

n° 145
2 microfiches

Stéphane HERDER

T h è s e s e t d o c u m e n t s m i c r o f i c h é s

Variabilité génétique
d'*Onchocerca volvulus*
(Leuckart, 1893).

Relations avec les faciès épidémiologiques
de l'onchocercose.

ORSTOM
éditions

ACADÉMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER II
- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC -

THÈSE

présentée à l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le diplôme de Doctorat

SPÉCIALITÉ : Biologie des Populations et Écologie
Formation doctorale : Parasitologie
École Doctorale : Biologie des Systèmes Intégrés
Agronomie - Environnement

VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE *D'ONCHOCERCA VOLVULUS* (LEUCKART, 1893). RELATIONS AVEC LES FACIÈS ÉPIDÉMIOLOGIQUES DE L'ONCHOCERCOSE.

par
Stéphane HERDER

Soutenue le 28 juin 1994

devant le jury composé de :

M. RAIBAUT André, Professeur, Université de Montpellier II	Président
M. BOUIX Georges, Professeur, Université de Montpellier II	Examineur
M. GRUNEWALD Jörg, Professeur, Université de Tübingen	Rapporteur
M ^{me} MEREDITH Stéphanie, Directeur de Laboratoire, KIT, Amsterdam	Rapporteur
M. BELLEC Christian, Directeur de Recherche, ORSTOM, Montpellier	Directeur de Thèse
M. CUNY Gérard, Directeur de Recherche, ORSTOM, Montpellier	Examineur

n° 145

2 microfiches



Thèses et documents microfichés



**Orstom, l'Institut français de recherche scientifique
pour le développement en coopération**

La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les «copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective» et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, «toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite» (alinéa 1^{er} de l'article 40).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal.

© ORSTOM éditions 1996, Paris

ISSN : 0767-922X

ISBN : 2-7099-1311-9

RESUME

La variabilité génétique d'*Onchocerca volvulus* a été étudiée sur plusieurs isolats du Cameroun. Cette filaire est la deuxième cause infectieuse de cécité dans le monde et affecte, selon l'OMS, environ 17 millions de personnes en Afrique, en Amérique Centrale et en Amérique du Sud. La complexité de l'épidémiologie de l'onchocercose apparaît liée à l'existence de différentes souches du parasite qui sont à l'origine de taux de cécités très variables selon les régions étudiées. Plusieurs types de marqueurs ont été utilisés pour étudier différentes populations d'*O. volvulus* du Cameroun ; les sondes spécifiques des souches de savane d'Afrique de l'Ouest s'hybrident avec tous les isolats étudiés. De nouveaux marqueurs ont donc été recherchés. Il s'agissait des RAPD et des séquences microsatellites, deux techniques basées sur la PCR qui présentaient l'avantage de pouvoir travailler sur de faibles quantités de matériel biologique.

La technique des RAPD a été utilisée, dans un premier temps, sur différentes espèces de filaires du genre *Onchocerca* proches d'*O. volvulus* afin de déterminer sa capacité à visualiser du polymorphisme interspécifique. Appliquée à différents isolats d'*O. volvulus* du Cameroun, la technique des RAPD a montré la grande hétérogénéité de cette espèce entre vers issus de foyers géographiquement proches, confirmant ainsi un phénomène déjà mis en évidence par la technique des isoenzymes. Cependant, en raison des difficultés rencontrées lors de la mise au point de cette technique (problèmes de reproductibilité), de nouveaux marqueurs de populations ont été recherchés. Nous avons ainsi isolé, pour la première fois chez un parasite, des séquences microsatellites du génome d'*O. volvulus*. Celles-ci ont permis de séparer les isolats provenant de quatre foyers du Cameroun et même des individus provenant de deux nodules excisés d'un même patient. Cette technique a également mis en évidence l'hétérogénéité de l'espèce *O. volvulus* et a montré l'existence probable d'allèles diagnostiques de certains isolats de ce parasite. La valeur ainsi que l'utilisation de ces différents outils ont été discutés dans le cadre de la lutte contre l'onchocercose et dans le cadre de la phylogénie du genre *Onchocerca*. L'intérêt de ces différents outils dans le cadre de la lutte contre l'onchocercose en Afrique est inégal ; les RAPD permettant l'amplification de tous les ADN, leur application pour la détection des différents stades du parasite chez le vecteur est donc difficilement envisageable. Les séquences microsatellites peuvent, en revanche, représenter une amélioration de la technique utilisée dans les programmes de lutte ; elles permettent en effet, de différencier les espèces de filaires qui peuvent être présentes chez le même vecteur par simple amplification. Les nouveaux marqueurs développés dans cette étude se sont donc avérés utiles pour étudier la variabilité génétique d'*O. volvulus* et présentent des potentialités qui permettent d'envisager leur utilisation prochaine dans le cadre de la lutte contre l'onchocercose.

SUMMARY

Genetic variability of *Onchocerca volvulus* has been surveyed on several cameroonese isolates. This filarial parasite is the second cause of infectious blindness in the world, and according to WHO, it affects nearly 17 million people in Africa and Latin America. This disease's epidemiological complexity seems to be accounted for by the existence of several parasite strains. This would be the explanation of the variability of the blindness rate according to the region under study. Several types of markers have been used for studying various *O. volvulus* populations in Cameroon. Those probes that are specific of West Africa Savannah strains hybridize with all studied isolates. New markers have hence been looked for, namely Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and microsatellite DNA sequences. These two techniques are PCR-based, and hence have the advantage of requiring only limited amounts of biological material. The RAPD technique has been used in a first time on different filarial species of the genus *Onchocerca*, closely related to *O. volvulus*, in order to estimate its value as a species-specific marker. When applied to various cameroonese *O. volvulus* isolates, the RAPD technique showed the considerable heterogeneity of this species between parasites originating from geographically related foci, which confirmed former isozyme results. Nevertheless, due to the difficulties in perfecting the RAPD technique (lack of reproducibility), additional population markers have been looked for. We have been able to isolate for the first time in a parasite, microsatellite sequences in the genome of *O. volvulus*. These sequences made it possible to discriminate between isolates originating from four different cameroonese foci, and even, between individuals taken from two nodules of a same patient. This technique confirmed the heterogeneity of the species *O. volvulus*, and suggested the existence of diagnostic alleles for certain isolates of this parasite. The value and the use of these different tools have been discussed in the framework of onchocerciasis control and of the phylogeny of the genus *Onchocerca*.

The interest of these tools for onchocerciasis control in Africa is variable. Since the RAPD method amplifies any DNA, its use for detecting the various parasite stages in the vector is impossible. Differently, the microsatellite sequences give the hope of an improvement of the technique used in control programmes. Indeed they make it possible to discriminate, by a mere amplification, between the filarial species that could exist in a same vector.

The new markers developed in the present study hence proved to be useful for studying *O. volvulus* genetic variability. Their potentialities allow to consider their use in the framework of onchocerciasis control in a near future.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	7
CHAPITRE I : POSITION DU PROBLEME.....	12
I. Le cycle d' <i>Onchocerca volvulus</i>	12
II. Le genre <i>Onchocerca</i>	12
III. Epidémiologie de l'onchocercose.....	13
IV. L'onchocercose au Cameroun.....	16
1) Généralités.....	16
2) Les foyers du Cameroun étudiés.....	16
a) Foyer de Touboro.....	16
b) Foyer de Poli.....	16
c) Foyer de Bafia.....	17
d) Foyer de Sa'a-Monatélé.....	17
V. Onchocercose et outils diagnostiques.....	17
1) Les sondes d'ADN existantes.....	18
2) Les nouveaux marqueurs utilisés.....	20
a) L'amplification aléatoire (Random Amplified Polymorphic DNA : RAPD).....	20
b) Les séquences d'ADN microsatellites.....	22
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	27
I. Le matériel biologique.....	27
1) Récolte du matériel biologique.....	27
2) Préparation du matériel.....	27
3) Extraction de l'ADN.....	28
II. Evaluation des sondes d'ADN disponibles.....	29
1) Transfert.....	29
2) Hybridation.....	29
III. L'amplification aléatoire (RAPD).....	30
1) Protocole de PCR aléatoire (RAPD).....	30
2) L'analyse des données obtenues par amplification (RAPD).....	30
IV. Les séquences microsatellites.....	33
1) Isolement de séquences microsatellites.....	33

a) Préparation du clonage.....	33
b) Clonage.....	33
c) Isolement des clones positifs.....	36
d) Préparation des formes simples brins.....	37
e) Le séquençage.....	38
f) Amplification des séquences microsatellites.....	40
g) Migration et révélation.....	41
CHAPITRE III : RESULTATS.....	44
I. Les sondes "d'Afrique de l'Ouest".....	44
1) Hybridation avec la sonde spécifique d' <i>O. volvulus</i>	44
2) Hybridation avec la sonde spécifique des formes de savane d'Afrique de l'Ouest.....	44
II. La mise au point des RAPD.....	47
1) Adaptation du protocole.....	47
2) Variation interspécifique.....	50
3) Variation intraspécifique.....	50
III. La mise au point des marqueurs microsatellites.....	55
1) Isolement de séquences microsatellites.....	55
2) Amplification des séquences microsatellites.....	57
a) Adaptation du protocole.....	57
b) Lecture et analyse des amplifications.....	59
CHAPITRE IV : DISCUSSION.....	64
I. Valeur des outils utilisés pour l'étude de la variabilité génétique d' <i>O. volvulus</i>	64
1) Les sondes d'ADN.....	64
2) Les "RAPD".....	65
3) Les séquences d'ADN microsatellites.....	66
II. Valeur des outils pour l'épidémiologie et la lutte.....	67
1) Les sondes d'ADN.....	67
2) RAPD, épidémiologie et lutte contre l'onchocercose.....	68
3) Utilisation des séquences d'ADN microsatellites.....	69
III. Valeur des outils pour les études phylogénétiques.....	70

1) Les séquences répétées de 150pb (ADN satellite).....	70
2) RAPD et diversité génétique.....	70
a) Le genre <i>Onchocerca</i>	70
b) Populations d' <i>O. volvulus</i> du Cameroun.....	71
3) Les séquences microsatellites.....	72
CONCLUSION.....	76
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	80
ANNEXES.....	93

AVANT-PROPOS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés dans le cadre du Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteurs (LEMV) du Centre ORSTOM de Montpellier. Ils ont bénéficié de fonds du troisième programme "Science et Technologies du Vivant pour les Pays en Développement" (STD III, contrat n°TS3CT930235).

Il m'est agréable de pouvoir remercier toutes les personnes (scientifiques ou non) qui ont contribué à divers titres à la réalisation de ce travail.

Monsieur le professeur Georges BOUIX. J'ai pu, grâce à vous, ouvrir mon horizon parasitologique dans le cadre de vos cours de Protistologie du DEA de Montpellier. De plus, vous avez accepté de faire partie de mon jury de thèse et je vous en remercie.

Monsieur le professeur André RAIBAUT. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Vous avez toujours répondu à mes sollicitations dans le cadre de la formation doctorale de parasitologie de Montpellier dont vous êtes le responsable.

Madame Stefanie E. O. MEREDITH. C'est dans votre laboratoire d'Amsterdam que j'ai découvert les techniques de biologie moléculaire appliquées à l'onchocercose. Votre rigueur scientifique ainsi que votre grande connaissance des endémies parasitaires africaines ont été pour moi, riches d'enseignements. Ce travail est en partie le fruit d'une collaboration qui dure depuis 3 ans et qui continuera, je l'espère, par dessus l'Atlantique ; je suis heureux que vous ayez accepté de juger ce travail et je vous renouvelle ici mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Jörg GRUNEWALD, je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je vous suis également reconnaissant pour vos encouragements et pour la bienveillance que vous avez eu à mon égard.

Monsieur Christian BELLEC. Cette thèse a été réalisée dans votre laboratoire puis au sein de votre Unité de Recherche où j'ai trouvé des conditions de travail idéales. Vous avez été l'instigateur de cette étude et m'avez guidé tout au long de mon périple. Votre connaissance de l'Afrique ainsi que votre sens des priorités ont favorisé le bon

déroulement de ce travail. Enfin, votre disponibilité et votre patience m'ont permis de présenter cette thèse. Pour la confiance que vous m'avez toujours accordée, je vous exprime ma profonde reconnaissance.

Monsieur Gérard CUNY. Vous avez beaucoup contribué à ma formation en biologie moléculaire. "Faire et défaire, c'est toujours travailler!" ; cet adage que vous citez si souvent m'a fait comprendre qu'en plus d'être une double hélice, l'ADN était une molécule retorse. Pour avoir accepté de juger ce travail et pour votre sens critique, je vous remercie sincèrement.

Monsieur le Professeur Louis EUZET, avec qui j'ai débuté ma formation en parasitologie à Montpellier au cours de mon DEA. La richesse de votre enseignement ainsi que votre soutien pendant cette année difficile sont pour beaucoup dans la réalisation de ce travail. Pour tout cela, je vous adresse mes sincères remerciements.

Cette thèse a pu être réalisée grâce à l'appui de Monsieur Bernard Philippon, chef du département Santé de l'ORSTOM.

J'adresse mes vifs remerciements aux médecins de l'ORSTOM, Messieurs Michel Boussinesq et Jean-Philippe Chippaux, qui m'ont accueilli chaleureusement à Yaoundé et m'ont fait partager leur grande connaissance de l'onchocercose dans les foyers du Cameroun ; sans leur participation active, ce travail n'aurait pas pu aboutir.

Un grand merci à Monsieur Jacques Brengues pour les bons moments passés au Cameroun. Votre connaissance du terrain et votre engagement pour le développement en Afrique resteront un exemple pour moi.

Monsieur Jacques Prod'hon, je vous remercie de votre bienveillance et de m'avoir toujours témoigné votre confiance depuis mon DEA jusqu'à la rédaction de cette thèse.

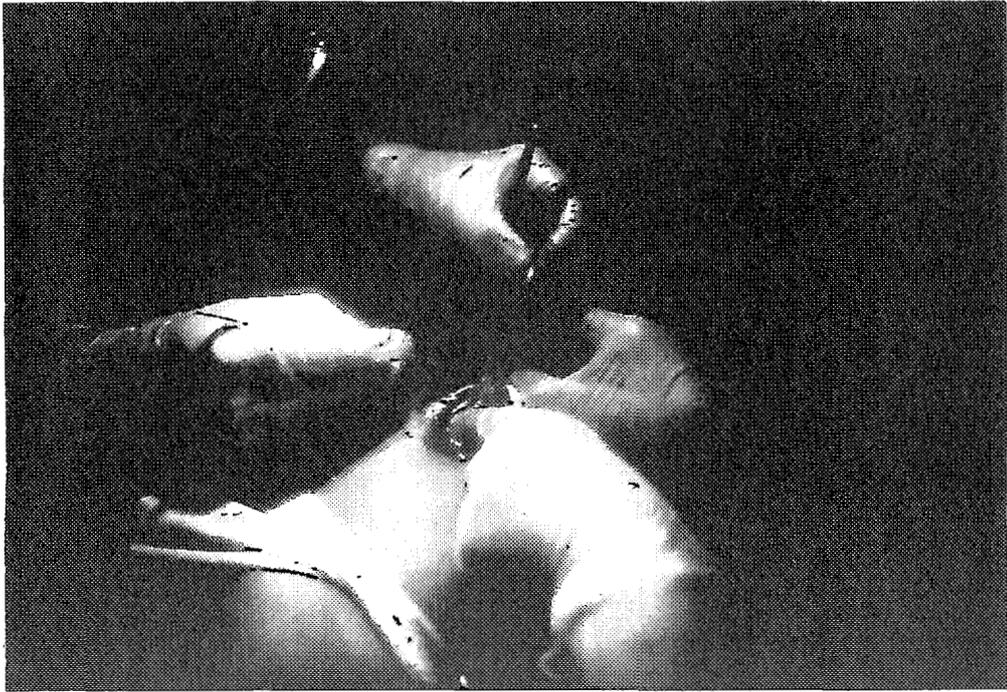
Monsieur Jean-Louis Frézil, je vous remercie sincèrement pour la patience que vous avez toujours eu à mon égard et pour vos encouragements, toujours teintés de votre humour catalan.

Merci à mon ami Thierry Baldet qui a été mon complice pendant ma première année à l'ORSTOM de Montpellier et que j'ai retrouvé plus tard à Yaoundé, où il m'a fait partager les connaissances qu'il avait acquises sur le terrain !

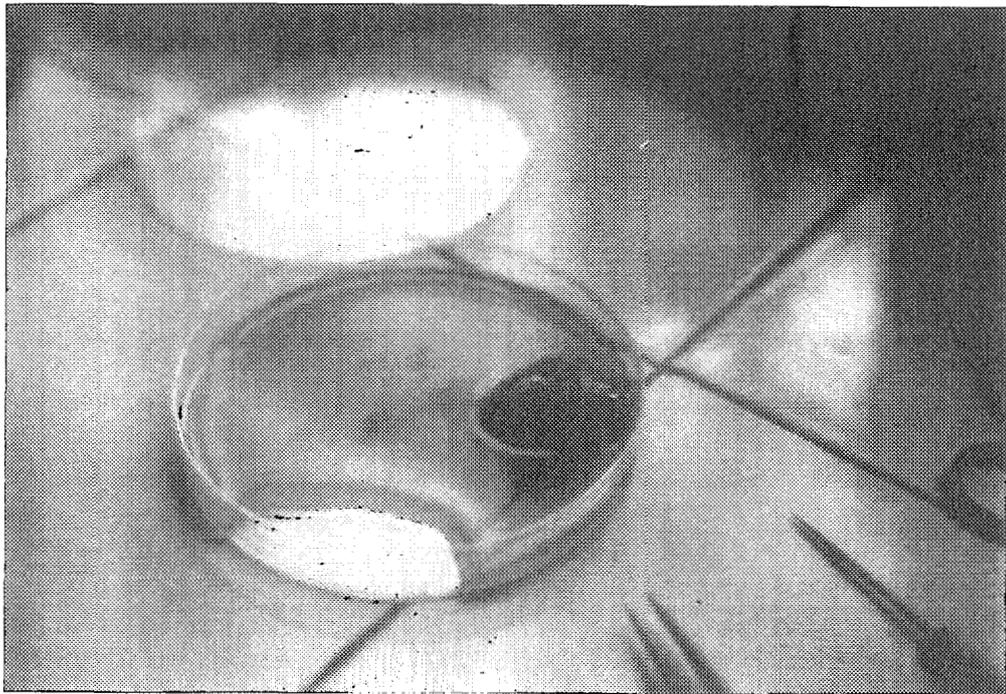
Merci à toutes les personnes de l'ORSTOM pour l'aide reçue dans la réalisation de ce travail, à Bernard Geoffroy qui est un véritable expert informatique, à Dominique

Cuisance pour sa grande culture scientifique, à Jacques Brunhes pour ses talents de rédacteur, à Jean-Paul Hervy pour l'aide dans la réalisation des figures de cette thèse sur MacIntosh (bien entendu !), à Philippe Barbazan pour les simulies du Cameroun.

Merci à J-P Aussel (FAD-KTK) et à V. Dumas pour le coup de main, à Franck, Flobert, Frédérique, Fred (le nyctalope), Jean Pierre (Big), Alexis (Alban), Pascal (le collègue) et Pascal (la miche), Florence (FF), Issa (le Peul), Bruno, Patrick, Jean-Marc, Sylvie et Christine, Jean Loup et Jean Loup, Christian, Komi, Diana, Valérie (VV), Nicole, Philippe (chouchou), Cécile, Sophie, Pierre (le falacha), Véronique, Pascale et Francisco pour la bonne (voire exceptionnelle) ambiance au 2ème étage.



Excision d'un nodule au niveau de la hanche (foyer de Touboro)



Digestion d'un nodule à la collagénase - foyer de Touboro
(début de la désagrégation du nodule au bout de 6 heures de digestion)

ABREVIATIONS

BSA : Bovine Serum Albumin (albumine sérique bovine)
CMFL : Community MicroFilarial Load
dATP, dGTP, dCTP, dTTP : déoxynucléoside 5'-triphosphate
ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP : didéoxynucléoside 5'-triphosphate
DMFO : diméthylformamide
EDTA : Ethyl Diamine Tétra Acétate
IMFA : Indice MicroFilarien Ajusté
IPTG : isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside
Kb : Kilo base (1000 pb)
ng : nanogramme
OCP : Onchocerciasis Control Programm
pb : paire de base
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEG : Poly Ethylène Glycol
QSP : Quantité Suffisante Pour
RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SSC : Standart Saline Citrate
SSPE : Standart Saline Phosphate EDTA
TBE : Tris-Borate-EDTA
TE : Tris-EDTA
TEN : Tris-EDTA-NaCl
Tris : Tris hydroxyméthyl-aminométhane
tr/mn : tour/minute
UE : Unité Evolutive
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
w/v : weight/volume
X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside

INTRODUCTION

L'onchocercose est une maladie parasitaire causée par le développement dans le derme de l'homme de la filaire *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893). Elle est transmise par un insecte vecteur de la famille des Simuliidae appartenant notamment au complexe *Simulium damnosum* en Afrique de l'Ouest.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 1987), l'onchocercose affecte 17 millions de personnes en Afrique, en Amérique Centrale et en Amérique du Sud. Parmi les manifestations cliniques de cette parasitose on distingue habituellement les syndromes cutanés, les nodules onchocerquiens, les syndromes lymphatiques et les lésions oculaires. Au moins deux types (ou faciès) épidémiologiques, caractérisés par la gravité des lésions oculaires sont classiquement reconnus en Afrique de l'Ouest : les onchocercoses de savane, à l'origine des lésions oculaires graves (taux de cécité de 10 à 15%), et les onchocercoses de forêt (taux de cécité inférieur à 2%). Il existe certes des exceptions à ce schéma général, par exemple, en Sierra Leone, où des taux de cécité relativement élevés ont été rapportés en zone de forêt (McMAHON *et al.*, 1986). Ailleurs, en Afrique Centrale, notamment au Cameroun, la situation épidémiologique semble nettement plus complexe (DUKE, 1981).

Ces différences de retentissement clinique n'ont pas encore été expliquées ; selon les données de la littérature, elles ont été successivement attribuées à la bio-écologie des vecteurs (LE BERRE, 1966), à la capacité vectorielle des différentes espèces du complexe *S. damnosum*, à la pathogénicité des souches ou au comportement et à l'occupation de l'espace par l'homme (HERVOUET et PROST, 1979).

En absence de médicament contre la filaire adulte, la stratégie de lutte contre l'onchocercose a été fondée sur l'interruption du cycle du parasite par destruction du vecteur à son stade le plus vulnérable, le stade larvaire inféodé aux eaux courantes. Cette stratégie de lutte antivectorielle par épandage hebdomadaire d'insecticides a été appliquée avec succès, depuis 1975, sur une superficie de plus d'un million de kilomètres carrés, dans le cadre du programme de lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. Dans la zone initiale du programme, la transmission a été interrompue et les traitements larvicides ont été suspendus après 15 ans de lutte. Un médicament microfilaricide, l'ivermectine, développé depuis 1987 dans le cadre de la

médecine vétérinaire, a été appliqué avec succès à l'onchocercose humaine et a permis de reconsidérer les stratégies de lutte en vigueur.

Tant la lutte antivectorielle que la lutte chimiothérapique nécessitent des moyens opérationnels fiables de détection et d'identification d'*O. volvulus*, qui s'inscrivent donc dans les priorités de recherche. En effet, dans le domaine de la lutte antivectorielle, les intensités d'infestation des populations résiduelles de simulies dans les zones traitées ou le suivi de la recrudescence de la transmission après 15 ans de lutte et arrêt des traitements sont estimés par dissection individuelle des simulies et comptage des larves infectantes et depuis peu, à l'aide de sondes d'ADN. Dans ces conditions, il convient donc de distinguer les larves infectantes d'*O. volvulus* de celles des autres filaires présentes chez les simulies (*O. ochengi* notamment), que l'on ne peut différencier morphologiquement. Dans le domaine de la lutte chimiothérapique, la distinction des différentes formes de pathogénicité d'*O. volvulus* est indispensable afin de déterminer des zones prioritaires de distribution de l'ivermectine.

Classiquement, les parasites sont identifiés, après dissection, par des méthodes faisant appel à la morphologie et à l'anatomie, à la biométrie ou aux colorations histochimiques. La distinction des onchocerques animales et humaines adultes peut être ainsi réalisée à partir de caractères morpho-anatomiques et depuis peu, par le nombre de chromosomes. En revanche, le recours à l'électrophorèse isoenzymatique n'a pas permis de distinguer les formes savaniques des formes forestières d'*O. volvulus*. Récemment, quelques sondes d'ADN basées sur des séquences répétées (150 pb) ont été mises au point à partir d'onchocerques originaires d'Afrique de l'Ouest. Elles permettent de distinguer, chez les adultes et les larves infectantes, les onchocerques animales des onchocerques humaines, et dans certains cas, les populations d'*O. volvulus* de forêt et de savane. Ces travaux ont mis en évidence une corrélation entre populations du parasite et épidémiologie de la cécité. Cependant, l'application de ces sondes aux autres régions où sévit l'onchocercose est d'autant plus discutable que ces outils se sont révélés parfois inefficaces sur des populations de parasites d'autres localités d'Afrique de l'Ouest.

Ce constat vaut particulièrement pour le Cameroun où la situation épidémiologique est plus complexe et ne présente pas une dualité de l'onchocercose selon les zones bioclimatiques. Dans ce contexte, il nous a donc semblé important d'étudier : (i) la variabilité génétique d'*O. volvulus* à différents niveaux, entre les foyers, entre les patients, entre les nodules (internodulaire) et entre les vers d'un même nodule

(intranodulaire), (ii) la relation entre des souches du parasite et la gravité de la symptomatologie dans différents foyers bien définis, (iii) les flux de gènes chez le parasite compte tenu des phénomènes migratoires humains mais également des vecteurs (simulies).

Le choix de nouveaux marqueurs devait donc répondre à une double exigence : une résolution suffisante pour séparer les populations du parasite et la possibilité d'utiliser du matériel conservé séché ou dans l'alcool ce qui facilite grandement les récoltes de matériel, notamment dans des foyers éloignés. Ainsi, les marqueurs RAPD (basé sur l'amplification aléatoire de l'ADN) et des séquences microsatellites ont successivement été expérimentés.

L'objectif de cette étude a donc été axée sur la variabilité génétique d'*O. volvulus* en liaison avec les différents faciès épidémiologiques de l'onchocercose et sur le développement de nouveaux outils diagnostiques afin d'identifier les populations parasitaires potentiellement pathogènes pour l'homme.

Cette étude s'intègre en fait dans le cadre d'un plus vaste projet financé par l'Union Européenne (projet STD III) qui se propose d'étudier la variabilité génétique d'*O. volvulus* en Afrique de l'Ouest (Sierra-Leone), Afrique Centrale (Cameroun) et en Afrique de l'Est (Tanzanie).

Avant de présenter les résultats de nos recherches, nous avons rappelé les éléments essentiels de l'épidémiologie de l'onchocercose au Cameroun et de son diagnostic.

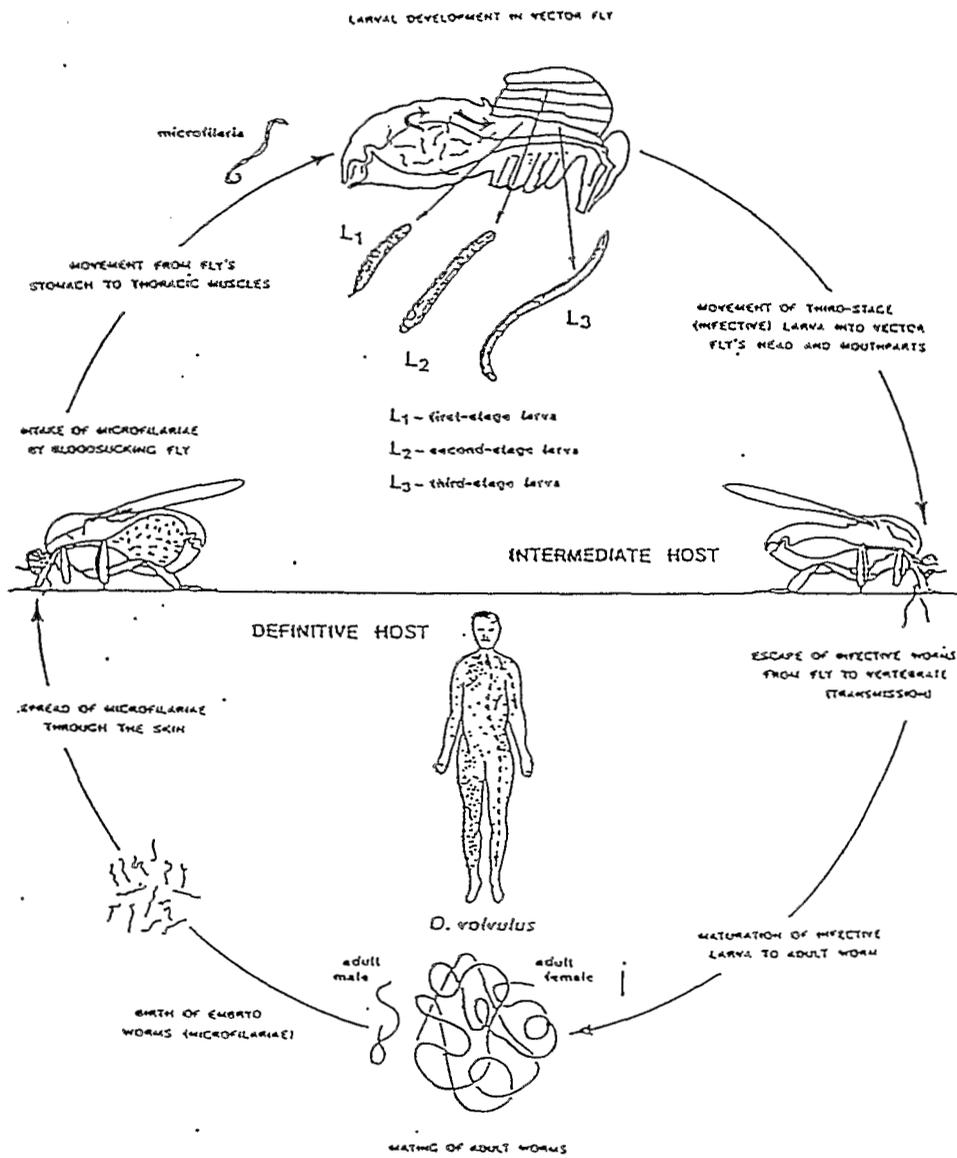


Figure 1: Le cycle de développement d'*Onchocerca volvulus*. Les zones grisées sur l'hôte vertébré montrent les parties du corps où les microfilaries sont habituellement nombreuses (d'après Crosskey, 1990).

CHAPITRE I

Position du problème

I. Le cycle d'*Onchocerca volvulus* (voir Figure 1)

La filaire *O. volvulus* ne se développe que chez l'homme, et n'a donc pas de réservoir animal, bien qu'elle ait pu être transmise expérimentalement au chimpanzé (DUKE, 1980). Son développement requiert un hôte définitif, l'homme, et un hôte intermédiaire vecteur, la similie. Chez l'homme, la filaire adulte vit dans le derme, dans des nodules où sont regroupés plusieurs individus. Les vers femelles sont plus longs (50 à 70 cm) que les vers mâles (2 à 5 cm) et vivent de 12 à 15 ans.

Seules les femelles de similies piquent et ingèrent des microfilaires lors du repas de sang indispensable à la maturation des oeufs. Ces parasites traversent la paroi stomacale puis gagnent la cavité générale et les muscles thoraciques (muscles indirects du vol). Les microfilaires s'épaississent alors et donnent naissance aux formes dites "saucisses", facilement reconnaissables à leurs queues effilées. Celles-ci subissent une première mue donnant naissance au deuxième stade larvaire (L2). Cette larve L2 grandit et mue à son tour, se transformant en stade III (L3). La larve infectante est la larve de troisième stade sortie des muscles thoraciques : elle est très mobile et se déplace activement dans la cavité générale de tout le corps de l'insecte mais gagne de préférence la tête et les pièces buccales. Elle peut sans doute survivre assez longtemps ; la durée de la maturation des larves chez la similie varie selon la température extérieure et donc la saison (6 à 8 jours) et montre des différences en fonction de l'espèce de similie concernée.

