Bac Professionnel Option
Laboratoire et Contrôle
De la Qualité

15 février /
8 avril 2016

CEA CADARACHE

DE LA RECHERCHE À L'INDUSTRIE

cea

Jade DOLOY

Promotion 2013 - 2016

Epreuve E6

Remerciements :

Avant toute explication, il me tient à cœur de remercier les personnes qui m'ont aidée tout au long de mon stage et qui m'ont permis de véritablement apprécier ces huit semaines passées.

Tout d'abord, je n'aurais pas pu intégrer le projet sans l'approbation de Gilles Peltier, chef du Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologies des Bactéries et Micro-algues (LB3M) du centre CEA Cadarache, qui m'a accueilli dans son laboratoire afin d'y réaliser mon stage de terminale professionnelle laboratoire contrôle et qualité.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à mon maître de stage, Stéphan Cuiné, qui a accepté de m'encadrer. C'est avec pédagogie, des conseils avisés mais surtout avec bonne humeur et patience qu'il m'a accompagnée tout au long de cette expérience professionnelle. Le temps qu'il a pu me consacrer, les responsabilités ainsi que la qualité de cet encadrement m'ont permis d'acquérir des connaissances et augmenter ma confiance dans mon choix de carrière. Merci aussi pour l'apport d'une aide précieuse à la confection de mon rapport de stage.

Je souhaite aussi remercier Isabelle Té, dont j'ai apprécié l'humour et pour son aide dans mes manipulations et sur l'explication du fonctionnement du laboratoire et de ses analyses.

Je remercie beaucoup Pierre Richaud, pour sa bonne humeur et son aide précieuse dans la confection de mon rapport de stage.

Je remercie aussi Pascaline Auroy et Stéphanie Blangy pour leur sympathie.

J'ai pu aussi compter sur toutes les personnes que j'ai côtoyées tout au long de mon stage : Yonghua Li-Beisson, Bertrand Legeret, Jean Alric, Frédéric Beisson, Véronique Cardettini, Audrey Beyly, Claire Sahut, Xénie johnson.

Sans oublier Frédéric Chaux, Marie Chazaux, Louis Dumas, Yuanxue Liang, Solène Moulin, Pawel Brzezowski, Adrien Burlacot, Fantao Kong, Malika Mekhalfi, Ismael Torres Romero Lin Xu avec qui j'ai collaboré, échangé mais aussi avec qui j'ai pu passer de bons moments.

Tous, grâce à leurs savoirs et leur compétences m'ont fait découvrir le monde de la recherche et m'ont transmis énormément de connaissances, de techniques, des méthodes de réflexion. Je les remercie d'avoir rendu ces deux mois à l'intérieur de ce laboratoire enrichissants autant professionnellement que personnellement.

De plus, j'ai enfin approché un sujet qui me tenait à cœur : l'étude des micro-algues et de leurs potentiels. Pour cela je remercie le CEA et la plateforme Héliobiotec, qui ont consacré leurs ressources, en mettant à disposition le matériel et l'encadrement adéquat pour mener à bien ce projet.

Sommaire

Introduction 1

Partie 1 : Economie de l'entreprise 1

I.1) Situer le laboratoire dans son environnement 1
I.11) Présentation du CEA 1
I.12) Présentation du centre de Cadarache 1
I.13) Schéma économique du laboratoire : 2
I.2) Présentation du laboratoire 3
I.21) Statut juridique 3
I.22) Les différentes activités : 3
I.23) Types d'analyses : 3
I.3) Organisation du laboratoire 4
I.31) Rôles des différents personnels du laboratoire : 5
I.32) Horaires et condition de travail : 5
I.33) Sécurité, qualité, réglementation : 5
I.34) Métrologie : 6
Partie 2 : Les situations professionnelles significatives 7

II.1) SPS n°1 Dosage de la chlorophylle 7
II.11) But : 7
II.12) Principe : 7
II.13) Mode opératoire : 8
II.14) Résultats et interprétation: 8
II.2) SPS n°2 Dosage de l'amidon 9
II.21) But : 9
II.22) Principe : 9
II.23) Mode opératoire : 10
II.24) Résultats et interprétation : 10
II.3) SPS n°3 Analyse des protéines 11
II.31) But : 11
II.32) Principe : 11
II.33) Mode opératoire : 12
II.34) Résultats : 12
II.35) Interprétation : 13
II.36) Conclusion : 13
II.37) Coût de l'analyse : 14
II.38) La recherche de la qualité qui implique des coûts : 14
Conclusion générale du rapport : 15

Introduction

J'ai effectué mon stage durant huit semaines dans le laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologies des Bactéries et des Micro-algues (LB3M) du centre CEA Cadarache, située dans les Bouches-du-Rhône en région Provence Alpes Côte d'Azur, du 15 février au 8 avril 2016. Mon intérêt pour le laboratoire est motivé par ma passion pour les micro-algues. Durant mon stage, mon travail a impliqué des prélèvements d'échantillons de cultures en photo-bioréacteurs. De ce fait, mes trois situations professionnelles significatives (SPS) seront d'abord le dosage de la chlorophylle contenue dans deux souches, qui est un témoin de la photosynthèse (1), le dosage de l'amidon pour connaitre leurs quantités de réserves carbonées (2) et la réalisation d'un western blot avec une extraction des protéines, une migration sur gel, un transfert sur membrane et une révélation grâce à des anticorps spécifiques, afin de connaitre les niveaux d'expression de certaines protéines (3).

