

VERS UNE UTILISATION DES BIO-PUCES À ADN POUR L'ÉTUDE D'ISOLATS PLASMODIAUX DE TERRAIN

P. REFOUR, M. GISSOT, A. SIAU, D. MAZIER, C. VAQUERO

Med Trop 2004 ; 64 : 387-393

RÉSUMÉ • L'infection à *Plasmodium falciparum* est l'une des premières causes de mortalité dans les zones d'endémie plasmodiale. Face à l'augmentation des résistances du parasite aux thérapies, l'utilisation d'outils permettant l'analyse à grande échelle de la biologie de *P. falciparum* devient de plus en plus urgente. L'exploration du génome et du profil d'expression de l'ensemble des gènes de *P. falciparum* est désormais possible grâce à la technique des bio-puces. Cette technologie reste cependant limitée à l'étude d'échantillons dont les quantités d'ARN totaux sont de l'ordre de 8 à 50 µg. En effet, afin d'assurer la robustesse statistique de ce type d'expériences, au moins une réplique technique et une réplique biologique sont nécessaires. Cette contrainte technique exclut de fait des échantillons provenant de souches de terrain. De nombreuses méthodes ont été développées afin d'adapter ces techniques aux faibles quantités d'ARN total. L'utilisation de techniques d'amplification et des marqueurs différents des fluorochromes couramment utilisés, ayant pour vocation d'augmenter la sensibilité de détection, permet de diminuer la quantité de matériel nécessaire à chaque expérience. Cependant, les techniques d'amplification semblent introduire un biais dans les résultats générés. De même, l'emploi de nouveaux marqueurs très performants est encore limité du fait de contingences techniques. A l'heure actuelle, le marquage radioactif semble le mieux répondre aux exigences de l'utilisation de faibles quantités d'ARN totaux. Utilisable en hybridation compétitive, ce type d'approche combine tous les critères de criblage des bio-puces et a fait la preuve de son efficacité sur des bio-puces thématiques de *P. falciparum* développées dans notre laboratoire.

MOTS-CLÉS • Paludisme - Biopuce - Isolats de terrain - Radio-isotope.

PROGRESS TOWARDS THE USE OF DNA MICROARRAY TECHNOLOGY FOR THE STUDY OF WILD *PLASMODIUM* STRAINS

ABSTRACT • *Plasmodium falciparum* is still a major cause of mortality in the world. Due to growing drug resistance in most endemic countries, the use of tools allowing large-scale analysis of *P. falciparum* biology is increasingly urgent. In addition to gene sequence data, post-genomic methods including microarray-based transcript profiling allow complete *Plasmodium* gene expression. However, application of this technology has been limited to study of samples presenting large quantities of total RNA (8 µg to 50 µg). Indeed at least two replicas (one technical and one biological) are necessary to ensure the statistical strength of results. This constraint excludes the use of biological materials hardly available and of wild strain samples. Many methods have been developed to facilitate the use of microarray technology with smaller quantities of total RNA. Currently the use of amplification techniques, various fluorochrome markers, and labelled cDNA and/or RNA probes avoiding all amplification steps, to enhance detection sensitivity has enabled reliable assays to be performed with less material. However these enhancement techniques appear to have a biasing effect on results and the use of powerful new markers is still limited for technical and practical reasons. At the present time radioactive labeling is the most reliable technique for assays using small quantities of total RNA. This approach is not only compatible with competitive hybridization but also enables all microarray screening criteria. Findings from our laboratory support the effectiveness of radioactive labeling for microarray-based determinations on *P. falciparum*.

KEY WORDS • Malaria - Microarray - Field samples - Radio-isotope.

• Travail de l'Unité INSERM U511, Immuno-Biologie Cellulaire et Moléculaire des Infections Parasitaires (P.R., Doctorant de l'université Paris VI; M.G., A.S., Doctorants de l'université Paris VI; D.M., Docteur en médecine, Professeur de l'université Paris VI, Directeur de recherche et de l'unité INSERM U511; C.V., Docteur de l'université Paris VII, Directeur de recherche INSERM U511), CHU Pitié-salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie Paris VI, Paris, France.

• Correspondance : P. REFOUR, INSERM U511, Immuno-Biologie Cellulaire et Moléculaire des Infections Parasitaires, CHU Pitié-salpêtrière, 91 Bd de l'hôpital, 75643 Paris cedex 13, France • Fax : 33 (0)1 45 83 88 58.

• Courriel : refour @ext.jussieu.fr ; vaquero @ext.jussieu.fr •

• Article reçu le 1/12/2003, définitivement accepté le 18/05/2004.

La complétion du séquençage et l'annotation graduelle du génome de *Plasmodium falciparum* ouvrent des perspectives de recherche nouvelles pour mieux comprendre la complexité biologique du parasite. Cependant, élucider les mécanismes biologiques impliqués dans la résistance, la virulence et la pathogénèse de *Plasmodium falciparum* nécessite d'étendre les investigations menées sur les souches adaptées de laboratoire, à l'étude des isolats plasmodiaux de terrain. L'exploitation des données issues du séquençage du clone 3D7 a permis de prédire approximativement 5 300 cadres

ouverts de lecture (1). Dès lors, les études de génomique fonctionnelle impliquent l'utilisation de techniques d'investigation à haut débit. Parmi ces approches, les puces à ADN ou bio-puces, sont particulièrement propices à ce type d'analyse à grande échelle. Il apparaît cependant nécessaire d'adapter des techniques utilisées communément dans le laboratoire au matériel de terrain.

