevé correspondant au chromosome 36 pour le tag 9-2.
** présence de misappariements potentiels au niveau des nucléotides soulignés.
(-) non déterminé.
(N) tout autre nucléotide excepté celui de l'amorce.

Tableau V: Transcrits différentiellement affichés entre l'isolat niscéral IV50 et cutané DREP14 de *L. infantum* au stade promastigote identifiées par DDRT-PCR.

Code du tag ^a	Sélection DREP14/IV50 ^b	Combinaison d'amorces utilisée ^c	Taille du fragment séquence ^d	Gene DBI ^e	Chromosome ^f	Annotation ^g	Taille du hit ^h	Localisation du hit ⁱ	Pourcentage d'homologie ^j	E-value ^k	Score (bits) ^l
1-2	-/+	MEP3	416	-	32	Région non annotée	377	1047556-1047932	100	0.0	747
3-6	+/-	MEP9	152	LinJ28_V3.2930	28	Protéine conservée inconnue	111	1060776-1060886	100	2e ⁻⁶⁷	220
9-1	+/-	MEP6	697	-	10	Région non annotée	503	2154386-215937	90	e ⁻¹⁶⁶	585
9-2	+/-	MEP6	400	LinJ06_V3.0010	6	Histone H4	303	4060-4862	95	e ⁻¹³⁶	482
				LinJ15_V3.0010	15	Histone H4	303	3794-4096	98	e ⁻¹⁶²	569
				LinJ21_V3.0020	21	Histone H4	331	7465-7795	97	e ⁻¹⁷¹	601
				LinJ25_V3.2560	25	Histone H4	308	878344-878651	98	e ⁻¹⁶²	571
				LinJ31_V3.3320	31	Histone H4	312	1458866-1459177	98	e ⁻¹⁶⁷	587
				LinJ35_V3.0020	35	Histone H4	313	6663-6975	98	e ⁻¹⁶⁸	589
				LinJ35_V3.1320	35	Histone H4	309	557297-557605	96	e ⁻¹⁴⁹	525
				LinJ36_V3.0020	36	Histone H4	378	2931-3308	98	0.0	718
9-3	-/+	MEP6	344	-	18	Région non annotée	303	716450-716752	99	e ⁻¹⁶⁹	593
9-4	+/-	MEP7	698	-	23	Région non annotée	672	364387-365056	97	0.0	1142
9-5	+/-	MEP7	481	LinJ22_V3.0580	22	Protéine conservée inconnue	441	229118-229556	99	0.0	844
9-10	-/+	MEP5	682	LinJ34_V3.4180	34	Cell differentiation, putative	661	1648574-1649234	99	0.0	1287
9-12	+/-	MEP9	589	LinJ10_V3.0900	10	Nuclear transport factor 2, putative	525	387469-387990	96	0.0	866

^a le nom de code du tag correspondant à la bande sélectionnée sur les gels de DDRT-PCR.
^b les résultats des réactions de DDRT-PCR où (+) indique la présence et (-) l'absence de la bande au sein des profils obtenus pour chacun des isolats.
^c combinaison d'amorce ayant généré le tag correspondant.
^d taille du fragment séquencé.
^e l'annotation de gènes selon la version 3 du génome *L. infantum* sur GeneDB (<http://www.genedb.org>).
^f le chromosome où est cartographié le tag in silico.
^g annotation fournie par le projet génome de *L. infantum*.
^h correspond à la taille en nucléotides des fragments apparus (i.e. bit) in silico.
ⁱ localisation sur le génome de l'alignement de la séquence requête apparue in silico (i.e. bits).
^j le pourcentage d'homologie des tags comparés à la version 3 du génome de *L. infantum* (MCANIES98/LM4-877).
^k paramètre statistique non dépendant de la taille du hit et donnant un aperçu sur la similarité.
^l paramètre statistique dépendant de la taille du hit et donnant un aperçu sur la similarité