Partie 1 : Economie de l'entreprise

I.1) Situer le laboratoire dans son environnement

I.11) Présentation du CEA

Le CEA est un établissement public créé en 1945 à l'initiative du Général De Gaulle. Ce « Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives » a pour but de poursuivre des recherches scientifiques et techniques sur l'énergie nucléaire dans divers domaines faisant suite à la découverte de la radioactivité en 1896. Financé par l'état à hauteur de 4.7 milliards d'euros, c'est le président de la République qui nomme l'administrateur général. Depuis 2012, Yves Bréchet a été nommé Haut-commissaire à l'énergie nucléaire. Les rôles importants du CEA sont :

- Assurer l'indépendance énergétique de la France, et le maintien de la force de dissuasion.
- L'information du gouvernement lui permettant de prendre ses décisions.

Il intervient donc dans les énergies « bas carbone » (nucléaires et renouvelables), la défense et la sécurité, les technologies pour l'information et pour la santé. Présent dans de nombreux pôles de compétitivité, le **CEA** est organisé en quatre directions opérationnelles, chacune ayant un domaine d'activité différent : énergie nucléaire (DEN), applications militaires (DAM), recherches technologiques (DRT), sciences de la matière et sciences du vivant (DRF). Acteur majeur dans l'innovation technologique et scientifique et actionnaire majoritaire d'AREVA, il possède des liens forts avec l'économie avec plus de 500 partenaires industriels et intervient dans la création de nombreuses start-ups. Environ 16000 techniciens, ingénieurs, chercheurs sont employés par le CEA.

I.12) Présentation du centre de Cadarache

Le CEA Cadarache se situe à environ 30 minutes d'Aix en Provence et une heure de Marseille.
Créé en 1959, l'établissement de **Cadarache** fait partie des 10 centres de recherche du CEA. Essentiellement

Image 1 : localisation de la région PACA
http://technoresto.org/

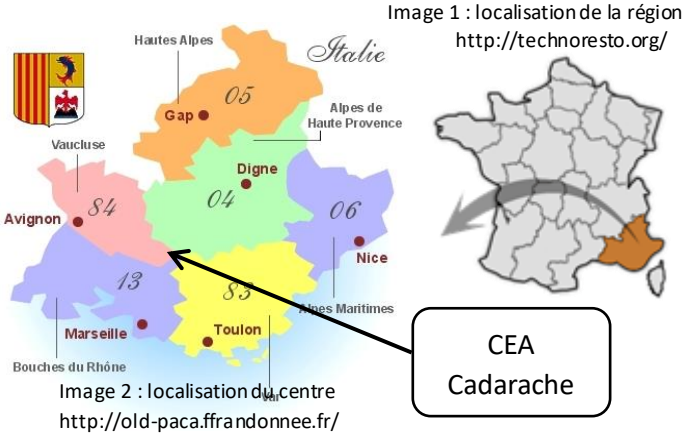


Image 2 : localisation du centre
http://old-paca.ffrandonnee.fr/

le développement de la nouvelle filière de réacteurs, il s'étend sur une superficie de plus de 1600 hectares et il regroupe 5000 employés de divers horizons, la moitié est employée par le CEA ; les autres appartiennent à AREVA, au CNRS, à l'université (doctorants, master, DUT,…) et prestataires extérieurs. Cinq plateformes y sont regroupées : Fusion, Fission, Nouvelles technologies, Biologie-microbiologie et Services administratifs.

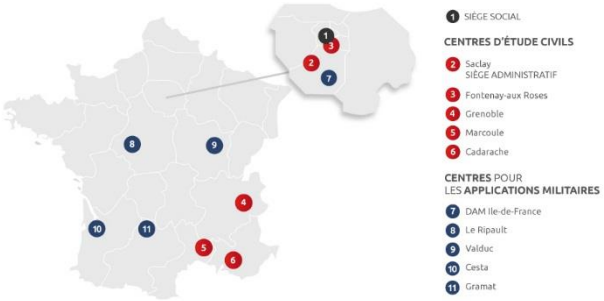


Image 3 : les centres CEA sur le territoire http://www.cea.fr/

Au CEA la recherche est répartie entre plusieurs directions. La biologie dépend de la direction de la recherche fondamentale (DRF), elle-même divisée en plusieurs instituts. Le Biam (Biosciences et Biotechnologies d'Aix Marseille) où j'ai effectué mon stage, comprend huit laboratoires dont le LB3M (Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologies des Bactéries et Micro-algues) spécialisé dans l'étude des micro-algues.