La technique des bio-puces est devenue en quelques années une technique incontournable pour l'analyse simultanée des variations de l'abondance des ARN messagers (ARNm) de plusieurs milliers de gènes, dans des cellules biologiquement différentes (2). Cependant, bien que l'utilisation majeure des bio-puces soit vouée à l'étude des transcritomes, cette approche à l'origine utilisée pour le séquençage et le génotypage (3, 4), pourrait ainsi permettre d'étudier la biodiversité des génomes parasitaires (5).

Les premières puces à ADN de *P. falciparum* ont été élaborées aux Etats-Unis, par dépôt de produits de PCR à partir d'une banque d'ADN génomique aléatoire (3 648 fragments) (6) ou d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) (944 fragments) (7). Depuis peu, un répertoire d'environ 7 500 oligonucléotides d'une taille moyenne de 70 mers correspondant au génome entier du clone 3D7 (Operon®, malaria oligoset), et comprenant plusieurs cibles par gène pour les grands messagers, est disponible. Ce répertoire a récemment été utilisé pour, d'une part valider l'approche expérimentale par oligonucléotides longs (8), et d'autre part étudier le profil d'expression des gènes au cours du cycle érythrocytaire en préparant des échantillons correspondant à chaque heure au cours des 48 h du développement érythrocytaire du clone HB3 (9). De plus, deux bio-puces prototypes ont été mises au point par la société Affymetrix® avec des oligonucléotides de 25 mers. La première, avec 4 167 oligonucléotides correspondant à la presque totalité du Chromosome 2 de *P. falciparum*, clone 3D7, a permis de valider la technologie des oligonucléotides courts par deux approches expérimentales (5, 10). La seconde, couvrant la totalité du génome de 3D7 comprend les régions codantes, intergéniques et des séquences antisens (260 000 oligonucléotides). Cette dernière ayant fait l'objet d'une étude de sept stades du cycle érythrocytaire dont le stade gamétoocyte, et le stade sporozoïte (11), constitue une base de données utile à la communauté (données disponibles sur: <http://plasmodb.org/>), même si un certain nombre de discordances sont observés entre les données issues de ces deux expériences mettant en œuvre le génome complet de *P. falciparum* (9, 11). Il n'en reste pas moins que l'accessibilité de telles puces est encore très restreinte, avec un coût non négligeable.

Bien que l'utilisation de bio-puces tende à se généraliser au sein des laboratoires travaillant sur Plasmodium, leur application à l'étude du transcriptome et du génome d'échantillons prélevés en zone d'endémie, se heurte à plusieurs problèmes de faisabilité. Outre l'hétérogénéité des isolats tant du point de vue de la synchronisation des échantillons (stades anneaux 0 à 18 h après pénétration dans l'érythrocyte) que du point de vue du nombre de clones présents (génotypes différents), l'obstacle majeur d'une telle méthodologie reste la faible quantité de matériel biologique

disponible. Suivant le protocole utilisé le coût peut être très important, et si l'on veut utiliser des bio-puces pour l'étude d'isolats de terrain, les contraintes expérimentales de répliques techniques et biologiques, ainsi que le nombre d'échantillons nécessaires à une étude, imposent l'utilisation de techniques sensibles et peu coûteuses. A l'heure actuelle, la plupart des études par approche bio-puce sont basées sur l'utilisation des ADNc marqués par 2 fluorochromes différents (Cyanine 3: cy3 et Cyanine 5: cy5) et nécessite environ 8 µg à 50 µg d'ARN totaux (12) soit un minimum de 2×10^8 parasites synchronisés au stade anneau. Dans cette revue, après une description du principe des bio-puces et des différentes approches expérimentales, nous insisterons sur les différents protocoles permettant d'augmenter la détection du signal et donc de diminuer la quantité de matériel biologique nécessaire à ce type d'étude.

PRINCIPE ET DIVERSITÉ DES BIO-PUCES

Le principe des bio-puces repose sur l'hybridation de deux acides nucléiques de séquences complémentaires : l'une, définie comme « cible » (soit des fragments d'amplification par PCR, soit des oligonucléotides correspondant aux gènes à étudier), est immobilisée sur un support, l'autre la « sonde » (correspondant aux ADNc produits lors de la rétrotranscription), qui une fois marquée va interagir avec la cible et après révélation, donner un signal. On peut ainsi analyser et comparer simultanément deux échantillons distincts discriminés par les deux marqueurs, où l'un est l'échantillon utilisé comme référence et l'autre l'échantillon test. Les gènes sont dits « sur-exprimés » ou « sous-exprimés » par rapport à l'échantillon référence, lorsque le rapport des valeurs obtenues entre les deux échantillons (ratio) est supérieur à une valeur seuil définie (en général $\times 2$ ou $/2$).

Plusieurs types de bio-puces existent à ce jour, répertoriées selon le support, la densité et la nature des dépôts. Trois types de support sont employés, les membranes de nylon, les lames de verre recouvertes d'un ligand (poly-L-lysine, aminosilane, aldéhyde, epoxy, matrice de gel polyacrylamide) et les dalles de silice (13, 14). Ces différents supports déterminent la technologie de dépôts des cibles donc le type de cible, ainsi que le type de marqueur utilisable pour la détection.

