

EPIGENESIS 2013 > 2016

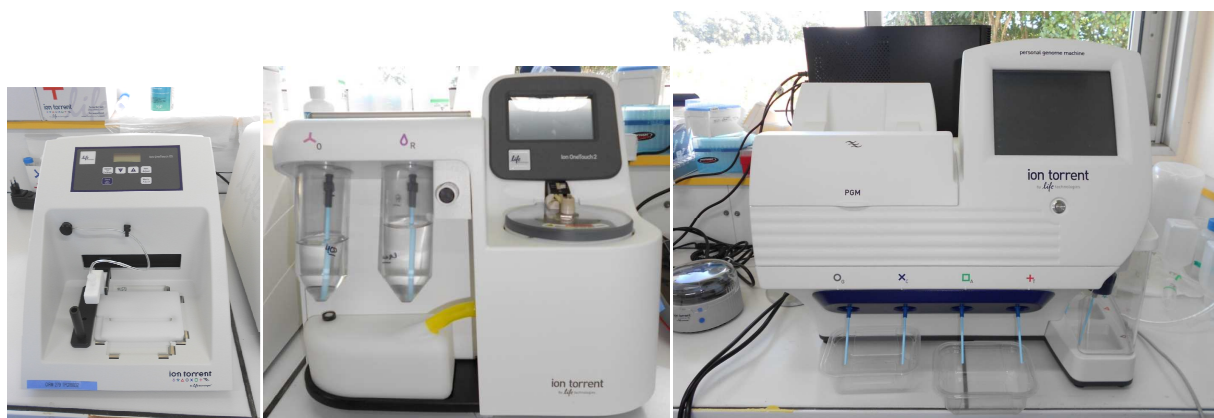
Acquisition de nouveaux équipements de laboratoire

Dans le cadre du projet européen de renforcement des capacités de recherche en santé animale, Epigenesis, le Cirad a récemment acquis à Duclos de nouveaux équipements. Ces installations, uniques dans la Caraïbe, constituent une plateforme ouverte à tous les chercheurs en santé de la zone, dans l'esprit du concept « One Health/Une seule Santé ».

Ces nouveaux équipements servent à séquencer et annoter des génomes complets de pathogènes (génomique) mais aussi analyser l'expression différentielle de gènes (transcriptomique). A l'aide d'une approche protéomique complémentaire, les chercheurs acquièrent une vision globale des protéines exprimées et peuvent distinguer celles exprimées par les cellules hôtes infectées de celles exprimées par les agents pathogènes. La mise en place d'un nouveau laboratoire de confinement P3, cofinancé par le Cirad, l'Europe et la Région Guadeloupe, complète cette plateforme de technologies de pointe.

Approches génomique et transcriptomique : des équipements pour le séquençage d'ADN et d'ARN.

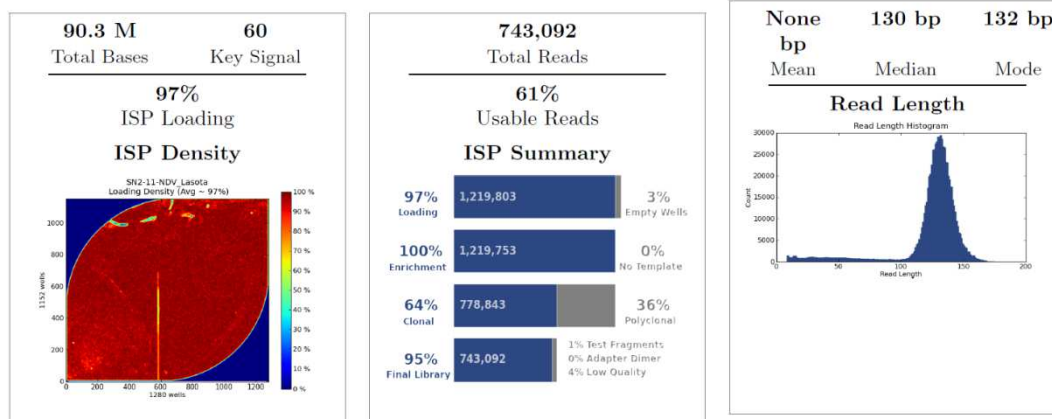
La nouvelle plateforme Personal Genome Machine (PGM™, Life Technologies) s'appuie sur l'industrie des puces d'ordinateurs ou semi-conducteurs. Elle mesure en temps réel l'émission de protons produits par l'incorporation d'une base pendant l'élongation. L'information génétique (ADN) est alors directement transcrite en information numérique (séquence d'ADN). La détection du séquençage direct et en temps réel permet d'obtenir des résultats de séquençage généralement en moins de 3 heures et permet de faire de la génomique (pour des génomes d'ARN et ADN) et transcriptomique comparatives (RNA seq).