I.13) Schéma économique du laboratoire :

Partenaires
Les financements proviennent de co-financeurs comme la Région, l'Europe mais aussi des entreprises biotechnologiques privées telles qu'Alpha Bio Tech, Microphyt, et de groupes sociétés telles que Total.

Fournisseurs
VWR et Sigma (plastique à usage unique et produit chimique)
Interchim (chromatographie)
Thermo Fisher (enzyme)
Les appareils ont chacun leurs fournisseurs.

LB3M

Clients
Pour la recherche fondamentale c'est la communauté scientifique et pour la recherche appliquée les industriels. Ce ne sont pas des clients à proprement parler mais celui qui attend des résultats est surtout l'Etat.

Concurrents
Les laboratoires de recherche appliqués du monde (IFREMER L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, NREL National Renewable Energy Laboratory aux USA, LOV laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-Mer)
Les start-ups (Global Bioénergie, Hélio Pur Technologies)
Les industriels (Fermentalg, F&M fotosintetica microbiologia en Italie).

Pour 2015 : dépenses 200 k€
Equipement 20k€ Missions 15 k€
Personnel non permanent : 337 k€
Personnel permanent CEA : 807 k€
Personnel permanent CNRS : 150 k€

L'équipement de la plateforme Héliobiotec a été acheté à l'aide d'un projet CPER (contrat de plan Etat-Région) de 2,4 millions €

I.2) Présentation du laboratoire

I.21) Statut juridique

Le CEA est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC), ayant pour but la gestion d'une activité de service public de nature industrielle et commerciale. C'est le plus important organisme de recherche en France avec le CNRS après les universités, très lié à l'Etat. Il a donc une source de financement publique mais dépend en partie du droit privé. Le CEA dépend de trois tutelles, le ministère de l'industrie, de la défense et de l'enseignement supérieur et des universités.
Le BIAM est une unité mixte de recherche (UMR 7265, CNRS, CEA, AMU)

I.22) Les différentes activités :

Le laboratoire appartient au secteur d'activité tertiaire ; il produit une activité de recherche fondamentale et appliquée.

Les activités du laboratoire s'organisent en deux axes de recherche :

- Un axe, plutôt fondamental, sur les mécanismes de régulation de la photosynthèse et les liens avec la gestion de l'énergie pour la croissance des microalgues et le stockage des réserves carbonées de celles-ci.
- Un autre axe, plus appliqué, sur la synthèse de molécules d'intérêt par ces micro-algues : elles ont, en effet, une forte capacité à en synthétiser : hydrogène, alcanes, amidon, pigments et acides gras… elles accumulent ces derniers sous forme de réserves en lipides. Celles-ci sont utilisées dans des applications telles que les biocarburants, la nutrition et la chimie verte.

I.23) Types d'analyses :

Le laboratoire fait appel à différentes techniques d'analyses selon le sujet de recherche. Le laboratoire dispose de quatre plateaux techniques à la disposition des chercheurs :

