TP SIGE : étude du polymorphisme génétique chez la souris par PCR. Etude du polymorphisme génétique du parasite *Leishmania infantum* déterminé par PCR-RFLP.

Etude de fonds génétiques chez la souris

Les souris sont les animaux les plus utilisés en laboratoire. Elles sont utilisées notamment pour étudier des phénomènes physiologiques ou pour tester des substances médicamenteuses. Pour qu'il y est le moins de variation génétique, des lignées consanguines sont utilisées.

Le but de ce TP est d'étudier le polymorphisme de la souris. En effet, il pourrait exister dans le génome de la souris des séquences dites en tandem, ce sont des séquences répétées souvent non codantes et sujettes à des mutations. Pour évaluer ce polymorphisme nous allons utiliser l'analyse par PCR des micro ou minisatellites.

1) Matériels et méthodes

Le matériel mis à notre disposition :

- Echantillons de tissus de souris
- Pipettes P200 et P20
- Plaque chauffante
- Centrifugeuse
- Tubes Eppendorf
- Données génétiques pour trouver les couples amorces
- dNTP
- Tampon Taq polymérase
- MgCl2
- Gel d'agarose 3%
- Support pour électrophorèse
- Kit de préparation d'ADN et PCR KAPA Mouse Genotyping Kit

a) Prélèvement d'ADN

Nous aurons des échantillons de tissus à notre disposition.

b) Extraction de l'ADN

Pour faire une extraction de l'ADN, nous allons utiliser un kit de préparation qui contient une protéase thermostable dans un milieu tampon qui extrait l'ADN des tissus en 15 minutes. Ce kit contient aussi une ADN polymérase qui permet d'accélérer la réaction d'amplification. La combinaison de ces deux enzymes permet d'extraire et d'amplifier l'ADN en une heure, ce qui pourrait prendre un jour ou plus avec les protocoles conventionnels.

Il faut placer dans un tube Eppendorf, l'échantillon de tissus, 10μL de solution tampon, 2μL de la protéase et 88μL d'eau pour un volume total de 100μL.

Ensuite, il faut faire une lyse dans un bain d'eau à 75°C pendant 10 min puis à 95°C pendant 5 min.

Ensuite, il faut centrifuger et diluer l'ADN avec du Tris-HCl 10mM.

c) Recherche couple amorces/type de génome

On utilise le tableau de données qui montre la taille des amplicons en fonction des marqueurs. Il faut choisir un marqueur qui donne 2 tailles différentes d'amplicons pour que l'on puisse les observer.

d) PCR : amplification de différents microsatellites

Toujours avec l'aide du kit, nous allons faire une PCR.

Il faut placer dans un tube Eppendorf, 10μ L de l'ADN polymérase, 0.5μ L de chaque amorce, 2μ L de l'ADN extrait et 7μ L d'eau.

Ensuite il faut commencer les cycles de PCR : un premier cycle de 5 min à 95°C, 35 cycles a 95°C, 54°C et 72°C pendant 30 sec pour les deux premiers et 45 sec pour le troisième, puis enfin un dernier cycle à 72°C pendant 10 min.

Le tout est conservé à 4°C.

Comme les volumes à prélever sont trop faibles, on doit diluer la concentration des amorces. Pour cela, on prélève alors $2\mu L$ d'amorce que l'on mélange dans $6\mu L$ d'eau car le facteur de dilution situé entre 0,5 et 2 est de 4. La concentration en amorces dans $2\mu L$ est alors de $2,125\mu M$.

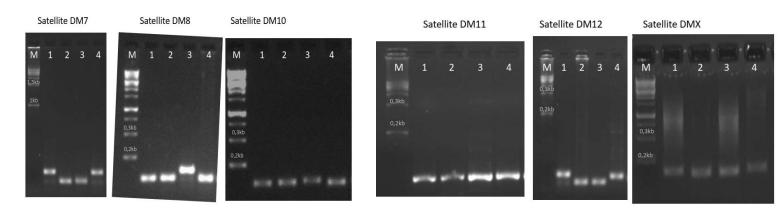
Cependant le volume doit être de $20\mu L$ et en prélevant $2\mu L$ de chaque amorce on arrive a un volume final de $23\mu L$. On décide alors de diluer par 2 la préparation d'ADN polymérase et de n'en ajouter que $5\mu L$ seulement. Le volume serait alors de $18\mu L$.