Nous avons par ailleurs confirmé l'observation faite relative au gène identifié via le tag 9-12 qui code pour une protéine apparentée au facteur de transport nucléaire 2 (NTF2-like) par une RT-PCR semi-quantitative comme on peut le voir sur la figure 3 illustrant l'amplification des ADNc ayant permis d'effectuer les criblages DDRT-PCR. Le signal d'amplification est

plus intense chez l'isolat DREP14 que chez l'isolat LV50 alors qu'il est équivalent pour le gène codant pour la tubuline alpha. Ces signaux quantifiés sur trois mesures effectuées chacune en triplicate sur un total de deux préparations indépendantes d'ARN ont conclu à une surexpression statistiquement significative chez DREP14 (p -value = 0.0115).

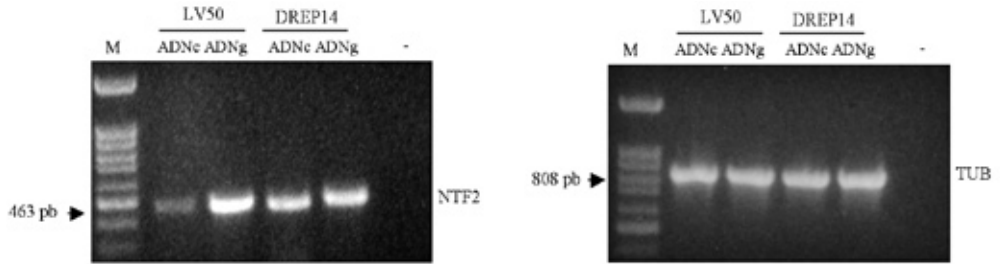


Figure 3. RT-PCR sur des transcrits codant pour une NTF2-like et l' α -tubuline à partir d'ADNc issus de formes promastigotes des isolats LV50 (viscéral) et DREP 14(cutané) de *L. infantum*. Des réactions de RT-PCR ont été effectuées en utilisant des quantités comparables d'ADNc synthétisés à partir de promastigotes pris en fin de phase logarithmique de croissance des isolats LV50 et DREP14. Les pistes (ADNc), (ADNg) et (-) correspondent à l'ADN complémentaire et à l'ADN génomique des isolats étudiés. L'ADN génomique des isolats constitue le contrôle positif de l'amplification. Les deux panneaux correspondent respectivement aux produits d'amplification des transcrits des gènes *Lin10_V3.0900* (NTF2-like) et *Lin13_V3.0330* (α -tubuline) utilisé comme contrôle d'amplification pour l'expression constitutive dans les promastigotes, respectivement amplifiés par les paires d'amorce NTF2F et NTF2R, *TubF* et *TubR*. M correspond au marqueur de taille de 100 pb. La taille des bandes amplifiées est indiquée sur la partie gauche de la figure.

DISCUSSION

Dans le cadre de ce travail, nous avons développé une variante de la technique *Differential Display RT-PCR*. A cet effet, nous avons utilisé des ARNm purifiés qui ont été rétrotranscrits grâce à des amorces oligodT. Les ADNc ainsi obtenus ont été amplifiés grâce à 2 types d'amorces: ME, qui correspondent à des séquences du mini-exon ancré, et P fournies par le kit commercialisé par Clontech.

L'amplification est réalisée en modifiant les conditions préconisées par le fournisseur en présence d'un nucléotide radiomarké au S³⁵ pour visualiser les produits par autoradiographie.

La particularité de cette nouvelle variante de la DDRT-PCR réside dans le choix des amorces ME afin que la plupart des produits amplifiés contiennent l'extrémité 5' des ARN messagers. L'intérêt étant de cibler d'une part des gènes spécifiques de *Leishmania* (en particulier, lorsque d'autre messagers sont présents), et d'autre part les gènes qui sont réellement exprimés et représentatifs d'une sous-population de messagers à un moment donné sélectionnée via les ancrs des amorces ME. L'objectif ici est d'améliorer