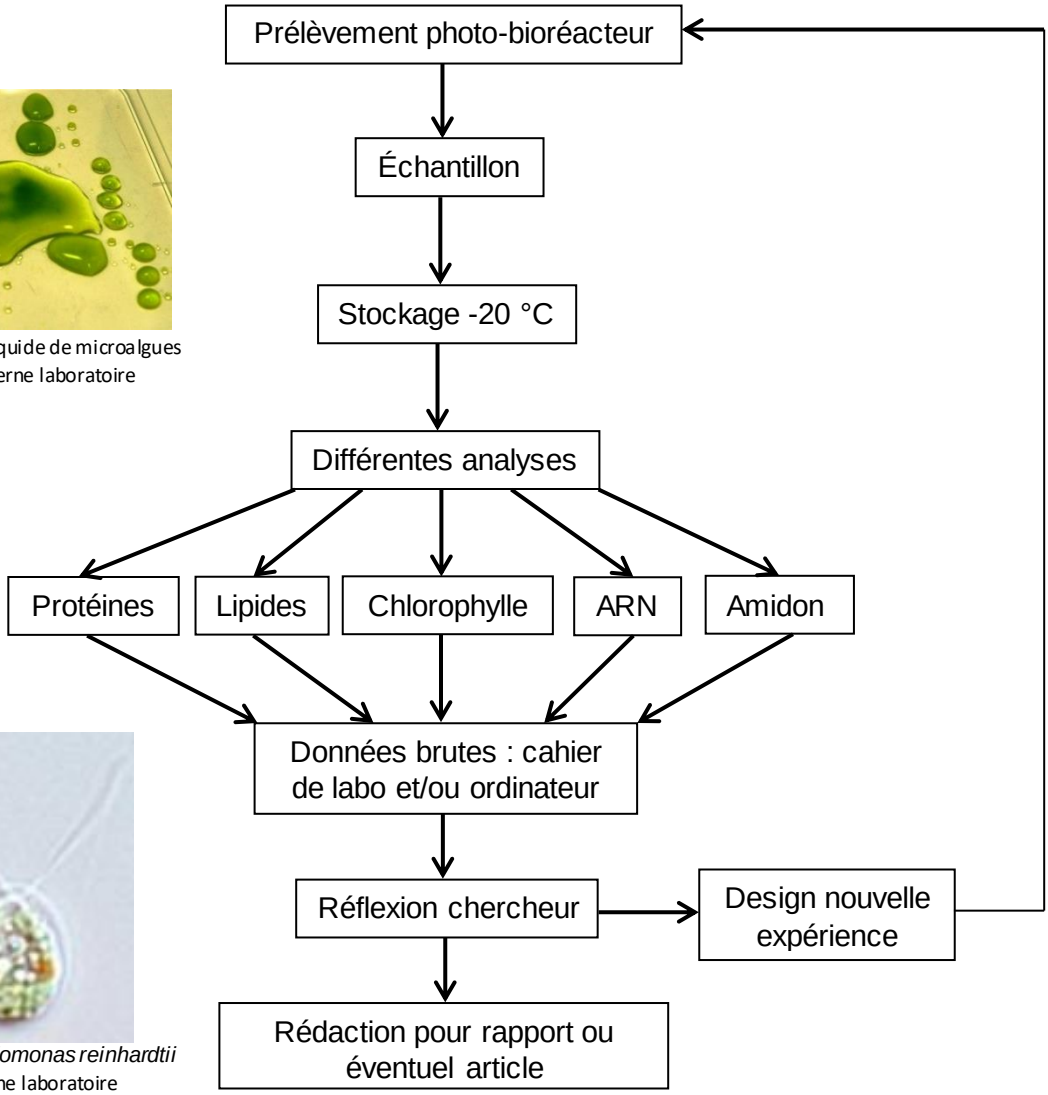
- Biologie cellulaire avec la culture et le croisement des souches de microalgues.
- Microbiologie et Biologie moléculaire pour l'étude des gènes et la production de protéines recombinantes
- Biochimie avec la purification des protéines et l'analyse des protéines à l'aide de western blot
- Techniques d'analyse en chromatographie et spectrométrie de masse (lipides, gaz)

Image 4 : micro algues cultivées en photo bioréacteur de 1 L en mode continu
Source interne laboratoire

Exemple d'analyses depuis le prélèvement jusqu'à la transmission des résultats :

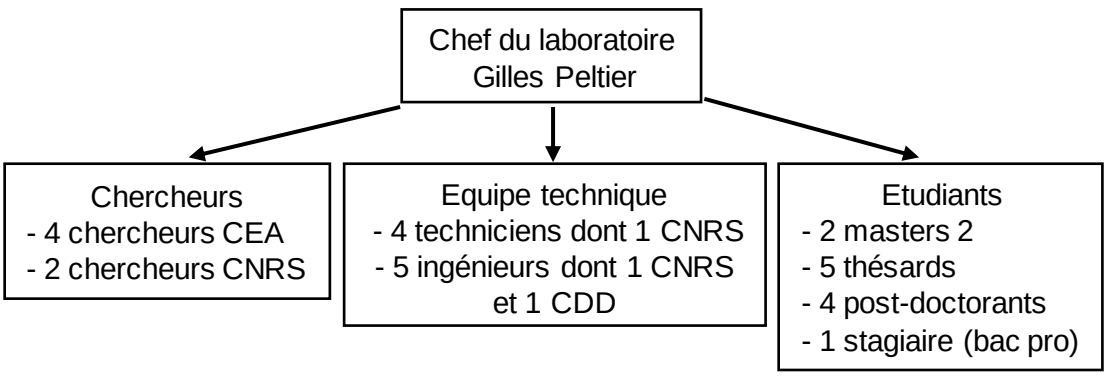
Image 5 : culture liquide de microalgues
Source interne laboratoire

Image 6 : *Chlamydomonas reinhardtii*
Source interne laboratoire



Une manipulation en photo-bioréacteur (PBR) commence par la demande du chercheur ou d'un étudiant, des pré-cultures sont ensuite réalisées avant l'ensemencement des 4 PBR. Tout au long de la culture les algues seront placées dans des conditions variables et on suivra différents paramètres comme le CO_2, la quantité de milieu injecté, le pH…

I.3) Organisation du laboratoire



I.31) Rôles des différents personnels du laboratoire :

Le laboratoire compte généralement entre 25 et 30 personnes selon la gestion du nombre d'étudiants et celle des CDD (contrat à durée déterminée) au sein du laboratoire.
Le BIAM est une Unité Mixte de Recherche 7265, du Centre National de Recherche Scientifique, du Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, d'Aix Marseille Université soit : UMR 7265, CNRS, CEA, AMU. Le personnel du laboratoire appartient au CNRS et au CEA.