On décide ensuite de prélever 3μL de chaque amorce au lieu de 2μL. Le facteur de dilution est de 6 (situé en 0,5μL et 3μL). On prélève finalement 2μL de solution d'amorces que l'on dilue dans 10μL d'eau. La concentration finale de la solution n'est plus qu'à 2,083μM.

e) Analyse sur gel d'électrophorèse

On dépose le produit de PCR sur un gel d'agarose 3% et on laisse migrer à 100V pendant 2h.

2) Analyse des photos



a) Satellite DM7:

On observe que les fragments des souris 1 et 4 se ressemblent et les fragments 2 et 3 se ressemblent aussi. On observe bien une variation génétique donc un polymorphisme.

b) Satellite DM8:

On voit que la bande 3 est de plus grande taille que les 3 autres. On peut émettre l'hypothèse qu'il y est une mutation (une insertion) dans la séquence du satellite.

On observe bien là aussi un polymorphisme génétique.

c) Satellite DM10:

Les 4 bandes ont toutes la même taille, on observe aucune variabilité. Les bandes sont très peu vives, il y a peu de fragments.

d) Satellite DM11:

On observe la même chose que pour le satellite DM10, c'est-à-dire, les bandes sont de mêmes tailles donc il n'y a pas de variabilité.

Les bandes 3 et 4 semblent plus vives que les bandes 1 et 2. Il y a donc moins de fragments chez les souris 1 et 2.

e) Satellite DM12:

Ici on observe le même schéma que pour le satellite DM7. Les fragments 1 et 4 se ressemblent et les fragments 2 et 3 se ressemblent aussi. On observe également une bande de très grande taille pour la souris 2 qui n'existent pas pour la souris 3. Il y a donc une variabilité entre la souris 2 et la souris 3.

f) Satellite DMX:

Tous les fragments semblent de la même taille cependant ils sont très peu vifs donc il y a peu de fragments.

En analysant ces photos, et en sachant que le fond consanguin de la souris 1 est B6 et le fond consanguin de la souris 2 est 129, on peut en déduire les fonds consanguins des souris 3 et 4. En effet, on peut voir que pour le satellite DM7 et le satellite DM12, la souris 3 est de fond consanguin 129 car les bandes sont de même taille que celle de la souris 2. Pour la souris 4, elle est de fond consanguin B6 car les bandes sont de mêmes tailles que la souris 1.

Il y a très peu de variabilité génétique entre les satellites de la souris 1 et de la souris 3. En revanche, pour la souris 3, il semble y avoir plus de variabilité génétique entre la souris 2 et 3. L'hypothèse est que soit la souris 3 est de la même lignée que la souris 2 (B6) ou soit elle est d'une lignée totalement différente.

Dans le cas de la dernière hypothèse, les fragments de la souris 3 oscillent entre les tailles des bandes B6 et la première bande du marqueur de taille, on estime alors le poids des fragments entre 160 et 200 pb. Selon le tableau de données génétiques des différentes souches, on observe que 195 est la seule valeur comprise dans cette fourchette donc les lignées sont : C3H, FVB, FVB Rhino, CBA, DBA1 et SJL. Toutes ces tailles correspondent au satellite DM8 où on voit bien que la bande 3 n'a pas la même taille.

						FVB								129	
Marqueurs	primer forward	primer reverse	Pos (cM)	C3H	FVB	Rhino	CBA	B6N	B6J	DBA1	DBA2	SJL	Balb/c	Pas	NOD
D1Nds9	AGAATCTGACTTACCCATGGT	GAGGGAGAAGAATTATGTCTG	94,2	150	120	120	120	100	100	120	120	150	150	150	150
D2mit148	GTTCTCTGATCTACGGGCATG	TTCACTTCTACAAGTTCTACAAGTTCC	105,0	125	120	120	135	120	120	135	130	130	130		120
D5mit188	AAGACGTTGGAACAAACAAACA	ACCAAATATCCACACTAATACTTTTTC	64,0	140	115	115	130	147	147	130	130	130	130	130	117
D7mit222	AGTGCAGGGAGAAAACCTGA	CAAAAATGTTGTCTTAAGTTTATGTGG	52,6	130	150	150	130	150	150	125	130	120	120		120
D8mit4	CCAACTCATCCCCAAAGGTA	GTATGTTCAAGGCTGGGCAT	14,0	195	195	195	195	160	160	195	200	195	210		200
D10mit10	CCAGTCTCAAAACAACAACAAAC	TTGCACCTAGATTGCCTGA	51,0	130	130	130	130	180	180	130	130	130	130	128	130
D11mit5	TTCTGTGAGCCTGGAGGAGT	TACAGGACTAGTTTCCATTTGGG	37,0	190	190	190	190	220	230	190	190	190	190	190	180
D16mit5	CGGGGATCATCCCTAAAAAC	TCCCCAATTCCTCTTGTGTC	38,0	160	160	160	160	160	160	130	130	160	130		160
D18mit188	TGCAAAATGATGTCTTCCCA	TATTTACCCACAGGTTAAATGAAGG	47,0	120	120	120	120	100	100	120	130	120	130		120
D19mit1	AATCCTTGTTCACTCTATCAAGGC	CATGAAGAGTCCAGTAGAAACCTC	52,0	150	140	140	140	120	130	140	150	140	150		150
DXmit140	ACATGAAAGTTAGAAAGAGACCCG	GTGCACATTTGTGTGTGTATGC	19,0	130	110	110	110		120	120	120	110	130		120