Les membranes de nylon à haute densité permettent jusqu'à 20 000 dépôts sur une surface de $8 \times 12 \text{ cm}^2$, tandis que les lames de verre autorisent jusqu'à 30 000 dépôts mais sur une surface de $2 \times 5,5 \text{ cm}^2$. Cependant, certaines approches tendent à combiner la densité de dépôts obtenues sur lame de verre et les supports membranes (15). Quant aux supports de silice, il est possible de concentrer jusqu'à 1×10^6 cibles sur une surface $1,3 \times 1,3 \text{ cm}^2$ (16).

Le matériel génétique déposé sur le support peut être de deux natures, soit des produits de PCR, soit des oligonucléotides. Il semble qu'il n'y ait aucune différence de sensibilité de détection entre l'utilisation de produits de PCR ou d'oligonucléotides longs (50 mers) (17). A notre connaissance aucune donnée publiée n'a fait état de différence de

Tableau I - Approches expérimentales utilisées pour baisser le seuil de détection.

	Fluorescence	Amplification d'ARN		Marquage d'ARN		Amplification du signal			Différents marqueurs plus sensibles	
		Amplification T7 polymérase	Marquage indirect	Haptènes de Platine	Dendrimers	TSA ^a	RCA ^b	Chimiluminescence	Radioactivité	
Hybridation différentielle	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	
Type de cibles	PCR ^c OS ^d	PCR OA ^e	PCR OS	PCR OS OA	PCR OS	PCR OS	PCR OS	PCR OS	PCR OS	
Quantité minimale d'ARN total requise	8 µg	0,3 µg à 3 µg	2 µg	2 µg	2,5 µg	1,5 µg	ND ^f	< 1 µg	0,5 µg à 1 µg	
Nombre de répliques/ 1 échantillon	1	1	1	1	1	1	1	1 à 10	1 à 5	
Références	(6)	(30)	(33)	(34)	(40)	(41)	(42)	Communication personnelle P. Ravassard	Données personnelles	

^a : Tyramide Signal Amplification; ^b : Rolling Circle Amplification; ^c : Produits PCR; ^d : Oligonucléotides Sens; ^e : Oligonucléotides Antisens; ^f : Non déterminé.

sensibilité entre produits de PCR et oligonucléotides court (20 mers). En revanche des différences de profils d'expression ont été observées entre des expériences menées sur ces deux types de cibles (18). Enfin, les supports utilisés ainsi que les méthodes de marquage des sondes sont déterminants quant aux limites de détection (19) et à l'échelle du criblage. D'ailleurs, l'innovation majeure dans le domaine du criblage à haut débit a été la miniaturisation du *pattern* de dépôt des cibles. Ainsi, le remplacement des membranes par des lames de verre a permis de diminuer et les volumes d'hybridation et la quantité de matériels immobilisés, avec une haute densité de dépôts.

Selon la méthode de détection des signaux, et donc le type de marquage des ADNc, la limite de détection peut varier d'un facteur dix (entre fluorescence et radioactivité par exemple) définissant ainsi la quantité minimale d'ARN totaux nécessaire pour une expérience. Le nombre, la diversité des méthodes de détection et des techniques d'amplification du signal et/ou d'ARN total décrites dans la littérature, montrent que baisser le seuil de détection reste une priorité dans le développement des bio-puces. Plusieurs types de marquage ont en effet été mis au point utilisant des marqueurs fluorescents (2, 20), enzymatique [chimiluminescence (21)] et radioactifs (22, 23). Bien que les marqueurs fluorescents soient les plus utilisés, ils présentent : 1) le désavantage de nécessiter beaucoup d'ARN totaux (8 à 50 µg) si l'on compare aux autres techniques tel que le marquage par radio-isotopes; 2) un seuil de détection élevé, ne permettant pas l'analyse des transcrits peu représentés.

La limite de détection à partir de petites quantités de matériel biologique (<5µg) peut être abaissée de plusieurs façons; 1) amplification des ARN totaux; 2) marquage direct et indirect des ARN totaux ou néo-synthétisés; 3) amplification des ADNc; 4) amplification du signal des ADNc marqués; 5) utilisation de marqueurs plus sensibles pour la détec-

tion. Ces approches (Tableau I) sont développées dans le paragraphe suivant.

APPROCHES PERMETTANT D'ABAISSE LE SEUIL DE DÉTECTION

Amplification des ARN messagers

Plusieurs techniques d'amplification des ARN et du signal ont été développées, afin d'exploiter les échantillons de faible quantité. Parmi les méthodes d'amplification des ARN, la plus utilisée est l'amplification des ARNm par l'ARN polymérase du bactériophage T7 (24). Cette technique repose sur la synthèse (transcription *in vitro*) d'ARN « antisens » à partir d'ADNc double brin lui-même synthétisé à partir de l'échantillon d'ARN total à tester, en présence d'un oligonucléotides poly dTTP couplé en 5' au promoteur spécifique de l'ARN polymérase T7. Les transcrits antisens ainsi générés sont alors convertis en ADNc marqués par incorporation directe ou indirecte de marqueurs fluorescents. La contrainte majeure de cette amplification est qu'elle n'autorise pas l'utilisation de bio-puces avec des cibles simple brin (oligonucléotides) correspondant aux séquences sens, ce qui est le cas de la majorité des bio-puces commerciales dont le répertoire d'oligonucléotides de *P. falciparum* commercialisé par Operon® (8).

