



HAL
open science

Utilisation des sondes d'ADN pour l'identification chromosomique et la cartographie du génome de *Leishmania*

C Ravel, F Macari, M Pagès, C Blaineau, P Bastien, Jp Dedet

► **To cite this version:**

C Ravel, F Macari, M Pagès, C Blaineau, P Bastien, et al.. Utilisation des sondes d'ADN pour l'identification chromosomique et la cartographie du génome de *Leishmania*. *Veterinary Research*, 1994, 25 (6), pp.603-604. hal-00902289

HAL Id: hal-00902289

<https://hal.science/hal-00902289v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

nique du drapeau dans 3 massifs forestiers situés dans des aires bioclimatiques différentes :

- station A : forêt de Rennes, Ile-et-Vilaine (climat océanique doux) ;
- station B : forêt de Bouconne, Haute-Garonne (climat océanique chaud) ;
- station C : bois de Saint-Jean de Thuri-nieux, Ain (climat continental).

Tous les prélèvements ont été effectués à la même période : juin 1993. Pour cette étude, seuls les adultes ont été prélevés et conservés individuellement à -80°C jusqu'à leur utilisation. Nous avons choisi pour ce travail 2 systèmes enzymatiques dont la résolution et le polymorphisme nous paraissaient satisfaisants, la phosphoglucomutase (PGM) et la malate déshydrogénase (MDH). La technique utilisée est celle qui a été codifiée par Second et Trouslot (1980).

Pour la PGM, nous avons obtenu un locus anodique à 6 bandes.

Les échantillons que nous avons pu interpréter selon les stations sont : pour la station A, 38 mâles et 59 femelles (sur respectivement 47 et 67), pour la station B, 25 mâles et 34 femelles (sur respectivement 30 et 38) et pour la station C, 20 mâles et 23 femelles (sur respectivement 20 et 23).

Il n'y avait pas de différences significatives entre les populations des 3 stations (ddl : 10, χ^2 : 8,454; $P = 0,584$ 6).

Pour la MDH, nous avons obtenu 2 loci : un locus anodique à 3 bandes : MDH 1 et un locus cathodique monomorphe : MDH 2.

Les échantillons que nous avons pu interpréter selon les stations sont : pour la station A, 40 mâles et 65 femelles (sur respectivement 40 et 67) ; pour la station B, 30 mâles et 50 femelles (sur respectivement 30 et 53) ; et, pour la station C, 20 mâles et 23 femelles (sur respectivement 20 et 23).

Là encore, il n'y avait pas de différence significative entre les populations des 3 stations (ddl : 4, χ^2 : 2,766 ; $P = 0,597$ 7).

Les calculs des distances génétiques de Nei ont confirmé les faibles différences génétiques entre ces populations.

Référence

Second G, Trouslot P (1980) *Électrophorèse d'enzymes de riz* (Oriza sp), Travaux et Documents de l'ORSTOM

Utilisation des sondes d'ADN pour l'identification chromosomique et la cartographie du génome de *Leishmania*.

C Ravel ¹, F Macari ¹, M Pagès ², C Blainneau ¹, P Bastien ¹, JP Dedet ¹ (¹ Laboratoire d'écologie médicale et de pathologie parasitaire, annexe de la faculté de médecine, 163, bd Auguste-Broussonet, 34000 Montpellier ; ² CRBM-CNRS, INSERM U 249, Institut de biologie, bd Henri-IV, 34000 Montpellier, France)

Définition de 20 groupes de liaison

Dans ce travail, nous présentons 99 sondes d'ADN isolées et clonées à partir du génome de *Leishmania infantum*. L'origine chromosomique de ces sondes a été déterminée sur les caryotypes polymorphes des clones LEM 1317 et LEM 1284 de *L. infantum*. Ces 99 sondes ont pu être classées en 20 groupes de liaison, avec 1 à 17 sondes par groupe. Quatre bandes chromosomiques n'ayant pas pu être identifiées par au moins une sonde, on peut donc estimer pour *L. infantum* un nombre minimum de 20 chromosomes et un maximum de 24.

