



HAL
open science

Stage Ouvrier TN05

Titouan Joyez

► **To cite this version:**

| Titouan Joyez. Stage Ouvrier TN05. [Stage] INRAE. 2021. hal-03573431

HAL Id: hal-03573431

<https://hal.inrae.fr/hal-03573431>

Submitted on 14 Feb 2022

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

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



STAGE OUVRIER TN05

INRAE Val-de-Loire

Du 28 Juin au 23 Juillet 2021



Centre INRAE¹ d'Orléans, Loiret.

Tutrice : Mme Frédérique SANTI

¹ Institut National de Recherches pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement

Remerciements

- Merci à Mme Frédérique SANTI de m'avoir pris comme stagiaire malgré la période de CoVID-19.
- Merci à Mme Bénédicte LE-GUERROUÉ d'avoir diffusé ma demande de stage au sein de l'INRAE (UMR² BioforA³).
- Merci à Ismaël OUMAROU d'avoir pris de son temps pour m'encadrer et me montrer sa méthode de travail pendant la majorité de la période de stage.
- Merci à Nathalie BOIZOT de m'avoir accueilli dans son laboratoire (laboratoire d'analyses biochimiques).
- Merci à Nassim BELMOKTHAR pour la formation et l'aide apportée sur Chemflow et sur le matériel SPIR en général.
- Merci à tous les membres de l'INRAE pour m'avoir accueilli aussi gentiment pendant toute la durée du stage.

² Unité Mixte de Recherche

³ Biologie intégrée pour la valorisation de la diversité des Arbres et de la Forêt

Sommaire

Table des matières

INTRODUCTION	4
Présentation de l'entreprise.....	5
Organisation du travail.....	7
Tâches accomplies durant le stage.....	8
1 - Échantillonnage sur le terrain	8
2 – Pré-broyage et mise en pot des feuilles de Merisier lyophilisées.....	10
3 – Broyage à la Machine	11
4 – Passage au SPIR	12
5 – Analyse des résultats sur les spectres	13
Bilan et Réflexion.....	15
Analyse d'une situation perçue.....	16
Conclusion	17
ANNEXES.....	18



INTRODUCTION

Ce stage ouvrier à l'INRAE en tant qu'adjoint technique s'inscrit dans le cadre du projet PRESTO, projet mené en collaboration par l'INRAE (dont les UMR BioforA et GBFor⁴) et plusieurs autres groupes tels que l'Université d'Orléans (groupe LBLGC⁵) et l'Université de Tours (groupe BBV⁶) visant à développer une méthode de prédiction à haut-débit de la vulnérabilité des arbres et de la vigne à des stress biotiques et abiotiques.

Ce projet s'inscrit dans une problématique d'importance majeure au niveau mondial puisqu'il s'agit de la problématique de changements climatiques globaux. Dans ce cadre, les organismes végétaux sont de plus en plus soumis à des stress de différentes natures, qui tendent à augmenter aussi bien du point de vue de leur nombre, de leur intensité, ou encore de leur fréquence. Ce projet se concentre plus particulièrement sur les stress hydriques (manque d'eau) et sur les bio-agresseurs (maladies par exemple).



Le projet PRESTO a donc pour objectif majeur de mettre au point une méthode de prédiction de la vulnérabilité des organismes vivants à ces stress ; Cependant, il est primordial que cette méthode soit compatible avec un fonctionnement de masse, donc à haut-débit, puisqu'il y a un nombre extrêmement important d'organismes végétaux concernés.

La méthode déployée et étudiée par le projet PRESTO est l'analyse des organismes par la spectrométrie proche infrarouge (SPIR⁷) afin de réussir à déterminer les caractères complexes des espèces étudiées, et plus particulièrement leur vulnérabilité et leur capacité adaptative.

Ma mission durant ce stage au sein du projet PRESTO a donc été de participer à l'analyse de nombreux échantillons de feuilles de merisier (cerisier sauvage – *Prunus Avium*, Fig.1) via des appareils de SPIR, en passant par toutes les étapes, de la récolte des feuilles sur l'arbre, au passage des échantillons dans le spectromètre. Cette mission autour des plants de merisier répond à la tâche immatriculée PRESTO T2-8, et son rôle est de voir si la spectrométrie proche infrarouge permet d'identifier si l'arbre sur lequel on a prélevé notre échantillon est diploïde ou triploïde. En effet, un triploïde complet

Fig.1 – Merisier ou *Prunus Avium*

⁴ Génétique et Biomasse Forestière

⁵ Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures

⁶ Biomolécules et Biotechnologies Végétales

⁷ Spectrométrie Proche Infra-Rouge

ayant trois copies de chaque chromosome, il a trois allèles à chaque gène, ce qui augmente ses possibilités d'hétérozygotie (jusqu'à trois allèles peuvent être différents), et d'adaptabilité. Une étude précédente réalisée sur 9 triploïdes et 20 diploïdes ayant montré que la triploïdie augmentait la largeur de feuilles (Serres-Giardi et al, 2010), l'espoir est de pouvoir repérer des individus en pépinière potentiellement triploïdes très tôt, et de le confirmer (ou pas) grâce à un test immédiat via la SPIR. En automne 2020 et en 2021, des feuilles ont été échantillonnées en collection sur des arbres dont la triploïdie ou diploïdie est sûre, et en plantation où ces caractéristiques sont putatives.