Il n'en reste pas moins que cette approche, par les biais qu'elle génère, reste controversée. En effet, bien que certaines expériences aient été menées sans comparaison avec des résultats obtenus en l'absence d'amplification (11, 25, 26), on observe lorsque cette comparaison est effectuée, une discordance dans la distribution des groupes de gènes repartis selon les ratios obtenus entre deux échantillons biologiques (27-31). Une étude statistique menée afin d'évaluer l'effet seul de l'amplification (32), a permis de montrer que

selon les classes de ratios déterminés pour discriminer les gènes différemment exprimés (par exemple x_2 et $/2$), les ratios ne sont pas tous préservés. Et ce, même si l'approche avec amplification induit des intensités d'hybridation plus élevées qu'un marquage classique et une reproductibilité satisfaisante. De plus, pour des quantités d'ARN totaux inférieures à 0,3 μg , il est nécessaire de procéder à deux amplifications successives pour obtenir un résultat proche de celui obtenu avec une seule amplification (possible seulement à partir de plus de 0,3 μg); ce qui augmente d'autant le coût de l'expérience. Cette technique reste cependant une alternative pour des quantités de matériel de départ de 0,3 μg à 3 μg , lorsque l'on compare deux échantillons amplifiés.

Marquage direct et indirect des ARN totaux ou néo synthétisés

Deux techniques de marquage des ARN totaux ou néo synthétisés utilisés directement comme sonde pour les biopuces ont été décrites. La première repose sur le marquage des transcrits *in vitro* en incorporant le dUTP-aminoalyle au cours de l'amplification des ARNm avec l'ARN T7 polymérase, qui après couplage à des fluorochromes libres, permet d'augmenter l'efficacité de marquage de 2 à 3 fois (33), et l'utilisation de bio-puces commerciales avec des oligonucléotides sens. Cependant, les effets sur la représentativité des ARNm dus à la technique d'amplification, pourraient être du même ordre que ceux décrits ci avant. L'autre technique consiste en un marquage chimique direct des ARN totaux avec des fluorochromes couplés à des complexes (haptènes) de platine (34). Très prometteuse, cette technique peut être utilisée à partir de 2 μg d'ARN totaux. Elle ne permet cependant, ni l'utilisation de bio-puces contenant des oligonucléotides sens, ni une réplique technique car tout l'échantillon marqué est directement utilisé; elle reste de plus pour l'instant extrêmement coûteuse.

Amplification des ADNc

Il est aussi possible d'amplifier les ADNc générés après transcription inverse des ARN totaux [méthode SMART PCR (35), SPA (36)], mais la représentativité des ARNm d'un échantillon dont les ADNc ont été générés par ce type de technique, est cependant relative [Siau *et Coll* données personnelles; (36-38)].

Amplification du signal des ADNc marqués

Trois techniques sont aujourd'hui disponibles pour amplifier le signal des ADNc marqués: technologie des dendrimers (40), Tyramide Signal Amplification (TSA), (41) et Rolling Circle Amplification (RCA), (42). La technologie des dendrimers repose sur l'utilisation de macromolécules d'acides nucléiques agrégés et très fortement marquées. En effet, les parties simple brin de surface du complexe viennent s'hybrider à une séquence incluse, au préalable, dans la partie 5' des oligonucléotides poly T utilisés pour la transcription inverse des échantillons à tester. La technologie de TSA est basée sur l'accumulation d'un marqueur activé *in situ* par la tyramide, *via* les sondes marquées à la biotine conjuguées

à un système streptavidine-peroxydase. L'amplification du signal au fur et à mesure de l'accumulation du marqueur est proportionnelle à la concentration de sondes hybridées à la cible. Enfin, le système RCA utilise un ADN circulaire simple brin hybridé sur une amorce spécifique immobilisée, pour amplifier à température constante la séquence circulaire en continu. Le matériel obtenu après amplification correspond à un concatémère de l'ADN circulaire ancré par l'oligonucléotide amorce et ayant incorporé des dNTP marqués par un fluorochrome, augmentant ainsi le signal de détection. Ces techniques ne semblent, pour l'instant, pas utilisées en routine, et ce type d'approche reste limité car on ne peut effectuer de répliques à partir d'un même échantillon (Tableau I).

Utilisation de marqueurs plus sensibles pour la détection

Plusieurs marqueurs différents des fluorochromes peuvent être employés, et deux d'entre eux, les plus couramment utilisés seront décrits. Le marquage avec des marqueurs enzymatiques puis révélation par chimiluminescence (21) est le système le plus sensible, mais ne permet pas pour l'instant de quantifier les signaux (réponse tout ou rien). De plus, cette technique perd de son intérêt du fait des phénomènes de diffusion, de saturation et d'extinction rapide du signal. L'utilisation encore expérimentale, de microcapillaires pour focaliser l'émission de lumière, et de la mesure du temps d'extinction du signal, devrait permettre d'éliminer ces désavantages, autorisant même une détection en différentiel en utilisant différents couples d'enzymes/révélateurs (43).