le criblage des ADNc différenciellement exprimés en ciblant plus spécifiquement la partie 5' des gènes. En effet, la diversité dans le choix des ancrs augmente la sensibilité du criblage, en permettant d'augmenter la représentativité des diverses sous-populations d'ARNm. Chacune des amorces utilisées a généré des profils d'amplifications différents. Par ailleurs, la plupart des amorces ME testées lors de ce travail ont généré des bandes différenciellement amplifiées. Beaucoup de variations du protocole original DDRT-PCR ont été publiées visant à réduire le nombre de faux positifs dont la cause serait l'utilisation d'amorces aléatoires courtes¹⁵. D'autres études se sont aussi attachées à améliorer la technique en modifiant également la séquence nucléotidique de leurs amorces en fonction de leur matériel biologique, en y intégrant par exemple des motifs propres à l'espèce étudiée¹⁶. Nous avons utilisé ici des amorces P fournies avec un kit optimisant l'obtention de vrais signaux positifs chez les cellules eucaryotes et préconisant l'utilisation de deux dilutions d'ADNc par échantillon afin de s'assurer que le signal obtenu réponde à la différence de concentration, ce qui

limiterait la sélection de faux positifs. Les amorces mini-exons sont spécifiques des *Leishmanies*.

Lors de notre étude, plusieurs types de profils d'amplification ont été obtenus: dans le premier, nous constatons l'absence de bandes différenciellement affichées; dans les autres cas, l'analyse met en valeur la présence de bandes présentes/absentes ainsi que des bandes d'intensité variable chez les deux isolats. Ainsi, plusieurs des transcrits observés avaient des intensités relatives plus élevées dans l'isolat viscéral que dans l'isolat cutané ou réciproquement. Cette analyse a aussi dégagé des profils plus ou moins riches en bandes différenciellement affichées. Certaines combinaisons d'amorces ont été plus «proliques» que d'autres telles que P9ME4, P7ME8 et P3ME5.

Les profils observés dépendent des couples d'amorces utilisés chaque amorce contribuant de manière aussi importante que l'autre. Ils reflètent l'abondance relative des séquences composant les amorces P au niveau des ARN messagers et leur proximité aux sites accepteurs de trans-épissage qui vont constituer l'ancre du mini-exon. Ils dépendent probablement aussi des isolats utilisés. On a ainsi observé plus de bandes différenciellement affichées chez l'isolat DREP14 que chez l'isolat LV50, 58% versus 42%. Néanmoins, les proportions des 2 types de bandes sont conservées entre les deux isolats avec 30% de bandes présentes ou absentes chez l'un ou l'autre des isolats.

Parmi les mécanismes relatifs à l'obtention de bandes «absentes versus présentes», la présence de différences au niveau du site d'amorçage semble majeure. Ainsi, 75 % des extrémités séquencées ont comporté des misappariements avec le génome séquencé d'un isolat canin de *L. infantum*. La proportion comparable des types de bandes observées pour chaque isolat est un autre argument qui étaye cette hypothèse. Néanmoins, on ne peut pas exclure des événements d'hybridation non spécifiques des amorces aux ADNc donnant lieu à des signaux faussement positifs. La sélection de séquences non annotées comme codantes parmi cette catégorie de bandes est en faveur de cela. Il semble probable que les 2 hypothèses contribuent à leur observation. La présence de bandes différenciellement exprimées est par ailleurs confirmée.

Afin de valider le variant de la technique, nous avons utilisé des transcrits exprimés en fin de phase logarithmique de culture où les chances d'identifier des différences sont augmentées par le passage

imminent en phase stationnaire, pendant laquelle a lieu la différenciation en promastigotes infectieux. Il est admis en effet que ce processus cellulaire est accompagné chez *L. donovani* par des variations ordonnées transitoires ou permanentes de l'expression d'un certain nombre de gènes¹⁷.