Présentation de l'entreprise

L'INRAE est le résultat de la fusion de deux entités, en date du 1^{er} janvier 2020 : l'INRA⁸ et l'IRSTEA⁹. Ces deux entités étaient des organismes publics, en tant qu'Entreprise public à Caractère Scientifique et Technologique (EPST), sous la direction du ministère chargé de la recherche, et du ministère chargé de l'agriculture.

L'INRA a été créée en 1946 avec le projet de trouver une solution pour nourrir les Français au lendemain de la guerre en pleine pénurie alimentaire. Une fois l'économie et la production alimentaire bien relancée, et alors que la France produit même en excès et commence à exporter de l'alimentaire, l'INRA change de rôle, dans le but non plus de produire plus, mais d'améliorer la qualité des aliments et leur transformation. A partir de 1973, son objectif principal change encore, suite à la crise énergétique, l'INRA sera plus poussé vers la recherche d'une agriculture autonome et économe en énergie.

Avant la fusion, L'INRA était le premier institut de recherche d'Europe et le deuxième dans le monde en termes de nombre de publications sur les sciences agricoles et les sciences de la plante et l'animal.

Après la fusion, les problématiques de l'INRAE s'étendent donc aux problématiques environnementales. Pour ce faire, la recherche à l'INRAE est étendue sur plusieurs domaines : le changement climatique, le carbone renouvelable, les systèmes agricoles à haute performance environnementale (produire plus en consommant moins et en prenant moins de place), la consommation d'eau, la biodiversité, l'alimentation, les biotechnologies végétales, les maladies végétales, etc.

Il s'agit d'une entreprise qui possède 18 centres locaux disséminés en métropole et en Territoires d'Outre-Mer (comme en Guyane et en Guadeloupe).

⁸ Institut National de la Recherche Agronomique

⁹ Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture

En qualité d'établissement de recherche public, l'INRAE est amenée à de nombreuses reprises à mener des projets en collaboration avec d'autres organismes, français comme étrangers.

Organisation du travail

Au niveau des horaires de travail, dans les locaux de l'INRAE, la plupart des chercheurs sont présents sur le lieu de travail à des horaires que l'on pourrait qualifier d'horaires de bureaux « classiques », à savoir de 8h30-9h à 17h-17h30, mais ce peut être beaucoup plus variable (comme je me suis calé sur les horaires d'Ismaël, qui m'encadrait, les horaires étaient 9h-17h30), avec une pause repas entre 12h40 et 13h30 (pour l'UMR BioforA). Cependant une cafétéria/salle de pause est à disposition pour améliorer la convivialité (puisque c'est là qu'on croise le plus de monde) et faire une pause plus ou moins longue si nécessaire..., par exemple, celle de 10h30 est généralement plus longue car y est souvent discuté des sujets concernant le travail.

Les cadences de travail sont donc variées, puisqu'elles dépendent de la quantité de travail que l'on doit accomplir, de si on veut ou non prendre des pauses, et surtout de si le mode opératoire le permet (dans l'une des activités que j'ai effectuées, certaines étapes nécessitent un passage d'une vingtaine de minutes dans une machine sans intervention de notre part par exemple) etc. Aucune cadence n'est imposée, l'important étant d'avoir fini ce qui nous a été demandé en temps voulu. Libre à chacun de prendre des pauses mais de travailler plus vite entre les pauses, si tant est que la qualité du travail ne s'en trouve pas dégradée.

Au niveau de la sécurité, chaque employé, doctorant ou stagiaire a suivi une formation de prévention aux risques et à la sécurité (qui relève actuellement de la fonction de Mme Armelle DELILE), complétée par la visite et les explications en pratique du traitement et de l'évacuation des déchets chimiques par Mme Nathalie BOIZOT.

Les conditions de travail quant-à-elles dépendent de l'activité à laquelle on s'adonne, de si on a besoin de machines, si on doit bouger, utiliser des produits chimiques, etc. En l'occurrence personnellement mon activité principale consistait en broyage des feuilles de merisier, mission effectuée assis, avec une blouse (fournie par l'INRAE et nettoyée par une société tierce spécialisée) et des gants en latex (pour le broyage) et en nitrile (pour l'extraction de polyphénols, activité secondaire – mode opératoire en Annexe 2).

Tâches accomplies durant le stage

1 - Échantillonnage sur le terrain

La première étape chronologiquement sur ce projet, est la récupération d'échantillons sur le terrain. Pour ce faire, on s'est rendu dans une plantation de merisier (en l'occurrence dans la Somme, à Saint-Aubin-Montenoy – Fig. 2). Cette plantation dont le propriétaire est Antoine Crété, retraité des pépinières Crété, comporte plusieurs espèces, dont des merisiers élevés dans la pépinière et attendus diploïdes (numérotés D-XXX), et des merisiers prélevés par Mme Santi dans plusieurs pépinières forestières. Ces merisiers ont été choisis car ils étaient parmi les plus grands, et semblaient présenter des feuilles plus larges, proportionnellement à leur longueur, que les autres. Ils sont des triploïdes putatifs et donc numérotés T-XXX.



Fig.2 – Plantation à Saint-Aubin-Montenoy

Pour chaque arbre, on relève son identifiant (D-XXX ou T-XXX en remplaçant les X par son numéro unique), que l'on reporte sur un document, qui nous permettra de relier l'identifiant de l'arbre, à son numéro d'échantillon (et ainsi nous permettre de savoir où et sur quel arbre a été prélevé tel ou tel échantillon). Ensuite, on sélectionne 3 belles feuilles entières et bien épanouies (au moins la 6^{ème} épanouie en partant de l'apex) sur chaque arbre, avec le moins de traces de maladies possible (Fig.3).