Différents équipements du plateau de séquençage. De gauche à droite: 1) automate pour l'enrichissement des billes de séquençage, 2) machine de PCR en émulsion pour amplification de la librairie et 3) machine de séquençage PGM™.

Run Report for Auto_user_SN2-11-NDV_Lasota_54

Run Summary



Résultats typiques d'un "Run" de séquençage d'un échantillon de génome d'ARN viral (about 15,000 bases) utilisant la Plateforme PGM Ion Torrent, en Guadeloupe. De gauche à droite : 1) image du chargement de la puce de séquençage, 2) nombre de « reads » avant et après le contrôle qualité et 3) taille médiane des « reads ».

Approche protéomique : des nouveaux équipements pour l'électrophorèse bidimensionnelle.

Pendant une électrophorèse bidimensionnelle (2DE), les protéines sont séparées en fonction de deux propriétés indépendantes, en deux étapes : (1) la focalisation isoélectrique (IEF), qui permet de séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI) et (2) la migration des échantillons par électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), qui sépare les protéines en fonction de leur masses moléculaires (MM). Suite à cette séparation, les gels sont digitalisés avec un scanner de haute résolution et, les images sont analysées avec des logiciels d'images spécialisés pour pouvoir sélectionner des protéines d'intérêt (spots). Les spots de protéines sont excisés de façon précise et automatique grâce à l'automate Ettan Spot Picker. Pour identifier les protéines d'intérêts, les échantillons sont digérés avec de la trypsine et les peptides sont analysés par spectrométrie de masse.

Depuis son introduction en 1975, la 2DE est reconnue comme étant une importante technique pour la séparation biochimique de protéines. En 2005, pour pallier aux fluctuations expérimentales et réaliser une 2DE quantitative, la technique intègre l'utilisation de 3 fluorochromes (2D-DIGE) pour ainsi comparer 2 protéomes dans le même gel.

L'électrophorèse bidimensionnelle a un large champ d'application : la caractérisation du protéome total (permettant l'identification de protéines avec des modifications pos-traductionnelles), des études de différenciation cellulaire, des études de détection de marqueurs de maladies (notamment le cancer), etc.

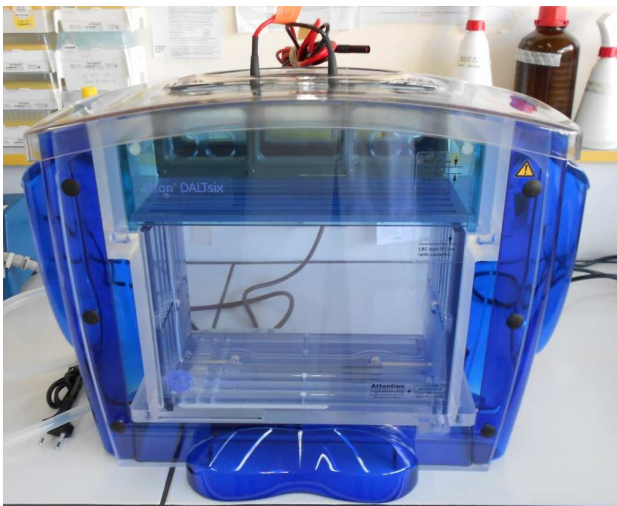
Première dimension : focalisation isoélectrique

L'appareil Ettan IPGphor 3 est un système de focalisation électrique qui permet de séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique.