Les marqueurs radioactifs semblent être les mieux adaptés aux faibles quantités de matériel biologique, car ils ont l'avantage de baisser le seuil de détection par rapport aux marqueurs fluorescents et ce en l'absence d'amplification. Il est certain que ce type de marquage engendre des contraintes d'utilisation non négligeables, mais plusieurs avancées récentes ont permis d'en éliminer un certain nombre. En effet, l'une des limitations majeures était la nécessité d'utiliser des membranes indépendantes pour comparer les échantillons tests à l'échantillon de référence, car il n'était pas possible de discriminer les 2 isotopes. Cette impossibilité imposait aussi de normaliser les résultats à l'aide d'une hybridation préalable avec un oligonucléotide marqué afin d'évaluer la qualité et la quantité des dépôts. Cependant, l'avantage des membranes est de pouvoir, après déshybridation, être réutilisées 5 à 10 fois, réduisant d'autant le coût des expériences. Récemment, la possibilité d'utiliser deux radio-isotopes avec des lames de verre a été décrite (44) permettant d'avoir recours aux lames conçues initialement pour les expériences en fluorescence. Le fait de faire usage des marqueurs radioactifs sur des systèmes miniaturisés présente plusieurs avantages, notamment celui de réduire les volumes d'hybridation (et les volumes de liquides contaminés), ce qui a pour effet de diminuer le seuil de détection. Néanmoins, avec de telles densités de cible, la résolution spatiale des appareils de détection des signaux radioactifs classiques (Phosphor imager) est limitante

(40 µm), la discrimination efficace des signaux produits par deux cibles distinctes immobilisées sur lames de verre devient alors difficile.

La détection d'émissions radioactives sur des supports à haute densité n'a été rendue possible que par l'utilisation d'une caméra CCD (charge-coupled device) à haute résolution (45). De plus, ce type de détecteur effectue le comptage des désintégrations en temps réel, rendant possible la quantification de l'ensemble des signaux hétérogènes sans phénomène de saturation pour les transcrits abondants. Enfin, l'avancée majeure est la possibilité d'hybrider en différentiel deux échantillons sur un même support puisque la discrimination de 2 radio-isotopes est actuellement possible (46). En effet, la filtration des émissions radioactives est basée sur la discrimination de la taille du diamètre de l'émission des photons produits lors de l'impact des micro éléments contre une fine couche de scintillant immobilisé sur une feuille de mylar® (Dupont®). L'image générée par la totalité des photons est filtrée et deux images sont alors constituées selon la contribution de chaque radio-isotope. La sensibilité, l'utilisation d'un support de verre, la possibilité d'exploiter des bio-puces disponibles, ainsi que la possibilité d'hybrider en différentiel avec un comptage en temps réel sont des atouts majeurs qui nous ont conduits à choisir préférentiellement cette méthode pour l'exploitation de petites quantités d'ARN totaux et permettre d'envisager l'application aux prélèvements de terrain.

BIO-PUCE THÉMATIQUE DE *P. FALCIPARUM* ET HYBRIDATION DIFFÉRENTIELLE D'ADNc MARQUÉS AVEC DEUX RADIOSOTOPES

Nous avons choisi d'adapter, sur le site de la Pitié-Salpêtrière (Plateforme Post-génomique Pitié-Salpêtrière, P3S), la technique de double marquage radioactif (47) à notre problématique d'analyse du transcriptome de *P. falciparum*. Une bio-puce thématique a été élaborée, regroupant 150 produits de PCR correspondant à des séquences de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la transduction du signal (~ 3% des cadres ouverts de lecture du génome complet, prédits). Ces produits sont immobilisés sur lames de verre, avec une densité de 400 µm de centre à centre, soit une surface totale de 1 cm² avec 2 répliques par gène. L'hybridation différentielle de deux échantillons d'ADNc marqués avec deux isotopes différents, ³[H]-dATP et ³⁵[S]-dATP, génère avec un faible bruit de fond, des signaux sans saturation au cours de la détection par comptage linéaire en temps réel sur 24 h (et plus si nécessaire). L'acquisition des désintégrations des deux radio-isotopes est effectuée par un Micro imager (45) (Biospace®, Paris) à une résolution de 15 µm pour le ³[H], et 20 µm pour le ³⁵[S]. L'image générée est ensuite filtrée à l'aide d'un algorithme de discrimination des signaux donnés respectivement par le ³[H]-dATP et le ³⁵[S]-dATP, (Dual Labelling®, Biospace®). Enfin, les données sont extraites (Arrayvision®, Imaging Research®), normalisées et analysées (Genespring®, Silicon Genetics®).

Cette technique de détection donne des résultats reproductibles, avec une sensibilité nous permettant d'exploiter des échantillons rares (=1 µg). Les résultats obtenus à partir de différents marquages et préparations d'ARN extraits au même stade du cycle sont reproductibles (48). Enfin, différentes expériences menées sur des gammes de concentration en ARN totaux utilisées au départ dans la réaction de transcription inverse, montrent qu'il serait possible d'appliquer ce type de technique aux isolats de terrain (Refour *et Coll*, manuscrit soumis). En effet, à partir d'un microgramme d'ARN total par échantillon il nous est possible d'hybrider en différentiel cinq lames précédemment décrites et cette même quantité pourrait donc être utilisée pour hybrider des puces correspondant au génome complet de *Plasmodium*.