Fig.3 Feuilles de merisier à récupérer pour l'Échantillon

Une fois les feuilles prélevées et mises dans des enveloppes Kraft identifiées par le numéro d'échantillon (Fig.4), on conserve les enveloppes au frais jusqu'à pouvoir procéder à l'analyse par SPIR sur feuilles fraîches. Cette première mesure, réalisée à l'aire de l'appareil micro-NIRS (Near Infra-Red Spectrometer, qui est portatif -c'est celui que l'on peut utiliser dans ou hors des murs de l'INRAE-), est faite dans la journée même où l'on a procédé à l'échantillonnage, au pire dans les deux jours, afin d'avoir les feuilles les plus fraîches possibles. On procède à l'acquisition de 2 spectres sur chaque feuille (1 sur le dessus de la feuille, et 1 sur le dessous), afin de minimiser tout impact d'une quelconque tache. Ce procédé a le défaut de nécessiter une prise de spectre rapide (dans la journée si possible) et plusieurs fois pour chaque arbre pour minimiser l'erreur. Cependant, l'avantage de cette méthode est qu'elle nécessite de nombreuses heures de travail en moins que la prise de spectre sur des échantillons poudreux sur le spectromètre fixe (traitée dans la 4^e sous-partie). Cette dernière demande plus d'étapes de traitement, ce qui rallonge nettement le délai avant de pouvoir traiter les résultats. En revanche, prendre les spectres sur la poudre, bien que beaucoup plus chronophage, présente d'autres avantages : premièrement la poudre étant homogène, il n'est plus nécessaire de faire 6 prises de spectres pour chaque arbre, de plus, le spectromètre fixe permet une prise de spectre sur une fourchette plus étendue de nombre d'ondes (6000 à 4000 cm⁻¹ sur le portable contre de 10000 à 4000 cm⁻¹ sur le fixe), ce qui permet d'avoir toujours plus d'information à traiter.

NUMERO	QUOI	OU	Date de broyage	Num spectre	Date Prise de	COMM
064	T-003	Cahotins-ligne01	30/06/2021	8488	05/07/2021	
065	T-004	Cahotins-ligne01	30/06/2021	8496	05/07/2021	
066	T-005	Cahotins-ligne01	30/06/2021	8489	05/07/2021	
067	T-006	Cahotins-ligne01	30/06/2021	8497	05/07/2021	feuilles petites
068	T-007	Cahotins-ligne01	30/06/2021	8487	05/07/2021	feuilles un peu jaunes
069	T-008	Cahotins-ligne02	30/06/2021	8491	05/07/2021	
070	T-009	Cahotins-ligne02	30/06/2021	8494	05/07/2021	ressemble à un diploide
071	T-010	Cahotins-ligne02	30/06/2021	8492	05/07/2021	
072	T-011	Cahotins-ligne02	30/06/2021	8495	05/07/2021	
073	T-012	Cahotins-ligne02	30/06/2021	8499	05/07/2021	
074	T-013	Cahotins-ligne03	30/06/2021	8571	06/07/2021	
075	T-014	Cahotins-ligne03	30/06/2021	8507	05/07/2021	
076	T-015	Cahotins-ligne03	30/06/2021	8498	05/07/2021	
077	T-016	Cahotins-ligne03	30/06/2021	8515	05/07/2021	ressemble à un diploide
078	T-017	Cahotins-ligne04	30/06/2021	8500	05/07/2021	

Fig.4 – Extrait du tableau récapitulatif reliant le numéro d'échantillon a son identification et son numéro de spectre

2 – Pré-broyage et mise en pot des feuilles de Merisier lyophilisées

Une fois les feuilles lyophilisées, la première tâche à réaliser avec nos 469 échantillons est le pré-broyage :

Nous recevons au laboratoire 469 enveloppes contenant chacune 3 feuilles de merisier lyophilisées que nous devons passer au SPIR. Pour ce faire, ces feuilles doivent être réduites en poudre, afin d'avoir une prise de spectre qui soit homogène (et qui ne dépend donc plus de l'endroit de la feuille fraîche sur lequel on a fait la prise de spectre).



Fig.5 : feuilles de merisier Lyophilisées

Pour se faire, on commence par sortir les 3 feuilles (fig.5) d'une enveloppe, retirer les tiges, qui sont généralement plus blanches (et qui peuvent donc fausser le spectre) et plus fibreuses (donc dures à broyer), et pré-broyer à la main les feuilles, en en faisant des morceaux les plus petits possibles afin de faciliter le broyage à la machine. Les morceaux des trois feuilles sont mélangés, et l'excès (si les feuilles sont grandes) est jeté.

Une fois le pré-broyage effectué, on remplit un tube Eppendorf® de 5ml avec les petits morceaux de feuille obtenus (fig.6). On rajoute dans chaque tube 2 billes métalliques (fig.7) qui permettront de broyer de manière très fine les morceaux de feuilles en s'entrechoquant dans la machine de broyage.



Fig.6 : Tubes Eppendorf® remplis



Fig.7 : Billes métalliques utilisées

3 – Broyage à la Machine

Maintenant que nos tubes sont prêts, avec à l'intérieur de chacun les petits morceaux des 3 feuilles et deux billes métalliques, on peut passer à l'étape suivante, le broyage. Le broyage à la machine s'effectue par groupes de 10 tubes : on utilise deux portants de 5 tubes chacun (fig.8), que l'on équipe ensuite à la machine (MM400 – fig.9) qui va les secouer selon une fréquence et un temps programmé. Pour nous, il va s'agir d'un fonctionnement à 30 Hz, pendant au moins 2 minutes ; ce temps peut être allongé si la granulométrie de la poudre obtenue n'est pas bonne.