Lorsqu'une similie pique l'homme pour prendre un repas sanguin, elle dépose sur la peau, autour de la piqûre, les larves infectantes (larves L3) du parasite. On ignore encore comment elles cheminent de façon précise et se développent dans le derme sous-cutané. La latence parasitaire, c'est à dire le temps qui sépare la pénétration de la larve infectante (L3) dans l'organisme humain et l'apparition de microfilaires dermiques a été

estimée entre 7 mois et 2 ans pour les cas extrêmes, avec une moyenne de 12 à 15 mois (PROST, 1980).

II. Le genre *Onchocerca*

D'après l'analyse de critères morphologiques, la naissance du genre *Onchocerca* et son évolution principale paraissent s'être effectuées en Afrique, où se trouvent l'espèce la plus primitive et le plus grand nombre d'espèces (BAIN, 1981) ; elle semble s'être déroulée à une période géologique relativement très moderne, correspondant peut-être à l'établissement des Equidés en Afrique, au Pléistocène.

Selon BAIN (1981), plusieurs hypothèses épidémiologiques peuvent être tirées de la phylogénie : «

- le genre *Onchocerca* est un genre moderne, en cours de spéciation, et on doit s'attendre à découvrir encore de très nombreuses espèces.
- L'espèce humaine, *O. volvulus*, est extrêmement proche de certaines espèces connues chez les Bovidés africains de savanes, et, en particulier, d'*O. ochengi*. Il faut la considérer comme un parasite encore relativement mal adapté à l'homme, ce qui explique vraisemblablement pourquoi les microfilaires sont aussi mal tolérées.
- Cependant, il ne semble pas que le nodule soit assimilable à une réaction de défense de l'organisme vis-à-vis d'un parasite mal toléré. *O. volvulus* et les autres formes nodulaires de Bovidés constituent une petite lignée homogène et les espèces morphologiquement plus primitives dont elles dérivent ne se développent pas dans des nodules. Le nodule apparaît donc comme une formation induite par ces espèces d'onchocerques, et favorable à leur développement, car les onchocerques sont fondamentalement des parasites des tissus conjonctifs.
- L'existence de petits foyers d'onchocercose humaine dans des régions très isolées telles que l'Amazonie pourrait inciter à rechercher l'existence de réservoirs animaux dans ces régions. La phylogénie des onchocerques ne paraît pas favorable à cette hypothèse. En effet, d'une façon générale, dans l'évolution d'une lignée, le pouvoir adaptatif et la faculté de spéciation du parasite par capture d'un nouvel hôte s'observe le plus souvent près de son lieu d'origine.

Dans le cas des onchocerques, il serait étonnant qu'une spéciation d'un parasite chez l'homme ait eu lieu en dehors de l'Afrique, centre d'évolution et de dispersion du

genre. L'hypothèse la plus logique est donc un isolement récent de l'onchocercose humaine en Amérique ; mais ces 3 siècles d'isolement sont largement suffisants pour permettre la réalisation de phénomènes de subséciation».

III. Epidémiologie de l'onchocercose

Plusieurs indices parasitologiques sont utilisés dans les études épidémiologiques sur l'onchocercose. Il s'agit principalement de la charge microfilarienne des communautés (CMFL : community microfilarial load) et de l'indice microfilarien ajusté (IMFA).

- la CMFL est la moyenne géométrique de Williams des charges individuelles chez les sujets de 20 ans et plus, la charge individuelle étant la moyenne arithmétique des charges microfilariennes observée (lecture à 24 heures) dans deux biopsies cutanées exsangues (skin-snip) prélevées à chaque crête iliaque (REMME *et al.*, 1986).

- l'IMFA est la prévalence de la microfilariodermie ajustée selon l'âge et le sexe (MOREAU *et al.*, 1978).

L'IMFA permet de définir les niveaux d'endémicité (PROST *et al.*, 1980) :

- hypoendémie : $IMFA < 35\%$
- mésoendémie : $35\% \leq IMFA < 60\%$
- hyperendémie : $60\% \leq IMFA$.

C'est au Cameroun, au début des années 60, que furent observées des différences profondes entre les manifestations cliniques de l'onchocercose de savane et de forêt (DUKE *et al.*, 1966).

Ces observations ont été vérifiées en Afrique de l'Ouest lors d'enquêtes effectuées sur plusieurs dizaines de villages. La maladie est grave en zone de savane (REMME *et al.*, 1989) et se traduit par des atteintes oculaires entraînant jusqu'à 15% de cécité (dans certains villages hyperendémiques), alors qu'en milieu forestier (à degré d'endémicité équivalent), l'onchocercose est beaucoup moins grave : les accidents oculaires sont moins fréquents et les cécités très rares (OMS, 1985).

D'abondantes observations témoignent de populations génétiquement distinctes d'*O. volvulus*. Les preuves à l'appui de l'existence en Afrique Occidentale de formes différentes dans la savane et dans la forêt, dont chacune est associée à des vecteurs

différents du complexe *S. damnosum*, reposent principalement sur les résultats d'expériences de transmission croisée (DUKE *et al.*, 1966 ; PHILIPPON, 1978 ; QUILLEVERE, 1979) sur volontaires ou sur chimpanzés (DUKE, 1980), sur la pathogénicité inégale de ces deux formes après inoculation dans l'oeil chez le lapin (DUKE et ANDERSON, 1972 ; GARNER *et al.*, 1973) et sur l'étude de certaines séquences d'ADN répétés de leurs génomes (ERTTMANN *et al.*, 1987 et 1990 ; ZIMMERMAN *et al.*, 1992).

Cependant, l'opposition entre onchocercose de savane et de forêt est considérée comme trop schématique (PICQ, 1983) car il existe des faciès épidémiologiques de transition. Ceci a poussé les auteurs à redéfinir les différents faciès (DUKE, 1976) : 7 faciès principaux dont 4 en Afrique ont été ainsi décrits et répartis selon les zones suivantes :

- forêt et savane guinéenne d'Afrique de l'Ouest.
- savane soudanienne d'Afrique de l'Ouest.
- bassin du Congo.
- Afrique de l'Est.

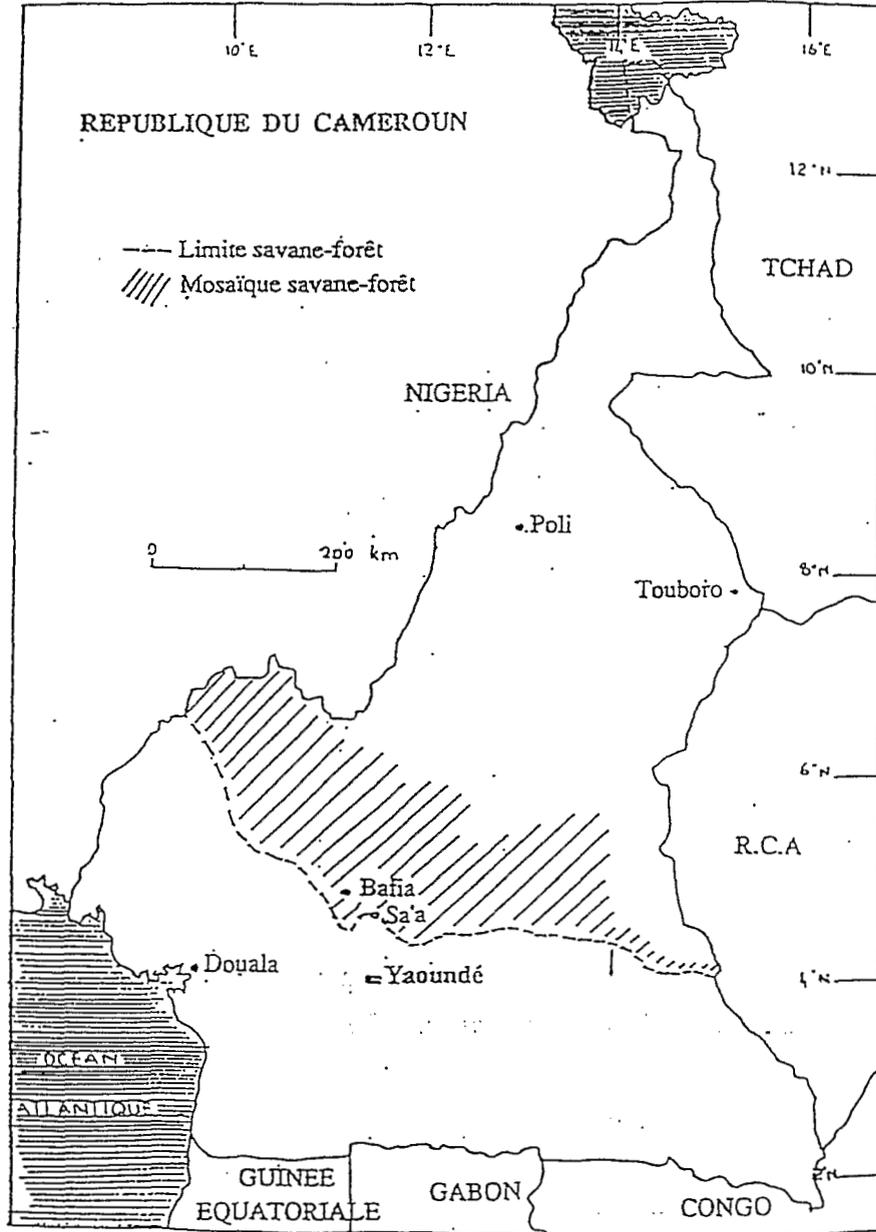
IV. L'onchocercose au Cameroun

1) Généralités

ANDERSON *et al.* (1974 et 1976) ont montré qu'à charge microfilarienne égale dans la communauté, la prévalence et le nombre moyen de nodules est plus élevé en zone de forêt que dans les foyers de savane. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence, et en particulier, la proportion de nodules profonds impalpables serait plus grande en savane qu'en forêt (DUKE, 1993). Il serait donc important d'évaluer la véracité de cette hypothèse par autopsie ou échographie.

Cependant, il semble que la distribution de la cécité due à l'onchocercose au Cameroun soit complexe et qu'elle ne soit pas corrélée avec les zones bioclimatiques (DUKE, 1981).

FIGURE 2



2) Les foyers du Cameroun étudiés

Quatre foyers du Cameroun entrent dans notre étude (voir Figure 2), deux situés en zone de savane (Touboro et Poli) et deux autres situés en zone de mosaïque savane-forêt (Bafia et Sa'a).

a) Foyer de Touboro

Ce foyer se situe le long de la Vina, dans la partie nord du pays, à la frontière avec le Tchad. La plupart des villages sont hyperendémiques (indices microfilariens supérieurs à 80%). Le retentissement visuel de l'infestation y est important ; il semble cependant qu'à charge microfilarienne égale, les répercussions oculaires de l'onchocercose soient inférieure à celle observée en savane d'Afrique de l'Ouest (taux de cécité observés compris entre 5 à 15% selon les auteurs) (BOUSSINESQ, 1991).

Les principaux vecteurs identifiés (TRAORE-LAMIZANA et LEMASSON, 1987) sont *Simulium damnosum* s.s., *S. sirbanum* et *S. mengense*, ce dernier dans une moindre mesure. Pendant la saison des pluies, les deux espèces prédominantes sont associées avec *S. squamosum*, espèce forestière qui, du fait de la mousson, remonte vers le nord-est à cette période.

b) Foyer de Poli

Les répercussions oculaires de l'onchocercose sont importantes dans ce foyer ; près de la moitié des villages étudiés par BOUSSINESQ *et al.* (1993) présentent des taux de cécité égaux ou supérieur à 2%. Près de la moitié des villages sont en situation hyperendémique (indices microfilariens supérieurs à 60%).

Le parasite y est transmis par les espèces savanicoles du complexe *Simulium damnosum* (*S. damnosum* s.s. et *S. sirbanum*) (TRAORE-LAMIZANA et LEMASSON, 1987). La transmission s'effectue essentiellement en saison des pluies, les gîtes à simulies n'étant productifs qu'à cette saison (QUILLEVERE *et al.*, 1990).

c) Foyer de Bafia

C'est un foyer de lisière savane-forêt situé non loin du Mbam, dans la Province du Centre. La fréquence de certaines manifestations cliniques (nodules et dépigmentations) correspondent au tableau typique de "l'onchocercose de forêt" (BOUSSINESQ *et al.*, 1992a). Les dix huit villages étudiés (BOUSSINESQ *et al.*, 1992b) sont hyperendémiques (les indices microfilariens variants de 67,9 à 98,7%).

L'onchocercose semble presque aussi cécitante en zone de limite savane-forêt d'Afrique Centrale et en zone de savane d'Afrique de l'Ouest.

Dans la zone étudiée, le principal vecteur de l'onchocercose est *Simulium squamosum* (BOUSSINESQ *et al.*, 1992b).

d) Foyer de Sa'a-Monatélé

Il est situé dans la boucle de la Sanaga, non loin de la confluence avec le Mbam. Tous les villages de cette zone situés à moins de cinq kilomètres de la Sanaga sont hyperendémiques (BOUSSINESQ *et al.*, 1992c) et la prévalence des dépigmentations cutanées y est très élevée. Seule la moitié des villages situés en première ligne par rapport à la Sanaga présentent des taux de cécité supérieurs à 1% (NYIOTO *et al.*, 1992), seuil au delà duquel on considère qu'il existe une pathologie cécitante spécifique. Ceci indique que les répercussions oculaires de l'onchocercose dans cette zone sont faibles, contrairement à ce que l'on observe dans la région de Bafia, située pourtant à moins de 50 km.

V. Onchocercose et outils diagnostiques

Plusieurs méthodes d'identification des onchocercques ont été testées sur des parasites isolés après dissection, méthodes faisant appel, chez les adultes, à la morphologie et à l'anatomie (GARMS, 1985), à la biométrie chez les larves infectantes (EICHNER et RENZ, 1990) ou aux colorations histochimiques (OMAR et SCHULTZ-KEY, 1976). La distinction des onchocercques animales et humaines adultes a pu ainsi être réalisée à partir de caractères morpho-anatomiques et depuis peu, par le nombre de chromosomes (POST *et al.*, 1989). Par contre, le recours à l'électrophorèse isoenzymatique n'a pas permis de distinguer les formes savaniques des formes forestières d'*O. volvulus* (CIANCHI *et al.*, 1985 ; FLOCKHART *et al.*, 1986). Bien que basées sur un petit nombre de populations, ces études ont montré une remarquable hétérogénéité de l'espèce *O. volvulus*. Ceci est en accord avec l'hypothèse selon laquelle les différents faciès épidémiologiques seraient en relation étroite avec les différences intrinsèques au parasite.

Chez les larves infectantes, en revanche, seules les sondes d'ADN permettent de distinguer *O. volvulus* d'*O. ochengi* qui peuvent être présentes chez le même vecteur.

1) Les sondes d'ADN existantes

D'une manière générale, deux grandes méthodes ont été employées pour élaborer des sondes d'ADN utilisables chez divers agents infectieux : la recherche de molécules d'ADN caractéristiques de l'organisme étudié (ADN kinétoplastique des leishmanies par exemple) et l'identification, à l'intérieur de génomes, de régions de l'ADN qui sont à la fois répétitives et caractéristiques de l'organisme étudié. Dans le cas des filaires, la deuxième méthode a donné de bons résultats.

Des séquences d'ADN hautement répétées (similaires aux ADN satellites des mammifères) pouvant indiquer des changements évolutifs rapides, ont été utilisées avec succès pour différencier certaines espèces de parasites (BARKER *et al.*, 1986 ; GOTTSTEIN et MOWATT, 1991). Dans le cas des filaires en particulier, certaines sondes spécifiques ont été ainsi mises au point (SIM *et al.*, 1986 ; DISSANAYAKE et PIESSENS, 1990 ; KLION *et al.*, 1991 ; GARATE *et al.*, 1990).

Chez *O. volvulus*, six sondes ont été élaborées (PERLER et KARAM, 1986 ; SHAH *et al.*, 1987 ; ERRTMANN *et al.*, 1987 ; HARNETT *et al.*, 1989 ; MEREDITH *et al.*, 1989 ; ERTTMANN *et al.*, 1990) qui possèdent toutes les caractéristiques communes suivantes :

- elles sont toutes constituées d'un fragment d'approximativement 150 paires de bases (pb) répétées en tandem, assimilables aux ADN satellites,
- l'origine géographique des échantillons ayant servi à l'élaboration de ces sondes est restreinte à l'Afrique de l'Ouest,
- parmi celles-ci, on note que la sonde pOv134 (MEREDITH *et al.*, 1989) reconnaît spécifiquement *O. volvulus*. Les sondes pSS-1 (ERTTMANN *et al.*, 1990) et pFS-1 (ERTTMANN *et al.*, 1987), plus spécifiques, sont les seules à pouvoir reconnaître respectivement les populations d'*O. volvulus* de savane et celles de forêt (UNNASCH, 1987).

Dans le cadre de la lutte contre l'onchocercose, il convient d'étudier la variabilité génétique du parasite en relation avec les différents faciès épidémiologiques de cette endémie majeure. En effet, les travaux menés grâce à l'outil moléculaire par l'OCP, en Afrique de l'Ouest, ont mis en évidence une corrélation entre les populations d'onchocercos et leur pathogénicité (ZIMMERMAN *et al.*, 1992).

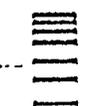
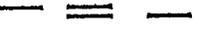
	ADN Satellite	ADN Minisatellite	ADN Microsatellite	RAPD
Localisation	espaces intergéniques	introns des gènes et espaces intergéniques	introns des gènes et espaces intergéniques	Aléatoire
Structure	Répétées en tandem un grand nombre de fois	Répétées en tandem (de 6 à 30 pb)	Répétées en tandem (de 1 à 5 pb)	Fragments d'amplifications (PCR)
Utilisation	Sonde spécifique (cas d' <i>O. volvulus</i>)	- Typage des Individus - Médecine légale - Génétique des populations	- Typage des individus - Médecine légale - Génétique des populations - Cartographie des génomes	- Génétique des populations - Identification d'espèces, de souches...
Avantages	Amplification aisée	- Utilisable pour la génétique des populations - marqueur codominant	- Utilisable pour la génétique des populations - marqueur codominant - facile à détecter (répétitions simples)	- petites quantités d'ADN nécessaires - pas de connaissances préalables sur la séquence nécessaire
Inconvénients	- Pas d'utilisation pour la génétique des populations - pas de transmission mendélienne	- séquençage obligatoire pour chaque locus - difficile à détecter (combinaisons de 6 à 30 pb) - peu de séquences connues	- séquençage obligatoire pour chaque locus - difficulté de visualisation des allèles	- mauvaise reproductibilité de la technique (difficultés de standardisation)
Visualisation	 <p>Profil typique d'amplification d'ADN satellite (cas d'<i>O. volvulus</i>)</p>	<p>AA AB BB</p>  <p>Exemple de profil d'amplification que l'on peut obtenir à partir d'ADN minisatellites. Les allèles peuvent aisément être identifiés car ils sont bien séparés.</p>	<p>AA AB BB</p>  <p>Exemple de profil d'amplification obtenu à partir d'ADN microsatellite. Les allèles peuvent être séparés, mais ceci requiert une technique très résolutive (gel dénaturant) car ils sont proches du point de vue de la taille.</p>	<p>espèces X Y</p>  <p>Exemple de profils polymorphes d'amplification obtenus pour deux espèces différentes.</p>

Figure 3 : Comparaison de certaines séquences d'ADN et des RAPD en tant qu'outils pour des études de variabilité génétique par PCR

2) Les nouveaux marqueurs utilisés (voir Figure 3)

a) L'amplification aléatoire (Random Amplified Polymorphic DNA : RAPD)

La technique des RAPD est une variante de la PCR (Polymerase Chain Reaction). La PCR est une procédure rapide d'amplification enzymatique *in vitro* d'une séquence d'ADN connue (SAIKI *et al.*, 1988). Elle a de très nombreuses applications à l'heure actuelle. La réaction d'amplification nécessite la présence d'oligonucléotides amorces qui se fixent spécifiquement aux deux extrémités de la séquence à amplifier, sur chacun des brins ; ceci se fait tout au long des 30 cycles d'amplification constitués :

- d'une dénaturation de l'ADN à amplifier,
- d'une fixation des amorces sur le brin complémentaire,
- d'une extension par la polymérase.

Chaque cycle permet donc de doubler la quantité d'ADN à amplifier et on obtient finalement une accumulation exponentielle du fragment "cible", d'approximativement 2ⁿ fois, où n est le nombre de cycles d'amplification. La grande spécificité de la PCR et sa capacité à multiplier l'ADN avec une enzyme thermostable (*Taq* ADN polymérase) en font une technique idéale pour l'isolement d'un fragment de génome particulier.

Comme la PCR, les RAPD consistent en l'amplification de séquences d'ADN, mais ne nécessitent pas de connaissance préalable de la séquence "cible". L'utilisation d'une amorce aléatoire à séquence arbitraire permet par amplification au hasard, de détecter des polymorphismes génétiques (empreinte génétique ou fingerprinting) entre différents génomes (WILLIAMS *et al.*, 1991 ; WELSH et McCLELLAND, 1991). Cette technique a été appliquée à l'analyse du polymorphisme de l'ADN génomique d'espèces nombreuses et variées (HADRYIS *et al.*, 1992). Elle permet une distinction à plusieurs niveaux taxonomiques, par exemple, le genre chez l'iris (ARNOLD *et al.*, 1991), l'espèce et la sous espèce chez le moustique (WILKERSON *et al.*, 1993 ; BALLINGER-CRABTREE *et al.*, 1992), la souche chez la souris et les schistosomes (WELSH *et al.*, 1991 ; NETO DIAS *et al.*, 1993), le cultivar chez le chou-fleur (HU et QUIROS, 1991) et le clone chez certains champignons (SMITH *et al.*, 1992).

Une différence nucléotidique (mutation sur une seule base) peut ainsi être détectée. Le polymorphisme se matérialise par la présence (ou l'absence) ainsi que la variabilité de tailles, de fragments amplifiés.

Les principaux avantages de cette technique sont la possibilité de procéder à des analyses à partir de très petites quantités d'ADN génomique (quelques nanogrammes) et le fait qu'aucune connaissance préalable de la séquence à analyser n'est nécessaire.

b) Les séquences d'ADN microsatellites

Les séquences microsatellites, également appelées "séquences simples répétées" sont des constituants communs du génome des eucaryotes. Elles sont constituées de copies répétées en tandem de séquences simples de une à cinq paires de bases, telles $(A)_n$, $(CA)_n$, $(CAC)_n$ ou $(GATA)_n$. La plupart de ces régions ont une taille inférieure à 200 pb et la PCR est utilisée pour détecter des polymorphismes de longueur.

Ces séquences sont dispersées dans le génome des eucaryotes (tous les 10 kb environ) et sont localisées dans des régions non codantes du génome (les introns par exemple). A l'instar des séquences minisatellites, elles sont hypervariables et constituent donc des outils intéressants pour l'étude du génome humain (SIRUGO *et al.*, 1992) et de certains animaux (DEMAS et WACHTEL, 1991 ; KASHI *et al.*, 1990 ; LOVE *et al.*, 1990 ; STEFFEN *et al.*, 1993). Du fait de leur fort taux de polymorphisme, les loci microsatellites sont utilisés de plus en plus comme marqueurs dans la cartographie des génomes (CORNALL *et al.*, 1991 ; WEBER, 1990).

La grande variabilité de ces loci serait due essentiellement à des crossing-over inégaux et des échanges inégaux entre chromatides soeurs et/ou des glissements lors de la réplication ou de la réparation. Ces deux types d'événements, glissements et/ou échanges inégaux, entraînent un nombre variable de répétitions en tandem dans les séquences microsatellites (LEVINSON et GUTMAN, 1987 ; WOLFF *et al.*, 1989). Ceci distingue les microsatellites des minisatellites dont la variabilité est essentiellement due à la recombinaison.

L'analyse du polymorphisme observé pour les séquences microsatellites se fait par la variation de la taille de ces séquences (TAUTZ, 1989), c'est à dire, du nombre de répétitions du motif de base entre différents individus (voir Figure 4). Chaque zone de répétition sur le génome représente un locus dont les allèles sont définis par le nombre de répétition de l'unité de base. Les taux de mutations sont très variables selon les loci et les organismes (DALLAS, 1992 ; WOLFF *et al.*, 1988 ; DEKA *et al.*, 1991).

Par comparaison avec les autres marqueurs utilisés en génétique des populations (isoenzymes, RFLP, RAPD, ADN minisatellites) les microsatellites présentent un certain nombre d'avantages. Ils sont codominants et à transmission mendélienne, les

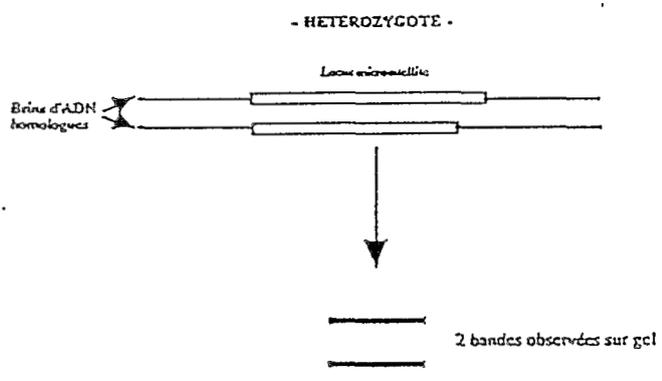
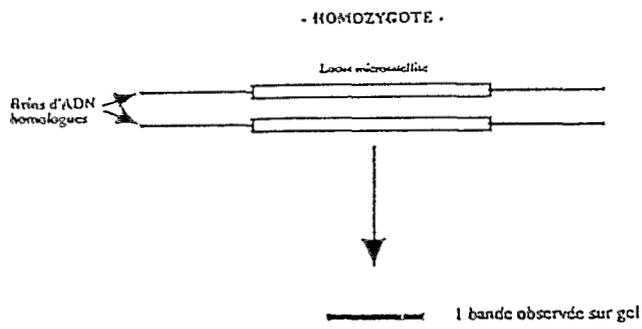


Figure 4: Exemple de lecture sur autoradiographie après amplification d'un locus microsatellite.

taux d'hétérozygotie sont relativement importants, la localisation chromosomique est réalisable, leur analyse par la technique de PCR permet de travailler sur de très petites quantités d'ADN.

Chez la souris (LOVE *et al.*, 1990), 88% des séquences étudiées montrent des différences entre souches, principalement pour les séquences CA/GT répétées. La moitié de ces variants de taille étaient détectables sur gel d'agarose.

Dans le génome de la souris ou le génome humain, il existe au moins 5×10^4 séquences contenant le motif répété $(CA)_n$. Leur distribution dans le génome humain semble aléatoire, et certains des loci analysés sont hautement polymorphes avec 6 allèles ou plus. Généralement, les différences de tailles entre allèles sont de l'ordre de 4 à 40 pb. Cependant, les auteurs précisent qu'un des désavantages des séquences dinucléotidiques répétées (microsatellites) est que la différence de taille entre les allèles peut être faible et donc, difficile à détecter. Une solution possible à ce problème serait d'isoler des répétitions constituées de 3, 4 ou 5 nucléotides.

L'emploi de ces séquences répétées en plus des digestions par enzymes de restriction a servi de marqueur de polymorphisme permettant de caractériser des individus de plusieurs espèces d'ongulés (SWAIGER *et al.*, 1992). Les sondes oligonucléotides $(CAC)_5/(GTG)_5$ et $(CA)_8/(GT)_8$ utilisées en hybridation avec des digestions d'ADN génomiques semblent être les plus performantes pour individualiser leurs échantillons. Les séquences cibles $(GTG)_n$ ou $(CAC)_n$ sont localisées dans les espaceurs ("spacers") inter-géniques et dans les introns des gènes. Les différences de longueurs de ces séquences sont dues au taux de mutation élevé dans ces parties du génome.

Le polymorphisme de longueur de simples séquences (Simple Sequence Length Polymorphisms : SSLP) s'est avéré être un outil efficace et informatif sur les systèmes de reproduction et sur la structure génétique des populations de globicéphales (Delphinidae) (SCHLOTTERER *et al.*, 1991).

Le clonage et le séquençage de ce type de séquence à partir de 11 différentes espèces de baleines ont montré une conservation inhabituelle des séquences flanquant ces loci. Sur les 11 loci étudiés sur différentes espèces de baleines, un seul s'est avéré être monomorphe.

Les marqueurs microsatellites sont neutres, codominants à transmission mendélienne (LITT et LUTY, 1989 ; WEBER et MAY, 1989) ce qui explique l'intérêt qu'ils suscitent dans de nombreux domaines. Ils sont en effet utilisés en médecine légale

pour des tests de paternité (EPPLEN, 1992) ou d'analyse de tissus (ROEWER *et al.*, 1991), pour la cartographie des génomes (HUANG *et al.*, 1992 ; ERLICH et ARNHEIM, 1992 ; LOVE *et al.*, 1990) et, pour l'étude de la structure des populations et des flux de gènes (AMOS *et al.*, 1993 ; QUELLER *et al.*, 1993 ; WALL *et al.*, 1993 ; EDWARDS *et al.*, 1992).

Ces séquences seraient impliquées dans des changements de conformation de l'ADN à l'origine de réarrangements génomiques (LEWIN, 1990 ; NORDHEIM et RICH, 1983) ou à des augmentations d'activité des gènes (STALLINGS *et al.*, 1991).

Bilan du Chapitre I

Après avoir brièvement rappelé les données récentes sur le cycle d'*O. volvulus* et sur la phylogénie du genre *Onchocerca*, nous avons présenté les caractéristiques générales de l'épidémiologie de l'onchocercose. L'onchocercose au Cameroun a été ensuite abordée par la brève description des 4 foyers qui font l'objet de notre étude.

La complexité de l'épidémiologie paraissant être liée aux souches du parasite, les outils diagnostiques disponibles et les techniques récentes qu'il est envisageable d'utiliser pour en développer de nouveaux ont été décrits.