Pour conclure sur ce TP, il y a effectivement du polymorphisme génétique au sein des espèces de souris. Une autre technique aurait pu être utilisé pour mieux définir de quelle souche provient la souris 3 est la RFLP. Il s'agit d'une technique qui permet d'utiliser les sites de coupures des enzymes de restrictions. On peut alors comparer ces fragments pour étudier le polymorphisme.

II) Etude du polymorphisme génétique de Leishmania infantum

Il s'agit d'un article de EL Hamouchi portant sur les maladies infectieuses et la pauvreté au Maroc publié en 2018. L'objectif est d'étudié le Polymorphisme génétique de *Leishmania infantum* isolé chez l'homme et chez les animaux déterminés par nagt PCR-RFLP (détermine le statut de maladie génétique).

En effet, *Leishmania infantum* est l'agent causatif de la leishmaniose viscérale humaine (VL) et de la leishmaniose cutanée (CL) dans la région méditerranéenne. La variation génétique des parasites leishmania peut être phénotypiquement différente et peut être associée à la répartition géographique et à la diversité des manifestations. Il s'agit d'explorer le polymorphisme génétique dans les isolats de *L. infantum* d'hôtes humains et animaux dans différentes régions du Maroc.

1) Matériels et méthodes

Ils ont utilisé une variabilité génétique interspécifique de 40 souches marocaines de L. infantum dans un milieu culturel Novy-MacNeal-Nicolle. 33 d'entre elles ont été isolées sur des patients immunocompétents avec VL (n = 31), CL (n = 2), et (n = 7) dans des réservoirs canins. Différents échantillons ont été prélevés dans les foyers endémiques et dans le sud du Maroc. Les VL et les souches leishmaniose sont caractérisés par MLEE appartenant à MON-1 à l'exception d'une souche appartenant à zymodeme MON24.

L'ADN a été extrait à l'aide de PureLink Genomic DNA Mini Kit puis une amplification de 1,4 kb nagt a été exécutée sur une paire d'amorces L1 (5' -TCATGACTCTTGGCCTGGTAG-3') et L4 (5'-CTCTAGCGCACTTCATCGTAG-3') par Akman et coll avec des modifications.

Les mélanges de PCR se composaient de 50 à 100 ng d'ADN, 1,25 U de GoTaq® une polymérase d'ADN, de tampon PCR 1X, de 0,4 µmol/L de chaque amorce, de 1,5 mmol/L de MgCl2 et de 0,2 mmol/L de chaque dNTP. La PCR a été réalisée à différentes températures (95°C, 94°C, 58°C et 72°C) en utilisant trois enzymes de restriction différentes : Nael, Alwl et Ncil. Toutes les réactions de restrictions ont été incubés à 37°C puis par PCR-RFLP de nagt, ils ont effectué un codage de gène d'une seule copie de N-acétylglucosamine-1-phosphate transférase

(transporte des enzymes nouvellement synthétisées vers le lysosome). Ensuite ils ont inclus des modèles de restriction nagt de 17 souches pour faire une analyse plus complète du polymorphisme de L. infantum. Les modèles sont déterminés par la digestion in-silico de trois séquences de la base de données GenBank. Les fragments de restriction ont été résolus par électrophorèse (2-3h) sur gel d'agarose (pour la séparation des fragments en fonction de leur taille) contenant du bromure d'Ethidium (intercalant qui marque les acides nucléiques) et visualisé sous l'éclairage UV.