- Les chercheurs vont gérer des thématiques de recherche, encadrer les étudiants dans leur travail et aussi rédiger des projets de collaboration avec d'autres laboratoires. Ces projets sont le plus souvent financés par des sources indépendantes du CEA (Agence Nationale de la Recherche, Europe…)
- L'équipe technique va s'occuper de la logistique du laboratoire, c'est-à-dire préparer les milieux de culture, gérer le stock des consommables, laver la vaisselle, stériliser selon les besoins par autoclavage. Ils réalisent également une partie des expérimentations et veillent au bon fonctionnement des appareils du laboratoire.
- Les étudiants sont présents dans le laboratoire pour une durée qui varie selon leur niveau d'étude : cela peut aller de deux mois comme mon stage actuel de terminale à trois ans pour les doctorants ou post-doctorants. La plupart vont avoir pour but de répondre à une thématique proposée par les chercheurs.

I.32) Horaires et conditions de travail :

Le personnel est soumis au port d'un badge qu'il doit présenter pour rentrer dans l'enceinte du CEA et lors d'éventuels contrôles hors de son bâtiment. Ce badge sert également de carte de cantine.
Les horaires de travail sont sur la base des 40h avec des RTT et des bus de ramassage sont mis à la disposition des salariés. Arrivée à 7h55, 35 min de pause accordée entre midi et deux heures, départ à 16h35, du lundi au vendredi.

I.33) Sécurité, qualité, réglementation :

La sécurité est un point crucial pour le CEA. Chaque nouvel arrivant est accueilli successivement par l'ingénieur-sécurité, l'ingénieur-qualité et le chef d'installation, pour prendre connaissance des dangers, des mesures de prévention mises en place et du règlement intérieur :

- L'ingénieur de sécurité va parler de prévention, des choses mises en place pour éviter au maximum les accidents et les risques :

- Les règles de base comme se laver les mains régulièrement, ne pas pipeter à la bouche, interdiction de stocker et de consommer des boissons et aliments dans le laboratoire, et autres…
- Les équipements de protection collective adaptés au niveau des risques de sécurité. L'utilisation des postes de sécurité microbiologique (PSM) de type I, II ou III. L'utilisation des autoclaves, des centrifugeuses conformes, et autres…
- Les équipements de protection individuelle (EPI) comme le port de blouse ininflammable, le port de gants jetables, le port de lunettes.
- La décontamination des postes de travail et des instruments avec des solutions décontaminantes, du matériel adapté pour l'utilisation de l'autoclave et des lave-vaisselles pour la verrerie.

- La gestion des déchets : les déchets d'activités de soin à risque infectieux (DASRI) sont jetés dans les poubelles jaunes puis collectés par une entreprise agréée puis incinérés. Les déchets chimiques sont triés dans des bacs pour éviter de mélanger ceux qui peuvent être incompatibles puis collectés et traités par une entreprise agréée. Les déchets mixtes sont les piquants, coupants, tranchants répartis dans les poubelles à verre ou DASRI
- Il est également possible de suivre différentes formations complémentaires selon le poste occupé et la durée d'accueil
- Au niveau suivi médical, une fiche de poste et de nuisance (FPN) est remise au salarié pour qu'il sache ce qu'il a le droit ou non de manipuler et ses conditions de travail (pour moi, horaires normaux, station debout prolongée, travail sur écran, exposition à certains produits chimiques). Une fois par an chaque salarié du centre est vu par le médecin du travail et selon le poste des vaccinations doivent être faites.

- L'ingénieur qualité a un rôle important en ce qui concerne la traçabilité des données (tenue des cahiers de laboratoire, qui doivent tracer les données expérimentales brutes et les conditions expérimentales avant d'être traitées). Il nous explique aussi que la direction du centre possède une triple certification ISO 9001 (Qualité), ISO 14001 (Environnement), OHSAS 18001 (Sécurité).
- Le chef d'installation rappelle les droits du travail ainsi que le règlement intérieur.