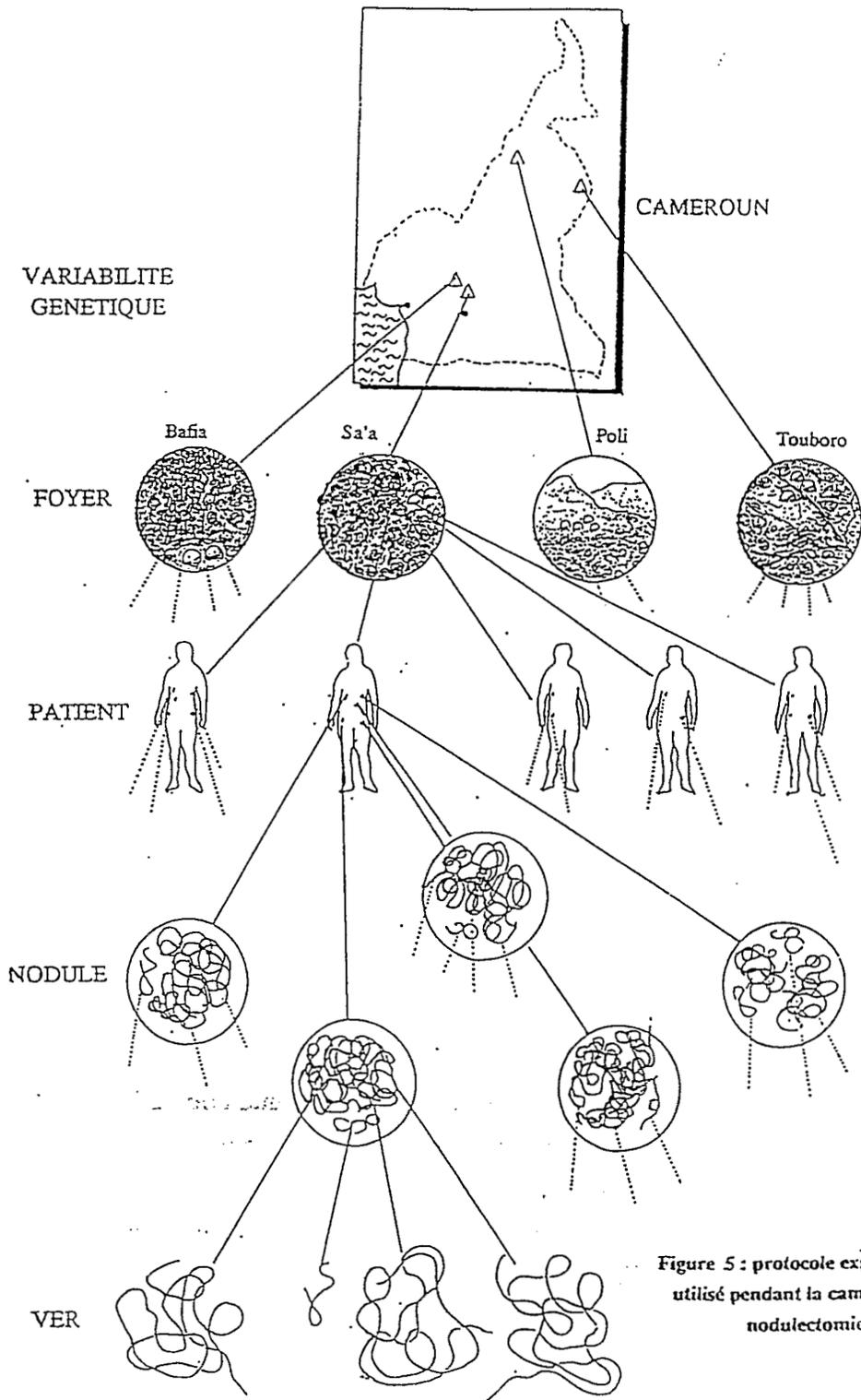


Figure 5 : protocole expérimental utilisé pendant la campagne de nodulectomie

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

I. Le matériel biologique

1) Récolte du matériel biologique

La récolte du matériel biologique a eu lieu au cours d'une mission réalisée dans quatre foyers du Cameroun sous la direction de médecins de l'antenne ORSTOM auprès du Centre Pasteur de Yaoundé. Sur l'ensemble des quatre foyers, 14 patients ont été examinés et nodulectomisés. Plusieurs nodules ont été prélevés sur chacun d'eux ; en tout, 48 nodules ont été excisés. Après digestion à la collagénase, le nombre moyen de vers observé par nodule était de 2.

Les vers de chaque nodule sont étudiés individuellement ce qui nous a permis d'envisager la variabilité génétique du parasite à différents niveaux (voir Figure 5) :

- entre les foyers,
- entre les patients,
- entre les nodules (internodulaire),
- entre les vers d'un même nodule (intranodulaire).

2) Préparation du matériel

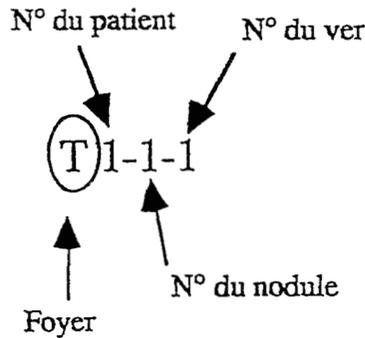
Après excision, les nodules sont rincés dans une solution de SDS à 1%, ce qui est une précaution contre le VIH (en le détruisant). Les fragments de tissu humain restant en excès autour du nodule sont précautionneusement retirés à l'aide d'un scalpel.

Les nodules contenant *O. volvulus* ont été digérés directement sur le terrain à la collagénase (SCHULTZ-KEY *et al.*, 1977). A cette fin, ils ont été placés dans une solution de collagénase (4 mg/ml dans du milieu de Hanks) contenant 100 mg/ml de gentamycine et incubés à 37°C de 8 à 24 heures selon la taille du nodule.

Quand les tissus nodulaires ont été entièrement digérés, les vers ont été isolés dans du sérum physiologique et remis dans du milieu de Hanks pendant une à deux

heures de façon à se débarrasser le plus possible du tissu humain restant. Les vers ont ensuite été trempés dans du sérum physiologique contenant 10 mM EDTA afin d'éviter au maximum les dégradations par les DNases.

Les vers ont enfin été placés dans des tubes et stockés dans l'azote liquide ou dans l'alcool absolu à -20°C et répertoriés selon la nomenclature indiquée ci-dessous :



Foyer : Touboro (T), Poli (P), Bafia (B) et Sa'a (S).

Ainsi T1-1-1 et T1-1-2 sont deux vers du même nodule (nodule n°1) provenant d'un patient de Touboro (patient n°1).

3) Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait d'après la technique décrite par MEREDITH *et al.*, en 1989. Les vers sont lavés dans du PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄ pH 7,3) et du tampon TEN (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7,5) trois fois de suite. Les parasites sont alors plongés dans l'azote liquide et broyés à l'aide d'un mortier. Le broyât est transféré dans un tube en polypropylène contenant du tampon TEN (1,8 ml par femelle adulte) (voir Annexe 1).

Du N-Lauryl sarcosine et de la protéinase K sont alors ajoutés à des concentrations finales de 1% (poids/volume) et 200 µg/ml respectivement. Le mélange est incubé à 50°C pendant au moins six heures. On ajoute alors de la ribonucléase A (RNase) à une concentration finale de 100 µg/ml et on incube le mélange à 37°C pendant 30 minutes. L'ADN est ensuite extrait au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol absolu (voir Annexe 3). Il est séché et repris dans 100 µl de tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

Des extractions d'ADN sur d'autres espèces de filaires ont également été pratiquées afin de pouvoir les comparer avec les résultats obtenus pour *O. volvulus*. Il s'agissait de :

- *Dirofilaria immitis* Leidy, 1856 qui est une filaire du chien et de certains autres carnivores sauvages.

- D'autres espèces du genre *Onchocerca*, essentiellement parasites de bovins domestiques :

- *O. gutturosa* Neumann, 1910, cosmopolite.

- *O. lienalis* Stiles, 1892, dont la répartition est limitée à la région holartique et à l'Australie.

- *O. gibsoni* Cleland et Johnson, 1910 rencontrée uniquement en Asie et en Australie.

- *O. dukei* Bain et coll., 1974, que l'on trouve dans les régions Afrotropicales.

- *O. ochengi* Bwangamoi, 1969, également Afrotropicale.

II. Evaluation des sondes d'ADN disponibles

Les échantillons d'ADN extrait des vers du Cameroun ont été testés à l'aide de certaines sondes développées en Afrique de l'Ouest.

1) Transfert

Les membranes de Nylon chargé (Nylon N+) sur lesquelles on effectuera le transfert sont coupées à la dimension voulue et trempées dans du tampon SSC (150 mM NaCl, 15 mM Na₃ citrate 2 H₂O pH 7,0) concentré deux fois. L'ADN est ensuite dénaturé dans une solution de soude et de sel (NaOH 0,4 N ; NaCl 1,5M). Les solutions d'ADN dénaturé (100 ng par échantillon) sont directement déposées par "taches" (Dot-Blot) à l'aide d'un appareil de transfert sous vide. Les membranes peuvent être conservées longtemps à sec si on ne désire pas réaliser l'hybridation immédiatement (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2) Hybridation

Les échantillons du Cameroun ont été testés avec deux sondes oligonucléotides ; la sonde S9 qui est spécifique d'*O. volvulus* et pSS-1 qui est spécifique des souches

d'*O. volvulus* de savane d'Afrique de l'Ouest. Les deux sondes (oligonucléotides) sont marquées à la digoxigénine (marquage non radioactif) à leur extrémité 3'.

Les membranes sont préhybridées pendant une heure à 50°C dans un bain-marie agitant avec au moins 20 ml de solution d'hybridation contenant :

- 5 X SSC,
- lait en poudre écrémé (agent bloquant) 1% w/v,
- n-lauroyl sarcosine 0,1% w/v,
- SDS 0,02% w/v,

par 100 cm² de membrane. On ajoute alors 100 ng de sonde marquée et on incube le mélange pendant au moins 6 heures à 50°C.

Les membranes sont ensuite lavées deux fois 5 minutes à 50°C avec au moins 50 ml de tampon 2 X SSC ; SDS, 0,1% (w/v) par 100 cm² de membrane et deux fois 5 minutes à 50°C avec du tampon 0,1 X SSC ; SDS, 0,1% (w/v). Les membranes peuvent être directement utilisées pour la révélation ou être stockées au sec.

La détection se fait à l'aide d'anticorps conjugués anti-digoxigénine et la révélation sur film autoradiographique.

III. L'amplification aléatoire (RAPD)

1) Protocole de PCR aléatoire (RAPD)

L'amplification se fait dans une solution (25 µl) contenant :

- 10 mM Tris-HCl (pH 9,0),
- 50 mM KCl,
- 0,1 % Triton X-100,
- 4 mM MgCl₂,
- 0,2 mM dATP, dGTP, dCTP et dTTP,
- 20 picomoles d'amorce (décamère),
- 20 ng d'ADN à amplifier,
- 1 unité de *Taq* ADN polymérase.

Un témoin négatif (C-), constitué uniquement d'eau distillée à laquelle on ajoute du mélange réactionnel dans les mêmes proportions que celles utilisées pour les autres échantillons est également amplifié pour détecter les contaminations.

Quarante cinq cycles d'amplification sont effectués sur les échantillons à tester ainsi que sur le témoin négatif, un cycle étant constitué de : 1 minute à 94°C (dénaturation), 1 minute à 35°C (fixation des amorces) et 2 minutes à 72°C (élongation). Une étape préalable de 5 minutes à 92°C (dénaturation) et une étape d'élongation finale (15 minutes) à 72°C sont ajoutées afin d'optimiser l'amplification.

Les échantillons obtenus après amplification sont déposés (20 µl) sur gel d'agarose à 1,4 % coloré au bromure d'éthidium. Le gel est ensuite photographié sous lumière U.V. (260 nm) avec une pellicule Polaroid.

Des paires d'oligonucléotides ont également été utilisées afin de comparer les résultats avec ceux obtenus par amplification à l'aide d'une seule amorce .

2) L'analyse des données obtenues par amplification (RAPD)

Les données recueillies par la technique des RAPD (différents profils d'amplification) ne peuvent être interprétées qu'au moyen de méthodes phénétiques. Ces méthodes se proposent de reconstruire des arbres phénétiques en partant des ressemblances observées entre chaque paire d'unités évolutives (UE). Cette ressemblance est une ressemblance globale établie à partir du maximum d'observations disponibles ; celles-ci doivent cependant représenter un ensemble homogène.

Ces méthodes n'ont un sens phylogénétique qu'à la condition d'y introduire des hypothèses évolutives extrinsèques, de telle manière que la similitude globale puisse être interprétée en terme de filiation (DARLU et TASSY, 1993).

Les données observées pour un individu se présentent sous forme d'une succession de bandes échelonnées sur un gel d'agarose. Un individu sera caractérisé, dans notre cas, par la présence ou l'absence d'un certain nombre de bandes réparties le long d'un profil. Les distances entre individus sont donc calculées en décomptant le nombre de caractères (bandes) concordants et le nombre de caractères discordants.

Deux indices ont été utilisés afin de calculer les distances entre individus :

- l'indice de similitude de Jaccard (1908) :

$$S_{ij} = \frac{nb}{K - na}$$

- l'indice de concordance simple de Sokal et Michener (1958) :

$$S_{ij} = \frac{na + nb}{K}$$

où i et j représentent deux UE,

K l'ensemble de caractères,

na signifie que l'on observe n caractères dans l'état a chez l'UE i et chez l'UE j .

Le premier indice (Jaccard) ne prend en compte que la présence conjointe de l'un des deux états (présence d'une bande dans notre cas), l'autre état étant considéré comme non informatif. Le second indice (Sokal et Michener), au contraire du premier, tient compte de la proportion de caractères qui sont dans le même état (présence et absence) chez deux individus.

Le calcul de ces indices a permis de construire des matrices de distances qui permettent d'établir des arbres phénétiques.

Les calculs de similitudes, les matrices de distances et les arbres phénétiques ont été établis à l'aide d'un logiciel informatique de construction d'arbres : PHYLIP (c) (Phylogeny Inference Package, version 3.4). Les arbres phénétiques ont été construits par méthode agglomérative de lien moyen ; de plus, les regroupements ont été faits de manière non pondérée (UPGMA : unweighted pair-group method of arithmetic averages).

IV. Les séquences microsatellites

1) Isolement de séquences microsatellites (Figure 6)

a) Préparation du clonage

L'ADN utilisé pour isoler des séquences microsatellites a été extrait de plusieurs vers issus d'un même nodule qui avait été excisé d'un patient de Touboro (savane camerounaise). L'extraction s'est faite sur les vers regroupés selon le protocole décrit ci-dessus. La présence d'ADN humain a été contrôlée par amplification à l'aide d'amorces spécifiques de séquences microsatellites humaines, ce qui permet de révéler la présence d'ADN contaminant même à l'état de traces.

L'ADN génomique total (10µg) a été digéré à l'aide des enzymes de restriction *HaeIII*, *AluI*, *TaqI*, *HinfI* et *Sau3A* à 37°C pendant au moins 6 heures. La digestion a été testée ensuite sur gel d'agarose à 0,8% ; la taille des fragments ainsi obtenus était comprise entre 200 et 500 paires de bases environ. Les fragments digérés ont été réparés à l'aide de l'enzyme de Klenow (ADN polymérase) et ont alors été purifiés au phénol-chloroforme et précipités à l'éthanol absolu (voir Annexe 3).

Le clonage a été effectué dans un virus bactériophage : le vecteur M13. Celui-ci permet, à partir de fragment d'ADN bicaténaire à cloner, d'obtenir des fragments purs, monocaténaires directement utilisables pour le séquençage par la technique de Sanger (voir Figure 7). Le vecteur utilisé (M13 BM20) circulaire (2µg) est digéré par l'enzyme de restriction *EcoRV* à 37°C pendant au moins 6 heures. La digestion est testée sur gel d'agarose, et le vecteur ainsi linéarisé est ensuite déphosphorylé à l'aide d'une enzyme, la phosphatase alcaline (une heure à 50°C), pour éviter qu'il ne se referme ("religation") et ne reprenne sa forme circulaire originelle. Après déphosphorylation, le vecteur est purifié à l'aide de billes de silice (Gene-Clean™).

b) Clonage

L'insertion des fragments (20ng) dans le vecteur (20ng) se fait à l'aide de la T4 ADN ligase à température ambiante pendant au moins six heures. De plus, une ligation est effectuée avec du vecteur seul pour vérifier qu'il a bien été déphosphorylé et que par conséquent, il ne se referme pas sur lui-même. Le vecteur M13 dans lequel des fragments d'ADN à cloner ont été insérés est utilisé pour transformer des bactéries (HANAHAN, 1983) (*Escherichia coli*, souche XL1) après que ces dernières ait été

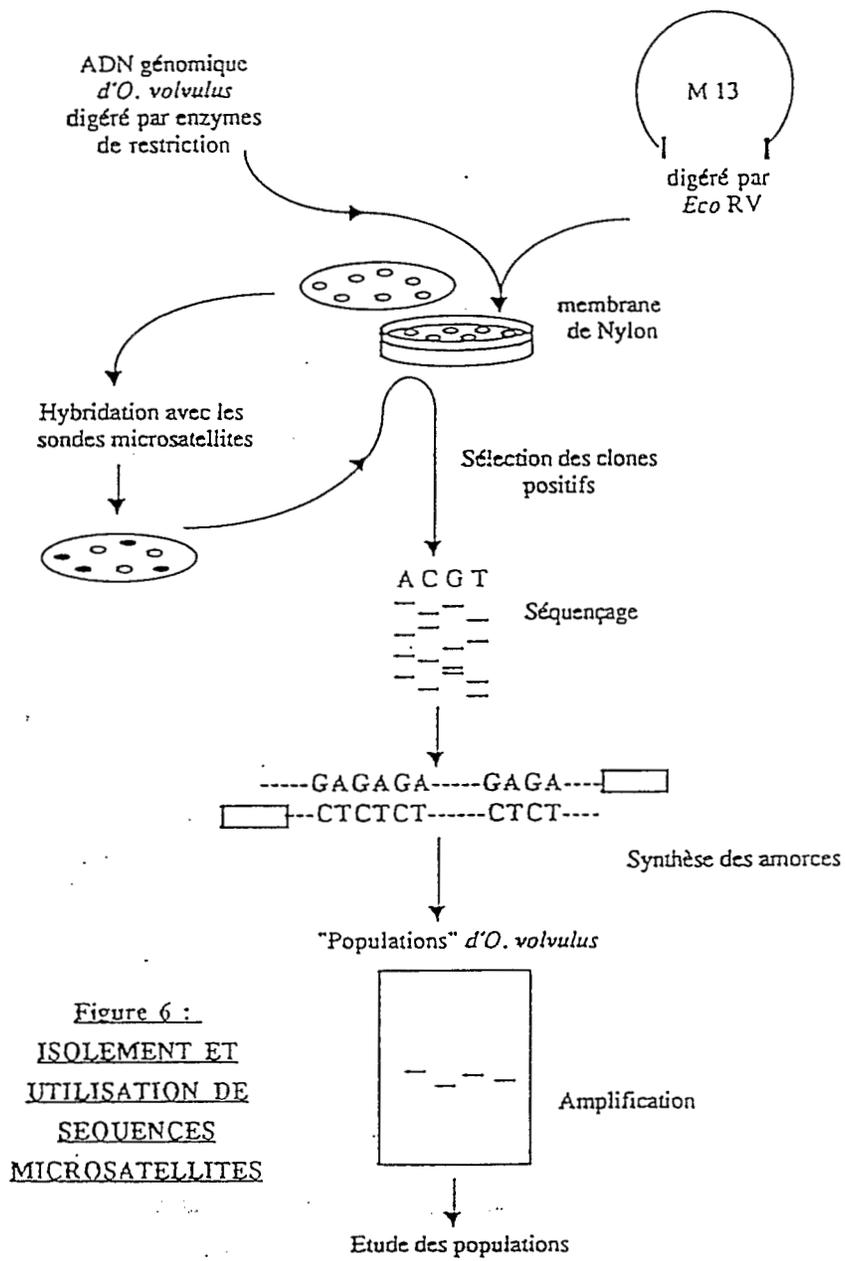


Figure 6 :
ISOLEMENT ET
UTILISATION DE
SEQUENCES
MICROSATELLITES

rendues compétentes (apte à intégrer le bactériophage) ; ceci se fait selon le protocole suivant :

- Une préculture de bactérie (*E. coli*, souche XL-1) est lancée dans 5 ml de milieu de culture (2TY : voir Annexe 2) à 37°C pendant la nuit.
- Quelques gouttes de milieu contenant des bactéries sont mises en culture à 37°C, mélange qui fournira les cellules indicatrices,
 - inoculation au 1/100^{ème} de 100 ml de milieu 2TY et incubation à 37°C jusqu'à ce que la culture ait atteint la densité optique (DO) de 0,3 pour une longueur d'onde de 600nm.
 - arrêt de la culture sur glace pendant 15 minutes,
 - centrifugation à 3500 tr/mn pendant 5 minutes,
 - enlever le surnageant , ajouter la moitié du volume initial de chlorure de calcium (0,1 M CaCl₂) stérile froid et agiter,
 - laisser reposer sur glace pendant 30 minutes puis centrifuger 5 minutes à 3500 tr/mn,
 - enlever le surnageant et re-suspendre le culot dans 1/20^{ème} du volume initial avec du CaCl₂ stérile froid,
 - laisser quelques heures sur glace (les cellules compétentes peuvent être gardées à 4°C pendant une nuit).
- La solution contenant des fragments d'ADN insérés dans le vecteur est aliquotée (en 20 aliquotes environ),
 - le volume de chaque aliquote est ramené à 100µl avec du CaCl₂ stérile froid,
 - 300µl de cellules compétentes sont ajoutés ; le mélange est agité doucement et laissé sur glace fondue au moins 1 heure,
 - le mélange est alors incubé à 42°C (choc thermique) pendant 3 à 5 minutes (moment où le phage pénètre dans les bactéries),
 - pour un tube en polypropylène préparer le mélange :
 - 40µl X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside) à 2% dissout dans de la diméthylformamide (DMFO) (w/v),
 - 40µl IPTG (isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside),
 - 200µl de cellules indicatrices,
 - pour chaque ligation, le mélange précédent est ajouté ainsi que 5 ml de gélose molle maintenue à 45°C,
 - agiter doucement,

- le mélange est alors coulé dans une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé (2TY agar : voir Annexe 2).

- Les boîtes de Pétri sont alors incubées pendant la nuit à l'étuve à 37°C.

La visualisation se fait à l'aide d'une réaction colorée : les clones bleus étant ceux qui n'ont rien inséré, tandis que les clones blancs représentent ceux qui ont inséré un fragment d'ADN.

Une banque génomique partielle ("shotgun cloning") est ainsi construite, chaque plage blanche visible sur les boîtes de Pétri représentant des bactériophages ayant intégré un fragment d'ADN génomique d'*O. volvulus*.

c) Isolement des clones positifs

Des répliques de cette banque sont produites par diffusion des phages sur membrane de nylon chargée. Les membranes rondes sont stérilisées, trempées dans une culture bactérienne (*E. coli*, souche XL1) et séchées sous hotte stérile. Elles sont ensuite placées pendant une heure à 4°C sur les boîtes de Pétri qui contiennent l'ADN génomique cloné. Les membranes sont transférées sur des boîtes de gélose fraîche et incubées au moins 4 heures à 37°C. Les bactériophages ainsi amplifiés sur membranes sont ensuite dénaturés dans NaOH, 0,5N ; NaCl, 1,5M et les membranes neutralisées dans du tampon 2 X SSPE. Elles peuvent être stockées sèches ou utilisées immédiatement.

Afin d'isoler les clones contenant des séquences microsatellites :

- des sondes polymérisées $(CA)_n/(GT)_n$ et $(GA)_n/(CT)_n$ ont été utilisées pour détecter respectivement des séquences microsatellites $(CA)_n/(GT)_n$ et $(GA)_n/(CT)_n$

- des sondes oligonucléotides $(GATA)_4$ et $(CAC)_5$ ont été utilisées pour détecter respectivement des séquences microsatellites GATA et CAC répétées.

Les sondes polymérisées sont marquées par la technique de l'amorçage au hasard (FEINBERG et VOGELSTEIN, 1983) en présence de $[\alpha^{32}P]$ dCTP et les sondes oligonucléotides par marquage terminal (kinase) en présence de $[\gamma^{32}P]$ ATP.

La préhybridation (au moins une heure) et l'hybridation (au moins 6 heures) ont été effectuées à 65°C dans une solution contenant 0,5% de lait en poudre écrémé, 5 X SSPE, 1% SDS, 100µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé.

Les membranes ont ensuite été lavées deux fois dans une solution de 2 X SSPE, 0,1% SDS à 65°C pendant 10 minutes suivi d'un lavage de 15 minutes en 0,5 X SSPE,

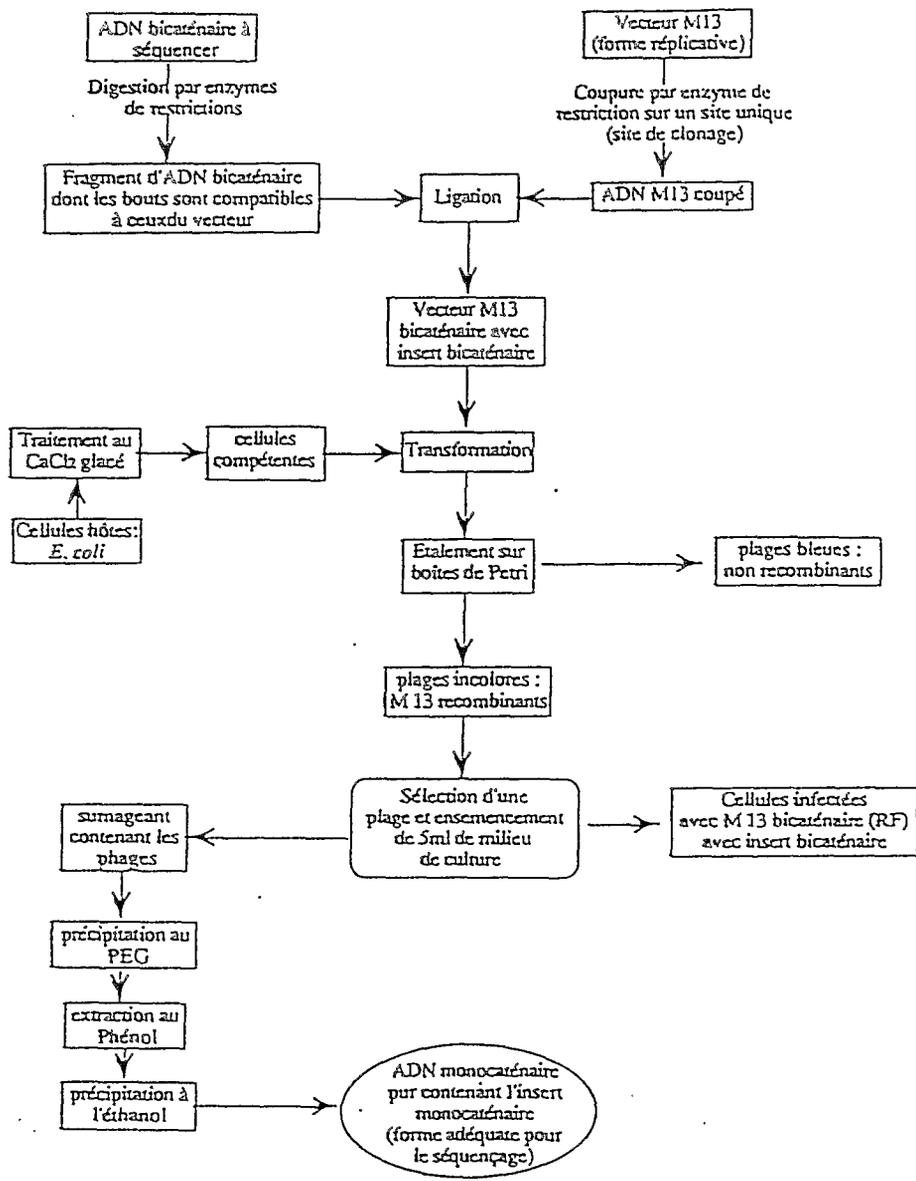


Figure 7 : CLONAGE AVEC LE VECTEUR M13 : OBTENTION D'ADN MONOCATENAIRE POUR LE SEQUENÇAGE

0,1% SDS. Les membranes sont séchées et autoradiographiées avec des écrans intensifiants à -70°C pendant 2 à 16 heures.

Les clones positifs sont repérés sur le film autoradiographique car apparaissant sous forme de spots noirs. Les films sont placés en correspondance sur les boîtes de Pétri afin de localiser le clone directement sur la boîte.

d) Préparation des formes simples brins (voir Figure 7)

Les formes simples brins (matrices) ont été isolées à partir de plaques positives (MESSING, 1983) selon la technique suivante :

une préculture d'*E. coli* souche XL-1 est préparée par ensemencement de 5 ml de milieu de culture (2TY).

- "Amplification" des clones positifs (près d'une flamme)

- inoculer au 1/100^{ème} du milieu 2TY avec les bactéries issues de la préculture,
- répartir le mélange par 2 ml,
- prélever un clone positif (clone blanc) par carottage sur la boîte de Pétri à l'aide d'une pipette pasteur stérile,
- ajouter un clone positif par tube de mélange et agiter pendant 5 heures à 37°C.
- 1^{ère} centrifugation : 3500 tr/mn pendant 5 minutes,
- 2^{ème} centrifugation : transférer le surnageant dans des microtubes et centrifuger à 15.000 tr/mn pendant 3 à 4 minutes.

- Précipitation au polyéthylène glycol (PEG)

- transférer le surnageant dans des microtubes et ajouter 200µl de PEG-NaCl,
- agiter et attendre 15 minutes,
- 3^{ème} centrifugation : 15.000 tr/mn pendant 5 minutes,
- à l'aide d'une pipette pasteur stérile effilée, aspirer et jeter le surnageant.

- Extraction au phénol

- re-suspendre le culot dans 200µl de tampon TE X (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH 8,0),
- ajouter un même volume (200µl) de phénol saturé, agiter fortement et laisser reposer 15 minutes,
- centrifuger à 15.000 tr/mn pendant 3 à 4 minutes,
- récupérer 190µl de surnageant dans un microtube.

- Précipitation à l'éthanol

- ajouter 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3M et 3 volumes d'éthanol absolu glacé,
- laisser reposer à -80°C pendant 30 minutes ou à -20°C pendant la nuit,
- centrifuger à 15.000 tr/mn pendant 15 minutes et aspirer l'éthanol avec une pipette effilée,
- laver le précipité avec 3 volumes d'éthanol à 70% glacé et centrifuger à 15.000 tr/mn pendant 10 minutes,
- retirer le surnageant,
- sécher le précipité pendant quelques minutes sous vide,
- re-suspendre le précipité dans 25µl de TE X ou Tris 5mM pH 8,0 et conserver à -20°C.

Le vecteur qui a intégré le fragment d'ADN contenant fort probablement une séquence microsatellite est prêt à être séquencé.

e) Le séquençage

Le séquençage se fait par la technique des terminateurs de chaînes (SANGER *et al.*, 1977) à l'aide d'amorces M13 fluorescentes sur un séquenceur automatique (Applied Biosystems, Inc.). Les produits d'amplifications sont marqués par quatre types d'amorces du bactériophage M13 associées chacune à un type de terminateur de chaîne (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP). Une matrice est donc séquencée en quatre aliquotes différentes, une pour chaque type de base.

Chaque matrice est préparée selon le protocole suivant :

Réactifs	Base			
	A	C	G	T
d/ddNTP Mix	1µl	1µl	2µl	2µl
Dye primer	1µl	1µl	2µl	2µl
Tampon 5X	1µl	1µl	2µl	2µl
ADN	1µl	1µl	2µl	2µl
Enzyme diluée	1µl	1µl	2µl	2µl
Volume Total	5µl	5µl	10µl	10µl

L'enzyme utilisée (*Taq* ADN polymérase) est diluée au préalable (pour un échantillon) selon le protocole suivant :

- 4 unités (0,5µl) d'enzyme,
- 1µl de tampon de séquençage concentré cinq fois (400mM Tris-HCl, pH 8,9 ; 100mM sulfate d'ammonium ; 25mM MgCl₂)
- 5,5µl d'eau distillée.

Chaque mélange réactionnel est recouvert par environ 20µl d'huile minérale et centrifugé brièvement afin de bien séparer les deux phases.

L'amplification est conduite sur un "thermocycleur" programmé comme suit :

1^{ère} phase : pendant 15 cycles

- dénaturation à 95°C pendant 30 secondes,
- fixation des amorces à 55°C pendant 30 secondes,
- élongation à 70°C pendant 1 minute.

2^{ème} phase : pendant 15 cycles

- dénaturation à 95°C pendant 30 secondes,
- élongation à 70°C pendant 1 minute.

Les échantillons sont rassemblés (le contenu des quatre réactions A, C, G et T) dans un tube contenant 80µl d'éthanol à 95% et 1,5µl d'acétate de sodium 3M (pH 5,3) en prélevant le moins d'huile possible. Chaque tube contenant une séquence est laissé à température ambiante pendant 10 à 15 minutes pour que la précipitation soit complète puis centrifugé pendant 15 à 30 minutes à 15000 tr/mn. On retire alors le surnageant ; le précipité est rincé avec 250µl d'éthanol à 70% et le tube centrifugé 5 minutes à 15000 tr/mn. On sèche ensuite le précipité sous vide pendant 2 à 3 minutes en évitant le sur-séchage.

Avant de charger les échantillons sur gel d'acrylamide ayant déjà subi une pré-électrophorèse, les culots sont resuspendus dans 6µl d'un mélange 5/1 (v/v) de formamide déionisée et d'EDTA 50mM (pH 8,0). Les échantillons sont alors dénaturés à 90°C pendant 2 minutes.