Fig.8 : Portants avec Tubes



Fig.9 : Broyeur MM400

Le broyage s'effectue grâce aux deux billes métalliques rajoutées dans chaque tube : en secouant les portants (et donc les tubes) à une fréquence de 30 Hz via le broyeur, les billes vont s'entrechoquer à très grande vitesse, ce qui aura pour conséquence de broyer les petits morceaux de feuilles en fine poudre. Après la fin du programme du broyeur, on vérifie grossièrement la granulométrie (la poudre est-elle fine ? y'a-t-il encore des fibres, des bouts de feuilles clairement identifiables ? la poudre est-elle homogène ?), on récupère les billes métalliques, et on met la poudre dans des petits flacons identifiés avec le numéro de l'échantillon (fig.10), afin de procéder au passage dans le spectromètre.



Fig.10 : Flacons SPIR identifiés

4 – Passage au SPIR

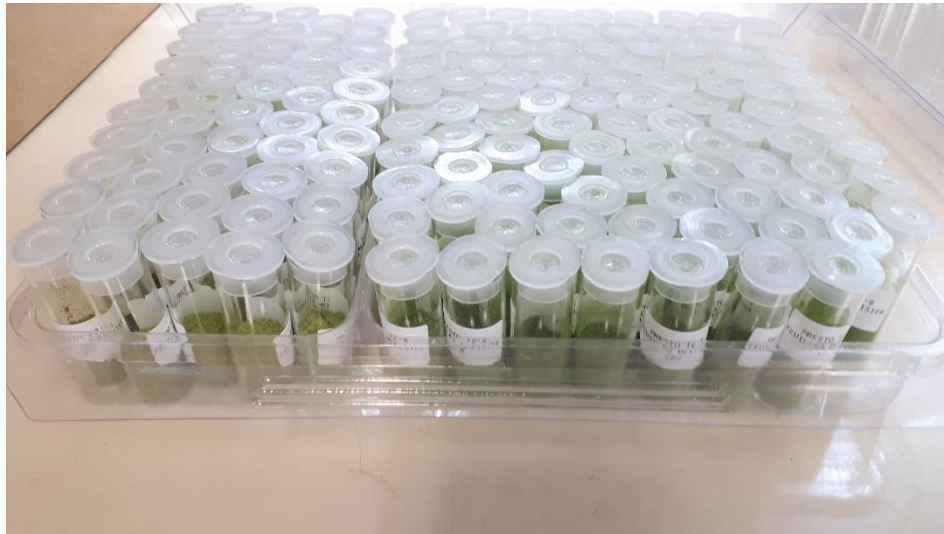


Fig.11 : Boîte de flacons pour passage au SPIR

Une fois une quantité assez importante de flacons remplis (et donc d'échantillons traités – fig.11), on se rend dans le laboratoire SPIR, qui est une petite pièce équipée d'un climatiseur, d'un humidificateur et d'un déshumidificateur, qui permettent de conserver des conditions de température et d'hygrométrie relativement stables, pour ne pas perturber les spectres proche infrarouge, qui sont très sensibles à ces facteurs.

Une fois le numéro de l'échantillon rattaché à un numéro de spectre dans le fichier partagé du laboratoire SPIR, on positionne le flacon contenant l'échantillon sur la fenêtre du spectromètre infrarouge (Fig.12) configuré en mode NIR¹⁰, on lui renseigne le numéro de spectre, et on lance l'acquisition du spectre (Fig.13). Après plusieurs acquisitions de suite, le logiciel permet la superposition de tous les spectres obtenus, afin de vérifier le bon déroulement des mesures (Fig.14).



Fig.12 : Spectromètre Infra-Rouge

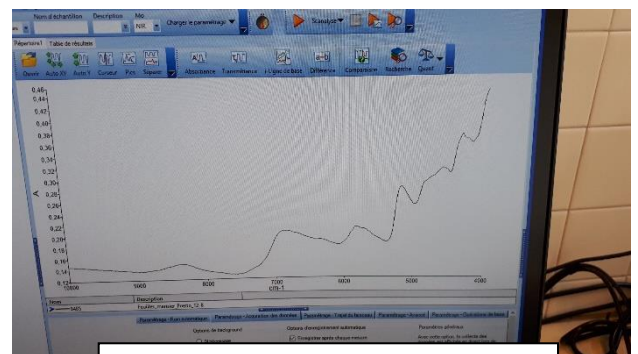
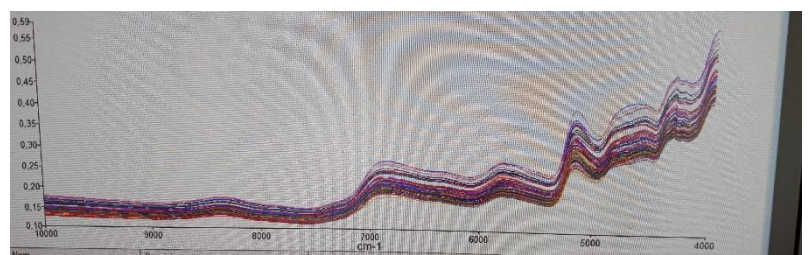


Fig.13 : Spectre IR d'un échantillon

-> Fig.14 : Superposition de tous les spectres obtenus en passant une boîte complète



¹⁰ Near Infra-Red : Proche Infra-Rouge

5 – Analyse des résultats sur les spectres

La dernière partie de mon travail sur la tâche T2-8 est l'analyse des résultats spectrométriques des échantillons que nous avons traités avec Ismaël.