I.34) Métrologie :

Plusieurs manipulations sont mises en œuvre au sein du laboratoire pour vérifier la métrologie ce qui assure la fiabilité des manipulations, dont une grande partie concerne les photo-bioréacteurs :

- Les sondes de pH sont étalonnées grâce à des solutions tampon de différents pH. Nous commençons par une solution à pH 7, puis une à pH 4. Une fois la sonde réglée une vérification est effectuée en la replongeant dans le tampon pH 7. Cette sonde servira à vérifier que le pH des cultures ne descende pas trop bas car le CO_2 injecté dans le milieu acidifie celui-ci.
- Les sondes de biomasse sont étalonnées grâce à une différence de deux densités optiques (DO), d'abord celle de l'eau distillée qui est proche de zéro puis celle d'un filtre optique qui est à une DO de 0.35. Cette sonde sera utilisée pour vérifier la turbidité et donc le nombre de cellules qui troublent le milieu. La culture est homogénéisée par agitation permanente, la sonde permettra de déclencher à un certain seuil (DO=0.4) la dilution du milieu.
- Les pompes doseuses vont être étalonnées en mesurant un volume, une mesure est réalisée à 20 mL/min. Ce volume est ensuite pesé, le poids doit être égal à 20 g (soit un volume de 20 mL). Si c'est le cas, alors la pompe prévente le débit, sinon elle est réglée puis de nouveau étalonnée. Ces pompes vont être déclenchées par la sonde de biomasse pour injecter du milieu neuf.

En ce qui concerne tout ce qui doit être autoclavé, un scotch « autoclave » est collé pour vérifier que l'autoclave a bien atteint la température de 120 °C. Pour cela, à partir de cette température le scotch change de couleur. De cette façon en laissant le scotch sur les différents objets nous savons s'ils sont stériles ou pas. Les paramètres du cycle de l'autoclave sont par ailleurs sauvegardés de manière informatique.
Pour le reste la métrologie est sous-traitée et vérifiée environ une fois par an. Des entreprises viennent vérifier les balances, les pipettes, les spectromètres de masse, les congélateurs et les chambres froides.

Partie 2 : Les situations professionnelles significatives

II.1) SPS n°1 Dosage de la chlorophylle

II.11) But :

L'étude porte sur la micro-algue nommée *Chlamydomonas reinhardtii* sous sa forme sauvage (*wt*) ou mutée (hf_0). Cette mutation entraine un phénotype particulier dans la capacité d'effectuer la photosynthèse en lumière modérée ou forte. Pour caractériser plus finement ce phénotype, nous allons observer l'évolution de la chlorophylle au cours d'une culture à des éclairements variés et mesurer la différence entre le mutant et la souche sauvage. La chlorophylle donne une indication globale de la capacité photosynthétique de l'algue.

II.12) Principe :

Le méthanol servira à extraire les pigments à partir des cellules. Après centrifugation, la chlorophylle se retrouve dans le surnageant, tandis que l'amidon que nous analyserons par la suite se retrouve dans le culot.

Image 7 : spectrophotomètre du laboratoire
Source personnelle

Le principe de la spectrophotométrie:

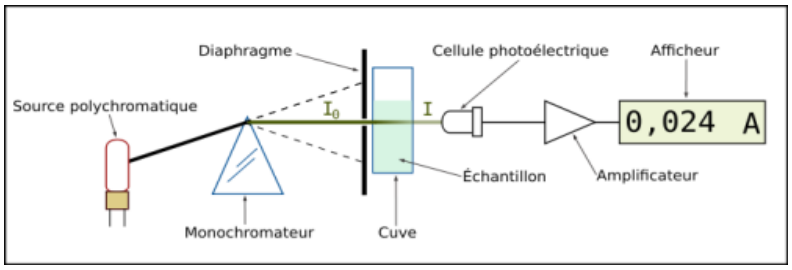


Image 8 : schéma explicatif d'un spectrophotomètre
fr.wikipedia.org

- La source polychromatique est constituée d'une lampe au tungstène qui émet des longueurs d'onde (λ) comprises entre 400 et 800 nm.

- Le monochromateur sélectionne une seule λ à la fois. On choisira alors successivement une λ correspondant à l'absorbance de la chlorophylle (653 et 666 nm), à celle des caroténoïdes (450 nm) puis une λ non absorbée par les pigments (750 nm) qui permettra d'évaluer la turbidité de la solution pour la soustraire aux différentes absorbances mesurées.

- La cuve en plastique contient nos échantillons à analyser, la lumière la traversera sur 1 cm. La première cuve contient le blanc, qui est dans ce cas du méthanol. Cela permet de mettre à zéro l'absorbance du solvant et de la cuve.

- Le détecteur est constitué d'une cellule photoélectrique qui transforme l'énergie de la lumière en courant électrique (plus l'absorbance est grande, plus l'énergie de la lumière reçue par le détecteur est faible et donc plus le courant mesuré est faible). Il est également constitué d'un ampèremètre qui mesure le courant électrique produit par la cellule photoélectrique. Le signal est ensuite transmis à un ordinateur qui calcule la concentration en fonction des absorbances par la formule ci-dessous :

$$(A_{653}-A_{750}) \times 19{,}71 + (A_{666}-A_{750}) \times 4{,}4 = \text{concentration en } \mu g/mL$$

- L'écran affiche les absorbances mesurées et les concentrations calculées

II.13) Mode opératoire :

Image 9 : centrifugeuse
Source personnelle

Matériel : tube à vis, centrifugeuse, micropipettes, cônes, cuve, spectrophotomètre, méthanol, congélateur -20 °C, sorbonne, gants.