Les échantillons sont chargés sur gel d'acrylamide à 8% en condition dénaturante (contenant de l'urée 7M) et l'électrophorèse est effectuée sous une tension de 1500 V (25-30 mA) pendant 12 heures. Les résultats sont analysés alors par un ordinateur relié directement au séquenceur, à l'aide d'un logiciel d'analyse et les séquences sont interprétés (Figure 8).

f) Amplification des séquences microsatellites

Des amorces pour la PCR ont été choisies à partir des régions flanquant les séquences microsatellites. Ces amorces ont été choisies à l'aide d'un programme informatique pour éviter la formation de dimères (autohybridation entre amorces) et synthétisées sur un synthétiseur d'ADN (Applied Biosystems, Inc.).

Les produits d'amplification obtenus à l'aide d'amorces de séquences microsatellites sont révélés par autoradiographie de gel d'acrylamide, car le marquage de l'ADN est effectué par incorporation de soufre 35 lors de la réaction de PCR sous forme de dATP marqué.

Classiquement, la réaction d'amplification est menée dans les conditions suivantes :

- 10mM Tris-HCl (pH 9,0),
- 50mM KCl,
- 0,1% Triton X-100,
- 1mM MgCl₂,
- 75µM dGTP, dCTP et dTTP,
- 6µM dATP,
- 0,2 µl [α^{35} S] dATP,
- 20 picomoles de chaque amorce,
- de 20 à 40ng d'ADN à amplifier,
- 2 unités de *Taq* ADN polymérase.
- eau distillée QSP 25µl

L'amplification se fait sur un "thermocycleur" programmé comme suit :

- 1 cycle à 94°C pendant 5minutes
- 20 cycles comprenant :
 - une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes,
 - une fixation des amorces à 58°C pendant 30 secondes,
 - une élongation à 72°C pendant 30 secondes,
- 1 cycle d'élongation finale à 72°C pendant 15 minutes.

Il est cependant nécessaire d'optimiser les étapes successives menant à l'obtention d'un résultat interprétable. En ce qui concerne l'étape d'amplification, les paramètres de la réaction doivent être établis avec précision afin d'avoir une bonne

reproductibilité des résultats. Lors de tests préalables, différentes concentrations des différents réactifs intervenants dans l'amplification ont été testées, la concentration en chlorure de magnésium et en ADN à amplifier en particulier. La révélation sur gel de séquence est également une donnée importante à maîtriser de façon précise.

Après amplification, les produits de PCR sont concentrés par précipitation à l'éthanol absolu (voir Annexe 3) et repris dans une solution (5/1) de formamide, EDTA (10mM) à laquelle est ajouté du bleu de bromophénol et du xylène cyanol. Ils sont dénaturés à 95°C pendant 5 minutes juste avant d'être chargés sur le gel.

g) Migration et révélation

La variabilité d'un locus microsatellite peut n'être matérialisée que par une différence de 2 paires de bases (cas d'un dinucléotide répété). Il faut donc utiliser une méthode suffisamment résolutive pour pouvoir séparer les produits d'amplification. Un gel d'acrylamide dénaturant (contenant de l'urée) répond à cette exigence, puisque capable de séparer des fragments d'ADN divergents à la base près (PARKER *et al.*, 1993). Nous avons utilisé un gel d'acrylamide dénaturant (8M urée) à 6%. La migration dure environ 1 heure et demie à 60 W (1700 V, 40 mA).

Un marqueur de taille est utilisé pour pouvoir déterminer la position exacte, à la base près, de chaque fragment amplifié. Il s'agit, dans notre cas, de la séquence du bactériophage M13, obtenue par séquençage manuel à partir de l'amorce "sens" (-21M13).

Après migration, le gel est fixé dans une solution de 10% éthanol, 10% acide acétique, puis séché sous vide avant d'être placé en cassette autoradiographique, au contact d'un film pendant au moins 6 heures à température ambiante.

Après révélation du film autoradiographique, les différents paramètres à déterminer sont le nombre d'allèles par locus et par population et l'hétérozygotie par locus et par population. Pour les loci étudiés, en général, le faible nombre d'allèle permet d'utiliser les programmes et logiciels informatiques utilisés pour des données allozymiques.

Bilan du Chapitre II

Après avoir exposé notre plan de travail qui consistait à étudier la variabilité génétique d'*O. volvulus* à différents niveaux (foyer, patient, internodulaire et intranodulaire), nous nous sommes attachés à décrire les différentes méthodes que nous avons utilisées lors de notre étude.

Pendant une campagne de nodulectomie, 48 nodules ont été prélevés sur 14 patients différents ; ces nodules ont été directement digérés sur le terrain.

Les marqueurs des populations d'*O. volvulus* (sondes d'ADN) développés en Afrique de l'Ouest ont été testés sur nos populations du Cameroun.

D'autres marqueurs génétiques ont été recherchés et les méthodes mises en oeuvre pour les isoler ont été décrites. Il s'agit de la technique de l'amplification aléatoire (RAPD) et des séquences d'ADN microsatellites.

CHAPITRE III

RESULTATS

I. Les sondes "d'Afrique de l'Ouest"

1) Hybridation avec la sonde spécifique d'*O. volvulus*

Tous les échantillons d'ADN d'*O. volvulus* du Cameroun dont nous disposons ont été testés tout d'abord avec une sonde spécifique d'*O. volvulus*. L'hybridation avec une sonde spécifique est la seule méthode ayant une valeur diagnostique d'espèce pour l'ADN et cette sonde oligonucléotide utilisée ici (sonde S9) ne s'hybride qu'avec l'ADN d'*O. volvulus*. Bien qu'*O. volvulus* soit la seule filaire nodulaire se développant chez l'homme, il nous a semblé important de tester tous les ADN extraits de nodules humains que nous avons isolé, afin de confirmer leur statut spécifique.

Les résultats obtenus à l'aide de la sonde spécifique d'*O. volvulus* montrent que tous les échantillons testés (voir Figure 9) répondent positivement à l'hybridation. L'hétérogénéité dans les réponses s'explique probablement par les quantités d'ADN transféré qui doivent être légèrement différentes selon les échantillons ; la quantification de ces dernières de manière précise étant parfois difficile et/ou l'efficacité du transfert n'étant pas strictement identique.

2) Hybridation avec la sonde spécifique des formes de savane d'Afrique de l'Ouest

Les mêmes échantillons d'ADN du Cameroun ont été testés avec pSS-1 qui est une sonde spécifique des souches de savane d'Afrique de l'Ouest (voir Figure 10). La faiblesse de certains signaux observée dans cette expérience correspond à celle observée dans l'expérimentation précédente (sonde spécifique d'*O. volvulus*). La quantité d'ADN transféré peut ici aussi, être invoquée pour expliquer une certaine hétérogénéité des résultats.

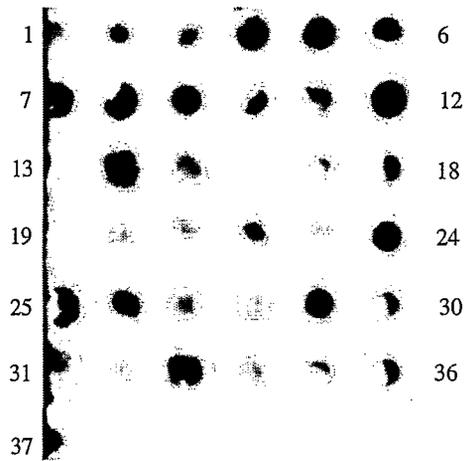


Figure 9 : hybridation de l'ADN de différents isolats d'*O. volvulus* du Cameroun avec la sonde oligonucléotide S9, spécifique d'*O. volvulus*. De 1 à 12 : vers de Touboro ; de 13 à 22 : vers de Poli ; de 23 à 29 : vers de Bafia ; de 30 à 37 : vers de Sa'a.

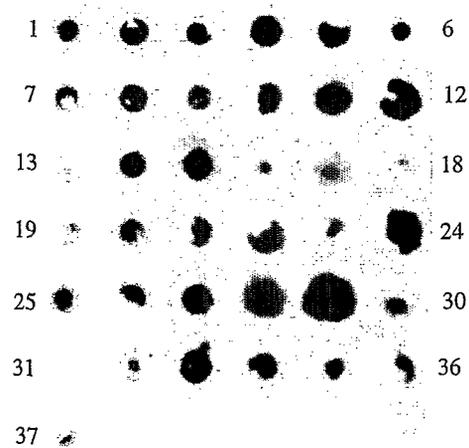


Figure 10 : hybridation de l'ADN de différents isolats d'*O. volvulus* du Cameroun avec la sonde oligonucléotide pSS-1, spécifique des souches de savane d'Afrique de l'Ouest. De 1 à 12 : vers de Touboro ; de 13 à 22 : vers de Poli ; de 23 à 29 : vers de Bafia ; de 30 à 37 : vers de Sa'a.

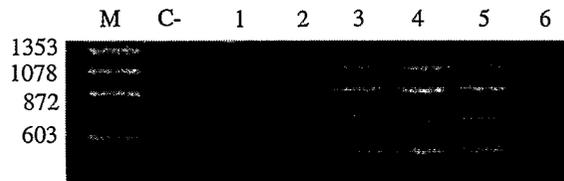


Figure 11 : amplification aléatoire de l'ADN (RAPD) d'un ver (T2-1-5) avec variation de la concentration finale en $MgCl_2$. M : marqueur de taille (Φ X-174 digéré par *Hae* III) donnée en pb. C- : contrôle négatif ; 1 : 1,5mM ; 2 : 2mM ; 3 : 3mM ; 4 : 4mM ; 5 : 5mM ; 6 : 6mM $MgCl_2$.

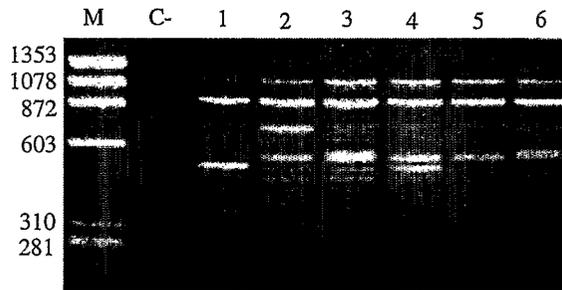


Figure 12 : amplification aléatoire de l'ADN (RAPD) d'un ver (T2-1-5) avec variation de la concentration finale en ADN. M : marqueur de taille (Φ X-174 digéré par *Hae* III) donnée en pb. C- : contrôle négatif ; 1 : 7ng ; 2 : 10ng ; 3 : 15ng ; 4 : 20ng ; 5 : 30ng ; 6 : 40ng.

Néanmoins, quelle que soit la provenance de l'échantillon (savane ou mosaïque savane forêt), l'hybridation donne une réponse positive. La sonde spécifique des souches de savane d'Afrique de l'Ouest (pSS-1) s'hybride aussi bien avec certains échantillons de Touboro, de Poli, de Bafia ou de Sa'a. Dans notre cas, cette sonde s'avère donc inutilisable pour distinguer les formes d'*O. volvulus* du Cameroun pourtant caractérisées par des pathogénicités différentes.

II. La mise au point des RAPD

1) Adaptation du protocole

La recherche des conditions optimales pour l'amplification nous a amené à aménager les protocoles précédemment décrits pour l'étude du matériel biologique dont nous disposons. La fiabilité de la technique peut être évaluée en terme de reproductibilité des résultats ainsi qu'en terme d'intensité et de netteté des bandes (bandes d'intensité trop faible rejetées).

Les profils obtenus pour différents ADN peuvent varier (présence ou absence de bandes) notamment lorsqu'il y a modification du site d'appariement des amorces (mutations, délétions, insertions...) ou variation de taille entre les deux sites d'appariement (trop grand éloignement).

Les différents paramètres et réactifs intervenants dans la réaction d'amplification ont fait l'objet de nombreux tests.

- Une variation de la température de fixation des amorces ("annealing") ne modifie pas significativement les résultats lorsqu'elle reste comprise entre 34°C et 40°C. Nous avons donc choisi une température moyenne d'hybridation des amorces de 36°C, température qui nous donnait des résultats reproductibles.

- La concentration en chlorure de magnésium ($MgCl_2$) est un paramètre critique de toute réaction de PCR et demande un ajustement très précis (WILLIAMS, 1989). Une gamme de concentration de $MgCl_2$ variant de 1,5mM à 6mM finale a été utilisée (voir Figure 11). Au vu des résultats obtenus, la valeur de 4mM en concentration finale a été retenue et utilisée pour toute la suite des expérimentations.

- La quantité d'ADN à amplifier est également un des paramètres des plus importants dans l'amplification RAPD. Une quantité d'ADN de départ (template) comprise entre 5 et 50ng permet d'obtenir des profils sur gel d'agarose. Cependant, les

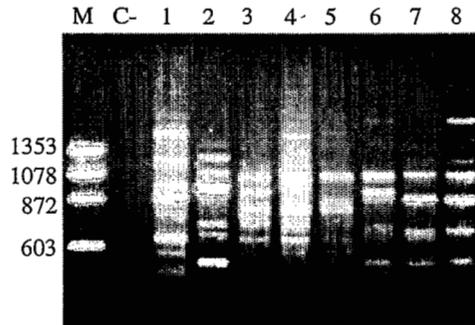


Figure 13 : comparaison de profils obtenus par amplification aléatoire de l'ADN humain et de différentes espèces de filaires avec l'amorce OPB-4. M : marqueur de taille (Φ X-174 digéré par *Hae* III) donnée en pb. C- : contrôle négatif ; 1 : ADN humain ; 2 : ADN de *D. immitis* ; 3 : ADN d'*O. gutturosa* ; 4 : ADN d'*O. lienalis* ; 5 : ADN d'*O. gibsoni* ; 6 : ADN d'*O. ochengi* et de deux isolats d'*O. volvulus*, un du Cameroun (7) et l'autre de la Sierra Leone (8)

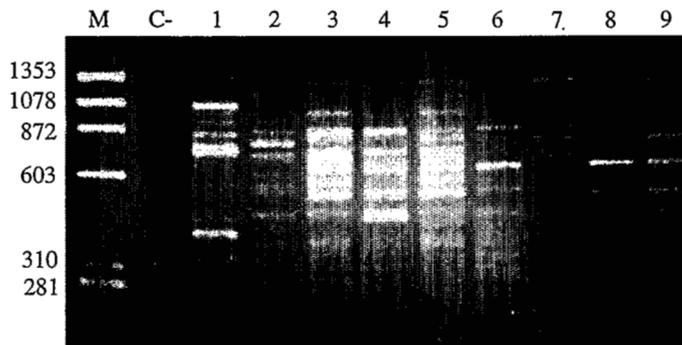


Figure 14 : comparaison de profils obtenus par amplification aléatoire de l'ADN de différentes espèces de filaires avec l'amorce OPB-6. M : marqueur de taille (Φ X-174 digéré par *Hae* III) donnée en pb. C- : contrôle négatif ; 1 : ADN de *D. immitis* ; 2 : ADN d'*O. gutturosa* ; 3 : ADN d'*O. lienalis* ; 4 : ADN d'*O. gibsoni* ; 5 : ADN d'*O. dukei* ; 6 : ADN d'*O. ochengi* et de trois isolats d'*O. volvulus* du Cameroun, 7 : Touboro ; 8 : Poli ; 9 : Bafia.

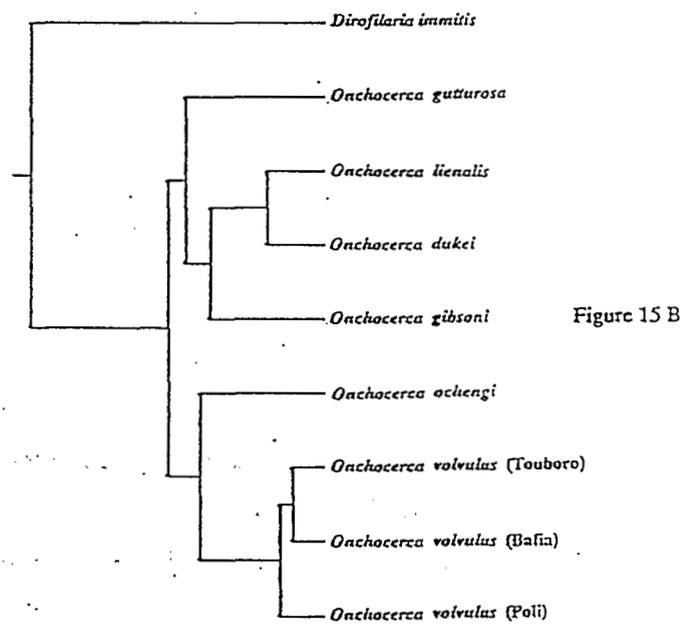
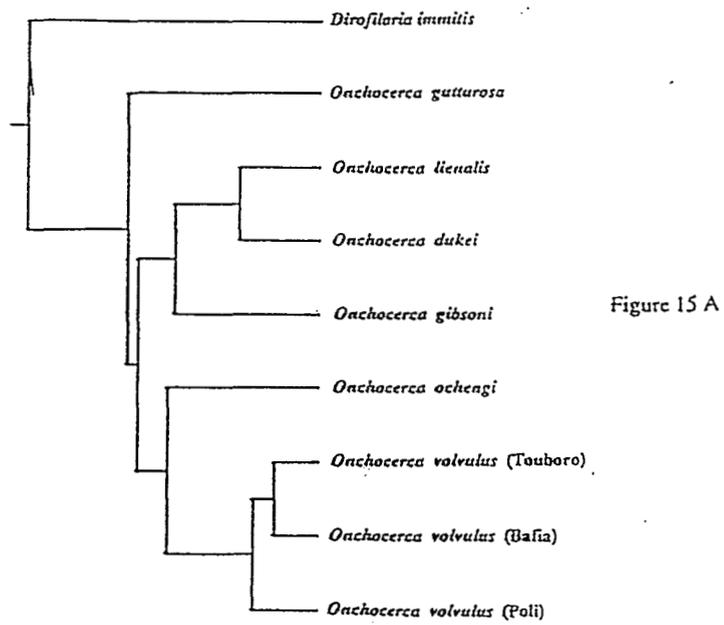


Figure 15 : arbres phénétiques construits à partir d'amplifications aléatoires de l'ADN (RAPD) sur plusieurs espèces de filaire. Les matrices de distances ont été calculées avec l'indice de Jaccard (Fig. 15 A) et l'indice de Sokal-Michener (Fig. 15 B)

résultats obtenus sont légèrement différents, notamment dans l'intensité des bandes, selon que 10 ou 40ng d'ADN aient été utilisés au départ (voir Figure 12). Il est donc très important d'étalonner la quantité d'ADN utilisée pour l'amplification ; la valeur choisie, 20ng d'ADN donnant des résultats acceptables, a été utilisée tout au long de notre travail.

Les autres paramètres de la réaction étant moins importants (tampon, concentration en dNTP...), une valeur compatible avec des résultats reproductibles a été fixée définitivement. Les amorces ("primers") décimères testées sont issues de kits commerciaux dont la liste figure en Annexe 4.

2) Variation interspécifique

Dans un premier temps, nous avons étudié la capacité de la technique des RAPD à détecter la variation interspécifique (distinction des différentes espèces proches d'*O. volvulus*). Plusieurs espèces de filaires du genre *Onchocerca* : *O. guttuosa*, *O. lienalis*, *O. dukei*, *O. gibsoni* et *O. ochengi*, et une filaire du chien, *Dirofilaria immitis*, ont été utilisées par comparaison à *O. volvulus*. De plus, de l'ADN humain a également été amplifié, car il peut parfois en subsister des traces lors de l'extraction de l'ADN d'*O. volvulus*.

L'ADN de ces différentes espèces de filaires a été extrait de la même manière que celui d'*O. volvulus*. Plusieurs amorces ont été utilisées pour amplifier l'ADN génomique de ces différentes espèces dans les conditions standard décrites ci-dessus. Dans chaque cas, au moins un fragment spécifique est amplifié pour chaque espèce étudiée. La taille des fragments observée le long des différents profils d'amplification varie de 150 à 1500pb environ. Le polymorphisme généré montre une grande variabilité interspécifique (voir Figures 13 et 14) ; cependant, l'allure générale du profil semble toujours plus proche lorsqu'il s'agit des filaires du genre *Onchocerca* par comparaison avec des espèces plus éloignées (*D. immitis*).

Neuf amorces ont permis de générer 60 bandes qui ont été utilisées pour construire des arbres phénétiques (voir Figure 15). Que l'on tienne compte seulement des bandes partagées (indice de Jaccard, voir Figure 15 A) ou de la présence et de l'absence partagées d'une bande (indice de Sokal-Michener, voir Figure 15 B), les résultats obtenus sont tout à fait comparables à l'exception de la position relative d'*O. guttuosa*. Dans les deux cas, la filaire du chien *D. immitis* est bien séparée des espèces du genre *Onchocerca*. *O. guttuosa* montre souvent des profils particuliers

contrairement aux trois autres filaires des bovins (*O. lienalis*, *O. dukei* et *O. gibsoni*) qui présentent souvent des profils dont l'allure générale est semblable. *O. ochengi* se trouve placée plus près de la filaire humaine *O. volvulus* que des autres filaires de bovins.

3) Variation intraspécifique

Après avoir étudié différentes espèces de filaires à l'aide de la technique des RAPD, la variation intraspécifique chez *O. volvulus* a été abordée. Le polymorphisme observé entre les différents isolats d'*O. volvulus* d'Afrique de l'Ouest et surtout entre ceux du Cameroun est peu important. L'ADN de vingt sept isolats provenant du Cameroun (6 de Touboro, 7 de Poli, 7 de Bafia et 7 de Sa'a) a été amplifié avec les 20 amorces dont nous disposions. Seules 4 amorces sur les 20 utilisées ont donné des profils polymorphes interprétables. Par comparaison avec les profils obtenus pour les différentes espèces de filaires, ceux obtenus pour les isolats d'*O. volvulus* du Cameroun sont beaucoup plus homogènes (voir Figures 16 et 17).

Les différences observées entre les différents profils reposent principalement sur des bandes de faible intensité. Le procédé utilisé pour construire les arbres phénétiques est le même que celui décrit au paragraphe précédent. Sur les 4 amorces qui ont généré des profils polymorphes, 12 bandes seulement ont pu être traitées en terme de présence ou d'absence (fragments polymorphes).

Certaines différences sont observées selon l'indice qui a servi aux calculs des distances entre les isolats du Cameroun. Trois grands groupes s'individualisent plus particulièrement quel que soit l'indice utilisé (voir Figures 18 et 19).

- un premier groupe comportant essentiellement des individus de Touboro (savane camerounaise),
- un second groupe comportant des individus de Sa'a (forêt dégradée du Cameroun),
- un troisième groupe plus important où sont principalement représentés des individus de Poli (savane) et de Bafia (forêt dégradée). Cependant, les individus des deux foyers semblent se séparer en deux sous groupes.

Les vers qui proviennent d'un même nodule sont, en général, relativement plus proches l'un de l'autre, avec quelques exceptions.

Afin d'augmenter le polymorphisme observé sur un profil, une amplification à partir de deux amorces au lieu d'une seule a été testée (voir Figure 20). Le nombre de

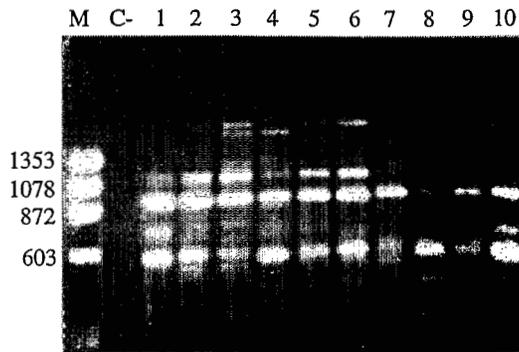


Figure 16 : amplification aléatoire de l'ADN d'*O. volvulus* de différentes origines à l'aide de l'amorce OPB-4. M : marqueur de taille (Φ X-174 digéré par *Hae* III) donnée en pb. C- : controle négatif ; 1 et 2 : deux vers de Touboro ; 3 et 4 : deux vers de Poli ; 5 et 6 : deux vers de Bafia ; 7 et 8 : deux vers de Sa'a ; 9 et 10 : deux vers de la Sierra Leone (Lundsar).

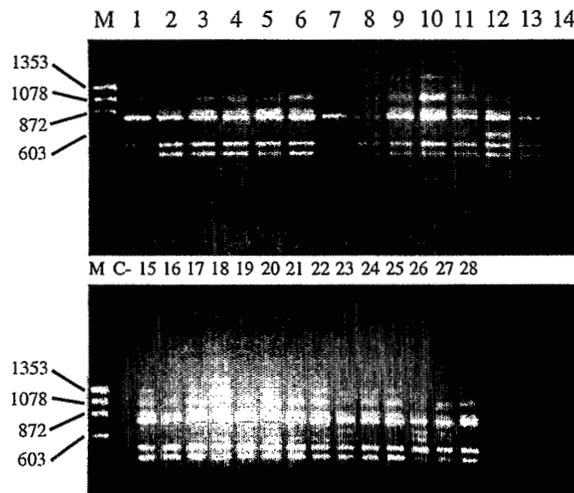


Figure 17 : amplification aléatoire de l'ADN d'*O. volvulus* du Cameroun à l'aide de l'amorce OPB-7. M : marqueur de taille (Φ X-174 digéré par *Hae* III) donnée en pb. C- : controle négatif ; 1 à 7 : vers de Touboro (T1-1-1, T2-1-1, T2-1-2, T2-1-3, T2-1-4, T2-1-5, T2-1-6) ; 8 à 14 : vers de Poli (P6-1-1, P6-1-2, P6-1-3, P6-1-4, P6-1-5, P6-1-6, P6-2-1) ; 15 à 21 : vers de Bafia (B7-1-1, B8-1-1, B9-1-1, B9-1-2, B9-1-3, B9-1-4, B11-3-1) ; 22 à 28 : vers de Sa'a (S12-1-1, S12-1-2, S12-1-3, S13-1-1, S13-1-2, S14-1-1, S14-1-2).

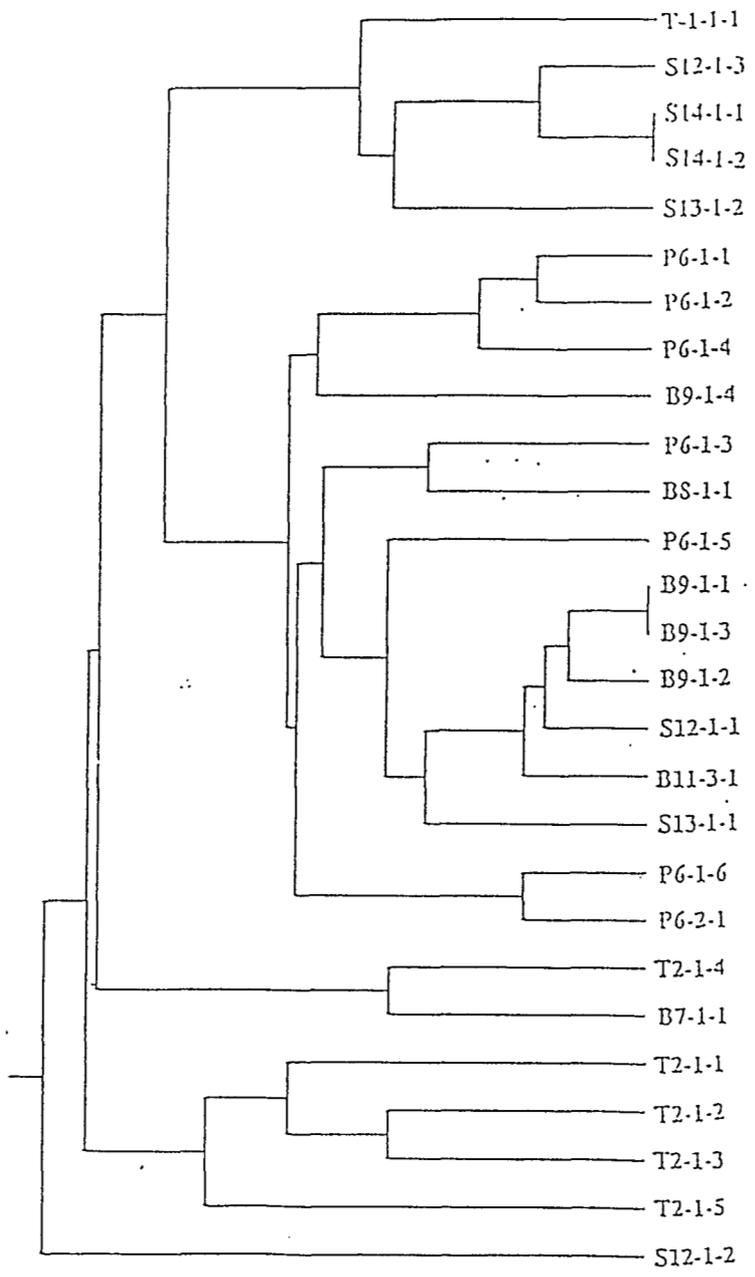


Figure 18 : arbre phénétique construit à partir d'amplifications aléatoires de l'ADN (RAPD) sur l'ADN de différents isolats d'*O. volvulus* du Cameroun. La matrice des distances a été calculée à l'aide de l'indice de Jaccard qui ne prend en compte que les bandes communes. (Les vers sont répertoriés selon la nomenclature définie précédemment)

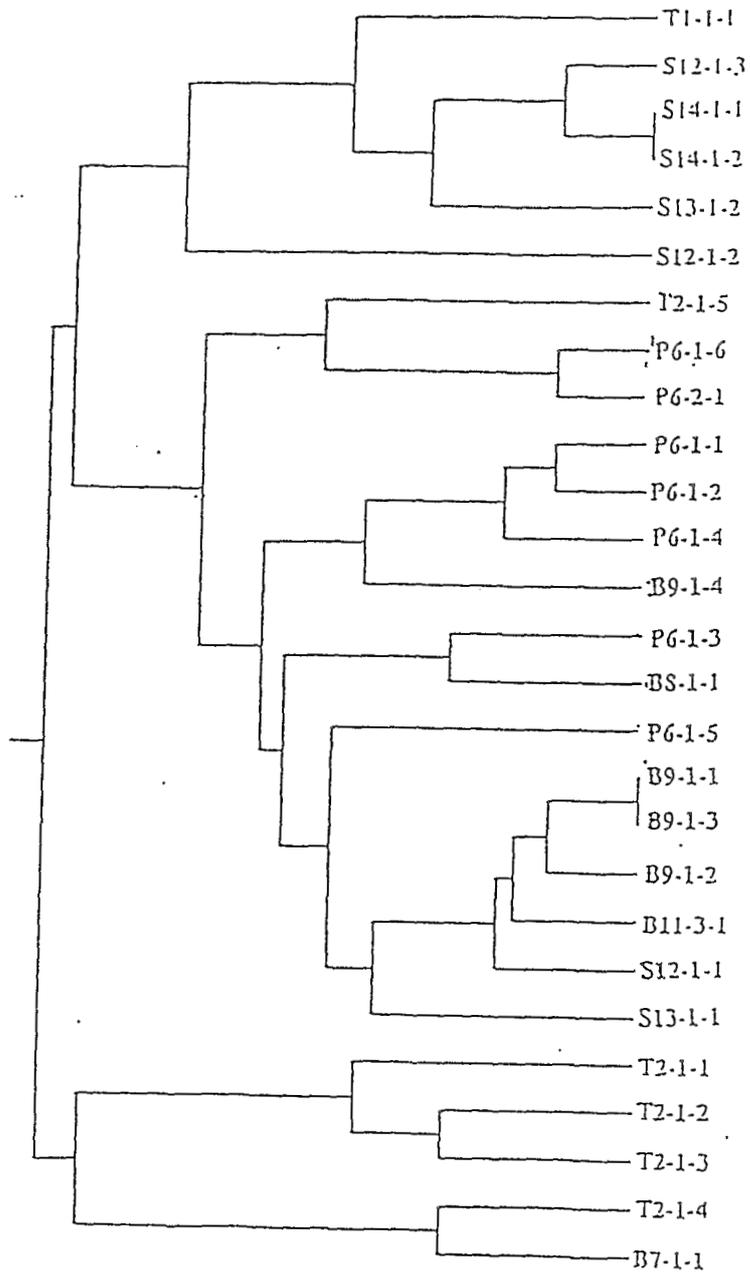


Figure 19 : arbre phénétique construit à partir d'amplifications aléatoires de l'ADN (RAPD) sur l'ADN de différents isolats d'*O. volvulus* du Cameroun. La matrice des distances a été calculée à l'aide de l'indice de Sokal-Michener qui prend en compte la présence et l'absence de bandes partagées par un même individu. (Les vers sont répertoriés selon la nomenclature définie précédemment)

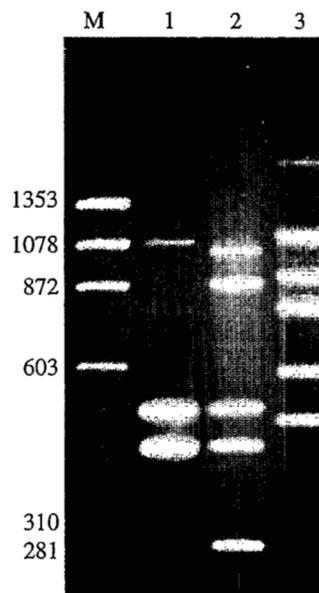


Figure 20 : comparaison des profils obtenus avec une et deux amorces pour l'ADN d'un ver de la Sierra Leone. M : marqueur de taille (Φ X-174 digéré par *Hae* III) donnée en pb. C- : controle négatif ; 1 : ADN amplifié par l'amorce OPB-7 ; 2 : ADN amplifié par les amorces OPB-7 et OPB-8 ; 3 : ADN amplifié par l'amorce OPB-8.