Pour ce faire, j'ai utilisé le logiciel Chemflow, disponible gratuitement en ligne, qui est un outil pratique et efficace pour faire les calculs de statistiques à partir des spectres (puisqu'il a été développé dans ce but). J'ai justement appris à m'en servir lors de ma première semaine de stage, en participant à une formation sur le sujet.

Une fois les données spectrales normalisées pour éliminer le maximum de bruit dans les calculs statistiques, et la détection de spectres atypiques anormaux (échantillons qui ont un trop gros impact sur les moyennes comparativement aux autres échantillons) effectuée, et ces derniers potentiellement éliminés (si l'on est sûr qu'il y a un problème de mesure et que rien ne justifie biologiquement que le spectre soit très différent des autres) ; on peut tracer un graphique où les spectres sont représentés par des points qui se regroupent en fonction du niveau de ploïdie de l'arbre sur lequel a été prélevé l'échantillon.

Pour commencer, et se rendre compte si la méthode fonctionne ou non, on commence par l'essayer en ne gardant les données spectrales que des échantillons que l'on a déjà reconnus comme étant diploïdes ou triploïdes (*via* cytométrie de flux). De cette manière, on saura s'il y a réellement une différence de positionnement des points caractéristiques selon la ploïdie de l'arbre duquel l'échantillon a été prélevé.

Malheureusement, sur Chemflow, le résultat espéré n'a pas été celui obtenu, puisque l'on a obtenu à l'issue de l'analyse en composantes principales (ou ACP, méthode d'analyse statistique) duquel on ne peut pas déduire de comportement particulier (les points sont globalement répartis relativement équitablement pour les deux groupes, D pour Diploïdes, et T pour Triploïdes, Fig.15).

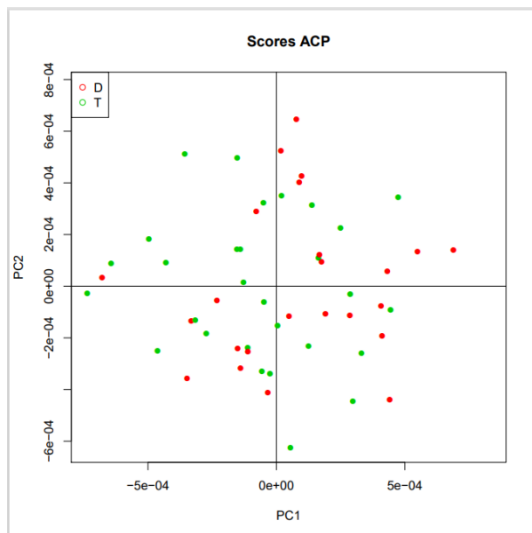


Fig.15 – Résultat de l'ACP sur les données spectrales

On ne peut donc pas conclure que les spectres sont différenciés à l'aide de cette première approche de base. Cependant, en réalisant de nouveaux traitements, plus avancés, de ces mêmes données spectrales, *via* un package spécifique du logiciel R (analyse faite par N Belmokhtar), on parvient à trouver un début de résultat prometteur. Pour commencer, on regarde après chaque prétraitement utilisé quel pourcentage de la variance des données est exprimé pour chaque point de contrôle (en abrégé PC ; fig. 16).

Pourcentage de variance expliquée

```
par(mfrow = c(2, 4))
for (i in 1:ncol(pve.pca)){
  barplot(pve.pca[, i], col = "steelblue", main = colnames(pve.pca)[i],
    ylab="PVE", ylim = c(0, 100))
}
```

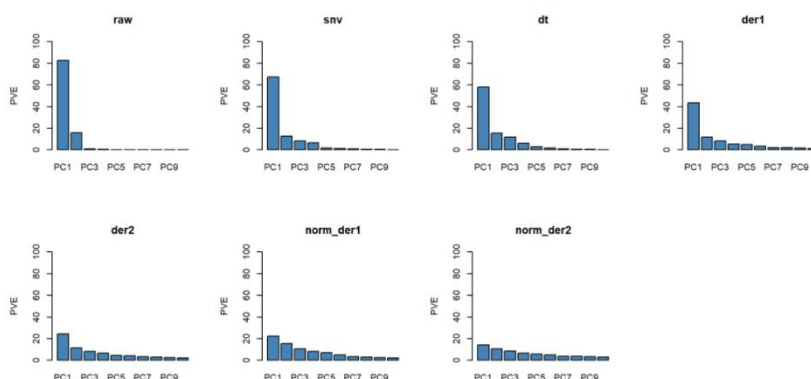


Fig.16 – Pourcentage de variance expliquée selon les points de contrôle

On s'aperçoit que le dernier prétraitement laisse apparaître une quantité de variance importante pour les 6/7 premiers points de contrôle, ce qui implique que ces derniers nous donnent encore une quantité d'information suffisamment importante et intéressante pour que l'on puisse les exploiter. C'est ici le cas : en traçant un graphique d'ACP sur les premiers points de contrôle, diploïdes et triploïdes ne se différencient pas. Cependant, lorsqu'on trace ce graphique sur les PC5 et 6, on remarque pour le dernier prétraitement (qui nous semblait le plus prometteur), que les diploïdes (en rouge) et les triploïdes (en bleu clair) commencent à se séparer (Fig.17). Ce résultat n'est pas suffisant pour que diploïdes et triploïdes soient distinguables de manière univoque, mais il en reste néanmoins très encourageant, puisque cela signifie qu'en analysant bien les données, on pourra peut-être réussir à retirer des informations univoques sur la ploïdie des échantillons de nos spectres.

```
par(mfrow = c(2, 4))
for (i in 1:length(pca.NIRS)){
  s.class(dfxy = pca.NIRS[[i]]$li,
    fac = as.factor(data.ade4[[i]]$info$DT), xax = 5, yax = 6,
    col = rainbow(n=length(unique(data.ade4$raw$info$DT))), sub = names(pca.NIRS)[i], csub=2, possub="topleft")
}
```