Ettan IPGphor 3

Deuxième dimension : électrophorèse verticale



Unité d'électrophorèse Ettan DALTsix

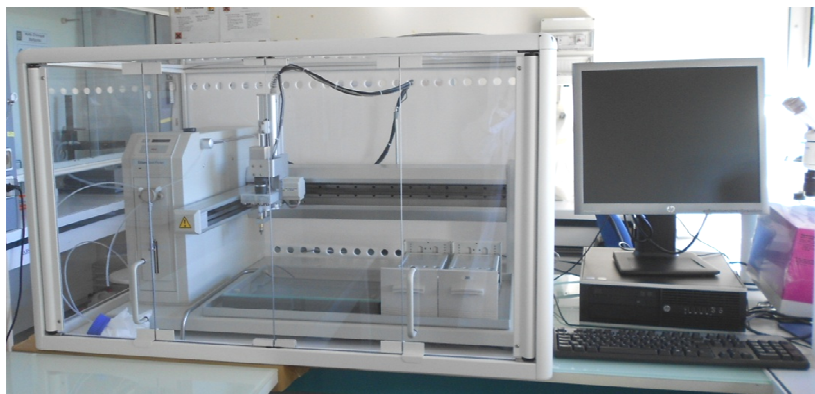
Gel scanning

Le scanner-laser Typhoon FLA 9500 sera utilisé pour scanner les gel 2DE et 2DE-DIGE (avec fluorochromes).

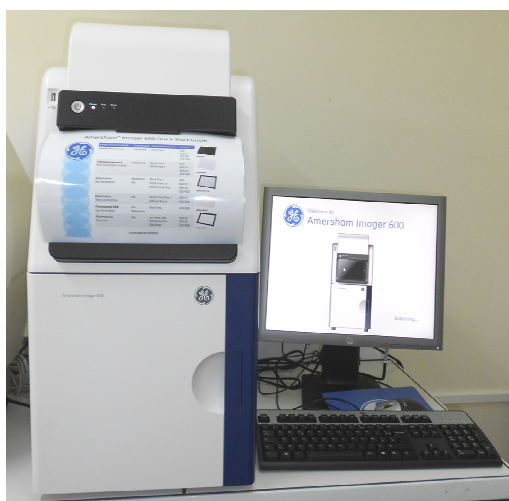


Typhoon FLA 9500

Excision automatique des spots de protéines



Ettan Spot Picker



Identification spécifique d'une protéine utilisant la technique de Western blot

L'Amersham Imager 600 UV est une caméra CCD sensible et robuste conçu pour identifier et quantifiés des protéines dans des gels ou des membranes (Western blot, notamment avec la chimiluminescence). Les images numériques de haute résolution peuvent être analyses avec le software ImageQuant TL (qui permet la quantification de protéines).



Automate pour l'extraction automatique d'acides nucléiques (équipement financé par le projet européen FEDER, « Gestion des risques en santé animale et végétale »)

Cet équipement permet d'extraire simultanément 96 échantillons en moins d'1h30 avec une haute précision et une sensibilité comparable à celle de l'extraction manuelle d'ARN/ADN.

Laboratoire de confinement P3 (BSL3) :

Le BSL3 (50 m²) du Cirad à Duclos est composé de 3 modules qui incluent un laboratoire, un insectarium et une animalerie. Il permet d'examiner et d'analyser des échantillons suspectés de contenir les virus de l'influenza, de la fièvre West Nile et d'autres zoonoses. Le laboratoire est aussi adapté pour l'isolement et l'étude des interactions hôte-pathogènes-vecteur.