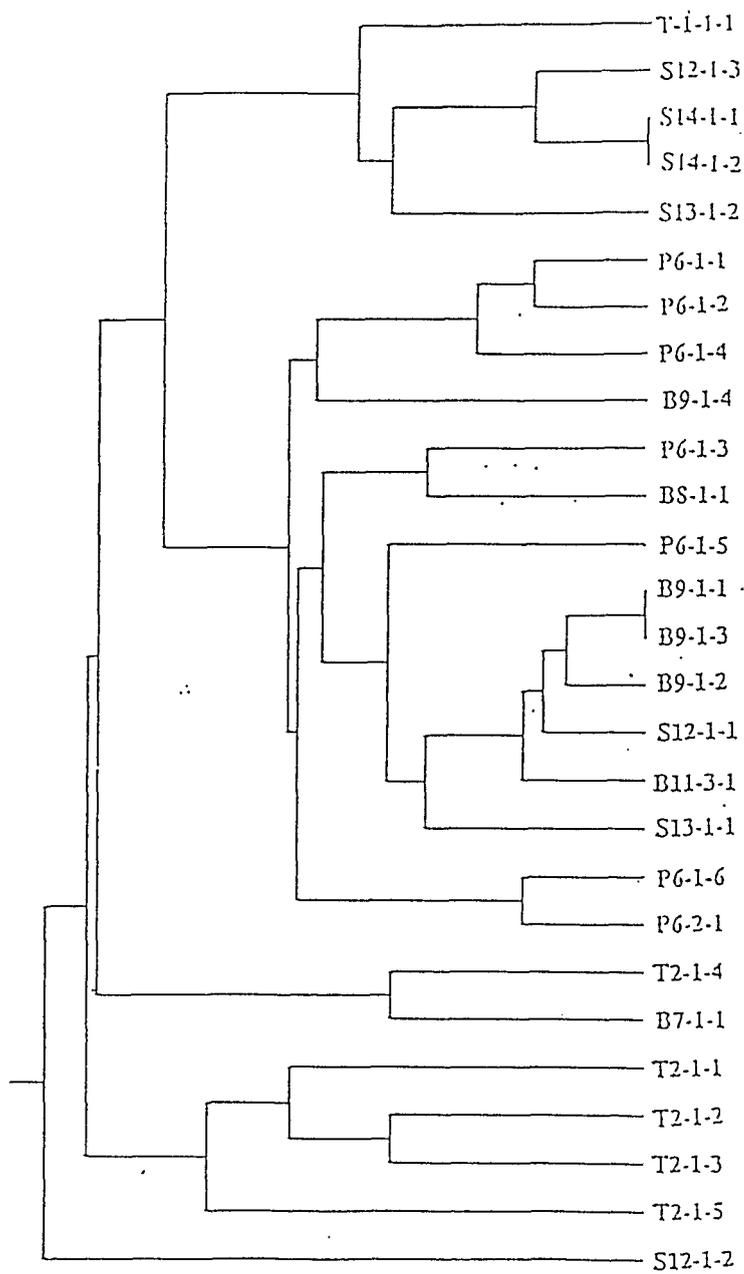


Figure 18 : arbre phénetique construit à partir d'amplifications aléatoires de l'ADN (RAPD) sur l'ADN de différents isolats d'*O. volvulus* du Cameroun. La matrice des distances a été calculée à l'aide de l'indice de Jaccard qui ne prend en compte que les bandes communes. (Les vers sont répertoriés selon la nomenclature définie précédemment)

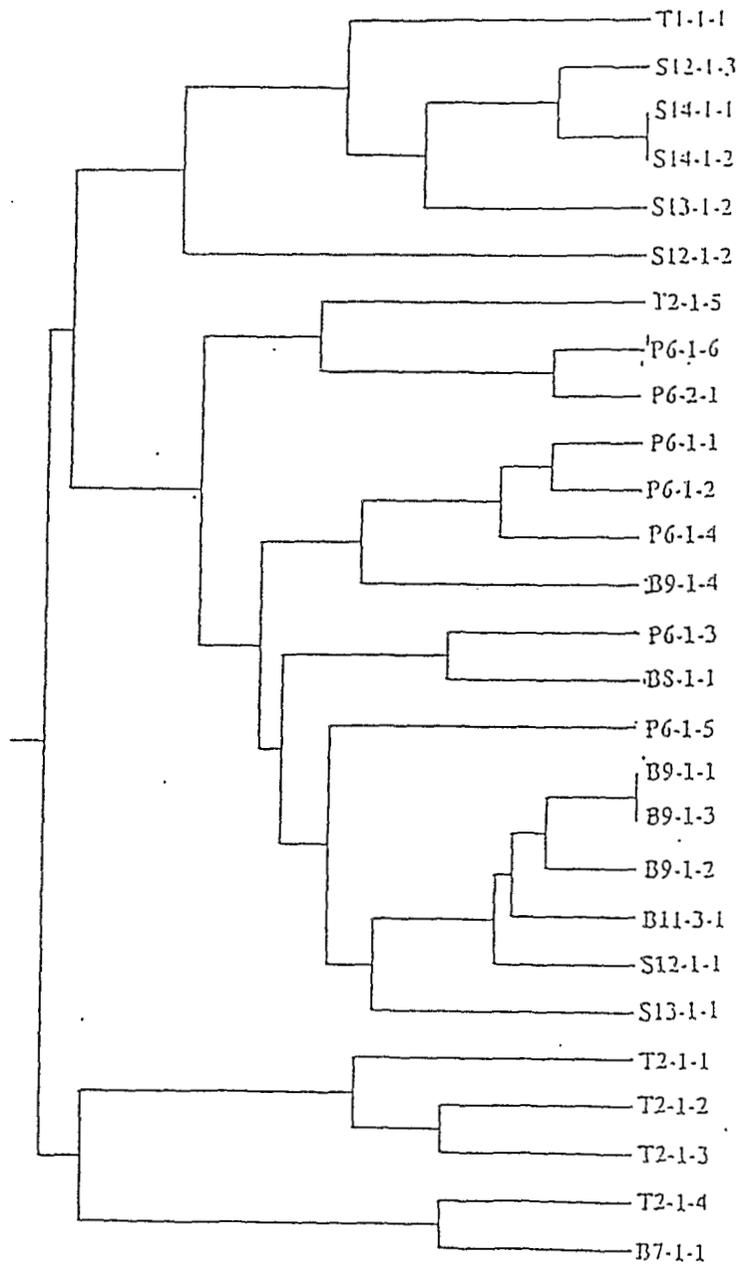


Figure 19 : arbre phénétique construit à partir d'amplifications aléatoires de l'ADN (RAPD) sur l'ADN de différents isolats d'*O. volvulus* du Cameroun. La matrice des distances a été calculée à l'aide de l'indice de Sokal-Michener qui prend en compte la présence et l'absence de bandes partagées par un même individu. (Les vers sont répertoriés selon la nomenclature définie précédemment)

bandes observées est souvent équivalent à celui observé avec une amorce ; il y a un changement de la taille des fragments plutôt qu'une augmentation de leur nombre.

III. La mise au point des marqueurs microsatellites

1) Isolement de séquences microsatellites

La méthode de clonage dans le bactériophage M13 (banque partielle : "shotgun cloning") a permis d'isoler environ 10.000 clones. Ces clones blancs sont des plages de moindre croissance des bactéries (analogue aux plages de lyse) ; ceux-ci représentent les phages ayant intégré un fragment d'ADN génomique d'*O. volvulus*. Sur ces 10.000 clones testés par hybridation, 32 se sont révélés positifs pour l'une ou l'autre des sondes testées ((CA)_n, (GA)_n, (GATA)₄ et (CAC)₅) ; ces 32 clones positifs ont été séquencés. Le séquençage a montré que 18 clones sur 32 sélectionnés par hybridation et autoradiographie ne contenaient pas de séquences microsatellites. L'obtention de ces faux positifs dans la phase de recherche de séquences microsatellites est due à des homologies imparfaites entre ces clones et la sonde microsatellite utilisée dont l'explication est la présence de régions riches en A et la faible stringence des lavages utilisée.

Les 14 clones restants comprenaient tous une séquence microsatellite. Un clone contenait une répétition dont le motif de base était GATA, trois autres une répétition avec GA/CT pour motif de base, mais les répétitions CA/GT restaient les plus fréquentes (10 clones isolés).

Sur ces 14 séquences microsatellites isolées, une seule (une séquence CA/GT répétée) a pu être utilisée dans notre étude (voir Figure 21). En effet, les treize autres clones isolés contenaient des séquences microsatellites qui étaient tronquées. La plupart étaient coupées au niveau de la région flanquant les séquences microsatellites, soit en amont, soit en aval, ce qui interdisait de définir des amorces pour l'amplification de ces séquences. La technique de coupure, c'est à dire le choix des enzymes de restriction, peut être modifiée afin d'éviter au maximum le clivage par ces enzymes dans la séquence microsatellite.

ACTTTTAGCATTCCCATTGTCACGCGAAAAAATGAAACTTTTTTACACgAC
ACACACACACACACACACACACATACACACAGACAC
ATACATACACATACACACATAAAATGTTGGAATAAGTAAGGCCGCA
TCATTGGGATGTTTTTTCAGTAGAGACACAACTGTGCACTTTTACACTCACAAG

Figure 21 : séquence microsatellite utilisée pour amplifier l'ADN de différents isolats d'*O. volvulus* du Cameroun.
Les bases indiquées en minuscule représentent des insertions et les bases indiquées en gras représentent des mutations ponctuelles.
Les parties soulignées ont servi à la construction d'amorces permettant l'amplification de cette séquence microsatellite par la PCR.

2) Amplification des séquences microsatellites

a) Adaptation du protocole

Les différents paramètres de la réaction d'amplification des loci microsatellites ont été testés. Certains sont plus importants que d'autres, notamment la concentration en chlorure de magnésium, la température de fixation des amorces et le nombre de cycles d'amplification.

- La concentration en chlorure de magnésium ($MgCl_2$) a été étalonnée à l'aide d'une gamme de concentration allant de 0,5mM jusqu'à 4mM finale. On constate qu'une augmentation de la concentration en chlorure de magnésium augmente l'intensité du signal et par conséquent, le nombre de bandes parasites. Il faut donc choisir une concentration qui permette un compromis entre intensité du signal et absence de bruit de fond. Une concentration finale de 1mM en chlorure de magnésium nous a permis de concilier ces deux exigences.

- La température de fixation des amorces est donnée par leur composition en bases (A, C, G et T). Cependant, il a été souvent nécessaire d'adapter cette température en fonction des profils observés (apparition de bandes "parasites"). Une augmentation de la température de fixation des amorces ("annealing") a souvent permis d'obtenir des profils d'amplification plus nets.

- Le nombre de cycles d'amplification ainsi que la durée de chacun d'eux posent les mêmes problèmes que le paramètre précédent (température de fixation), c'est à dire l'apparition de bandes parasites. En effet, si le nombre de cycles d'amplification est trop important, certains fragments (artefacts) seront présents en plus grande quantité. Une diminution du nombre de cycles (jusqu'à 20) et de la durée de chaque étape d'amplification (30 secondes au lieu d'une minute) permet de faire disparaître, la plupart du temps, les artefacts d'amplification observés.

- Une modification récente du protocole (MELLERSH et SAMPSON, 1993), en liaison avec les paramètres température et nombre de cycles, a été tentée. Selon cette méthode, l'amplification démarre avec une température de fixation des amorces supérieure de 10°C à la température normalement utilisée. En diminuant la température de fixation des amorces de 1°C tous les deux cycles jusqu'à atteindre la température de fixation normale des amorces au bout de 20 cycles, une amélioration de la lecture des gels doit être obtenue. Ceci n'a pas amené d'amélioration notable dans notre cas et nous

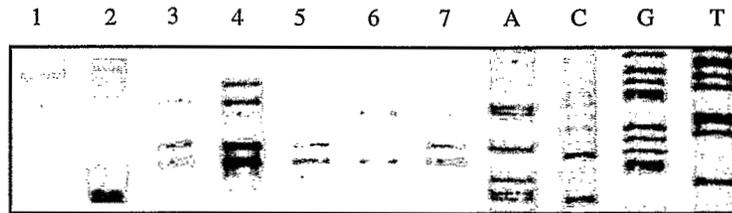


Figure 22 : amplification de l'ADN d'*O. ochengi*, d'*O. dukei* et de différents isolats d'*O. volvulus* à l'aide d'amorces microsatellites. 1 : *O. ochengi* ; 2 : *O. dukei* ; 3 : *O. volvulus* (B11-1-1) ; 4 : *O. volvulus* (B8-1-1) ; 5 : *O. volvulus* (P6-4-2) ; 6 : *O. volvulus* (P6-1-5) ; 7 : *O. volvulus* (T1-6-2). A, C, G, T représentent les marqueurs de taille : la séquence du bactériophage M13.

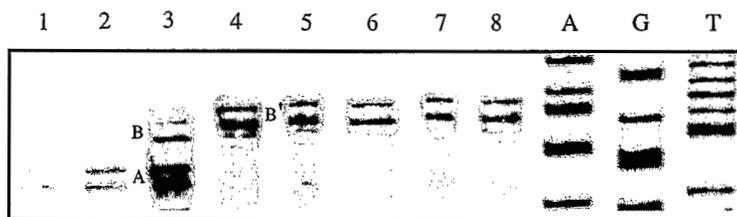


Figure 23 : amplification de l'ADN d'*O. volvulus* de Touboro à l'aide d'amorces microsatellites. 1 et 2 : vers d'un même nodule (T1-1-1 et T1-1-3) ; 3 : vers du même patient que précédemment mais d'un autre nodule (T1-6-1) ; 4 à 8 : vers d'un même nodule, autre patient (T2-1-1, T2-1-2, T2-1-3, T2-1-4 et T2-1-5). A, G, T représentent les marqueurs de taille : séquence du bactériophage M13. A, B et B' sont les trois allèles du locus microsatellite.

avons donc abandonné cette adaptation du protocole d'amplification des séquences microsatellites.

- L'adjonction d'albumine sérique bovine (BSA) a été testée car elle permet de diminuer considérablement les artefacts d'amplification observés souvent lors de réaction de polymérisation par PCR. Une gamme de concentrations finales allant de 50µg/ml à 200µg/ml a été utilisée dans les conditions standard d'amplification. Aucune amélioration de la qualité des résultats (présence d'artefacts d'amplification) n'a été constatée quelle que soit la concentration de BSA additionnée ; nous ne l'avons donc pas utilisée pour le reste de notre étude.

- Les autres paramètres étudiés semblent moins importants que ceux présentés ci-dessus. Ainsi, une variation de la quantité d'ADN de départ ("template") comprise entre 5 et 100ng ne change que très peu la qualité des résultats. Il en va de même pour la quantité de nucléotides marqués ou non au soufre 35.

b) Lecture et analyse des amplifications

La migration des produits d'amplification de loci microsatellites sur gel dénaturant permet d'individualiser des bandes (lecture à la base près) qui correspondent aux allèles des loci étudiés (voir Figure 22 et 23). Pour un organisme diploïde, il ne peut apparaître que deux bandes (allèles) au maximum (pour un hétérozygote). Cependant, lors de la lecture des autoradiographies, des bandes "parasites" apparaissent, qui sont en général, de taille plus faible et de moindre intensité. Ce sont probablement des artefacts d'amplification, provoqués par des glissements lors de la polymérisation (WEBER et MAY, 1989 ; FRIES *et al.*, 1990). La présence de ces bandes est liée aux conditions d'amplification, notamment à des paramètres comme la concentration en chlorure de magnésium et la température de fixation des amorces.

L'amplification du locus microsatellite a été effectuée sur 54 vers provenant du Cameroun (48) et de la Sierra Leone (6). Des amplifications sur d'autres espèces de filaires ont également été tentées. Seuls les ADN d'*O. dukei* et d'*O. ochengi* ont été amplifiés (voir Figure 22) ; les produits d'amplification étaient facilement différenciables de ceux obtenus pour les différents isolats d'*O. volvulus* (environ 10pb de différence). Aucune amplification n'a été observée ni pour les ADN des autres espèces de filaires testées (*O. gibsoni*, *O. gutturosa* et *D. immitis*) ni pour l'ADN humain.

TOUBORO	POLI	BAFIA	SA'A	SIERRA LEONE
1-1-1 : AA	6-1-1 : BB'	7-1-1 : B'B'	12-1-1 : AB'	Ov 1 : AA
1-1-2 : AB'	6-1-4 : BB'	8-1-1 : AB'	12-1-2 : AB'	Ov 2 : AA
1-1-3 : AA	6-1-5 : AB	9-1-1 : AB'	12-1-3 : AA	Ov 3 : AA
1-6-1 : AB	6-1-6 : AB'	9-1-2 : AB'	13-1-1 : AB'	Ov 4 : AA
1-6-2 : AB	6-2-1 : AB'	9-1-3 : AA	13-1-2 : AB'	Ov 5 : AA
2-1-1 : B'B'	6-3-1 : AB	9-1-4 : AA	14-1-1 : AB'	Ov 6 : AA
2-1-2 : B'B'	6-4-1 : AB	11-1-1 : AB'	14-1-2 : AB	
2-1-3 : B'B'	6-4-2 : AB	11-3-1 : AB'	14-2-1 : AB'	
2-1-4 : B'B'		Ov 11 : AB'	14-2-2 : AB'	
2-1-5 : B'B'		Ov 12 : AB'	14-3-1 : AB'	
4-2-1 : BB'		Ov 13 : AB		
4-2-2 : AB'		Ov 14 : AB		
5-1-1 : BB'				
Ov 7 : AB'				
Ov 8 : AB'				
Ov 9 : BB				
Ov 10 : AB'				
Ov 15 : AB				
18 individus	8 individus	12 individus	10 individus	6 individus
f(A) = 0,33 f(B) = 0,2 f(B') = 0,47	f(A) = 0,44 f(B) = 0,31 f(B') = 0,25	f(A) = 0,54 f(B) = 0,08 f(B') = 0,38	f(A) = 0,55 f(B) = 0,05 f(B') = 0,4	f(A) = 1

Figure 24 : Résultats obtenus par amplification du locus microsatellite sur différents isolats d'*O. volvulus*. Les vers sont répertoriés selon la nomenclature définie précédemment ; les vers appelés Ov(n) représentent l'ensemble des vers de nodules qu'il n'a pas été possible d'individualiser. Les fréquences alléliques (3 allèles) ont été calculées pour chacun des foyers étudiés.

Les produits d'amplification obtenus pour les différents isolats d'*O. volvulus* (18 vers de Touboro, 8 vers de Poli, 12 vers de Bafia, 10 vers de Sa'a et 6 vers de la Sierra Leone) ont été analysés pour le seul locus microsatellite dont nous disposions. La taille du produit d'amplification attendue était de 188pb (voir Figure 23). Les allèles de ce locus microsatellite se présentaient toujours sous forme d'un doublet de bandes (toujours séparées par 3 bases), ce qui est probablement dû à des glissements lors de l'amplification. Dans notre cas, un doublet représente donc un allèle. Au total, trois allèles ont été obtenus pour les différents isolats d'*O. volvulus* testés (voir Figure 23) ; un premier allèle, appelé A (doublet de 188 et 191pb) représente le fragment de taille attendue, et deux autres allèles B et B' (doublet de 196-199pb et de 198-201pb respectivement). Les résultats obtenus pour chacun des vers sont donnés dans la figure 24 ; les fréquences de chacun des allèles sont données à titre indicatif car, pour un seul locus, l'échantillon dont nous disposions était trop petit pour être interprété de façon statistique. On peut cependant constater que pour les isolats provenant de la Sierra Leone, seul l'allèle A est présent. De plus, pour les souches de savane du Cameroun l'allèle B est nettement plus représenté que pour les souches de mosaïque savane-forêt.

Bilan du Chapitre III

Différents isolats d'*O. volvulus* du Cameroun ont été utilisés pour tester les sondes d'ADN spécifiques développées en Afrique de l'Ouest ; tous nos isolats ont été reconnus par la sonde spécifique d'*O. volvulus* ainsi que par la sonde spécifique des souches de savane d'Afrique de l'Ouest. Ces outils n'étaient donc pas utilisables pour notre étude, puisqu'incapables de discriminer les différentes populations d'*O. volvulus* du Cameroun dont nous disposions.

La technique des RAPD a donc été mise au point sur différentes espèces de filaires du genre *Onchocerca* et a montré une grande capacité à générer du polymorphisme. Appliquée à nos différents isolats d'*O. volvulus* du Cameroun, cette technique s'est avérée peu efficace pour classer ces populations. De plus, des résultats reproductibles sont souvent longs et difficiles à obtenir. Cependant, la technique des RAPD peut permettre d'obtenir aisément de nouvelles sondes d'ADN spécifiques, ce qui fut le cas pour *O. ochengi*.

Par conséquent, des marqueurs microsatellites ont été recherchés dans le génome d'*O. volvulus*. Plusieurs séquences microsatellites ont ainsi été isolées ; une seule s'est avérée utilisable pour notre étude. Ce locus a montré qu'il était polymorphe, puisque trois allèles ont pu être identifiés chez différents isolats d'*O. volvulus* du Cameroun et de la Sierra Leone. Tous les vers de la Sierra Leone sont homozygotes et possèdent le même allèle tandis que l'hétérozygotie est importante chez les vers du Cameroun. La taille de notre échantillon interdit cependant toute interprétation génétique de nos résultats.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

I. Valeur des outils utilisés pour l'étude de la variabilité génétique d'*O. volvulus*

Rappelons que, dans le cas des nouveaux marqueurs développés, l'objectif était de répondre aux questions suivantes :

- permettent-ils de détecter un éventuel polymorphisme entre populations de vers et d'obtenir des empreintes génétiques de ces populations ?
- ce polymorphisme est-il utilisable dans des études de génétique des populations ?
- ces méthodes sont-elles fiables et reproductibles ?

Nous aborderons donc successivement les différents marqueurs utilisés :

1) Les sondes d'ADN

Ces outils, développés en Afrique de l'Ouest, se sont avérés inefficaces pour la classification des populations d'onchocercs du Cameroun que nous avons étudiées. En effet, tous les isolats du Cameroun testés avec la sonde spécifique des souches de savane d'Afrique de l'Ouest ont répondu positivement à l'hybridation, bien qu'on ait pu s'attendre à certaines différences de réponses liées à des différences nosologiques. Les populations du Cameroun dont nous disposons proviennent en effet de deux foyers de savane (Touboro et Poli) et de deux foyers de mosaïque savane-forêt (Bafia et Sa'a). Il est cependant possible que le parasite circulant dans ces deux derniers foyers soit issu des zones de savane et qu'il ait pénétré les zones de forêt dégradée. Dans ce cas les sondes d'Afrique de l'Ouest seraient efficaces et un contrôle serait nécessaire avec des souches de forêt du Cameroun. Néanmoins, même si cette hypothèse était avérée (ce qui est loin d'être le cas, puisque même dans le cadre de l'OCP, elles ont prouvé leurs

limites), ces sondes d'ADN ne permettent pas de séparer les populations étudiées qui sont responsables pourtant de signes cliniques tout à fait différents selon les foyers.

Ces outils moléculaires ne sont donc pas adaptés à notre étude puisqu'ils ne permettent pas de distinguer les différentes populations d'*O. volvulus* dont nous disposons. De plus, il n'est pas possible d'étudier, par cette technique, la variabilité génétique du parasite qui est pourtant un paramètre important de l'épidémiologie de l'onchocercose.

De nouveaux marqueurs des populations ont donc été recherchés, qui permettent à la fois de distinguer les différentes souches d'*O. volvulus* et d'étudier éventuellement la génétique des populations de ce parasite.

2) Les "RAPD"

Les résultats de notre étude montrent que la technique des RAPD peut être utilisée pour amplifier des fragments d'ADN génomique de certaines espèces du genre *Onchocerca*. Des profils d'amplification ont en effet été obtenus pour toutes les espèces testées (*D. immitis*, *O. gutturosa*, *O. lienalis*, *O. dukei*, *O. gibsoni*, *O. ochengi* et *O. volvulus*).

Le principal problème rencontré lors de l'utilisation de la technique des RAPD se situe au niveau de la reproductibilité des expérimentations. Comme nous l'avons vu lors de la présentation des résultats, les conditions dans lesquelles sont conduites les amplifications sont variables en fonction des paramètres physico-chimiques de la réaction. Nous avons montré que des variations de la quantité de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) et d'ADN à amplifier ("template") peuvent hypothéquer l'obtention de résultats reproductibles. En effet, selon les diverses concentrations de réactifs utilisées, des variations dans les profils sont observées pour un même échantillon (apparition de nouvelles bandes, disparitions de certaines autres). Il convient donc d'étalonner de façon très précise tous les paramètres de la réaction de manière à obtenir des résultats comparables pour les différents échantillons que l'on désire tester. Dans ces conditions, la méthode peut être considérée comme relativement fiable.

Nous l'avons donc utilisée tout d'abord sur différentes espèces de filaires afin de voir si les résultats obtenus étaient cohérents avec les données phylogénétiques issues des études morpho-anatomiques (BAIN, 1981). Des profils d'amplification ont été obtenus pour toutes les espèces de filaires testées ainsi que pour toutes les populations

d'*O. volvulus* étudiées. Les résultats sur la phylogénie des espèces seront discutés dans les paragraphes suivants.

Les principales difficultés rencontrées lors de l'adaptation de la technique des RAPD à *O. volvulus* sont à imputer à la reproductibilité des expérimentations. Il est nécessaire de répéter de nombreuses fois les amplifications de chaque échantillon afin de valider les profils obtenus ; il faut donc pouvoir disposer de suffisamment de matériel (ADN). Ceci est un problème important pour l'utilisation de cette technique sur des échantillons provenant du terrain qui ne contiennent que très peu d'ADN. C'est le cas notamment des microfilaires isolées et des larves infectantes (L3) d'*O. volvulus*.

Un autre point important dont il faut tenir compte dans l'utilisation de la technique des RAPD est la présence éventuelle d'ADN contaminant. En effet, l'utilisation de contrôles négatifs d'amplification ne met en évidence que des contaminations ayant eu lieu lors de la manipulation des échantillons au laboratoire. Dans notre cas précis, l'extraction de l'ADN du parasite se fait à partir de vers issus de nodules humains. Les nodules onchocerquiens ont une texture fibreuse (collagène) et sont digérés à l'aide d'une collagénase dégradant le tissu humain ; malgré cette digestion et un nettoyage important des vers de toutes traces de tissu humain pouvant subsister, il n'est pas à exclure que de l'ADN humain soit isolé en même temps que l'ADN du parasite. Cette hypothèse a d'ailleurs été testée en amplifiant nos échantillons d'ADN d'*O. volvulus* à l'aide d'amorces spécifiquement humaines ; nous nous sommes effectivement aperçus que plus de la moitié de nos échantillons présentaient des traces d'ADN humain ce qui les rendaient de ce fait inutilisables pour les RAPD. En effet, même s'il n'est présent que sous forme de traces, l'ADN humain peut être amplifié et générer ainsi des fragments qui interfèrent avec ceux obtenus à partir du ver.

Le problème est similaire pour l'application de cette technique à l'identification des formes parasitaires présentes chez le vecteur (simulie). Les profils obtenus alors sont la résultante de l'amplification de l'ADN du vecteur et de celui du parasite. Il y aura ainsi superposition des deux types de fragments ce qui rendra les profils d'amplification inutilisables.

3) Les séquences d'ADN microsatellites

Des séquences d'ADN microsatellites ont été recherchées afin de pouvoir classer différentes populations d'*O. volvulus*. Notre travail a montré que, comme dans

la plupart des génomes eucaryotes (TAUTZ et RENZ, 1984), il était possible d'isoler ce type de séquences du génome d'*O. volvulus*.

Le premier problème rencontré lors de la recherche de l'ADN microsatellite était, à l'instar des RAPD, de pouvoir disposer d'ADN d'*O. volvulus* pur, sans trace d'ADN humain pour éviter les interférences. Il convenait donc de s'assurer au préalable, grâce à une amplification à l'aide d'amorces spécifiques humaines dans notre cas, de l'absence d'ADN humain dans nos échantillons.

L'ADN génomique d'*O. volvulus* utilisé pour construire une banque partielle a été coupé à l'aide d'enzymes de restriction. Ces enzymes ont été choisies parce qu'elles possédaient des sites de reconnaissances courts (quatre enzymes à 4pb et une à 5pb). Ces sites étaient donc statistiquement plus nombreux dans l'ADN génomique d'*O. volvulus*, ce qui permettait d'obtenir des fragments de petite taille faciles à séquencer. Les fragments ainsi générés avaient une taille moyenne comprise entre 200 et 500pb. Cette taille est parfaitement convenable pour le séquençage, puisqu'un clone peut être séquencé en une seule fois, mais pose un problème au niveau de l'intégralité de la séquence microsatellite. Si les régions flanquantes séquencées ne sont pas assez longues (au moins 30pb), la séquence microsatellite est inutilisable car aucune amorce ne pourra être définie. Ceci a été le cas de figure le plus souvent rencontré lors de la phase de recherche de séquences microsatellites puisque 13 de ces séquences, sur 14, étaient tronquées. Un moyen de pallier ce travers serait sans doute de cloner des fragments plus longs, mais ceci rallongerait considérablement le temps d'obtention des séquences de clones isolés par des techniques déjà longues à mettre en oeuvre. De nouvelles méthodes qui devraient permettre une amélioration de l'isolement de séquences microsatellites sont actuellement en cours de développement (HAWKINS, 1992 ; OSTRANDER *et al.*, 1992). Certaines d'entre elles permettent, à l'aide de billes magnétiques, d'enrichir significativement en séquences microsatellites, les banques construites.

La différence de taille des fragments d'amplification (allèles) pouvant être une seule paire de base, l'utilisation d'une technique de visualisation très résolutive (gel d'acrylamide dénaturant et soufre 35) a été nécessaire ; cette technique est assez fastidieuse à mettre en oeuvre de par la longueur des manipulations et l'utilisation de produits radioactifs. Les différences de taille entre allèles seront d'autant plus grandes que le motif de base de la répétition sera long. Il est en effet plus facile de distinguer une différence d'une unité de répétition dans le cas d'un motif à quatre paires de bases

(GATA par exemple) que dans le cas d'un motif à deux paires de bases (CA). Dans un but de simplification de la technique, il est donc avantageux d'isoler des séquences microsatellites constituées de répétitions dont le motif de base est le plus long possible, même si elles sont moins fréquentes dans le génome.