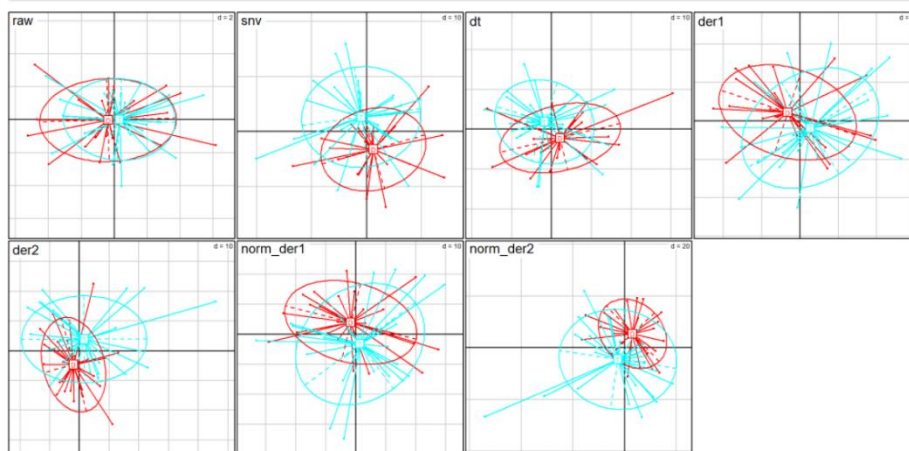


Fig.17 – Résultats de l'ACP sur les données spectrales selon le prétraitement utilisé

Bilan et Réflexion

Premièrement, la première chose qu'il m'a été donné de constater a été l'importance de la communication, aussi bien intra qu'inter-entreprises :

Au niveau intra-entreprise cela va de soi, il est impératif de bien se comprendre pour pouvoir suivre un mode opératoire en travaillant en coopération (comme je l'ai fait avec Ismaël), sans perdre de temps, pour s'organiser sur les horaires, la cadence, et pour que l'ambiance dans laquelle on travail soit plaisante, saine, et intéressante.

Au niveau de la communication inter-entreprises, j'ai aussi eu l'occasion de voir l'importance de la communication. Lors de la 2^e semaine de stage, suite à la réception d'un colis d'une entreprise espagnole, qui n'avait pas suivi (ou pas compris) les instructions données par l'INRAE, Ismaël et moi avons perdu une demi-journée entière à devoir recompter et trier une cinq-centaine d'échantillons arrivés dans un format qui n'était pas celui demandé (puisqu'on a reçu les échantillons – carottes de bois - dans des pailles en plastique), et avec un listing incomplet.

Pour ce qui est du métier et du rôle de l'ingénieur, j'ai eu l'occasion de pouvoir travailler et discuter avec plusieurs d'entre eux afin de me rendre compte de leur manière de travailler, de leur but, etc. Dans le cas du projet PRESTO, le but est d'exploiter une technologie relativement récente, la spectroscopie infra-rouge à champ-proche, afin de mettre au point une toute nouvelle méthode de prédiction de caractères à haut-débit.

Pour ce faire, ils sont organisés sous forme de tâches (dont la tâche T2-8 sur laquelle j'ai travaillé). Comme la démarche est exploratoire, il n'est pas garanti que la SPIR permettra de différencier tout ce qui est espéré. L'espoir est plus grand quand le caractère mesuré s'approche de caractères chimiques : par exemple, une teneur d'un certain composant. Pour la différenciation entre diploïdie et triploïdie, certes les triploïdes contiennent plus d'ADN par cellule, mais cela sera-t-il suffisant, sachant que leurs cellules sont plus grandes ?

Dans le cas de PRESTO T2-8, ici l'utilisation des données traitées avec les méthodes statistiques que j'ai pu utiliser sur Chemflow ont été un échec. Cependant la tâche n'est pas écartée pour autant, les agents de l'INRAE exploiteront les données avec d'autres méthodes statistiques, mais surtout ajouteront de nouveaux échantillons de triploïdes certifiés via la cytométrie de flux. En effet, parmi les échantillons déjà connus, nous n'avions que 7 triploïdes certains.

Pour ce qui est de l'organisation du travail, on se rend rapidement compte qu'il ne faut pas hésiter à demander de l'aide, des conseils, ou l'opinion des autres sur la méthode que l'on va ou que l'on a utilisée, pour savoir s'ils l'auraient fait mieux, plus facilement ou tout simplement différemment ; c'est là un des autres avantages de la salle de pause, puisque c'est à cet endroit que l'on croise le plus de monde, ce qui favorise la discussion, la bonne entente, et donc la facilité à s'entraider.

Au niveau des feuilles et fichiers de modes opératoires pour les manipulations par exemple, il n'est pas rare de pouvoir voir que le mode opératoire a été rédigé ou mis au point par une personne, puis amélioré ou remis au goût du jour par une autre ; c'est l'une de ces situations où l'on voit bien que l'entraide et la discussion sont primordiales.