- Prélever un volume de culture de 2 mL dans un tube à vis (tripliquats techniques), centrifuger 4 min à 4000 rpm (rotation par minute), enlever le surnageant et ajouter 1mL de méthanol. Conserver à -20 °C.
- Sortir les échantillons pour les décongeler
- Centrifuger 5 min à 10 000 rpm
- Récupérer le surnageant sous la sorbonne, en portant des gants et le verser dans la cuve pour dosage de la chlorophylle
- Exporter les résultats sur Excel pour analyse
- Laisser évaporer le méthanol des tubes sous la sorbonne, le reste du protocole concerne le dosage de l'amidon (SPS n°2)

II.14) Résultats et interprétation:

Nos échantillons proviennent de deux souches cultivées chacune dans deux photo-bioréacteurs (dupliquats biologiques). Pour chaque temps de la cinétique, trois prélèvements sont effectués par photo-bioréacteur (tripliquats techniques). A partir des résultats du spectrophotomètre, on calcule une moyenne et un écart type pour chaque condition que l'on représente ci-dessous sous la forme d'un tableau et d'un graphique :

	Temps (h)	0	2	4	6	8	26	48
Moyenne (mg/L)	*hf0*	8,62	13,64	14,01	15,11	15,61	14,74	9,06
	wt	8,22	10,16	11,81	13,22	13,22	14,68	5,98
Ecart type (mg/L)	*hf0*	2,13	1,19	1,84	2,17	1,56	1,78	1,14
	wt	1,21	1,26	0,28	0,46	0,56	4,72	0,78

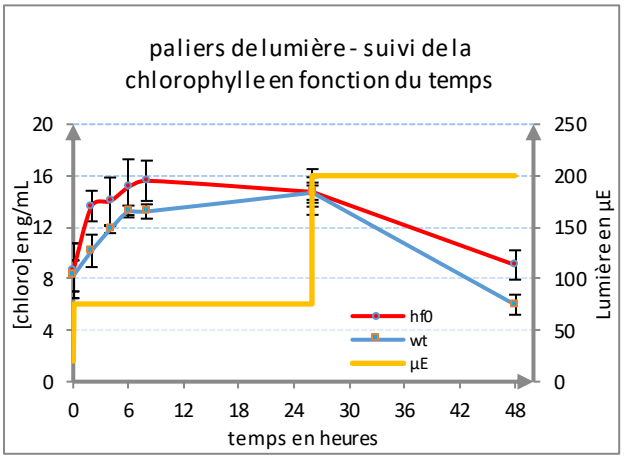


Image 10 : graphique évolution de la chlorophylle

Sur le graphique nous représentons également en jaune les intensités lumineuses au cours de l'expérience en µE (micro mole de photon/m²/seconde)

On observe d'abord une différence peu significative entre les deux souches lorsque l'on passe à 75 µE (accroissement de la chlorophylle au cours du temps).
Par contre à fort éclairement (200 µE), les deux souches dégradent leur chlorophylle. La souche sauvage le fait d'une manière plus importante que la souche mutante.
La dégradation de chlorophylle résulte de l'adaptation de l'algue aux fortes lumières : afin de limiter les excès d'énergie (risque de stress oxydant), elle diminue sa capacité de collecte de photons (Photosystèmes+Pigments).

II.2) SPS n°2 Dosage de l'amidon

II.21) But :

Le dosage de l'amidon nous sert à suivre l'état des réserves carbonées chez la souche sauvage et le mutant. Celles-ci résultent de la photosynthèse et peuvent donc être altérées chez ce dernier.

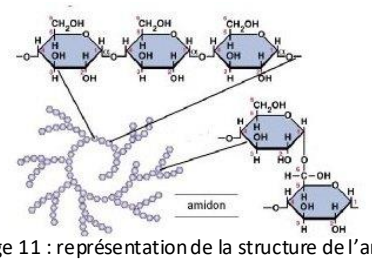


Image 11 : représentation de la structure de l'amidon
laperceptiondesaliments.wordpress.com/

Lors de l'expérience, les prélèvements utilisés pour la chlorophylle servent pour le dosage de l'amidon. En effet, lors de l'extraction des pigments par le méthanol celui-ci reste sous forme insoluble et se retrouve dans le culot.