Malgré ces contingences techniques, une fois isolées, ces séquences peuvent être amplifiées facilement et permettent d'obtenir des résultats très fiables et d'une définition bien supérieure aux autres marqueurs existants (KARL et AVISE, 1993). Elles peuvent être traitées de la même manière que les isoenzymes et possèdent un taux de polymorphisme plus élevé (HUGHES et KELLER, 1993). De plus, contrairement à la technique des RAPD, la région amplifiée est connue, ce qui permet des analyses en terme de génétique des populations avec moins de conditions restrictives (SOBRAL et HONEYCUTT, 1993).

II. Valeur des outils pour l'épidémiologie et la lutte

1) Les sondes d'ADN

Les sondes d'ADN issues de la "famille" de répétition de 150pb développées pour l'Afrique de l'Ouest sont largement utilisées pour les études épidémiologiques en relation avec la lutte contre l'onchocercose dans le cadre de l'OCP. Elles ont prouvé leur efficacité en Afrique de l'Ouest et ont permis d'améliorer la détection et l'identification des larves d'*O. volvulus* présentes chez leur vecteur, la simulie (MEREDITH *et al.*, 1991). Auparavant, les simulies étaient disséquées individuellement pour estimer certains paramètres importants de la transmission (potentiel annuel de transmission...). Le problème principal rencontré lors de la dissection des simulies parasitées était de distinguer les larves infectantes d'*O. volvulus* de celles d'*O. ochengi* qu'on ne pouvait séparer à partir de caractères morphologiques. Les sondes d'ADN développées dans le cadre du programme OCP ont permis de résoudre cet important problème et d'améliorer la surveillance entomologique. Rappelons que la reprise des traitements larvicides serait décidée si plus de quinze larves infectantes (L3 d'*O. volvulus*) se trouvaient isolées de 15.000 simulies paires. Un laboratoire de biologie moléculaire a été installé en Afrique de l'Ouest (Bouaké, Côte d'Ivoire) et permet de traiter directement le matériel biologique provenant du terrain. Plusieurs centaines de milliers de simulies ont été disséquées et plusieurs centaines de larves infectantes ont pu être identifiées à l'aide de

ces sondes d'ADN. Le potentiel pathogène d'une souche (distinction savane-forêt) a également pu être prédit avec une sensibilité et une spécificité dépassant 90% (ZIMMERMAN *et al.*, 1992 et 1994).

Le succès de l'utilisation de l'outil moléculaire dans le cadre d'études épidémiologiques et de la lutte antivectorielle (programme OCP) a montré qu'il était maintenant envisageable de transférer ces technologies sur le terrain. Néanmoins, certaines recherches restent nécessaires pour l'application de ces techniques au sein ou hors de la zone du programme de lutte contre l'onchocercose. En effet, une proportion significative d'échantillons d'*O. volvulus* récoltés dans certaines régions de savane couvertes par l'OCP n'a pas été reconnue par la sonde spécifique correspondante (MEREDITH, com. pers.). Il est donc nécessaire de développer de nouvelles techniques permettant de résoudre ces différentes questions.

2) RAPD, épidémiologie et lutte contre l'onchocercose

Cette technique n'a pas permis de distinguer clairement les différents isolats d'*O. volvulus* du Cameroun que nous avons étudiés. Les vers provenant d'un même foyer ou d'un même nodule ne sont pas toujours situés au même niveau sur les arbres phénétiques construits (voir Figure 19). Un profil d'amplification ne peut, dans notre cas, permettre l'identification à coup sûr d'une population d'*O. volvulus*. De plus, aucun fragment polymorphe qui serait caractéristique de l'une des populations de parasites n'a été observé. Il est possible cependant qu'en utilisant un plus grand nombre d'amorces aléatoires que celui utilisé dans ce travail (20), des fragments polymorphes caractéristiques de certaines souches soient isolés.

Cette technique utilisée telle qu'elle ne peut donc être un outil diagnostique des différentes souches d'*O. volvulus* et par conséquent, ne permet pas de distinguer les différents faciès épidémiologiques de l'onchocercose. En effet, les profils obtenus sont traités de manière statistique en terme de diversité ou de distance génétique et ne permettent pas, dans notre cas, de classer à coup sûr une souche individuelle dans un groupe précis.

Malgré les travers que nous venons de mentionner, la technique de l'amplification aléatoire présente un certain nombre de potentialités. Les profils obtenus pour différentes espèces du genre *Onchocerca* présentaient des bandes spécifiques pour chaque espèce. Certaines d'entre elles ont été isolées afin de tester leur capacité comme sondes spécifiques. Habituellement, les sondes spécifiques sont construites à partir de

banques génomiques ce qui nécessite un gros effort en terme de temps, de compétence et de moyens. Les RAPD permettent, après une simple amplification, d'isoler des fragments spécifiques qui sont des sondes potentielles qu'il convient de tester. Dans le cadre de la lutte contre l'onchocercose, un des problèmes majeur est l'identification des larves infectantes que l'on rencontre chez le vecteur. Il est donc nécessaire de disposer de sondes spécifiques d'*O. volvulus* mais aussi d'*O. ochengi*. Les sondes utilisées actuellement (oligonucléotides) pour *O. ochengi* sont limitées puisque certains isolats de cette filaire ne sont pas reconnus. Certains fragments spécifiques d'*O. ochengi* ont été isolés par la technique des RAPD et sont actuellement testés comme sonde spécifique (KIT, Amsterdam). De plus, les premiers résultats obtenus sur les deux filaires des bovins européens (*O. lienalis* et *O. gutturosa*) sont exploités (Ecole vétérinaire de Toulouse) pour obtenir des sondes spécifiques permettant de différencier les microfilaires de ces deux espèces.

Il est donc possible d'envisager à terme, l'isolement de fragments spécifiques de certaines souches d'*O. volvulus* en utilisant un grand nombre d'amorces aléatoires, ce qui permettrait de développer de nouvelles sondes spécifiques.

3) Utilisation des séquences d'ADN microsatellites

Ce type d'outil a été développé chez certaines espèces dans deux buts principaux, la cartographie des génomes et les études de génétique des populations. A notre connaissance, aucun marqueur de ce type n'a encore été développé sur une espèce parasite.

Contrairement à la technique des RAPD, des échantillons parasitaires contaminés par de l'ADN étranger peuvent être utilisés car les amorces microsatellites d'*O. volvulus* n'amplifient ni l'ADN humain, ni l'ADN de la simule.

Les premiers résultats obtenus pour les séquences microsatellites développées chez *O. volvulus* montrent que cette technique peut permettre d'améliorer de façon significative les méthodes de détection et d'identification de ce parasite. La technique utilisée actuellement pour différencier *O. volvulus* et *O. ochengi* passe par une amplification par PCR puis par une hybridation à l'aide de sondes spécifiques. Une simple amplification à l'aide des amorces du locus microsatellite permet de distinguer directement, sur un simple gel, les deux principales espèces de filaires qui peuvent être présentes chez la simule. Ceci évite l'utilisation de sondes d'ADN et diminue par

conséquent le temps nécessaire à l'identification spécifique des larves infectantes ainsi que le coût de traitement des échantillons.

L'amplification de ces séquences apporte une information en terme de fréquences alléliques ; de plus il est possible de trouver des allèles diagnostiques chez certains isolats. En effet, dans le cas des vers de la Sierra Leone, tous les individus sont homozygotes pour l'allèle A (voir Figure 24) ; ceci n'est évidemment pas significatif compte tenu de la taille réduite de notre échantillon mais indique qu'il est possible de différencier certaines souches à l'aide de cette technique, mais pour l'instant, les amorces microsatellites n'ont pas été testées avec des isolats d'*O. volvulus* d'Afrique de l'Ouest de pathogénicité déterminée.

III. Valeur des outils pour les études phylogénétiques

Comme nous l'avons vu au début de ce travail, l'évolution à l'intérieur du genre *Onchocerca* semble relativement récente, notamment dans la lignée des espèces d'*Onchocerca* de bovidés africains à laquelle appartient *O. volvulus* (BAIN, 1981). Les relations entre les espèces du genre ont été confirmées par l'étude des séquences codant pour les ARN ribosomiques (GILL *et al.*, 1988) et sont évidentes au vu des difficultés rencontrées lors de l'isolation de séquences répétées spécifiques des espèces.

1) Les séquences répétées de 150pb (ADN "satellite")

Des études portant sur l'évolution de l'espèce *O. volvulus* en Afrique et en Amérique par l'analyse des séquences répétées (ZIMMERMAN *et al.*, 1991) ont montré que les souches de savane africaine étaient plus proches de celles d'Amérique que de celles de forêt (Liberia). Des relations étroites entre souches américaines et africaines montreraient que le parasite a été introduit outre atlantique à partir du XV^{ème} siècle, lors de la traite des esclaves.

Cependant, l'interprétation de la variabilité de ces séquences répétées (150pb) en terme de phylogénie reste limitée. En effet, le nombre de répétitions de cette séquence est important dans un seul génome et une grande variabilité existe entre elles pour un même individu. Il est donc difficile de savoir si la variabilité observée pour ces séquences est liée à des différences intra-individuelles ou à des différences inter-individuelles.

2) RAPD et diversité génétique

a) Le genre *Onchocerca*

Les principales études menées sur le genre *Onchocerca* ont été faites essentiellement sur la base de critères morphologiques et dans une moindre mesure, par isoenzymologie (ANDREWS *et al.*, 1976 ; FLOCKHART, 1982). La position systématique de chacune des espèces du genre semble ainsi déterminée par la répartition géographique des parasites plutôt que par la place zoologique des hôtes. Actuellement, le genre comprend 24 espèces "suffisamment connues", mais on connaît certainement peu d'espèces par rapport à celles qui existent réellement dans la nature (BAIN, 1981).

L'amplification aléatoire (RAPD) a été menée sur plusieurs espèces de filaires pour tester, dans un premier temps, la capacité de la technique à visualiser du polymorphisme. Les résultats obtenus ont été interprétés en terme de distance génétique en tenant compte d'une part, de la présence partagée d'une bande (indice de Jaccard) et d'autre part, de la présence ou de l'absence partagée d'une bande (indice de Sokal-Michener). Il semble qu'il vaille mieux tenir compte du premier indice (bande partagée) plutôt que du second, puisque, chez deux individus, l'absence d'une bande peut avoir différentes origines et ne signe pas, par conséquent, une proximité génétique. Quoiqu'il en soit, les deux arbres phénétiques ainsi construits sont pratiquement similaires et nous n'analyserons donc que le premier (Figure 15 A).

La plus grande distance génétique observée sépare la filaire du chien *D. immitis* des espèces du genre *Onchocerca*. Deux grands groupes sont également matérialisés : un groupe contenant 3 espèces d'onchocerques du bétail (*O. lienalis*, *O. dukei* et *O. gibsoni*) et un groupe contenant 3 isolats d'*O. volvulus* et *O. ochengi*. Le parasite du ligament cervical des bovins domestiques, *O. gutturosa*, est séparé des autres espèces. Cette espèce étant cosmopolite, il est possible que le test d'autres isolats, en plus de celui d'Angleterre que nous avons étudié, préciserait sa position par rapport aux autres espèces. *O. lienalis* qui vit dans le ligament gastro-splénique des bovins domestiques est étonnamment proche de deux autres espèces (*O. dukei* notamment) qui sont nodulaires. En revanche, la filaire nodulaire des bovins domestiques africains *O. ochengi* se trouve placée dans le même groupe qu'*O. volvulus*. Ceci n'est pas surprenant compte tenu des difficultés rencontrées pour différencier ces deux espèces, notamment lors de campagnes de lutte.

La technique des RAPD s'est avérée suffisamment résolutive pour étudier le polymorphisme génétique du genre *Onchocerca*. Certaines différences apparaissent cependant quand ces données sont comparées à celles obtenues par des critères morphologiques, en particulier les positions relatives d'*O. gutturosa* et d'*O. lienalis*. Ceci est peut être dû à un certain manque de fiabilité de la technique, ou au très petit nombre d'isolats étudiés. Malgré cela, le positionnement des différentes espèces étudiées montre, à l'instar des études morphologiques, une grande homogénéité chez ces parasites.

b) Populations d'*O. volvulus* du Cameroun

Une remarquable hétérogénéité au sein de l'espèce *O. volvulus* a été mise en évidence par des études immunologiques (BRYCESON *et al.*, 1976) et isoenzymatiques (CIANCHI *et al.*, 1985 ; FLOCKHART *et al.*, 1986).

La technique des RAPD appliquée à différents isolats du Cameroun a révélé certaines différences entre les vers étudiés. Ce polymorphisme est cependant faible, ce qui s'explique aisément par la proximité relative des différents foyers étudiés par comparaison à la large répartition du parasite en Afrique. Dans notre analyse, nous utiliserons les distances génétiques calculées à partir des caractères "présence" et "absence" de bandes partagées (indice de Sokal-Michener) car elles apportent plus d'informations. En effet, contrairement au cas rencontré pour plusieurs espèces de filaires, l'absence d'une bande partagée par deux individus de la même espèce a une grande probabilité d'avoir la même origine.

Les données sur la variabilité génétique d'*O. volvulus* tirées des études isoenzymatiques montrent que l'essentiel de la variabilité du ver (entre 70 et 90% selon les loci enzymatiques) se situe au niveau intranodulaire, internodulaire et entre patients d'un même foyer et non entre différents villages ou différents pays comme on pouvait s'y attendre. Les arbres phénétiques construits par la technique des RAPD ne permettent pas de séparer les vers selon leurs foyers d'origine. Trois grands groupes s'individualisent : un groupe contenant la plupart des vers du foyer de Sa'a, un autre groupe avec l'essentiel des vers de Touboro et un troisième, plus hétérogène contenant les vers de Bafia et de Poli. Les vers provenant d'un même nodule sont souvent proches les uns des autres avec quelques exceptions. Il est possible que la technique ne mette en évidence que des différences liées à des séquences à évolution rapide, qui ne seraient pas soumises à la pression de sélection (séquences non codantes) et dont la signification

phylogénétique pourrait être mise en doute. Ces résultats (RAPD) semblent pourtant corrélés avec ceux obtenus par isoenzymologie puisqu'ils montrent également une grande variabilité génétique entre des vers issus d'un même nodule, de nodules excisés d'un même patient ou de nodules excisés de patients d'un même foyer.

L'utilisation des RAPD a donc donné des résultats cohérents avec ceux obtenus par d'autres techniques et renforce l'hypothèse selon laquelle *O. volvulus* est une espèce présentant une hétérogénéité importante ; son statut d'espèce n'est cependant pas à remettre en cause puisque les distances génétiques calculées à partir des données isoenzymologiques restent dans l'intervalle attendu pour des populations de la même espèce séparées géographiquement.

3) Les séquences microsatellites

Ces séquences se sont avérées être des outils performants pour les études de génétique des populations (AMOS *et al.*, 1993 ; QUELLER *et al.*, 1993 ; WALL *et al.*, 1993). Elles peuvent en effet servir à estimer des paramètres importants de la structure génétique des populations tels que les flux de gènes. Dans certain cas, un locus microsatellite apporte autant d'informations que 15 loci enzymatiques (JARNE, comm. pers.). L'analyse des résultats obtenus pour les séquences microsatellites montre que des allèles différant par un seul motif de la répétition sont issus d'évènements mutationnels plus proches que deux allèles séparés par plusieurs motifs de répétition (DEKA *et al.*, 1991). Ainsi, dans le cas d'*O. volvulus*, les allèles appelés B et B' sont plus proches l'un de l'autre, d'un point de vue phylogénétique, que de l'allèle appelé A.

Un seul locus microsatellite d'*O. volvulus* a pu être utilisé dans cette étude. Il est évident que celui-ci ne permet pas de tester, de façon fiable, des hypothèses génétiques ; il peut cependant révéler certaines tendances. Sur les 54 vers étudiés, 66,6% (36 vers) étaient hétérozygotes ce qui est une valeur élevée. De plus, les vers de la Sierra Leone représentaient à eux seuls 33% des homozygotes. Plusieurs hypothèses peuvent être invoquées pour expliquer ce taux d'hétérozygotie élevé chez les vers du Cameroun. Il est possible que les vers femelles étudiés contenaient des microfilaires dans leur utérus et que le matériel génétique de celles-ci interfère avec celui de leur mère lors de l'amplification du locus microsatellite. Dans ce cas on devrait trouver, malgré les différences de quantité d'ADN entre adulte et microfilaire, des profils d'amplification avec les trois types d'allèles. Ceci n'a jamais été le cas, mais compte tenu du petit nombre d'individus testés, un échantillonnage plus important devrait pouvoir infirmer ou

confirmer cette hypothèse. La seconde hypothèse plausible pour expliquer ce taux d'hétérozygotie élevé est l'importance des flux de gènes. En effet, la grande variabilité génétique observée chez *O. volvulus*, à l'aide de plusieurs techniques, peut être expliquée par l'importance des échanges au sein d'une même population ; dans le cas de l'onchocercose, ces échanges sont essentiellement liés aux taux de transmission et à la mobilité des populations humaines.

Les fréquences alléliques ont été calculées pour chacun des foyers étudiés. Le nombre d'individus dans chaque échantillon étant, dans la plupart des cas nettement inférieur à 20, ces chiffres n'ont qu'une valeur indicative. En Sierra Leone, seul l'allèle A est rencontré ce qui est relativement inattendu même pour un échantillon composé seulement de 6 individus, compte tenu des taux élevés d'hétérozygotie observés chez les vers du Cameroun. La fréquence de l'allèle B semble être significativement différente entre les populations d'*O. volvulus* de savane (0,2 et 0,31) et celles de mosaïque savane-forêt (0,05 et 0,08).

Un plus grand nombre de vers reste à tester pour ces différentes populations d'*O. volvulus* du Cameroun, mais cet outil s'avère déjà très prometteur pour les études de génétique des populations de ce parasite.

Bilan du Chapitre IV

Après avoir discuté de la valeur des outils existants pour l'étude de la variabilité génétique d'*O. volvulus*, les limites de ceux ci, notamment dans le cadre de l'OCP ont été évoquées. L'amplification aléatoire (RAPD) s'est avérée être un outil efficace pour matérialiser la diversité génétique du parasite. Cependant, des problèmes existent quand à la fiabilité de cette méthode appliquée à *O. volvulus*. Les séquences microsatellites ont été isolés pour la première fois chez un parasite, afin de s'affranchir des problèmes rencontrés lors de l'utilisation des RAPD. Malgré les difficultés rencontrées parfois, notamment lors de la phase d'isolement de ces marqueurs, leurs potentialités justifiaient un tel effort.

La valeur des différents outils (sondes d'ADN, RAPD, microsatellites) dans le cadre de l'épidémiologie et de la lutte contre l'onchocercose a été évaluée. Les sondes d'ADN ont déjà fait leur preuves sur le terrain car elles ont permis d'améliorer la surveillance entomologique d'un programme de lutte (OCP). Cependant, du fait de leurs limites, leur utilisation en l'état ne pourra être envisagée systématiquement dans toutes les régions endémiques.

La technique des RAPD ne peut en aucun cas, être directement utilisée soit pour l'identification de parasites chez l'homme ou chez le vecteur car amplifiant sans distinctions, les ADN des deux espèces présentes. Elle peut néanmoins être utilisée pour la construction de nouvelles sondes d'ADN spécifiques.

En revanche, les séquences microsatellites peuvent permettre d'améliorer les techniques de détection et d'identification utilisées dans le cadre de programmes de lutte. Leur utilité dans la détermination des souches de différentes pathogénicités n'a pas été totalement démontrée mais semble cependant tout à fait réalisable.

La valeur de ces différentes techniques pour les études phylogénétiques a ensuite été abordée. La variabilité des séquences répétées (150pb) a permis d'étudier les relations entre souches africaines et américaines mais reste difficile à interpréter. Les RAPD montrent, à l'instar de la morphologie et des études isoenzymatiques respectivement, une grande homogénéité du genre *Onchocerca* et une grande variabilité entre les vers (*O. volvulus*) au niveau d'un même foyer. Enfin, les séquences microsatellites représentent l'outil de choix pour l'étude de la variabilité génétique d'*O. volvulus* ; elles permettent d'estimer les flux de gènes et devraient permettre une meilleure connaissance de la circulation des parasites.

CONCLUSION

Il est clairement établi que les faciès épidémiologiques de l'onchocercose, notamment au niveau des lésions oculaires, sont liés à l'existence de différentes souches d'*O. volvulus*. Compte tenu de la large répartition de la maladie en Afrique et en Amérique, une bonne connaissance de la variabilité génétique et des flux de gènes entre différentes populations de ce parasite peut apporter des informations utiles dans le cadre de la lutte contre l'onchocercose.

Les sondes d'ADN spécifiques d'*O. volvulus* et de certains faciès épidémiologiques (savane et forêt) développées en Afrique de l'Ouest ont été utilisées pour caractériser des isolats du Cameroun. Ces outils n'ont pas été assez résolutifs pour nous permettre d'étudier ces différentes populations de parasite, notamment du fait de la réaction positive de tous les isolats (savane et forêt du Cameroun) à la sonde spécifique des souches de savane d'Afrique de l'Ouest.

De nouveaux outils ont donc, dans un premier temps, été mis au point afin d'étudier la variabilité génétique d'*O. volvulus*. L'utilisation des isoenzymes et des séquences minisatellites étaient difficilement envisageable du fait de la quantité (au moins 5µg d'ADN nécessaires pour les minisatellites) et de la qualité (conservation dans l'azote liquide indispensable pour les isoenzymes) du matériel biologique nécessaire pour ce type d'expérimentations. Des techniques basées sur la PCR et développées récemment (RAPD et microsatellites) ont par conséquent été adaptées pour étudier la variabilité génétique du parasite et pour mettre éventuellement au point de nouveaux outils diagnostiques. C'est dans ce cadre que des séquences microsatellites ont été isolées pour la première fois chez un parasite. Elles présentaient un certain nombre d'avantages : de petites quantités d'ADN suffisaient pour utiliser ces techniques et elles ne nécessitaient pas de moyens de conservation du matériel biologique tel que l'azote liquide qui reste peu adapté aux conditions de terrain.

Les résultats obtenus ont clairement indiqué les potentialités des nouveaux outils développés, tant au plan fondamental qu'au plan appliqué.

Au plan fondamental, la technique des RAPD a permis de mettre en évidence certaines relations au sein du genre *Onchocerca*, notamment la position relative d'*O. ochengi* qui serait plus proche d'*O. volvulus* que des autres filaires de bovins domestiques. Elle a également permis de confirmer la grande hétérogénéité des isolats

d'*O. volvulus* provenant de foyers proches, qui avait été mise en évidence par des études isoenzymatiques. Cependant, cette technique présentait des limites puisqu'elle s'est avérée peu efficace pour classer les différentes populations d'*O. volvulus* dont nous disposions ; de plus des résultats reproductibles étaient souvent longs à obtenir. De nouveaux marqueurs des populations d'*O. volvulus* ont donc été recherchés. Des séquences microsatellites ont ainsi été isolées et ont permis de mettre en évidence des taux d'hétérozygotie importants chez *O. volvulus* et l'existence probable d'allèles diagnostiques. Pour l'instant, les résultats obtenus à l'aide des séquences microsatellites sont, du fait de la faiblesse de l'effectif étudié, insuffisants pour pouvoir analyser les forces agissant sur les populations d'*O. volvulus*. Les séquences microsatellites se sont avérées capables de mettre en évidence la variabilité fine au sein de l'espèce *O. volvulus*.

Les vecteurs de l'onchocercose (simulies) sont des complexes d'espèces qui seraient associés à différentes souches d'*O. volvulus*. L'existence de ces complexes hôtes/parasites (simulie-onchocerce) est probablement une des données les plus explicatives de l'épidémiologie de l'onchocercose. L'identification des simulies au sein de ces complexes d'espèces est actuellement réalisée par l'étude des chromosomes des glandes salivaires des larves (cytotaxonomie), qui est une technique relativement difficile à mettre en oeuvre et qui ne permet pas de différencier les insectes adultes. Les séquences microsatellites peuvent être, de la même manière que pour *O. volvulus*, utilisées pour l'étude fine du polymorphisme des différents complexes d'espèces vectrices. Mis à part l'intérêt, du point de vue pratique de ce couplage, l'utilisation d'un même marqueur pour l'étude des relations simulies/onchocerques permettrait probablement de répondre à la question restée longtemps sans réponse : qui transmet quoi ? et où ?

Au plan appliqué, les RAPD ont montré qu'il n'étaient pas adaptés à une utilisation dans le cadre d'études épidémiologiques sur le terrain ou dans le cadre de la lutte ; ils peuvent néanmoins permettre le développement de nouvelles sondes spécifiques par simple amplification, ce qui est plus facilement réalisable que par les techniques utilisées classiquement (clonage et banque d'ADN).

En revanche, les tests préliminaires menés sur les séquences microsatellites ont montré qu'elles pouvaient d'ores et déjà, améliorer significativement les moyens de détection et d'identification des parasites dans les programmes de lutte. En effet, différentes espèces du genre *Onchocerca*, notamment celles rencontrées chez les

vecteurs de l'onchocercose, peuvent être identifiées par simple amplification ce qui n'était pas possible auparavant. Ces séquences devraient également permettre d'identifier, par des études de génétique des populations, les souches d'*O. volvulus* circulant dans un foyer et de disposer ainsi d'un marqueur de pathogénicité.

Ce dernier point est des plus importants puisque la lutte contre l'onchocercose est basée actuellement sur l'utilisation en campagne de masse d'un microfilaricide, l'ivermectine (PROD'HON *et al.*, 1991). Dans ce contexte, il n'est pas possible de distribuer le médicament à toutes les populations présentant un risque onchocerquien. Il est donc nécessaire de pouvoir définir des zones prioritaires de distribution de l'ivermectine, c'est à dire de localiser les populations humaines présentant une symptomatologie visuelle fonctionnelle et/ou des lésions cutanées intolérables. La possibilité d'utiliser un marqueur de pathogénicité des souches parasitaires, en complément des indicateurs parasitologiques et cliniques existants, est donc particulièrement intéressante dans ce contexte.

Ce travail n'est qu'une première étape, mais il souligne cependant les résultats prometteurs susceptibles d'être obtenus par l'emploi de cette technique.

Les marqueurs RAPD et microsatellites développés dans notre étude vont être utilisés dans plusieurs foyers du Cameroun, de Sierra Leone et de Tanzanie dans le cadre d'un projet européen. Ces tests effectués à grande échelle et en prise directe avec le terrain permettront de confirmer leur potentialité en tant qu'outils moléculaires applicables à la lutte contre l'onchocercose. Ces recherches fourniront des données supplémentaires, nécessaires dans le contexte de la mise en place d'un programme de lutte contre l'onchocercose en Afrique Centrale annoncée récemment par la Banque Mondiale.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Amos, B., Schlötterer, C. et Tautz, D. 1993. Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science*, **260**, 670-672.

Anderson, J., Fuglsang, H., Hamilton, P.J.S. et Marshall, T.F. 1974. Studies on onchocerciasis in the United Cameroon Republic, II. Comparison of onchocerciasis in rain forest and Sudan savanna. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **68**, 209-222.

Anderson, J., Fuglsang, H. et Marshall, T.F. 1976. Studies on onchocerciasis in the United Cameroon Republic, III. A four year follow-up of 6 rain-forest and 6 Sudan-savanna villages. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **70**, 362-373.

Andrews, R.H., Beveridge, I., Adams, M. et Baverstock, P.R. 1989. genetic characterization of three species of *Onchocerca* at 23 enzymes loci. *J. Helminthol.*, **63**, 87-92.

Anonyme. 1985. Dix années de lutte contre l'Onchocercose : Bilan des activités du programme de lutte contre l'Onchocercose dans la région du bassin de la Volta de 1974 à 1984. 135pp *multigr.*

Anonyme. 1987. Comité O.M.S. d'experts de l'onchocercose. Troisième rapport. Série de Rapports Techniques n°. 752. *Organisation Mondiale de la Santé*, Genève. 187pp.

Arnold, M.L., Buckner, C.M. et Robinson, J.J. 1991. Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1398-1402.

Bain, O. 1981. Le genre *Onchocerca* : hypothèses sur son évolution et clé dicotomique des espèces. *Ann. Parasitol.*, **56**, n° 5, 503-526.

Ballinger-Crabtree, M.E., Black, W.C. et Miller, B.R. 1992. Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 47(6), 893-901.

Barker, Jr. R.H., Suebsaeng, H., Rooney, W., Alecrim, G., Dourado, H.V. et Wirth, D.F. 1986. Specific DNA probe for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Science*, 231, 434-436.

Boussinesq, M. 1991. Etude épidémiologique de l'onchocercose en zone de savane camerounaise. Effets d'un traitement de masse par l'ivermectine. *Thèse de doctorat*, Université Montpellier II, 426 pp.

Boussinesq, M., Demanga-Ngangue, Richard, P., Lélé, D., Cot, S. et Chippaux J.P. 1992a. Etude clinique et parasitologique de l'onchocercose dans huit villages de la vallée du Mbam (Province du Centre, Cameroun). *Bull. Liais. Doc. OCEAC*, n°100, 26-31.

Boussinesq, M., Demanga-Ngangue, Richard, P. et Chippaux, J.P. 1992b. L'onchocercose dans le département du Mbam (Province du Centre, Cameroun) : étude de 18 villages hyperendémiques. *Document de l'Antenne ORSTOM auprès du Centre Pasteur*, n°34/92.

Boussinesq, M., Auduge, A., Nlatte, B., Chippaux, J.P., Richard, P., Foumane, V., Louis, F.J. et Louis, J.F. 1992c. L'onchocercose dans le département de la Lékié (Province du Centre, Cameroun) : résultats d'une enquête clinique, parasitologique et ophtalmologique. Centre Pasteur du Cameroun, *Document d'entomologie médicale et de parasitologie*, n°21/92.

Boussinesq, M., Richard, P. et Chippaux, J.P. 1993. Etude sur les filarioses dans le département du Faro et Deo (Province du Nord, Cameroun). *Document de l'Antenne ORSTOM auprès du Centre Pasteur*, n°7/93.

- Bryceson, A.D.M., Van Veen, K.S., Oduloju, A.J. et Duke, B.O.L.** 1976. Antigenic diversity among *Onchocerca volvulus* in Nigeria, and immunological differences between onchocerciasis in the savanna and forest of Cameroon. *Clin. exp. Immunol.*, **24**, 168-176.
- Cianchi, R., Karam, M., Henry, M.C., Villani, F., Kumlien, S. et Bullini, L.** 1985. Preliminary data on the genetic differentiation of *Onchocerca volvulus* in Africa (Nematoda : Filarioidea). *Acta Tropica*, **42**, 341-351.
- Cornall, R.J., Aitman, T.J., Hearne, C.M. et Todd, J.A.** 1991. The generation of a library of PCR-analyzed microsatellite variants for genetic mapping of the mouse genome. *Genomics*, **10**, 874-881.
- Crosskey, R.W.** 1990. The natural history of blackflies. *John Wiley & Sons Ed.*, Chichester, England. 711 pp.
- Dallas, J.F.** 1992. Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mamm. Genome*, **3**, 452-456.
- Darlu, P. et Tassy, P.** 1993. Reconstruction phylogénétique - concepts et méthodes. *Collection Biologie Théorique*, Masson Ed., Paris, 245 pp.
- Deka, R., Chakraborty, R. et Ferrell, R.E.** 1991. A population genetic study of six VNTR loci in three ethnically defined populations. *Genomics*, **11**, 83-92.
- Demas, S. et Wachtel, S.** 1991. DNA fingerprinting in reptiles: Bkm hybridization patterns in Crocodylia and Chelonia. *Genome*, **34**, 472-476.
- Dissanayake, S. et Piessens, W.F.** 1990. Cloning and characterization of a *Wuchereria bancrofti* -specific DNA sequence. *Mol. and Biochem. Parasitol.*, **39**, 147-150.