Analyse d'une situation perçue

Comme je viens de le développer dans la partie précédente, les compétences les plus importantes à mobiliser en tant qu'ingénieur sont avant tout la communication et la capacité à aller vers les autres, être capable d'écouter et de prendre en compte le point de vue des autres pour s'améliorer.

Il est tout aussi important de savoir faire preuve de beaucoup d'adaptation, afin de pouvoir répondre à une problématique lorsqu'elle se présente, ou encore dans l'optique de gagner en efficacité. Par exemple dans les premiers jours du stage, Ismaël m'a montré comment il procédait pour le broyage des feuilles, donc j'ai commencé par faire exactement ce qu'il m'a montré, avant ensuite d'adapter sa méthode pour moi (positionner les différents éléments -comme la poubelle, l'entonnoir, etc. – différemment pour éviter les pertes de temps ou d'énergie), selon la taille, la posture etc. En d'autres termes il est important de suivre les méthodes et les conseils des autres, mais il est tout aussi important de les adapter pour les faire correspondre à notre physionomie, notre rythme, etc.

Il est également important de faire preuve d'anticipation, à savoir surtout de réfléchir où pourraient être les potentielles sources d'erreur pour les éviter. Par exemple, on y a mis beaucoup d'application avant d'aller sur le terrain pour ramasser les échantillons. Ainsi, savoir positionner les différents éléments à des endroits précis afin de toujours les prendre au même endroit et dans la même chaîne d'actions (le même ordre) pour ne pas confondre, ou même oublier de faire quelque chose d'important. Par exemple lorsque l'on était sur le terrain, on prenait bien soin de toujours alterner dans la glacière une enveloppe Kraft avec un sachet plastique – qui nous servait à ramasser des morceaux de tige à envoyer dans un autre laboratoire pour la cytométrie de flux – afin de ne jamais pouvoir oublier ni une enveloppe, ni un sachet. C'est toutes les réflexions autour de ces petites attentions à avoir qui font le métier d'ingénieur sur le terrain.

Il faut également réfléchir à ce que nos actions ou choix impliquent pour les autres par la suite. On peut reprendre l'exemple du colis envoyé par les Espagnols, leur choix d'envoyer un colis avec des pailles en plastique sans tenir compte des demandes de l'INRAE nous a fait perdre du temps, et en plus de cela, puisque certaines pailles n'étaient pas bien refermées, plusieurs échantillons ont failli être perdus.

Le plus étonnant au niveau de cette entreprise pour moi a été l'accueil : je ne m'attendais pas à être aussi bien accueilli en tant que stagiaire de niveau bac +1/+2 dans une entreprise destinée à la recherche, constituée majoritairement (dans ce laboratoire de biochimie) de salariés ingénieurs et chercheurs, ou de doctorants et post-doctorants, ou techniciens. Cependant, malgré la différence de savoir et d'expérience, l'intégralité du personnel s'est montrée très accueillant, en s'intéressant à moi, à mon parcours scolaire, et à ce que je veux faire après. En plus de cela ils étaient tous sans exception contents de me montrer leur laboratoire, ce sur quoi ils travaillaient, leur manière de fonctionner, quelles machines ils utilisent, sur quelles espèces ils travaillent (le peuplier noir, le mélèze, le pin, le merisier, etc.).

Cette propension pour le partage de savoir-faire et d'expérience était très agréable et très intéressante pour moi en tant qu'étudiant.

Conclusion

En conclusion, ce stage a été très enrichissant, aussi bien d'un point de vue personnel (les différents contacts que j'ai pu avoir, les rencontres que j'ai pu faire, etc.), que professionnel, puisqu'il m'a permis de mieux pouvoir cerner comment un ingénieur fonctionne, ce que l'on attend de lui etc.



En plus de cela il m'a permis de découvrir des machines et des modes opératoires/méthodes, qui ne sont pas forcément accessibles dans un cadre scolaire (au niveau budget ou même au niveau cohésion avec les UVs).

Le fait que le stage dure 4 semaines permet aussi de bien avoir le temps de cerner comment fonctionne l'entreprise dans sa globalité, comment elle tourne, l'organisation (création de feuilles de vie des échantillons pour savoir qui a donné quoi à qui par ex ; où est stocké quoi, etc.), la sécurité, etc.

Ici même si la tâche sur laquelle j'ai travaillé n'a pas encore donné les résultats espérés, j'espère au moins avoir apporté une aide à l'entreprise sous forme d'une main d'œuvre efficace. Dans tous les cas j'ai vraiment apprécié ce stage, qui m'a permis non seulement de découvrir le monde de l'entreprise, mais aussi de pouvoir suivre une tâche durant toutes ses étapes : dans le cadre de PRESTO T2-8 j'ai réellement pu participer à chacune des tâches (pas forcément dans l'ordre chronologique pour des soucis organisationnels et de météo), de la récolte des feuilles, à l'analyse statistique, en passant par toutes les étapes en laboratoire.

Je suis encore une fois reconnaissant à l'INRAE de m'avoir accueilli pendant ces 4 semaines qui m'ont beaucoup appris ; et j'espère avoir pu leur apporter une valeur ajoutée intéressante et avoir été agréable comme stagiaire.