Ce matériel biologique a permis d'obtenir des bandes différenciellement affichées en proportions variables pour chaque paire d'amorces mais correspondant à un total de 6.8%. L'utilisation de mini-exon a effectivement permis de sélectionner la partie 5' de gènes parmi lesquels on confirme le caractère différenciellement exprimé soit par les données de la littérature soit par l'expérimentation. On ne peut cependant pas affirmer s'il s'agit de différences entre isolats ou entre stades de cultures. Ainsi, parmi les gènes sélectionnés par DDRT-PCR, nous avons identifié un gène codant pour l'histone H4. Les histones incluant la H4 sont classées par Chang comme des déterminants pathoantigéniques impliqués dans la virulence des leishmanies¹⁸. La protéine histone H4 est extrêmement conservée entre les espèces de *Leishmania* reflétant leur fonction universelle. Chez *Leishmania infantum*, Soto et al.¹⁹ se sont focalisés sur l'étude de l'expression des gènes histone H4, montrant que la régulation des ARNm des histones est fonction de la phase de croissance parasitaire. En effet, au cours de la différenciation des parasites, le niveau d'une classe d'ARNm codant pour la protéine histone H4 diminue en passant de la phase logarithmique vers la phase stationnaire²⁰. Par ailleurs, les études d'expression globale effectuées chez *L. major* ou *L. mexicana* confirment que les gènes de ce groupe sont surexprimés au stade promastigote par rapport au stade amastigote, et semble-t-il au stade procyclique par rapport au stade métacyclique^{21, 22, 23}.

Le second gène caractérisé code pour une protéine apparentée au facteur nucléaire de transport 2 (ou NTF2-like). Le facteur NTF2 est impliqué dans le transport nucléo-cytoplasmique qui est comme récemment décrit aussi impliqué dans le mécanisme d'apoptose²⁴. Ces travaux ne permettent cependant pas de conclure au rôle de la protéine NTF2-like ni à son implication dans l'apoptose du parasite. La différence d'expression de ce gène chez les 2 isolats de notre étude a été confirmée sur 2 préparations différentes d'ARN correspondant à des cultures indépendantes des parasites.

On peut conclure qu'il y a bien des profils d'affichage

différents entre les deux isolats Tunisiens de *L. infantum* qui demandent à être abordés de manière plus approfondie. Grâce à cette approche, nous avons identifié des gènes exprimés différemment entre stades PNA- de 4 isolats de *L. infantum*, suggérant une association probable de l'expression de ces gènes avec les niveaux de virulence affichés par les isolats (Turki-Mannoubi et al., en préparation).

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Technologie (contrat – programme 2004-2008, LR00SP04), par le programme spécial de l'UNICEF / PNUD / banque mondiale / OMS pour la recherche et la formation en matière de maladies tropicales (TDR, ID : A11032). Les auteurs remercient Merherzia Ben Fadhel (Institut Pasteur de Tunis) pour son aide dans la réalisation du séquençage.