- Duke, B.O.L., Lewis, D.J. et Moore, P.J.** 1966. *Onchocerca-Simulium* complexes. I. Transmission of forest and Sudan savanna strains of *Onchocerca volvulus*, from Cameroun, by *Simulium damnosum* from various West African bioclimatic zones. *Ann. Trop. Med Parasitol.*, **60**, 318-336.
- Duke, B.O.L. et Anderson, J.** 1972. A comparison of the lesions produced in the cornea of the rabbit eye by microfilariae of the forest and sudan savanna strains of *Onchocerca volvulus* from the Cameroon. I. The clinical picture. *Z. Tropenmed. Parasit.*, **23** (4), 354-368.
- Duke, B.O.L.** 1976. Strains of *Onchocerca volvulus* and their pathogenicity. *Tropenmed. Parasitol.*, **27** (suppl.), 21-22.
- Duke, B.O.L.** 1980. Observations on *Onchocerca volvulus* in experimentally infected chimpanzees. *Tropenmed. Parasitol.*, **31**, 41-54.
- Duke, B.O.L.** 1981. Geographical aspects of onchocerciasis. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, **61**, 179-186.
- Duke, B.O.L.** 1993. The population dynamics of *Onchocerca volvulus* in the human host. *Trop. Med. Parasitol.*, **44**, 61-68.
- Edwards, A., Hammond, H.A., Jin, L., Caskey, C.T. et Chakraborty, R.** 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, **12**, 241-253.
- Eichner, M. et Renz, A.** 1990. Differential length of *Onchocerca volvulus* infective larvae from the Cameroon rain forest and savanna. *Trop. Med. Parasitol.*, **41**, 29-32.
- Epplen, J.T.** 1992. Diagnostic applications of repetitive DNA sequences. *Clinica Chimica Acta*, **209**, S5-S13.
- Erlich, H.A. et Arnheim, N.** 1992. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annu. Rev. Genet.*, **26**, 479-506.

Erttmann, K.D., Unnasch, T.R., Greene, B.M., Albiez, E.J., Boateng, J., Denke, A.M., Ferraroni, J.J., Karam, M., Schulz-Key et Williams P.N. 1987. A DNA sequence specific for forest form *Onchocerca volvulus*. *Nature*, vol. 327, 415-417.

Erttmann, K.D., Meredith, S.E.O., Greene, B.N. et Unnasch, T.R. 1990. Isolation and characterisation of form specific DNA sequences of *O. volvulus*. *Acta Leidensia*, 1-2, 253-260.

Feinberg, A.P. et Vogelstein, B. 1983. A technique for radio labelling DNA restriction endonucleases fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 137, 6-13

Flockhart, H.A. 1982. The identification of some *Onchocerca* spp of cattle by isoenzyme analysis. *Tropenmed. Parasitol.*, 33, 51-56.

Flockhart, H.A., Cibulskis, R.E., Karam, M. et Albiez, E.J. 1986. *Onchocerca volvulus* : enzyme polymorphism in relation to the differentiation of forest and savannah strains of this parasite. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80, 285-292.

Fries, R., Eggen, A. et Stranzinger, G. 1990. The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics*, 8, 403-406.

Garate, T., Harnett, W. et Parkhouse, R.M.E. 1990. Cloning of a species-specific DNA probe from *Onchocerca gibsoni*. *Int. J. Parasitol.*, 20, n°1, 31-35.

Garms, R. 1985. Morphological differentiation from *Onchocerca volvulus* of first stage larvae of an unknown filarial species commonly found in *Similium sanctipauli* s.l. in Liberia. *Trop. Med. Parasitol.*, 36, 255-256.

Garner, A., Duke, B.O.L. et Anderson, J. 1973. A comparison of the lesions produced in the cornea of the rabbit eye by microfilariae of the forest and sudan savanna strains of *Onchocerca volvulus* from the Cameroon. II. The pathology. *Z. Tropenmed. Parasitol.*, 24 (4), 385-396.

Gill, L.L., Hardman, N., Chappel, L., Hu Qu, L., Nicoloso, N. et Bachellerie, J.P. 1988. Phylogeny of *Onchocerca volvulus* and related species deduced from rRNA sequence comparisons. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **28**, 69-76.

Gottstein, B. et Mowatt, M.R. 1991. Sequencing and characterization of an *Echinococcus multilocularis* DNA probe and its use in the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **44**, 183-194.

Hadrys, H., Balick, M. et Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecology*, **1**, 55-63.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.

Harnett, W., Chambers, A.E., Renz, A. et Parkhouse, R.M.E. 1989. An oligonucleotide probe specific for *Onchocerca volvulus*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **35**, 119-126.

Hawkins, T. 1992. M13 single-strand purification using a biotinylated probe and streptavidin coated magnetic beads. *J. DNA Sequ. Mapp.*, **3**, 65-69.

Hervouët, J.P. et Prost, A. 1979. Organisation de l'espace et épidémiologie de l'onchocercose. In : Maîtrise de l'espace agricole et développement en Afrique tropicale. *Mémoires ORSTOM*, **89**, Paris, 179-189.

Hu, J. et Quiros, C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflowers cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Report*, **10**, 505-511.

Huang, T.H.M., Cottingham, R.W., Ledbetter, D.H. et Zoghbi, H.Y. 1992. Genetic mapping of four dinucleotide repeat loci, DXS453, DXS459, DXS454 and DXS424, on the X chromosome using multiplex polymerase chain reaction. *Genomics*, **13**, 375-380.

Hughes, C.R. et Queller, D.C. 1993. Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Mol. Ecology*, **2**, 131-137.

- Jaccard, P.** 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Mat.*, **44**, 223-270.
- Karl, S.A. et Avise, J.C.** 1993. PCR-based assays of mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear DNA: techniques and applications for population genetics. *Mol. Biol. Evol.*, **10** (2), 342-361.
- Kashi, Y., Tikochinsky, Y., Genislav, E., Iraqi, F., Nave, A., Beckmann, J.S., Gruenbaum, Y. et Soller, M.** 1990. Large restriction fragments containing poly-TG are highly polymorphic in a variety of vertebrates. *Nucl. Ac. Res.*, vol. 18, **5**, 1129-1132.
- Klion, A.D., Raghavan, N., Brindley, P.J. et Nutman, T.B.** 1991. Cloning and characterisation of a species-specific repetitive DNA sequence from *Loa loa*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **45**, 297-306.
- Le Berre, R.** 1966. Contribution à l'étude biologique et écologique de *Simulium damnosum* Théobald, 1903 (Diptera, Simuliidae). Mémoires ORSTOM, n°17, Paris, 204 pp.
- Levinson, G. et Gutman, G.A.** 1987. Slipped-strand mispairing : a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, (3), 203-221.
- Lewin, B.** 1990. Genes IV. Oxford University Press, New-York.
- Litt, M. et Luty, J.A.** 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide within the cardiac muscle actin antigen. *Am. J. Hum. Genet.*, **44**, 397-401.
- Love, J.M., Knight, A.M., McAleer, M.A. et Todd, J.A.** 1990. Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. *Nucl. Ac. Res.*, **18**, n°14, 4123-4130.

McMahon, J.E., Davies, J.B., White, M.D., Goddard, J.M., Beech-Garwood, P.A. et Kirkwood, B.R. 1986. Onchocerciasis in Sierra-Leone. I. Studies on the prevalence and transmission at Gbaima village. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **80**, 802-809.

Mellersh, C. et Sampson, J. 1993. Simplifying detection of microsatellite length polymorphisms. *Biotechniques*, **12**, 115-116.

Meredith, S.E.O., Unnasch, T.R., Karam, M., Piessens, W.F. et Wirth, D.F. 1989. Cloning and characterisation of an *Onchocerca volvulus* specific DNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **36**, 1-10.

Meredith, S.E.O., Lando, G., Gbakima, A.A., Zimmerman, P.A. et Unnasch, T.R. 1991. *Onchocerca volvulus* : application of polymerase chain reaction to identification and strain differentiation of the parasite. *Exp. Parasitol.*, **73**, 335-344.

Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. In "Methods in Enzymology" (R. WU, L. Grossman, and K. Moldave, Eds.), Vol. 101, pp. 10-89. Academic Press, New York.

Moreau, J.P., Prost, A. et Prod'hon, J. 1978. Essai de normalisation de la méthodologie des enquêtes clinico-parasitologiques sur l'onchocercose en Afrique de l'ouest. *Méd. Trop.*, vol. 38, 1.

Neto Dias, E., Pereira de Souza, C., Rollinson, D., Katz, N. Pena, S.D.J. et Simpson, A.J.G. 1993. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **57**, 83-88.

Nordheim, A. et Rich, A. 1983. The sequence (dC-dA)_n(dG-dT)_n forms left-handed Z-DNA in negatively supercoiled plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1821-1825.

Nyoto, J.F., Louis, J.P., Louis, F.J. et Boussinesq, M. 1992. Projet pilote HKI/OCEAC "Stratégie de distribution de l'ivermectine sur une base communautaire dans le foyer d'onchocercose de Monatélé". Données socio-géographiques. *Rapport de l'OCEAC n°810/OCEAC/SG/SES*.

Omar, M.S. et Schulz-Key, H. 1976. Acid phosphatase activity of *Onchocerca volvulus* microfilariae from West Africa and Guatemala. *WHO Doc.*, WHO/ONCHO/76.130

Ostrander, E.A., Jong, P.M., Rine, J. et Duyk, G. 1992. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3419-3423.

Parker, S., Angelico, M.C., Laffel, L. et Krolewski, A.S. 1993. Application of denaturing gradient gel electrophoresis to detect DNA sequence differences encoding apolipoprotein E isoforms. *Genomics*, **16**, 245-247.

Perler, F.B. et Karam, M. 1986. Cloning and characterization of two *Onchocerca volvulus* repeated DNA sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **21**, 171-178.

Philippon, B. 1978. Etude de la transmission d'*Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893) (*Nematoda*, *Onchocercidae*) par *Simulium damnosum* Théobald 1903 (*Diptera*, *Simuliidae*) en Afrique Tropicale. *Travaux et Documents de l'ORSTOM.*, **60**, Paris, 308 pp.

Picq, J.J. 1983. Onchocercose de savane et de forêt en Afrique de l'Ouest et complexe pathogène de l'onchocercose. *Trav. Doc. Géog. Trop.*, **48**, 243-252.

Post, R.J., McCall, P.J., Trees, A.J., Delves, C.J. et Kouyate, B. 1989. Chromosomes of six species of *Onchocerca* (Nematoda : Filarioidea). *Trop. Med. Parasitol.*, **40**, 292-294.

Prod'hon, J., Boussinesq, M., Fobi, G., Prud'hom, J.M., Enyong, P., Lafleur, C. et Quilleveré, D. 1991. Campagne de masse contre l'onchocercose par chimiothérapie (Ivermectine) au Nord-Cameroun. *Bull. Org. Mond. Santé*, **69**, 4.

Prost, A. 1980. La latence parasitaire dans l'onchocercose. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, **58**, 923-925.

Prost, A., Rougemont, A. et Omar, M.S. 1980. Caractères épidémiologiques, cliniques et biologiques des onchocercoses de savane et de forêt en Afrique Occidentale. *Ann. Parasitol.*, **55**, 347-355.

Queller, D.C., Strassman, J.E. et Colin, R.H. 1993. Microsatellites and kinship. *Tree*, **8**, 285-288.

Quillevééré, D. 1979. Contribution à l'étude des caractéristiques taxonomiques, biologiques et vectrices des membres du complexe *Simulium damnosum* présents en Côte d'Ivoire. *Travaux et Documents de l'ORSTOM*, **109**, Paris, 307 pp.

Quillevééré, D., Hougard, J.M. et Prud'hom, J.M. 1990. Etude de la transmission de l'onchocercose aux alentours d'un camp de réfugiés situé en zone de savane du Cameroun. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, **70**, 193-202.

Remme, J., Ba, O., Dadzie, K.Y. et Karam, M. 1986. A force-of-infection model for onchocerciasis and its applications in the epidemiological evaluation of the Onchocerciasis Control Programme in the Volta River basin area. *Bull. Wld. Hlth Org.*, **64**, 667-681.

Remme, J., Dadzie, K.Y., Rolland, A. et Thylefors, B. 1989. Ocular onchocerciasis and intensity of infection in the community. I. West African savanna. *Trop. Med. Parasitol.*, **40**, 340-347.

Roewer, L., Rieb, O. et Prokop, O. 1991. Hybridization and polymerase chain reaction amplification of simple repeated DNA sequences for the analysis of forensic stains. *Electrophoresis*, **12**, 181-186.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R.G., Horn, G.T., Mullis, K.B. et Erlich, H.A. 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New-York. Second Edition.

Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, **74**, 5463-5467.

Schlötterer, C., Amos, B. et Tautz, D. 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, **354**, 63-65.

Schultz-Key, H., Albiez, E.J., et Buttner, D.W. 1977. Isolation of living adult *Onchocerca volvulus* from nodules. *Tropenmed. Parasitol.*, **28**, 428-430.

Shah, J., Karam, M., Piessens, W.F. et Wirth, D.F. 1987. Characterisation of an *Onchocerca* specific clone from *O. volvulus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **37**, 376-384.

Sim, B.K.L., Piessens, W.F. et Wirth, D.F. 1986. A DNA probe cloned in *E. coli* or the identification of *Brugia malayi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **19**, 117-123.

Sirugo, G., Keats, B., Fujita, R., Duclos, F., Purohit, K., Koenig, M. et Mandel, J.L. 1992. Friedreich Ataxia in Louisiana acadians : demonstration of a founder effect by analysis of microsatellite-generated extended haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.*, **50**, 559-566.

Smith, M.L., Bruhn, J.N. et Anderson, J.B. 1992. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature*, **356**, 428-431.

Sobral, B.W.S. et Honeycutt, R.J. 1993. High output genetic mapping of polyploids using PCR-generated markers. *Theor. Appl. Genet.*, **86**, 105-112.

Sokal, R.R. et Michener, C.D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*, **38**, 1409-1438.

Stallings, R., Ford, A.F., Nelson, D., Torney, D.C., Hildebrand, C.E. et Moysis, R.K. 1991. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*, **10**, 807-815.

Steffen, P., Eggen, A., Dietz, A.B., Womach, J.E., Stranzinger, G. et Fries, R. 1993. Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Anim. Genet.*, **24**, 121-124.

Swaiger, F.W., Gomolka, M., Geldermann, H., Zischler, H., Buitkamp, J., Epplen, J.T. et Ammer, H. 1992. Oligonucleotide fingerprinting to individualize ungulates. *Appl. Theor. Electrophoresis*, **2**, 193-200.

Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Ac. Res.*, vol. 17, **16**, 6463-6471.

Tautz, D. et Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous components of eukaryotic genomes. *Nucl. Ac. Res.*, **12**, 4127-4138.

Traoré-Lamizana, M. et Lemasson, J.J. 1987. Participation à une étude de faisabilité d'une campagne de lutte contre l'onchocercose dans la région du bassin du Logone. Répartition des espèces du complexe *Simulium damnosum* dans la zone camerounaise du projet. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, vol. XXV, 3-4, 171-186.

Unnasch, T.R. 1987. DNA probes to identify *Onchocerca volvulus*. *Parasitology Today*, vol.3, **12**, 377-378.

Wall, W.J., Williamson, R., Petrou, M., Papaioannou, D. et Parkin, B.H. 1993. Variation of short tandem repeats within and between populations. *Hum. Mol. Genet.*, **2**, 1023-1029.

Weber, J.L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n·(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, **7**, 524-530.

Weber, J.L. et May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, **44**, 388-396.

Welsh, J. et McClelland, M. 1991. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Ac. Res.*, vol. 18, **24**, 7213-7218.

Welsh, J., Petersen, C. et McClelland, M. 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse : application to strain identification and genetic mapping *Nucl. Ac. Res.*, vol. 19, **2**, 303-306.

Wilkerson, R.C., Parsons, T.J., Albright, D.G., Klein, T.A. et Braun M.J. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). *Insect Mol. Biol.*, **1** (4), 205-211.

Williams, J.F. 1989. Optimization strategies for the Polymerase Chain Reaction. *Biotechniques*, **7**, 762-768.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. et Tingey, S.V. 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Ac. Res.*, vol. 18, **22**, 6531-6535.

Wolff, R.K., Nakamura, Y. et White, R. 1988. Molecular characterization of a spontaneously generated new allele at a VNTR locus: no exchange of flanking DNA sequence. *Genomics*, **3**, 347-351.

Wolff, R.K., Plaetke, R., Jeffreys, A.J. et White, R. 1989. Unequal crossingover between homologous chromosomes is not the major mechanism involved in the generation of new alleles at VNTR loci. *Genomics*, **5**, 382-384.

Zimmerman, P., Meredith, S.E.O., Wooten, M.C., Lang-Unnasch, N., Green, B.M. et Unnasch, T.R. 1991. The origin of american onchocerciasis deduced by molecular phylogenetic analysis. *39th Annual meeting of the Am. Soc. Trop. Med. and Hyg.*

Zimmerman, P.A., Dadzie, K.Y., De Sole, G., Remme, J., Soumbey Alley, E. et Unnasch, T.R. 1992. *Onchocerca volvulus* DNA probe classification correlates with epidemiologic patterns of blindness. *J. Inf. Diseases*, **165**, 964-968.

Zimmerman, P.A., Guderian, R.H., Aruajo, E., Elson, L., Phadke, P., Kubofcik, J. et Nutman, T.B. 1994. Polymerase chain reaction-based diagnosis of *Onchocerca volvulus* infection: improved detection of patients with onchocerciasis. *J. Inf. Diseases*, **169**, 686-689.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Solutions tampons utilisées

TBE 10X

pour 1 litre : Tris base (890mM) 108 g
 Acide borique (890mM) 55 g
 EDTA (0,5M) 40 ml, soit 7,44 g

Amener à pH 8

TE X

pour 1 litre : Tris 1,211 g (10 mM)
 EDTA 0,372 g (1mM)

Amener à pH 8

TEN X

NaCl 50 mM (2,92 g)
EDTA pH 8,0 10 mM (3,72 g)
Tris.HCl pH 7,4 50 mM (6,05 g)

SSPE 20X

Dans 800 ml H₂O : NaCl (3,6M) 174 g
 NaH₂PO₄H₂O (200mM) 27,6 g
 EDTA (200mM) 7,4 g

Amener à pH 7,4

Ajuster à 1 litre avec H₂O.

SDS 10%

Dans 900 ml H₂O : SDS 100g
 Chauffer à 68 °C jusqu'à dissolution

Amener à pH 7,2

Ajuster à 1 litre avec H₂O.

ANNEXE 2 : Milieux utilisés

2TY MEDIUM

Bacto Tryptone :	8 g dans 500 ml H ₂ O, soit	12,8 g pour 800 ml
Yeast extract :	5 g	8 g
NaCl :	2,5 g	4 g
Autoclaver		

2TY AGAR

Bacto Tryptone :	8 g dans 500 ml H ₂ O, soit	12,8 g pour 800 ml
Yeast extract :	5 g	8 g
NaCl :	2,5 g	4 g
Bacto Agar :	7,5 g	12 g
Autoclaver		

H PLATE

Bacto Tryptone	5 g dans 500 ml H ₂ O, soit	8 g pour 800 ml
NaCl	4 g	6,4 g
Agar	6 g	9,6 g
Autoclaver		

H TOP AGAR

Bacto Tryptone	5 g dans 500 ml H ₂ O, soit	8 g pour 800 ml
NaCl	4 g	6,4 g
Agar	4 g	6,4 g
Autoclaver		

ANNEXE 3

Extraction au phénol-chloroforme :

- 1- Mélanger l'échantillon d'ADN à extraire avec un volume égal de phénol (conservé à +4°C) dans un tube eppendorf.
- 2- Mélanger jusqu'à formation d'une émulsion - 10 min.
- 3- Centrifuger 10 min. à 15000 tr./min. (15 °C).
- 4- Transférer la phase aqueuse située au-dessus dans un nouveau tube.
- 5- Répéter les étapes 1 à 4.
- 6- Ajouter un volume égal d'une solution 1:1 phénol : chloroforme/alcool isoamylique (24/1 ; conservé à +4°C).
- 7- Etapes 2 à 4.
- 8- Ajouter un volume égal de chloroforme et répéter l'étape 7.
- 9- Précipiter la phase aqueuse à l'éthanol absolu.

Précipitation à l'éthanol absolu :

- 1- Ajouter à la solution d'ADN 1/10 de vol. d'acétate de sodium 3 M.
- 2- Mélanger puis ajouter 2 à 3 volumes d'éthanol absolu glacé (-20 °C).
- 3- Laisser au froid au moins 30 min. (-80°C) ou quelques heures (-20°C).
- 4- Centrifuger 20 min. à 15000 tr./min. (+4°C);
- 5- Jeter le surnageant et ajouter sur le culot 3 volumes d'éthanol à 70% glacé.
- 6- Répéter l'étape 4.
- 7- Jeter le surnageant et sécher le culot contenant l'ADN sous vide :
 - au dessiccateur (speed-vac), 5-7 min.
 - dans la cloche à vide, 15 min.
- 8- Récupérer l'ADN avec 100 µl de TE X et conserver à -20°C.

ANNEXE 4

<u>Amorce</u>	<u>Séquence nucléotidique</u>
OPB-01	5' GTTTCGCTCC 3'
OPB-03	5' CATCCCCCTG 3'
OPB-04	5' GGA CTGGAGT 3'
OPB-05	5' TGC GCCCTTC 3'
OPB-06	5' TGCTCTGCC 3'
OPB-07	5' GGTGACGCAG 3'
OPB-08	5' GTCCACACGG 3'
OPB-09	5' TGGGGGACTC 3'
OPB-10	5' CTGCTGGGAC 3'
OPB-11	5' GTAGACCCGT 3'
OPB-12	5' CCTTGACGCA 3'
OPB-13	5' TTCCCCCGCT 3'
OPB-14	5' TCCGCTCTGG 3'
OPB-15	5' GGAGGGTGTT 3'
OPB-16	5' TTTGCCCGGA 3'
OPB-17	5' AGGGAACGAG 3'
OPB-18	5' CCACAGCAGT 3'
OPB-19	5' ACCCCCCGAAG 3'
OPB-20	5' GGACCCTTAC 3'

Séquences des amorces (décamères) OPB-01 à OPB-20
(Kit B, Operon technologies Inc.) utilisées pour les amplifications aléatoires (RAPD).

ANNEXE 5

PUBLICATIONS

PUBLICATION 1

Isolation of new markers to detect genetic variation in *Onchocerca
volvulus*

HERDER Stéphane, BELLEC Christian et CUNY Gérard.

PARASITE, vol. 1 (suppl.), 55-57 (1994)
*3rd CEC Filariasis Network Meeting
Lisbon-IHMT, 4-7 september 1993*

- DUKE B.O.L. : Observations on *Onchocerca volvulus* in experimentally infected chimpanzees. *Tropenmed. Parasitol.*, 1980, 31, 41-54.
- EBERHARD M.L., ORRHEL T.C. : *Loa loa* : output of microfilariae in single pair infections. *Trop. Med. Parasitol.*, 1986, 37, 369-374.
- HAWKING F. : The reproductive system of *Litomosoides carinii*, a filarial parasite of the cotton rat. III. The number of microfilariae produced. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1954, 48, 382-385.
- KARAM M., SCHULZ-KEY H., REMME J. : Population dynamics of *Onchocerca volvulus* after 7 to 8 years of vector control in West Africa. *Acta Tropica*, 1987, 44, 445-457.
- MÖSSINGER J., WENK P. : Fecundity of *Litomosoides carinii* (Nematoda, Filarioidea) *in vivo* and *in vitro*. *Z. Parasitenk.*, 1986, 72, 121-131.
- MÖSSINGER J., BARTHOLOE E. : Fecundity and localization of *Dipetalonema viteae* (Nematoda, Filarioidea) in the jird *Meriones unguiculatus*. *Parasitol. Res.*, 1988, 74, 84-87.
- PLAISIER A.P., VAN OORTMARSEN G.J., REMME J., HABBEMA J.D.F. : The reproductive lifespan of *Onchocerca volvulus* in West African savanna. *Acta Tropica*, 1991, 48, 271-284.
- SCHULZ-KEY H. : Observations on the reproductivity of *Onchocerca volvulus*. *Third Int. Symp. of Invertebrate Reproduction*, Tübingen, 1983, 2-27 August.
- SCHULZ-KEY H. : The collagenase technique : how to isolate and examine adult *Onchocerca volvulus* for the evaluation of drug effects. *Trop. Med. Parasitol.*, 1988, 39, 423-444.
- SCHULZ-KEY H. : Observation on the reproductive biology of *Onchocerca volvulus*. *Acta Leidensia*, 1990, 59, 27-43.
- SCHULZ-KEY H., KARAM M. : Periodic reproduction of *Onchocerca volvulus*. *Parasitol. Today*, 1986, 2, 284-286.
- SCHULZ-KEY H., KARAM M., MÖSSINGER J., REMME J. : The worm population of *Onchocerca volvulus* 10 years after vector control in West Africa. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 1987, 265, 492.
- SOHOSLAY P.T., DREWECK C.M., TAYLOR H.R., BROTMAN B., WENK P., GREENE B.M. : Experimental onchocerciasis in chimpanzees. Cell-mediated immune response, and production and effects of IL-1 and IL-2 with *Onchocerca volvulus* infection. *J. Immunol.*, 1991, 147, 346-353.
- TREES A.J., WAHL G., KLÄGER S., RENZ A. : Age-related differences in parasitosis may indicate acquired immunity against microfilariae in cattle naturally infected with *Onchocerca ochengi*. *Trop. Med. Parasitol.*, 1992, 104, 247-252.
- VANKAN D.M., COMEMAN D.B. : Reproduction of female *Onchocerca gibsoni*. *Trop. Med. Parasitol.*, 1988, 39, 469-471.
- WEINSTEIN P.P., SAWYER T.K. : Survival of adult *Dirofilaria uniformis in vitro* and their production of microfilariae. *J. Parasitol.*, 1961, 76, 23-24.

ISOLATION OF NEW MARKERS TO DETECT GENETIC VARIATION IN ONCHOCERCA VOLVULUS

HERDER S.*, BELLEC CH.* AND CUNY G.**

KEYWORDS : *Onchocerca volvulus* genetic variability, RAPD, microsatellite PCR

SUMMARY

Newly developed techniques [RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA and microsatellite DNA sequences] were used to study genetic

variation in *Onchocerca volvulus*. RAPD technique, derived from the Polymerase Chain Reaction (PCR), allow clear distinction between the different species of the genus *Onchocerca*. Microsatellite DNA has been shown to be useful as polymorphic markers for populations and even for individuals. Short repeated sequences (CA repeats) have been isolated, and a PCR assay using such microsatellite DNA sequences to generate polymorphisms is currently being experimented

in West Africa, particularly in the OCP area (Onchocerciasis Control Programme), at least two strains of the parasite are known to exist. The so-called "savannah" strain associated with high blindness level, and the "forest" strain associated with a milder form of onchocerciasis which causes blindness in less than 1 % of the population (Prost *et al.*, 1980). However, Sierra Leone is exceptional in that high levels of blindness are found in forest areas (McMahon *et al.*, 1986).

Various *Onchocerca* specific DNA probes have been developed (Meredith *et al.*, 1989) and also strain specific probes (Erttmann *et al.*, 1987 and 1990). These DNA probes sequences are based on the 150 bp repeat family. Recently, studies conducted in West Africa have shown that DNA probe classification correlates with the epidemiology of blindness (Zimmerman *et al.*, 1992).

In Cameroon, the situation is more complex, notably the pathology of blindness is distributed without apparent relation to bioclimatic zones (Duke, 1981 ; Boussinesq *et al.*, 1993). To date, no studies similar to those carried out in West Africa have been done in Cameroon.

We are investigating other molecular markers that may be useful for studies on genetic variation in *O. volvulus*, namely RAPD and microsatellite sequences.

Polymorphism in genomic fingerprints generated by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) is a recently developed assay that is based on the amplification by the Polymerase Chain Reaction (PCR) of random DNA fragments. In RAPD mapping, decamer oligonucleotide primers of arbitrary sequence but with a GC content of 50 % or higher are used to amplify fragments of genomic DNA (Williams *et al.*, 1990 ; Welsh and McClelland, 1990).

RAPD has been successfully applied to the analysis of genomic DNA variation of several organisms (Williams *et al.*, 1990 ; Hadrys *et al.*, 1992 ; Klein-Lankhorst *et al.*, 1991 ; Crowhurst *et al.*, 1991 ; Mazurier *et al.*, 1992). Strains can be distinguished by comparing polymorphisms in genomic fingerprints (Welsh *et al.*, 1991).

The particular advantages of RAPD technology is that small amounts (nanograms) of genomic DNA are needed and, unlike PCR, no prior sequence knowledge is needed.

Microsatellite DNA sequences are short (from 2 to 5 bp), tandemly repeated sequences that have been shown to be useful as polymorphic markers for populations and even for individuals. They have been reported from a large panel of eukaryotic species such as human, mouse, cattle, whales and insects (Tautz, 1989 ; Love *et al.*, 1990 ; Swaiger *et al.*, 1992 ; Weber and May, 1989 ; Hughes and Queller, 1993). These dinucleotide repeats are referred to as microsatellites (Litt and Luty, 1989). Most of these regions are less than 200 bp in length and PCR is used to detect length polymorphisms.

We describe here the use of the RAPD assay for the detection of variation in the genus *Onchocerca*, using a set of 20

oligonucleotide decamer primers and the adaptation of microsatellite DNA sequences to study genetic variability in *O. volvulus* populations.

METHODS

RAPD

Nodules containing *O. volvulus* were excised and collagenase-digested (Schulz-Key *et al.*, 1977) and the worms preserved in absolute alcohol. The nodules were from savannah and degraded forest areas of Cameroon (Touboro, Poli and Bafia, Sa'a) and from forest regions of Sierra Leone (Lunsar and Njala).

O. gutturossa, *O. lienalis*, *O. gibsoni* and *O. ocbengi* DNA was provided by Dr. Meredith. *O. volvulus* DNA was extracted from worms as described by Meredith *et al.* (1991). PCR reactions were performed in 25 μ l of 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 20 picomoles of decamer primer(s) (Operon Technologies Inc.), 25 ng template DNA and 1 unit Taq polymerase (Promega). Amplification was carried out in a thermocycler (Techné PHC-3) programmed for 45 cycles of 1 minute at 92° C, 1 minute at 36° C and 2 minutes at 72° C. Amplification products were resolved electrophoretically on 1.4 % agarose gel.

MICROSATELLITE DNA SEQUENCES

Nodules containing *O. volvulus* worms from 14 patients originating from 4 different foci in Cameroon were excised and collagenase digested in the field. Total genomic DNA from the worms was digested to completion with the restriction enzymes *Hae*III, *Alu*I, *Taq*I, *Hinf*I and *Sau*3A and shotgun cloned under standard conditions into a M13BM20 vector containing an *Eco*RV site (Hanahan, 1983). Poly(CA)_n/(GT)_n and poly(GA)_n/(CT)_n probes for detection of respectively (CA)_n/(GT)_n and (GA)_n/(CT)_n microsatellites sequences were labelled by random priming in the presence of [α -32P]dCTP (Feinberg and Vogelstein, 1983). The genomic M13 library was screened by transferring the plaques onto nylon membranes. Prehybridization and hybridization were performed at 65° C in a solution containing 0.5 % nonfat powdered milk, 5 X SSPE, 1 % SDS, 100 μ g/ml denatured salmon sperm DNA, followed by two washes of 15 minutes each in 2 X SSPE, 0.1 % SDS, one of 15 minutes in 0.5 X SSPE, 0.1 % SDS and the stringent wash of 15 minutes in 0.1 X SSPE, 0.1 % SDS at 65° C. Dried filters were then autoradiographed with an intensifying screen on Hyperfilm (Amersham) at -70° C for 2 to 16 hours. Single-stranded template DNA was isolated from positive plaques (Messing, 1983) and sequenced (Sanger, 1977) on an automatic sequencer (Applied Biosystems, Inc.).

PCR primers were chosen from the region immediately flanking the microsatellite sequence. These primers were designed with computer assistance to minimize self annealing. PCR conditions were optimized by combining different Mg²⁺ concentrations, annealing temperatures and number of amplification cycles. PCR products were resolved on non-denaturing acrylamide gels (from 7 to 10 %) and visualised by ethidium bromide (1 μ g/ml) or silver staining

(0.2 % silver nitrate for 30 minutes and reduction with 0.75M NaOH ; 0.1M formaldehyde for 10 minutes).