DISCUSSION

L'application des bio-puces à l'étude des isolats de terrain nécessite de prendre en compte toutes les contraintes techniques (quantités suffisantes de matériel de départ, reproductibilité, répliques, nombre d'échantillons, etc.), ainsi que les contraintes inhérentes à la dynamique des infections (souches asynchrones, populations polyclonales, polymorphisme des souches étudiées, ...). Cependant, l'analyse à haut débit est nécessaire, que les études soient génomiques : mise en évidence de la diversité du génome des souches de terrain, remaniements chromosomiques (délétions, mutations, polymorphismes, ...), identification des *loci* associés à la résistance et à la virulence du parasite, ou qu'elles soient de type post-génomique fonctionnelle : caractérisation des gènes et des voies métaboliques modulés sous pression médicamenteuse, identification de groupes de gènes caractéristiques d'isolats potentiellement impliqués dans les accès graves, anémie, neuropaludisme, etc.

Dans l'emploi de bio-puces, pour l'étude du génome mais plus encore pour l'étude du transcriptome, l'une des contraintes la plus importante est l'extraction de matériel biologique en quantité suffisante, en particulier pour la réalisation de plusieurs répliques expérimentales. En effet, les schémas expérimentaux communément utilisés (49) préconisent au moins une réplique expérimentale dite technique, et une réplique expérimentale dite biologique soit au moins 4 expériences par condition. La réalisation de ces différentes répliques est indispensable pour la validation et la robustesse de l'étude statistique des données expérimentales. Si l'on estime qu'à partir d'un prélèvement de cinq millilitres de sang total avec une parasitémie de 0,5 % (soit 1x10⁸ parasites), et une population parasitaire synchronisée au stade anneau, il est possible d'obtenir environ 5 µg d'ARN totaux, on comprend la nécessité de mettre en œuvre une approche expérimentale très sensible. La qualité et la quantité d'ARN total obtenu à partir d'un échantillon, est un paramètre déterminant pour les rendements de marquage. L'extraction d'ARN de qualité à partir de faible quantité de matériel biologique reste une étape délicate. Bien qu'un certain nombre de techniques et de nombreux kits soient disponibles, la technique utilisant le Trizol®

(Invitrogen) (50), et un entraîneur d'ARN lors de l'étape de précipitation, reste la plus efficace en termes de rendement et de qualité. En effet, l'efficacité de lyse au Trizol® du parasite est supérieure aux autres méthodes et évite le traitement à la saponine. Enfin, cette méthode d'extraction en phase liquide permet de maîtriser la concentration finale de l'échantillon.

Une autre contrainte est de pouvoir quantifier la concentration du matériel de départ et sa qualité, la limite actuelle se situant aux alentours de 50 ng à 100 ng grâce à un système d'électrophorèse capillaire développé par la société Agilent® (Biochip®). Il est en effet important de standardiser les rendements d'extraction en fonction de la parasitémie et selon la méthode d'extraction, afin de normaliser les quantités utilisées pour chaque expérience.

Bien que les formes circulantes de *P. falciparum* soient des formes anneaux, l'échantillon sanguin comprend le plus souvent plusieurs isolats plus ou moins synchrones. En effet, un décalage dans le cycle cellulaire est possible sans distinction morphologique à ce stade (4 h à 12 h de décalage), revenant à étudier le transcriptome d'un mélange d'anneaux jeunes et âgés. Or, les méthodes de séparation/synchronisation *ex vivo* induisent un stress à même de perturber le transcriptome du parasite. De même pour les prélèvements de faible parasitémie, la nécessité d'effectuer une maturation *ex vivo* des isolats afin d'augmenter la quantité de matériel disponible, pourrait avoir des effets non négligeables sur le transcriptome. Ces étapes de multiplication cellulaire sélectionnent les parasites capables de se développer *ex vivo* ce qui augmente la clonalité des cultures et pourrait induire un biais dans les données obtenues lors de l'étude du génome et du transcriptome.

Un grand nombre d'études de terrain pourraient bénéficier des propriétés de criblage à grande échelle des bio-puces. Et l'un des axes possibles de recherche serait d'identifier des groupes de gènes parasitaires associés soit aux accès pernicieux, soit aux accès simples. Il n'en reste pas moins qu'en plus du parasite qui évidemment participe à la gravité de l'infection, la susceptibilité de l'hôte intervient dans le développement des formes pernicieuses. De plus, il est important de souligner le fait que les parasites présents dans la voie sanguine, seul stade pouvant être étudié, puissent exprimer des gènes différents de ceux exprimés dans les parasites séquestrés dans le cerveau.

Enfin, bien que les possibles hybridations croisées entre l'homme et le parasite aient été évaluées de manière indépendante (5), il est important de tester l'impact sur le transcriptome d'une hybridation compétitive entre des ADNc issus d'ARN totaux humains et plasmodiaux. Aussi, il est nécessaire de prendre en compte le choix des cibles utilisées pour ces différentes études, car celles disponibles actuellement sont générées à partir des données issues du séquençage du clone 3D7. Il sera donc nécessaire d'évaluer le degré de divergence entre le génome des isolats de terrain et ce clone modèle (5). La définition de cibles spécifiques pourrait conduire à la caractérisation des différentes souches et espèces de *Plasmodium*, utilisables pour des études épidémiologiques.