Distribution synthénique des sondes entre complexes différents

Les sondes spécifiques des 6 premiers chromosomes de *L. infantum* ont été hybridées sur les caryotypes de souches appartenant à différents complexes de *Leishmania* de l'Ancien Monde (*L. infantum*, *L. donovani*, *L. Major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*). Ces 6 ensembles de sondes constituant des groupes de liaison chez *L. infantum* étaient également associées sur les caryotypes des différents complexes. Au-delà du poly-

morphisme de taille des chromosomes (Pagès *et al*, 1989), on a constaté une remarquable conservation de la structure générale du génome, au moins pour ces 6 premiers chromosomes. L'existence d'hybrides intercomplexes a été démontrée par certains auteurs (Kelly *et al*, 1991), et, dans le même sens, nos résultats mettent en évidence la proximité génétique des *Leishmania* appartenant à différents complexes.

Cartes chromosomiques chez L. infantum

Les 3 premiers chromosomes de *Leishmania* ont été isolés et hydrolysés par des enzymes ayant peu de sites de restriction dans le génome (*Asel*, *DraI*, *XbaI*, *EcoRV*). Les 30 sondes qui ont été caractérisées comme spécifiques des 3 premiers chromosomes ont été hybridées sur ces différents profils de restriction. En comparant les profils obtenus pour des chromosomes homologues de différentes souches, cette technique a permis la mise en évidence des régions impliquées dans les variations de taille chromosomique.

Une banque d'ADN de *Leishmania* dans le vecteur YAC vient d'être réalisée dans le laboratoire. Les sondes que nous avons isolées vont en permettre l'exploitation en positionnant les clones entre eux et sur le caryotype. On peut ainsi envisager une extension de la cartographie chromosomique à tout le génome.

Références

- Kelly JM, Law JM, Chapman CJ, Van Eys GJ, Evans DA (1991) Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 46, 253-263
- Pagès M, Bastien P, Veas F *et al* (1989) Chromosomes size and number polymorphisms in *L. infantum* suggest amplification/deletion and possible genetic exchange. *Mol Biochem Parasitol* 36, 161-168

Competitive polymerase chain reaction (PCR) and carry-over prevention for dia-

gnosis in microbiology. S Bretagne ¹, JM Costa ², M Vidaud ² (¹ *Laboratoire de parasitologie, faculté de médecine Paris XII, 94010 Créteil cedex*; ² *Laboratoire de biologie moléculaire, American Hospital of Paris, 92202 Neuilly cedex, France*)

Prevention and treatment of viral, bacterial or parasitic diseases necessitate a rapid and reliable diagnosis. Gene amplification using the polymerase chain reaction (PCR) offers such a possibility. However PCR may produce false positive and false negative results.

False positive results are mainly due to contamination with previous PCR products. To avoid such contamination, sample processing and amplification testing must be performed in 2 separate rooms. Moreover, kits like the GeneAmp PCR carry-over prevention kit (Perkin-Elmer, Paris, France) should be used. The method used to make PCR products susceptible to degradation involves substituting dUTP for dTTP and adding the enzyme uracil-*N*-glycosylase (UNG) to the PCR reaction mixture. Prior to amplification, the samples are incubated for 2 min at 50°C to allow UNG to excise any dUTP from dUTP-containing amplified products, which could have been carried over from previous PCR reactions. This incubation is followed by a 5-min heating at 95°C prior to temperature cycling to inactivate UNG. Moreover, this method produces a hot-start, which improves specificity and enhances the sensitivity of PCR.

False negative results depend on the presence of amplification inhibitors in the biological samples tested. An internal control can evaluate the efficiency of the amplification reaction. Such a control can exclude false negative results and can give semi-quantitative evaluation of the number of initial target DNA molecules. We have thus developed an internal control using M13mp18 phage DNA for the diagnosis of *Toxoplasma gondii* (Bretagne *et al*, 1993).