REFERENCES

- 1- **P. Desjeux** (2001). The increase risk factors for Leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **95**, 239-243.
- 2- **R. Ben-Ismaïl, D.F. Smith, P.D. Ready, A. Ayadi, M. Gramiccia, A. Ben-Osman and 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**, 508-510.
- 3- **P. Liang and A. Pardee** (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, **257**, 967-971.
- 4- **P.L. Heard, C.S. Lewis and G. Chaudhuri** (1996). *Leishmania mexicana amazonensis*: differential analysis and cloning of mRNAs from attenuated and infective forms. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **43**, 409-415.
- 5- **D. Gamboa, G. Van Eys, K. Victoir, K. Torres, V. Adaui, J. Arevalo and J.C. Dujardin** (2007). Putative markers of infective life stages in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasitology*, **134**, 1689-1698.
- 6- **M. Ouakad, M. Chenik, Y. Ben Achour-Chenik, H. Louzir and K. Dellagi** (2007). Gene expression analysis of wild *Leishmania major* isolates: identification of genes preferentially expressed in amastigotes. *Parasitol. Res.*, **100** (2), 255-264.
- 7- **K. Liu, S. Zinker, C. Argüello and L.M. Salgado** (2000). Isolation and analysis of a new developmentally regulated gene from amastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Parasitol. Res.*, **86** (2), 140-150.
- 8- **J.A. Gutiérrez, F. Puentes, A. Moreno, M.E. Patarroyo and L.A. Murillo** (2001). Identification of a differentially expressed mRNA in axenic *Leishmania panamensis* amastigotes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **96** (6), 835-838.
- 9- **Y. Ben Achour, M. Chenik, H. Louzir and K. Dellagi** (2002). Identification of a disulfide isomerase protein of *Leishmania major* as a putative virulence factor. *Infect. Immun.*, **70** (7), 3576-3585.
- 10- **H. Noyes, M. Chance, C. Ponce, E. Ponce and R. Maingon** (1997). *Leishmania chagasi*: Genotypically Similar Parasites from Honduras Cause both Visceral and Cutaneous Leishmaniasis in Humans. *Exp. Parasitol.*, **85**, 264-273.
- 11- **J.K. Stiles, P.I. Hicock, P.H. Shah and J.C. Meade** (1999). Genomic organisation, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **93**, 781-807.
- 12- **J.E. Purdy, J.E. Donelson and M.E. Wilson** (2005). *Leishmania chagasi*: the alpha-tubulin intercoding region results in constant levels of mRNA abundance despite protein synthesis inhibition and growth state. *Exp. Parasitol.*, **110** (2), 102-107.
- 13- **G. Srividya, R. Duncan, P. Sharma, B.V. Raju, H.L. Nakhasi and P. Salotra** (2007). Transcriptome analysis during the process of in vitro differentiation of *Leishmania donovani* using genomic microarrays. *Parasitology*, **134**, 1527-1539.
- 14- **K. Rutherford, J. Parkhill, J. Crook, T. Horsnell, P. Rice, M.A. Rajandream and B. Barrell** (2000). Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, **16** (10), 944-945.
- 15- **M.V. Matz and S.A. Lukyanov** (1998). Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Res.*, **26** (24), 5537-5543.
- 16- **L.B. Diachenko, J. Ledesma, A.A. Chenchik and P.D. Siebert** (1996). Combining the Technique of RNA Fingerprinting and Differential Display to obtain Differentially Expressed mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **219**, 824-828.

- 17- **A. Saxena, T. Lahav, N. Holland, G. Aggarwal, A. Anupama, Y. Huang, H. Volpin, P.J. Myler and D. Zilberstein** (2007). Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **152** (1), 53-65.
- 18- **K.P. Chang and B.S. McGwire** (2002). Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid. Biol. Dis.*, **20**, 1(1), 1.
- 19- **M. Soto, L. Quijada, C. Alonso and J.M. Requena** (1997). Molecular cloning and analysis of expression of the *Leishmania infantum* histone H4 genes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **90**, (2), 439-47.
- 20- **S.I. Belli** (2000). Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. *Int. J. Parasitol.*, **30**, (6), 679-687.
- 21- **R. Almeida, B.J. Gilmartin, S.H. McCann, A. Norrish, A.C. Ivens, D. Lawson, M.P. Levick, D.F. Smith, S.D. Dyll, D. Vetrie, T.C. Freeman, R.M. Coulson, I. Sampaio, H. Schneider and J.M. Blackwell** (2004). Expression profiling of the *Leishmania* life cycle: cDNA arrays identify developmentally regulated genes present but not annotated in the genome. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **136** (1), 87-100.
- 22- **T.R. Holzer, W.R. McMaster and J.D. Forney** (2006). Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **146** (2), 198-218.
- 23- **N.S. Akopyants, R.S. Matlib, E.N. Bukanova, M.R. Smeds, B.H. Brownstein, G.D. Stormo and S.M. Beverley** (2004). Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **136** (1), 71-86.
- 24- **M. Casanova, P. Portalès, C. Blaineau, L. Crobu, P. Bastien and M. Pagès** (2008). Inhibition of active nuclear transport is an intrinsic trigger of programmed cell death in trypanosomatids. *Cell Death and Differentiation*, 1-11.