2) Analyse des résultats

L'analyse des produits PCR avec trois endonucléases indique l'hétérogénéité génétique parmi la population marocaine de *L. infantum*. La digestion avec Alwl et Nael ont produit 2 et 4 modèles différents. L'endonucléase Ncil a abouti à une monomorphe. Chaque souche a été comparée aux cartes de restrictions de *L. infantum* et a été utilisée comme séquence de référence pour identifier les sites de restriction nagt des trois enzymes testées et de confirmer la taille des fragments de restriction et les positions coupées sur la séquence de référence correspondant à chaque enzyme. L'analyse des modèles de restriction nagt-RFLP a permis de regrouper 40 isolats de *L. infantum* en 6 génotypes distincts (tableau3).

Table 3 nagt genotypes identified within Moroccan L infantum population and defined by the restriction patterns obtained with endonucleases Alwl, Nael and Nall

Genotype	RFLP	patterns	Strains			
	Alwi	Nael	Ncil	26 (18 VL + 7 CanL +1CL)		
L. infantum (common genotype)	а	а	а			
L. infantum variant 2	a	ь	a	1 (VL)		
L. infantum variant 4	ь	a	a	3 (VL)		
L. infantum variant M1	a	c	a	6 (VL)		
L. infantum variant M2	ь	c	a	3 (VL)		
L. infantum variant M3	a	d	a	1 (CL)		
L. infantum Iranian varianta	a	e	a	1 (VL)		

VL Visceral leishmaniasis, CL Cutaneous leishmaniasis, Cant. Canine visceral leishmaniasis

Dans le tableau 2, on observe des digestions successives au niveau de chaque enzyme de façon décroissante. On observe que Nael a coupé dans toutes les modèles (a. b. c. d. et e).

observe que Nael a coupé dans toutes les modèles (a, b, c, d, et e).

Enzymes	AlwI		Nael	Ncil				
Patterns	a	ь	а	b	c	d	eª	a
Fragments (bp)	1053 257 95	1148 257	797 510 98	797 608	895 510	1405	797 338 172 98	1017 222 166

^{*}This variant was identified by in-silico RFLP analysis of an Iranian sample retrieved from the GenBank database

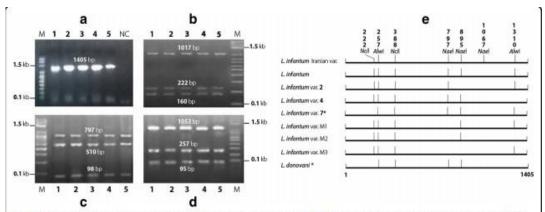


Fig. 2 a PCR amplification of nagt gene (1.4 kb) from Moroccan L. Infantum strains. b, c, d PCR-amplified nagt digested with Ncil, Nael, and AlMI, respectively. The numbers above and below the digested fragments indicate their sizes. Lanes 1–5: DNA samples of Moroccan L. Infantum isolates 1 to 5; NC: Negative control; M: Molecular marker HyperLader™ 100 bp plus (Bioline, Taunton, MA, USA). e RFLP maps illustrating the nagt genotype identified in this work and those identified by Waki et al. [34]*. The vertical numbers indicate the cut position of each enzyme

Les souches marocaines de *L. infantum* b, c, et d amplifiées par PCR, sont digérées avec Ncil, Nael, et Alwl. Les enzymes de restriction coupent l'ADN prolongé en pièce courtes, chacune de ces enzymes vise des nucléotides de différentes séquences sur un brin et coupe à différents sites.

Les nombres au-dessus et au-dessous des fragments digérés indiquent leurs tailles (tableau 3).

Les 60 échantillons ont montré que la plupart des isolats (37/60) correspondent au génotype *L. infantum* commun indépendamment de l'origine géographique, de l'hôte ou des formes cliniques. Sauf variante M2, les variantes de *L. infantum* ont été regroupées en trois grappes (fig.3).

Les deux séquences de *L. infantum* correspondent au génotype prédominant de nagt. Des cartes de restriction ont été construites pour illustrer clairement les différences entre le nagt génotypes identifiés ici et dans l'étude de 2007 par Waki et coll.

Pour conclure, la méthode d'analyse dans cet article nagt PCR-RFLP a montré une hétérogénéité génétique importante chez les Souches de *L. infantum* isolées à partir de réservoirs humains et canins avec 6 génotypes identifiés. Trois des six génotypes nagt n'ont pas été décrits précédemment et soutiennent la diversité génétique particulière du *L. infantum* de la population marocaine signalée dans d'autres études.