CONCLUSION

L'utilisation de sondes radioactives pour un criblage à haut débit, qu'il concerne l'étude du génome ou du transcriptome de *P. falciparum* fait que les contraintes d'étude des souches de terrain ne seront plus d'ordre quantitatif mais plutôt d'ordre qualitatif. Il est raisonnable d'envisager que les isolats de terrain puissent bénéficier d'une étude globale du transcriptome et du génome. Néanmoins, l'étude du transcriptome sur bio-puce(s) pangénomique(s) n'est qu'une première étape de criblage, permettant de définir des familles de gènes caractéristiques de différents phénotypes (résistance, accès pernicieux, etc.). Les futures applications de terrain seront vraisemblablement orientées vers l'utilisation de bio-puces « thématiques » telles que celle que nous avons développée et contenant des familles de gènes caractéristiques de ces différents phénotypes.

Remerciements • Les auteurs tiennent à remercier l'INSERM, la région Ile-de-France, la Fondation de Recherche HMR-Aventis, et l'Université Paris VI, pour leur soutien à la Plateforme Post-génomique de la Pitié-Salpêtrière (P3S). P. Refour et M. Gissot ont été financés par le programme PAL+.

RÉFÉRENCES

- 1 - GARDNER MJ, HALL N, FUNG E *et Coll* - Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002; **419** : 498-511.
- 2 - SCHENA M, SHALON D, DAVIS RW *et Coll* - Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; **270** : 467-470.
- 3 - DRMANAC R, LABAT I, BRUKNER I *et Coll* - Sequencing of megabase plus DNA by hybridization : theory of the method. *Genomics* 1989; **4** : 114-128.
- 4 - KHRAPKO KR, LYSOV YUP, KHORLYN AA *et Coll* - An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. *FEBS Lett* 1989; **256** : 118-122.
- 5 - VOLKMAN SK, HARTL DL, WIRTH DF *et Coll* - Excess polymorphisms in genes for membrane proteins in *Plasmodium falciparum*. *Science* 2002; **298** : 216-218.
- 6 - HAYWARD RE, DERISI JL, ALFADHLI S *et Coll* - Shotgun DNA microarrays and stage-specific gene expression in *Plasmodium falciparum* malaria. *Mol Microbiol* 2000; **35** : 6-14.
- 7 - BEN MAMOUN C, GLUZMAN IY, HOTT C *et Coll* - Co-ordinated programme of gene expression during asexual intraerythrocytic development of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* revealed by microarray analysis. *Mol Microbiol* 2001; **39** : 26-36.
- 8 - BOZDECH Z, ZHU J, JOACHIMIAK MP *et Coll* - Expression profiling of the schizont and trophozoite stages of *Plasmodium falciparum* with a long-oligonucleotide microarray. *Genome Biol* 2003; **4** : R9.
- 9 - BOZDECH Z, LLINAS M, PULLIAM BL *et Coll* - The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol* 2003; **1** : E5.
- 10 - LE ROCH KG, ZHOU Y, BATALOV S *et Coll* - Monitoring the chromosome 2 intraerythrocytic transcriptome of *Plasmodium falciparum* using oligonucleotide arrays. *Am J Trop Med Hyg* 2002; **67** : 233-243.
- 11 - LE ROCH KG, ZHOU Y, BLAIR PL *et Coll* - Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* 2003; **301** : 1503-1508.
- 12 - RATHOD PK, GANESAN K, HAYWARD RE *et Coll* - DNA microarrays for malaria. *Trends Parasitol* 2002; **18** : 39-45.