 Centre Val de Loire _ Orléans Unité d'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières	Mode opératoire 		Référence : AGPF-MO-0045 Version : V3 Nombre de page : 3	
	Extraction des composés phénoliques sur <u>aiguilles</u> <u>de mélèze</u> - Méthode analytique			
Date d'émission : 11/04/2014	Date de mise à jour : 18/03/16	Date d'impression : 14/09/2021	Date d'archivage :	
Diffusion :				
Rédigé par : Nathalie BOIZOT	Revu par :		Approuvé par : Vanina GUERIN	

Attention ! Vérifiez sous AQRODOC que vous avez en main la dernière version

1. Objet :

Extraire les composés phénoliques pour permettre leur analyse quantitative et qualitative.

2. Domaine d'application :

Analyses Biochimiques.

L'extraction des composés phénoliques peut être réalisée sur n'importe quel organe de la plante (tige, bois, feuilles, etc...). L'extraction est réalisée sur du matériel réduit en poudre par un broyeur à billes.

3. Documents de référence (bibliographie) :

Néant

4- Principe :

La poudre est mise à macérer dans un solvant organique (acétone ou méthanol) supplémenté avec de la 6-méthoxyflavone (témoin interne pour les analyses HPLC) et du D-gluconolactone (inhibiteur des β -glucosidases qui dégradent les polyphénols glycosylés). Elle est soumise à l'action des ultra-sons qui permettent la libération des composés phénoliques dans le solvant. Après centrifugation, le surnageant contenant les polyphénols

est récupéré et séché au speed-vac. Le résidu sec ainsi obtenu est repris dans du MeOH ou de l'eau. On obtient ainsi un extrait végétal qui peut servir à plusieurs types d'analyses : dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin (AGPF-MO-0044), dosage des flavanols par DMACA (AGPF-MO-0047), analyse HPLC, DO à 280 nm.

5- Responsabilités et exécutants :

Cette méthode a été mise au point par Jean-Paul Charpentier. Le protocole actuel utilisé en routine a été élaboré avec Nathalie Boizot. Il peut être exécuté par toute personne travaillant dans le Laboratoire d'Analyses biochimiques après un apprentissage auprès de NB, Kévin Ader ou JPC.

6- Matériels et produits nécessaires :

Produits chimiques :

- 6-méthoxyflavone (Aldrich ref 419737-1G) ; étagère labo protéines
- D- gluconolactone (Sigma ref G4750-500G) ; étagère labo protéines
- Acétone ; chambre froide.
- Méthanol HPLC gradient grade (VWR ou Fisher) ; armoire jaune
- Eau ultra pure fraîchement soutirée

Matériels :

- Microtubes à centrifuger Safe Lock Eppendorf 2 mL
- Balance Ohaus après vérification avec les masses étalons
- Flacon en verre brun équipé d'une dispensette Easy Calibration Brand
- Cuve ultra-sons en chambre froide 4°C
- Agitateur magnétique et barreau aimanté
- Agitateur rotatif
- Centrifugeuse réfrigérée à 4°C (1-15 K Sigma)
- Pipette automatique P1000 dont la vérification est conforme
- Tubes à hémolyse en PP 5 mL
- Speed-vac
- Cônes à filtre à charbon actif
- Eprouvette en verre 1L
- Bécher en verre 200 mL
- Portoir flottant

7- Hygiène et sécurité :

- Port de gants et blouse obligatoire
- L'évaluation des risques a été réalisée et est disponible sur le logiciel OPPI à l'adresse <https://oppi.prevention.inra.fr>
- Les fiches toxicologiques des produits sont présentes dans le laboratoire (classeur violet labo HPLC)

- Les plastiques souillés chimiquement doivent être recueillis dans la poubelle à couvercle rouge

8- Conditions spécifiques, contraintes, précautions et recommandations :

- Préparer le solvant d'extraction sous la sorbonne
- Effectuer l'extraction à 4°C afin d'éviter la dégradation des composés phénoliques
- Effectuer la récupération des surnageants sous la sorbonne.

9- Documents d'illustration :

Néant

10- Détails de manipulation :

A- Préparation du solvant d'extraction : acétone ou méthanol 80%, 6-méthoxyflavone 10⁻⁴M, gluconolactone 10⁻¹M :

- Dans une éprouvette en verre de 1 L, mettre 800 mL d'acétone ou méthanol. Ajouter 25,2 mg de 6-méthoxyflavone et laisser dissoudre sous agitation.
- Dans un bécher en verre, mettre 100 mL d'eau ultra pure. Ajouter 17,8 g de gluconolactone et laisser dissoudre sous agitation. Le contenu du bécher en verre est transvasé dans l'éprouvette et le volume est complété à 1L avec de l'eau ultra pure.
- Le solvant d'extraction est transvasé dans un flacon ambré de 1L équipé de la dispensette et stocké à 4°C.

B- Extraction des composés phénoliques :

- Peser environ exactement 30 mg de poudre directement en tube Eppendorf 2 mL.
- Ajouter 1,80 mL de solvant d'extraction. Mélanger.
- Insérer les tubes sur un portoir flottant, le placer dans la cuve à ultra-sons, remplie au 3/4 avec de l'eau osmosée et une poignée de glace, et laisser soniquer pendant 30mn, vortex après 15 min.
- Centrifuger les tubes pendant 20 min à 18000 g à 4°C.
- Transvaser les surnageants dans les tubes à hémolyse, 500µL pour le folin et 1 mL pour HPLC correspondant avec une pipette automatique P1000 équipée d'un cône à filtre à charbon actif.
- Evaporer à sec pendant environ 3h au speed-vac.
- Les résidus secs sont ensuite solubilisés dans 250 µL de MeOH 100% sous agitation en fonction de l'essence de bois et des analyses ultérieures.
- Les tubes sont stockés à 4°C.