RESULTS AND DISCUSSION

First, we investigated the potential of RAPD in differentiating at the species level. Genomic DNA from different species was amplified by use of a single decamer primer. 20 primers were tested in these experiments and in each case, at least one specific fragment was obtained for the *Onchocerca* DNA's used. For each sample, some of the bands (ranging from 1.5 Kb and 150 bp) are common for the genus *Onchocerca* and some are unique to one species depending on the primer used. By comparing fingerprints generated by the RAPD method, *Onchocerca volvulus*, *O. gutturossa*, *O. lienalis*, *O. gibsoni* and *O. ocbengi* can be identified and distinguished from each other by the specific polymorphic patterns.

Secondly, RAPD profiles of different *O. volvulus* isolates have been compared using the same primer as described earlier. Different patterns are observed between different isolates and even between worms from the same nodule.

Using these primers, we could observe differences between species and also between *O. volvulus* isolates. However when amplification is repeated, we often find the profiles to vary slightly. Furthermore, the presence of DNA contamination can seriously affect the results. Thus, in this case, this technique seems more suitable for isolation of new DNA probes rather than for studies on population genetic.

Microsatellite loci can be easily scored using polymerase chain reaction (PCR) followed by electrophoresis to separate alleles which differ in length as a result of differences in the number of repeat units. The microsatellite sequences isolated from *O. volvulus* have been used to make primers (microsatellite flanking regions) to identify different strains of the parasite. These particular sequences consist of CA repeats. Initial results using *O. volvulus* microsatellite primers shows only slight differences between isolates. This lack of resolution observed between bands representing alleles (in some cases separated only by 2 bp) can be explained by the use of non denaturing acrylamide gel to visualize amplification products. In order to allow better resolution of DNA fragments, this technique can be improved by using denaturing sequence acrylamide gels.

In conclusion, we believe that these new tools developed (particularly microsatellites) will be useful for investigating the genetic variation in *O. volvulus*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Dr. M. Boussinesq and Dr. J.P. Chippaux for providing us with material and epidemiological data. We also thanks Dr. J.P. Aussel for excellent technical assistance.

REFERENCES

- BOUSSINESQ M., CHIPPAUX J.P. and PRODHON J. : Rapid assessment of onchocerciasis endemicity in Cameroon : a study in savanna and in forest - savanna mosaic. *Joint Meeting- of the American Society of parasitologists and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Atlanta, Georgia, 1993, 31 Oct.-i Nov.

- CROWHURST R.N., HAWTHORNE B.T., RIKKERINK E.H. and TEMPLETON M.D. : Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Current Genet.*, 1991, 20, 391-396.
- DUKE B.O.L. : Geographical aspects of onchocerciasis. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 1981, 61, 179-186.
- ERTTMANN K.D., UNNASCH T.R., GREENE B.M., ALBIEZ E.J., BOATENG J., DENKE A.M., FERRARONI J.J., KARAM M., SCHULZ-KEY H. and WILLIAMS P.N. : A DNA sequence specific for forest form *Onchocerca volvulus*. *Nature*, 1987, 327, 415-417.
- ERTTMANN K.D., MEREDITH S.E.O., GREENE B.M. and UNNASCH T.R. : Isolation and characterisation of form specific DNA sequences of *O. volvulus*. *Acta Leidensia*, 1990, 1-2, 253-260.
- FEINBERG A.P. and VOLGELSTEIN B. : A technique for radio labelling DNA restriction endonucleases fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 1983, 137, 6-13.
- HADRYN H., BALICK M. and SCHIERWATER B. : Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.*, 1992, 1, 55-63.
- HANAHAN D. : Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 1983, 166, 557-580.
- HUGUES C.R. and QUELLER D.C. : Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Mol. Ecol.*, 1993, 2, 131-137.
- KLEIN-LANKHORST R.M., VERMUNT A., WEIDE R., LIHARSKA T. and ZABEL P. : Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.*, 1991, 83, 108-114.
- LITT M. and LUTY J.A. : A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 1989, 44, 397-401.
- LOVE J.M., KNIGHT A.M., MCALEER M.A. and TODD J.A. : Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. *Nucl. Ac. Res.*, 1990, 18, n° 14, 4123-4130.
- MAZURIER S., VAN DE GIESSEN A., HEUVELMAN K. and WERNARS K. : RAPD analysis of *Campylobacter* isolates : DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Letters in Appl. Microbiol.*, 1992, 14, 260-262.
- MCMAHON J.E., DAVIES J.B., WHITE M.D., GODDARD J.M., BEECHGARWOOD P.A. and KIRKWOOD B.R. : Onchocerciasis in Sierra Leone. I. Studies on the prevalence and transmission at Gbaima village. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1986, 80, 802-809.
- MEREDITH S.E.O., UNNASCH T.R., KARAM M., PIESSENS W.F. and WIRTH D.F. : Cloning and characterisation of an *Onchocerca volvulus* specific DNA sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1989, 36, 1-10.
- MEREDITH S.E.O., LANDO G., GBAKIMA A.A., ZIMMERMAN P.A. and UNNASCH T.R. : *Onchocerca volvulus* : application of polymerase chain reaction to identification and strain differentiation of the parasite. *Exp. Parasitol.*, 1991, 73, 335-344.
- MESSING J. : New M13 vectors for cloning. In *Methods in Enzymology*. Wu R., Grossman L. and Moldave K. (eds), New York, Academic Press, 1983, vol. 101, 10-89.
- PROST A., ROUGEMONT A. and OMAR M.S. : Caractères épidémiologiques, cliniques et biologiques des onchocercoses de savane et de forêt en Afrique occidentale. *Ann. Parasitol.*, 1980, 55, 347-355.
- SANGER F., NICKLEN S. and COULSON A.R. : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1977, 74, 5463-5467.
- SCHULZ-KEY H., ALBIEZ E.J., BUTTNER D.W. : Isolation of living adult *Onchocerca volvulus* from nodules. *Tropenmed. Parasitol.*, 1977, 28, 428-430.
- SWAIGER F.W., GOMOLEK M., GELDERMANN H., ZISCHLER H., BUTTKAMP J., EPPLEN J.T. and ANMER H. : Oligonucleotide fingerprinting to individualize ungulates. *Appl. Theor. Electrophoresis*, 1992, 2, 193-200.
- TAMTZ D. : Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Ac. Res.*, 1989, 17, n° 16, 6463-6471.
- WEBER J.L. and MAY P.E. : Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, 1989, 44, 388-396.
- WELSH J. and MC CLELLAND M. : Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Ac. Res.*, 1990, 18, n° 21, 7213-7218.
- WELSH J., PETERSEN C. and MC CLELLAND M. : Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse : application to strain identification and genetic mapping. *Nucl. Ac. Res.*, 1991, 19, n° 2, 303-306.
- WILLIAMS J.G.K., KURBUK A.R., LYAK K.I., RAJESKI I.A. and TINGEY S.V. : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Ac. Res.*, 1990, 19, n° 2, 303-306.
- ZIMMERMAN P.A., DADZIE K.Y., DE SOLE G., REMME J., SOUMBEY ALLEY E. and UNNASCH T.R. : *Onchocerca volvulus* DNA probe identification correlates with epidemiologic patterns of blindness. *J. Inf. Diseases*, 1992, 165, 964-968.

CUTICLIN GENES OF NEMATODES

LEWIS E.*, SEBASTIANO M.*, NOLA M.*, ZEI F.*, LASSANDRO F.*, RISTORATORE F.*, CERMOLA M.*, FAVRE R.* AND BAZZICALUPO P.*

KEYWORDS : parasitic nematodes cuticle, cuticlin, dihydroxy, crosslinking

SUMMARY

Two genes coding for cuticlin components of *Caenorhabditis elegans* have been cloned and their structure is described. Recombinant proteins have been produced in *E. coli* and antibodies raised against them. Nucleic acid and specific antibodies are being used to isolate the homologues from the parasitic species *Ascaris lumbricoides* and *Brugia pahangi*.

The nematode cuticle protects the animal, serves as an exoskeleton and provides the surface over which interactions with the external environment occur. In the case of parasitic nematodes the external environment is the host and, as such, antigens expressed on/in the cuticle are within reach of both the humoral and cellular components of the immune system. The cuticle is a layered structure, the components of which are classified according to their solubility : lipids, some proteins and other readily soluble, non-structural components are mostly localized on the surface but are also distributed to a lesser extent throughout the lower layers of the cuticle ; the collagens make up the structural bulk of the cuticle, are coded for by a large and relatively well-characterized gene family, are not exposed on the cuticle surface and can be solubilized with SDS and mercaptoethanol ; and finally there is a highly cross-linked, insoluble and complex mixture of proteins present throughout the cuticle and known as the cuticlins. Up until now it has been virtually impossible to determine the roles and importance of the cuticlins because their insolubility does not allow either molecular or biochemical analysis of individual proteins.

* International Institute of Genetics and Biophysics, CNR, via G. Marconi 10, 80125 Napoli, Italy.

PUBLICATION 2

Genomic fingerprinting of *Onchocerca* species using random amplified
polymorphic DNA

HERDER Stéphane, BELLEC Christian, MEREDITH Stefanie et CUNY Gérard.

Tropical Medicine and Parasitology, 44 (1994)
(Epreuve d'imprimerie avant corrections)

Genomic fingerprinting of *Onchocerca* species using random amplified polymorphic DNA

S. Herder¹, C. Bellec¹, S. E. O. Meredith², G. Cuny³

¹ Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteurs, Centre ORSTOM de Montpellier, Montpellier, France;

² Royal Tropical Institute (KIT), Amsterdam, The Netherlands;

³ Laboratoire Rétrovirus-Parasites, Centre ORSTOM de Montpellier, Montpellier, France

Abstract

A method based on amplification of genomic DNA by decamer primers of random nucleotide sequence was used to obtain DNA fingerprints from different species of the genus *Onchocerca*. Each of the 20 primers tested allowed a clear distinction between the different species of the genus on an agarose gel. The technique offers the potential to construct species or strain specific probes and oligonucleotides PCR primers from the species specific fragments. A combination of these primers or others could be useful as population markers.

Introduction

There are marked geographical variations in the spectrum of disease associated with onchocerciasis. Clinical manifestations ranging from dermal lesions to ocular manifestations including blindness can occur. In West Africa, the incidence of blindness is much higher in savannah areas than in forest areas (Anderson et al., 1974; Prost et al., 1980). In forest areas, despite high prevalence rates and large numbers of microfilariae in the skin, the disease is generally less severe than in savanna areas. An exception is the pattern of disease in Sierra Leone, where blinding onchocerciasis occurs in forest regions (McMahon et al., 1986). Most onchocerciasis vectors are known to be zoophilic, and can thus be infected with animal *Onchocerca* species whose third stage larvae (L3) are morphologically indistinguishable from each other and from *O. volvulus*. These non-*volvulus* *Onchocerca* larvae affect the accurate measurement of the transmission of human onchocerciasis and thus, there is a real need for a method which can distinguish between the *Onchocerca* species as well as between strains of *O. volvulus*. This is especially important in areas where onchocerciasis control programmes are developed and where mass distribution of ivermectin is planned.

Immunological and biochemical studies on *O. volvulus* have done little to clarify the possible existence of distinct strains, although allozyme studies showed evidence of genetic variation (Cianchi et al., 1985; Flockhart et al., 1986). However, recently, some DNA probes specific for *O. volvulus* have been described which belong to a tandemly repeated DNA sequence family (Meredith et al., 1989; Harnett et al., 1989). A polymerase chain reaction (PCR), based on the 150 bp repetitive DNA, has now been developed for the detection of all stages of *O. volvulus* (Meredith et al., 1991). The variability of the 150 bp family has been exploited to develop species and strain specific DNA probes and has shown that at least two genetic forms of *O. volvulus* do exist in West Africa (Erttmann et al., 1987; Erttmann et al., 1990). The high level of homology within this repeat family means that the species specificity of these probes is largely dependant on the hybridization and washing stringencies (Zimmermann et al., 1992).

A technique generating genomic fingerprints by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) based on the amplification by the Polymerase Chain Reaction (PCR) of random DNA fragments has recently been developed. In RAPD mapping, decamer oligonucleotide primers of arbitrary sequence but with a GC content of 50% or higher are used to amplify fragments of genomic DNA (Williams et al., 1990; Welsh and McClelland, 1990). RAPD has been successfully applied to the analysis of genomic DNA variation of several organisms (Hadrys et al., 1992; Klein-Lankhorst et al., 1991; Crowhurst et al., 1991; Mazurier et al., 1992). Species and strains can be distinguished by comparing polymorphisms in genomic fingerprints (Welsh et al., 1991). The particular advantages of RAPD technology is that small amounts (nanograms) of genomic DNA are needed and, unlike PCR, no prior knowledge of the genome subjected to analysis is required.

We describe here the adaptation of the RAPD assay to the genus *Onchocerca*, using a set of 20 oligonucleotide decamer primers. By comparing the fingerprints generated by the RAPD method, *O. volvulus*, *O. gutturosa*, *O. lienalis*, *O. gibsoni* and *O. ochengi* can be identified and distinguished from each other by the specific polymorphic patterns.

Accepted 18 April 1994

Trop. Med. Parasitol. 44 (1994) -
© Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York

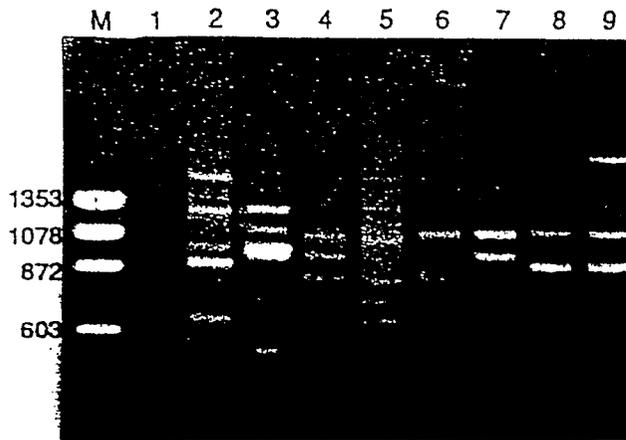


Fig. 1 Single primer PCR on genomic DNA from different species. Primer OPB-4 was used to amplify genomic DNA from human (lane 2), *Dirofilaria immitis* (lane 3), *O. gutturosa* (lane 4), *O. lienalis* (lane 5), *O. gibsoni* (lane 6), *O. ochengi* (lane 7) and two different *O. volvulus* isolates from Cameroon (lane 8) and from Sierra-Leone (lane 9). M: Molecular Weight Marker, λ X-174 Hae III digest. Lane 1: negative control.



Fig. 2 Single primer PCR on *O. volvulus* genomic DNA from different origins. Genomic DNA from *O. volvulus* (two different worms from the same nodule) coming from Cameroon (4 foci: Touboro, Poli, Bafia and Sa'a) and from Sierra-Leone (1 focus) were amplified with primer OPB-4.

M: Molecular Weight Marker, λ X-174 Hae III digest.

- Lane 1: negative control
- Lane 2: worm 1 from Touboro
- Lane 3: worm 2 from Touboro
- Lane 4: worm 1 from Poli
- Lane 5: worm 2 from Poli
- Lane 6: worm 1 from Bafia
- Lane 7: worm 2 from Bafia
- Lane 8: worm 1 from Sa'a
- Lane 9: worm 2 from Sa'a
- Lane 10: worm 1 from Sierra Leone
- Lane 11: worm 2 from Sierra Leone

Materials and methods

Nodules containing *O. volvulus* were excised and either conserved directly in absolute alcohol or collagenase-digested (Schultz-Key et al., 1977) and the worms preserved in absolute alcohol. The nodules were from savannah areas (Touboro and Poli, Cameroon), degraded forest areas (Bafia and Sa'a, Cameroon) and the isolated worms from forest regions of West Africa (Lunsar and Njala, Sierra-Leone). *Dirofilaria immitis*,

Table 1 Nucleotide sequence of primers OPB-01 to OPB-20 (Kit B, Operon technologies Inc.).

Primer	Nucleotide sequence
OPB-01	5' GTTTCGCTCC 3'
OPB-03	5' CATCCCCCTG 3'
OPB-04	5' GGACTGGAGT 3'
OPB-05	5' TGCGCCCTTC 3'
OPB-06	5' TGCTTGCC 3'
OPB-07	5' GGTGACGCAG 3'
OPB-08	5' GTCCACACGG 3'
OPB-09	5' TGGGGGACTC 3'
OPB-10	5' CTGCTGGGAC 3'
OPB-11	5' GTAGACCCGT 3'
OPB-12	5' CCTTGACGCA 3'
OPB-13	5' TCCCCCGCT 3'
OPB-14	5' TCCGCTCTGG 3'
OPB-15	5' GGAGGGTGTT 3'
OPB-16	5' TTTGCCCGGA 3'
OPB-17	5' AGGGAACGAG 3'
OPB-18	5' CCACAGCAGT 3'
OPB-19	5' ACCCCCCGAA 3'
OPB-20	5' GGACCCTTAC 3'

O. gutturosa, *O. lienalis*, *O. gibsoni*, and *O. ochengi* DNA were obtained from pooled worms as described previously (Meredith et al., 1989). The *O. volvulus* DNA was extracted from pooled worms as described by Meredith et al. (1989). PCR reactions were performed in 25 μ l of 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 20 picomoles of decamer primer(s) as given in Table 1 (Kit B, RAPD™ primer kits, Operon Technologies Inc.), 25 ng template DNA and 1 unit Taq polymerase (Promega). Amplification was carried out in a thermocycler (Techne PHC-3) programmed for 45 cycles of 1 minute at 92 °C, 1 minute at 36 °C and 2 minutes at 72 °C. Amplification products were resolved electrophoretically on 2% agarose gel, revealed by ethidium bromide and photographed under U. V. light (Sambrook et al., 1989).

Abbreviations

Deoxyribonucleic acid (DNA); random amplified polymorphic DNA (RAPD); base pairs (bp); polymerase chain reaction (PCR); sodium lauryl sulfate (SDS); operon primer kit B (OPB).

Results

First, we investigated the potential of RAPD in differentiating at the species level. Genomic DNA from different filarial species was amplified by use of a single decamer primer: 20 primers were tested in these experiments and in each case, at least one specific fragment was obtained for each *Onchocerca* DNA used. Fig. 1 shows the amplifications with primer OPB-4 on DNA from Human, *D. immitis*, *O. gutturosa*, *O. lienalis*, *O. Gibsoni*, *O. ochengi* and two of *O. volvulus* isolates from Cameroon and Sierra-Leone. Depending on the primer used, several bands can be seen, ranging from 1.5 Kb to 150 bp. Some of the bands are common between the different species and some are unique to one species. Preliminary investigations were also carried out to determine whether the RAPD patterns generated by these primers (OPB-1 to OPB-20) could be useful in strain differentiation within *O. volvulus*.

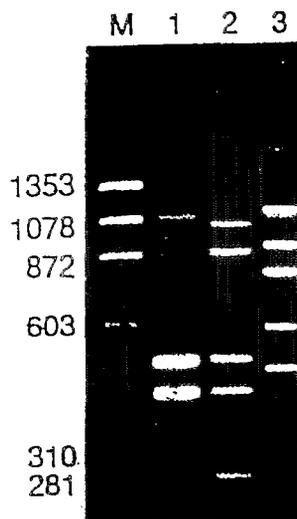


Fig. 3 Comparison of patterns generated with single and mixed primers (*O. volvulus* from Sierra-Leone). M: Molecular Weight Marker, ϕ X-174 Hae III digest. Lane 1: genomic DNA amplified with primer OPB-7. Lane 2: genomic DNA amplified with primer OPB-7 and OPB-8. Lane 3: genomic DNA amplified with primer OPB-8.

suitable for identification of the parasites in the fly since polymorphic pattern of the vector DNA will be superposed with those of the parasite, making interpretation of results difficult. However it shows great potential for the generation of species specific probes from the fragments generated, and species specific PCRs could be developed from the unique fragments for direct identification of *Onchocerca* species in vectors.

The primers used in this study do not show clear distinctions between the different isolates of *O. volvulus* tested. However, considering the number of RAPD primers available it is more than likely that clear differentiation between isolates can be obtained with other primers. Thus, a combination of these or other random primers could prove to be useful population markers. Further investigation of large number of isolates of *O. volvulus* is needed to evaluate the potential of RAPD in studies on population genetics. This technique may allow the selection of species or strain specific sequences as potential probes more easily than the classical approach. Such probes could improve the direct identification of *Onchocerca* infected vector (by hybridization or PCR) and the specificity would not be dependant on the stringency conditions.

It is important to be able to identify the origin or form of the parasite (L3 of different species of the genus *Onchocerca* or different strains of *O. volvulus*) in order to plan appropriate onchocerciasis control strategies. The results obtained on the correlation between classification of *O. volvulus* by DNA probes and epidemiologic patterns of onchocercal blindness (Zimmerman et al., 1992), support the hypothesis of strain association with pathogenicity.

RAPD analysis is interesting because very small amounts of genomic DNA are subjected to PCR and the amplification products are resolved on agarose gel. Consequently, for field application, there is no need for utilisation of radioactivity. Polymorphisms generated by this assay are useful as genetic markers when strictly standardized reaction conditions are used (Hadrys et al., 1992), which guarantee reproducible amplification products.

Acknowledgements

We would like to thank Drs. M. Boussinesq and J. P. Chippaux for providing material and epidemiological data and Dr. J. Prod'homme for support of this work. We are also grateful to Dr. J. P. Aussel for excellent technical assistance, Pr. Dorchies and Dr. C. Bevilaqua (Ecole Vétérinaire de Toulouse) for the *O. lienalis* control sample. We also thank Dr. R. Hartskeerl and G. van der Vliet for critical reading of the manuscript.

References

- Anderson, J. H., Fuglsang, P. J. S., Hamilton, T. F., Marshall: Studies on onchocerciasis in the United Cameroon Republic. II. Comparison of onchocerciasis in rain forest and a Sudan savanna. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68 (1974) 209-222
- Arnold, M. L., C. M. Buckner, J. J. Robinson: Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 1398-1402

DNA from different *O. volvulus* worms (4 isolates from Cameroon and 1 from Sierra-Leone) were amplified with different primers: Fig. 2 shows these amplifications with primer OPB-4; this figure is representative of all the amplification profiles obtained with the 19 other primers. The patterns observed for the different worms are very similar with some differences represented only by low intensity bands. To increase the chance of detecting intraspecific variation, pairs of oligonucleotides were tested. As an example, amplifications of *O. volvulus* genomic DNA with two primers (OPB-7 and 8) are presented in Fig. 3: the combination of two primers (Lane 2) result in the appearance of new amplified DNA fragments compared to amplification with single primer (Lane 1 and 3).

Discussion

RAPD is useful in differentiating at genus, species, and intraspecific level (Hadrys et al., 1992). Specific RAPD markers have been identified at genus level and species level in iris (Arnold et al., 1991) and tomato (Klein-Lankhorst et al., 1991), strain level in mouse (Welsh et al., 1991), "cultivar" level in broccoli and cauliflower (Hu and Quiros, 1991) and clone level in fungi (Smith et al., 1992). Divergence of even a fraction of one percent between two genomes often results in a different fingerprinting and thus allow strains of almost any organism to be distinguished (Welsh et al., 1991).

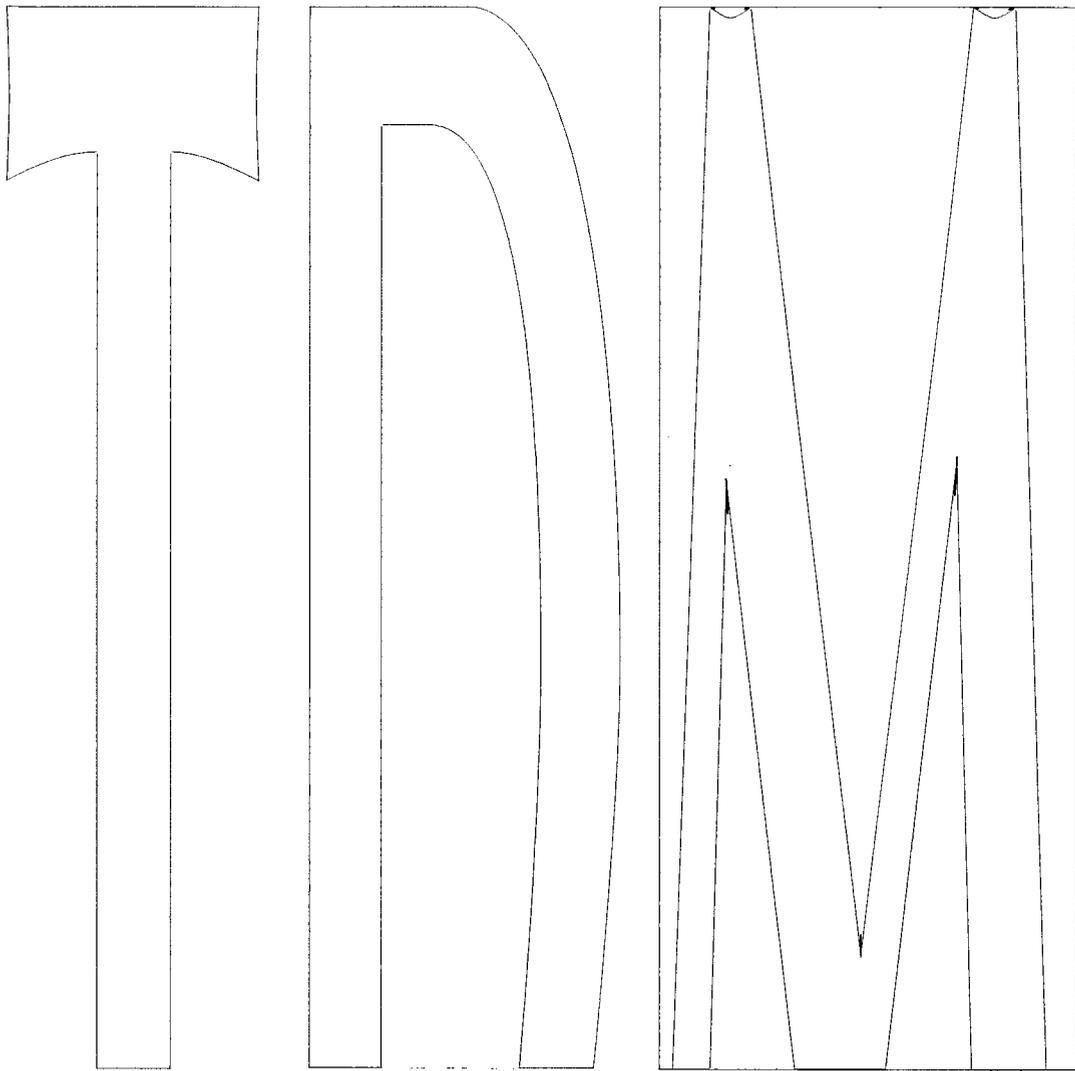
In this study, fragments of genomic DNA from various species of the genus *Onchocerca* were obtained by amplification with short primers of arbitrary nucleotide sequence. The polymorphic patterns allowed a clear distinction between the different species by RAPD with numerous different primers. When standardized reaction conditions were used, these results were highly reproducible. Clear differences on a simple agarose gel can be observed, unlike the conventional PCR assay described for *O. volvulus* (Meredith et al., 1991) that necessitate Southern blot analysis and hybridization. One important problem in Onchocerciasis control strategies and surveillance is the identification of *Onchocerca* species infecting the *Simulium* vector. The RAPD technique is not

- Cianchi, R., M. Karam, M. C. Henry, F. Villani, S. Kumelien, L. Bullini: Preliminary data on the genetic differentiation of *Onchocerca volvulus* in Africa (Nematoda: Filarioidea). Acta Tropica 42 (1985) 341-351
- Crowhurst, R. N., B. T. Hawthorne, E. H. Rikkerink, M. D. Templeton: Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. Current Genet. 20 (1991) 391-396
- Erttmann, K. D., T. R. Unnasch, B. M. Greene, E. J. Albiez, J. Boateng, A. M. Denke, J. J. Ferraroni, M. Karam, Schulz-Key, P. N. Williams: A DNA sequence specific for forest form *Onchocerca volvulus*. Nature 327 (1987) 415-417
- Erttmann, K. D., S. E. O. Meredith, B. M. Greene, T. R. Unnasch: Isolation and characterisation of form specific DNA sequences of *O. volvulus*. Acta Leidensia 1-2 (1990) 253-260
- Flockhart, H. A., R. E. Cibulskis, M. Karam, E. J. Albiez: *Onchocerca volvulus*: enzyme polymorphism in relation to the differentiation of forest and savannah strains of this parasite. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80 (1986) 285-292
- Hadrys, H., M. Balick, B. Schierwater: Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol. Ecol. 1 (1992) 55-63
- Hu, J., C. F. Quiros: Identification of broccoli and cauliflowers cultivars with RAPD markers. Plant Cell Report 10 (1991) 505-511
- Klein-Lankhorst, R. M., A. Vermunt, R. Weide, T. Liharska, P. Zabel: Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Theor. Appl. Genet. 83 (1991) 108-114
- Mazurier, S., A. van de Giessen, K. Heuvelman, K. Wernars: RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. Letters in Appl. Microbiol. 14 (1992) 260-262
- McMahon, J. E., J. B. Davies, M. D. White, J. M. Goddard, P. A. Beech-Garwood, B. R. Kirkwood: Onchocerciasis in Sierra Leone. I. Studies on the prevalence and transmission at Gbalima village. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80 (1986) 802-809
- Meredith, S. E. O., T. R. Unnasch, M. Karam, W. F. Piessens, D. F. Wirth: Cloning and characterisation of an *Onchocerca volvulus* specific DNA sequence. Mol. Biochem. Parasitol. 36 (1989) 1-10
- Meredith, S. E. O., G. Lando, A. A. Gbakima, P. A. Zimmermann, T. R. Unnasch: *Onchocerca volvulus*: application of polymerase chain reaction to identification and strain differentiation of the parasite. Exp. Parasitol. 73 (1991) 335-344
- Prost, A., A. Rougemont, M. S. Omar: Caractères épidémiologiques, cliniques et biologiques des onchocercoses de savane et de forêt en Afrique Occidentale. Ann. Parasitol. 55 (1980) 347-355
- Sambrook, J., F. F. Fritsch, T. Maniatis: Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). Second Edition
- Schultz-Key, H., F. J. Albiez, D. W. Büttner: Isolation of living adult *Onchocerca volvulus* from nodules. Tropenmed. Parasitol. 28 (1977) 428-430
- Smith, M.L., J. N. Bruhn, J. B. Anderson: The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. Nature 356 (1992) 428-431
- Welsh, J., M. McClelland: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acid Res. 18 (1990) 7213-7218
- Welsh, J., C. Petersen, M. McClelland: Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. Nucl. Acid Res. 19 (1991) 303-306
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, S. V. Tingey: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acid Res. 18 (1990) 6531-6535
- Zimmerman, P. A., K. Y. Dadzie, G. de Sole, J. Remme, E. Soubey Alley, T. R. Unnasch: *Onchocerca volvulus* DNA probe classification correlates with epidemiologic patterns of blindness. J. Infect. Dis. 165 (1992) 964-968

Dr. Stéphane Herder

Laboratoire d'Epidémiologie des Maladies à Vecteurs
Centre ORSTOM de Montpellier, 911
Av. Agropolis, BP 5045
F-34032 Montpellier
France

Harnett, W., Chambers, A. E., Kinz, A.,
Parkhous, R. E.: A DNA probe specific for *Onchocerca volvulus*.
Mol. Biochem. Parasitol. 35 (1989) 119-122



Thèses et documents microfichés

Mots-clés

Onchocerca volvulus, Variabilité génétique, RAPD, Microsatellites, PCR.



209-213, rue La Fayette
75480 Paris cedex 10

ISSN : 0767-922X
ISBN : 2-7099-1311-9

Diffusion :
32, avenue Henri Varagnat
93143 Bondy cedex