- 13 - SOUTHERN EM, MASKOS U, ELDER JK - Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides : evaluation using experimental models. *Genomics* 1992; **13** : 1008-1017.
- 14 - LIVACHE T, ROGET A, DEJEAN E *et Coll* - Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyromole group. *Nucleic Acids Res* 1994; **22** : 2915-2921.
- 15 - BERTUCCI F, SALAS S, EYSTERIES S *et Coll* - Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 2004; **23** : 1377-1391.
- 16 - LIPSHUTZ RJ, FODOR SP, GINGERAS TR *et Coll* - High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 1999; **21** : 20-24.
- 17 - KANE MD, JATKOE TA, STUMPF CR *et Coll* - Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res* 2000; **28** : 4552-4557.
- 18 - KUO WP, JENSSEN TK, BUTTE AJ *et Coll* - Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics* 2002; **18** : 405-412.
- 19 - DUGGAN DJ, BITTNER M, CHEN Y *et Coll* - Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 1999; **21 Suppl 1** : 10-14.
- 20 - PEASE AC, SOLAS D, SULLIVAN EJ *et Coll* - Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91** : 5022-5026.
- 21 - RAJEEVAN MS, DIMULESCU IM, UNGER ER *et Coll* - Chemiluminescent analysis of gene expression on high-density filter arrays. *J Histochem Cytochem* 1999; **47** : 337-342.
- 22 - LENNON GG, LEHRACH H - Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends Genet* 1991; **7** : 314-317.
- 23 - NGUYEN C, ROCHA D, GRANJEAUD S *et Coll* - Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics* 1995; **29** : 207-216.
- 24 - VAN GELDER RN, VON ZASTROW ME, YOOL A *et Coll* - Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87** : 1663-1667.
- 25 - KAMME F, SALUNGA R, YU J *et Coll* - Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1 : demonstration and validation of cellular heterogeneity. *J Neurosci* 2003; **23** : 3607-3615.
- 26 - MCCLINTICK JN, JEROME RE, NICHOLSON CR *et Coll* - Reproducibility of oligonucleotide arrays using small samples. *BMC Genomics* 2003; **4** : 4.
- 27 - BAUGH LR, HILL AA, BROWN EL *et Coll* - Quantitative analysis of mRNA amplification by *in vitro* transcription. *Nucleic Acids Res* 2001; **29** : E29.
- 28 - HU L, WANG J, BAGGERLY K *et Coll* - Obtaining reliable information from minute amounts of RNA using cDNA microarrays. *BMC Genomics* 2002; **3** : 16.
- 29 - ZHAO H, HASTIE T, WHITFIELD ML *et Coll* - Optimization and evaluation of T7 based RNA linear amplification protocols for cDNA microarray analysis. *BMC Genomics* 2002; **3** : 31.
- 30 - WANG E, MILLER LD, OHNMACHT GA *et Coll* - High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol* 2000; **18** : 457-459.
- 31 - SAGHIZADEH M, BROWN DJ, TAJBAKSHI J *et Coll* - Evaluation of techniques using amplified nucleic acid probes for gene expression profiling. *Biomol Eng* 2003; **20** : 97-106.
- 32 - NYGAARD V, LOLAND A, HOLDEN M *et Coll* - Effects of mRNA amplification on gene expression ratios in cDNA experiments estimated by analysis of variance. *BMC Genomics* 2003; **4** : 11.
- 33 - T HOEN PA, DE KORT F, VAN OMMEN GJ *et Coll* - Fluorescent labelling of cRNA for microarray applications. *Nucleic Acids Res* 2003; **31** : E20.
- 34 - GUPTA V, CHERKASSKY A, CHATIS P *et Coll* - Directly labeled mRNA produces highly precise and unbiased differential gene expression data. *Nucleic Acids Res* 2003; **31** : E13.
- 35 - FRANZ O, BRUCHHAUS II, ROEDER T - Verification of differential gene transcription using virtual northern blotting. *Nucleic Acids Res* 1999; **27** : E3.
- 36 - SMITH L, UNDERHILL P, PRITCHARD C *et Coll* - Single primer amplification (SPA) of cDNA for microarray expression analysis. *Nucleic Acids Res* 2003; **31** : E9.
- 37 - VERNON SD, UNGER ER, RAJEEVAN M *et Coll* - Reproducibility of alternative probe synthesis approaches for gene expression profiling with arrays. *J Mol Diagn* 2000; **2** : 124-127.
- 38 - ISCOVE NN, BARBARA M, GU M *et Coll* - Representation is faithfully preserved in global cDNA amplified exponentially from sub-picomogram quantities of mRNA. *Nat Biotechnol* 2002; **20** : 940-943.
- 39 - PUSKAS LG, ZVARA A, HACKLER L, JR. *et Coll* - RNA amplification results in reproducible microarray data with slight ratio bias. *Biotechniques* 2002; **32** : 1330-1334, 1336, 1338, 1340.
- 40 - STEARS RL, GETTS RC, GULLANS SR - A novel, sensitive detection system for high-density microarrays using dendrimer technology. *Physiol Genomics* 2000; **3** : 93-99.
- 41 - KARSTEN SL, VAN DEERLIN VM, SABATTI C *et Coll* - An evaluation of tyramide signal amplification and archived fixed and frozen tissue in microarray gene expression analysis. *Nucleic Acids Res* 2002; **30** : E4.
- 42 - NALLUR G, LUO C, FANG L *et Coll* - Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2001; **29** : E118.
- 43 - CHEEK BJ, STEEL AB, TORRES MP *et Coll* - Chemiluminescence detection for hybridization assays on the flow-thru chip, a three-dimensional microchannel biochip. *Anal Chem* 2001; **73** : 5777-5783.
- 44 - WHITNEY LW, BECKER KG - Radioactive 33-P probes in hybridization to glass cDNA microarrays using neural tissues. *J Neurosci Methods* 2001; **106** : 9-13.
- 45 - LANIECE P, CHARONY Y, CARDONA A *et Coll* - A new high resolution radioimager for the quantitative analysis of radiolabelled molecules in tissue section. *J Neurosci Methods* 1998; **86** : 1-5.
- 46 - SALIN H, MAITREJEAN S, MALLET J *et Coll* - Sensitive and quantitative co-detection of two mRNA species by double radioactive *in situ* hybridization. *J Histochem Cytochem* 2000; **48** : 1587-1592.
- 47 - SALIN H, VUJASINOVIC T, MAZURIEA *et Coll* - A novel sensitive microarray approach for differential screening using probes labelled with two different radioelements. *Nucleic Acids Res* 2002; **30** : e17.
- 48 - GISSOT M, REFOUR P, BRIQUET S *et Coll* - Transcriptome of 3D7 and its gametocyte-less derivative F12 *Plasmodium falciparum* clones during erythrocytic development using a gene specific microarray assigned to gene regulation, cell cycle and transcription factors. *Gene* 2004; (sous presse).
- 49 - YANG YH, SPEED T - Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat Rev Genet* 2002; **3** : 579-588.
- 50 - KYES S, PINCHES R, NEWBOLD C - A simple RNA analysis method shows var and rif multigene family expression patterns in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2000; **105** : 311-315.