II.22) Principe :

Image 12 : l'analyseur de glucose
Source personnelle

L'amidon est un sucre insoluble qui correspond à un polymère de glucose. L'appareil utilisé ici pour le dosage d'amidon détermine en fait la concentration en glucose après hydrolyse.
Les culots provenant du dosage de chlorophylle (SPS n°1) sont resuspendus dans de l'eau et autoclavés, ce qui permettra de rendre accessibles les chaines glucidiques de l'amidon en le décondensant. Ensuite nous ajoutons l'amylo-glucosidase, qui est une enzyme qui va lyser les liaisons entre les molécules de glucose.
Les sucres solubles sont débarrassés des résidus insolubles par centrifugation. Le surnageant est ensuite analysé par le doseur de glucose. Cet appareil possède une enzyme immobilisée sur membrane capable d'oxyder le glucose selon la réaction ci-dessous :

$$\text{Glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{Glucose oxydase}} H_2O_2 + \text{D-Glucono-}\delta\text{-Lactone}$$

Une seconde membrane retient tout ce qui est supérieur à 200 daltons.
L'eau oxygénée produite par la réaction donne des électrons à une électrode ce qui va créer un courant dont l'intensité est directement liée à la concentration en glucose, et donc à celle en amidon. Ce qui va donner une deuxième réaction :

$$H_2O_2 \longrightarrow 2H^+ + O_2 + 2e^-$$

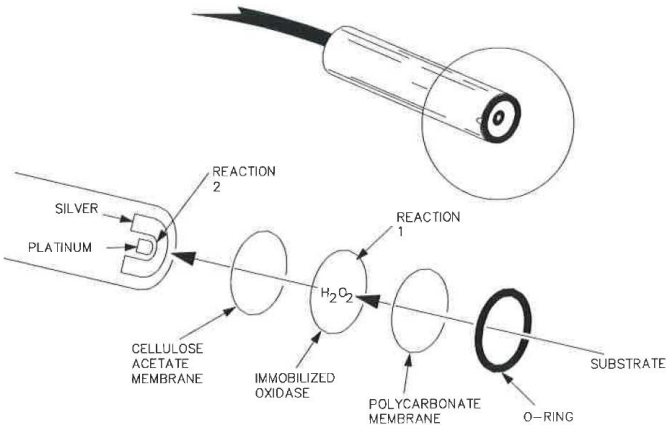


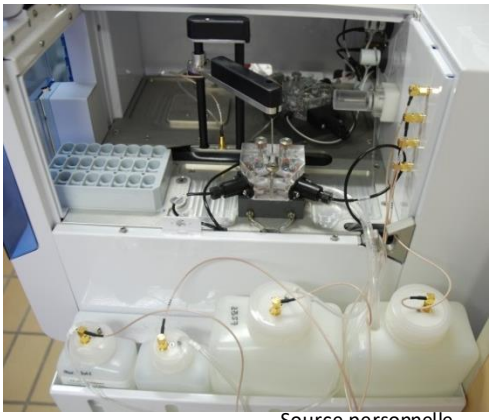
Image 13 : sonde réactionnelle pour le dosage du glucose
Sources interne au laboratoire

Image 15 : l'analyseur de glucoses (pompe, injecteur, solution tampon, poubelle, portoir échantillon, …)

II.23) Mode opératoire :

Matériel : Tube à vis, centrifugeuse, micropipettes, cônes, congélateur -20 °C, doseur de glucose (YSI 2900 Select)

Image 14 : micropipette



Source personnelle

A la suite du mode opératoire de la SPS n°1 :

- Ajouter 400 µL d'eau milli-Q (conservation possible des échantillons à -20 °C jusqu'au lendemain)
- Autoclaver les échantillons (21 min, 121 °C)
- Centrifuger brièvement pour faire tomber la condensation
- Ajouter 200 µL d'amyloglucosidase par tube (préparation à 1 U/mL) et incuber 1h30 à 55 °C.
- Centrifuger 5 min à 13 000 rpm
- Passer les échantillons au doseur de glucose.

II.24) Résultats et interprétation :

Comme pour la SPS n°1 : nos échantillons proviennent de deux souches cultivées chacune dans deux photo-bioréacteurs (dupliquats biologiques). Pour chaque temps de la cinétique, trois prélèvements sont effectués par photo-bioréacteur (tripliquats techniques). A partir des résultats de l'analyseur de glucose, on calcule une moyenne et un écart type pour chaque condition que l'on représente ci-dessous sous la forme d'un tableau et d'un graphique :

	Temps (h)	0	2	4	6	8	26	48
Moyenne (mg/L)	*hf0*	1,92	14,90	18,03	21,77	24,20	14,80	25,85
	wt	3,76	3,67	14,64	16,99	18,79	10,04	63,56
Ecart type (mg/L)	*hf0*	1,75	1,79	3,99	3,66	3,38	3,78	5,75
	wt	2,27	1,45	3,43	4,82	2,32	1,92	8 ,14

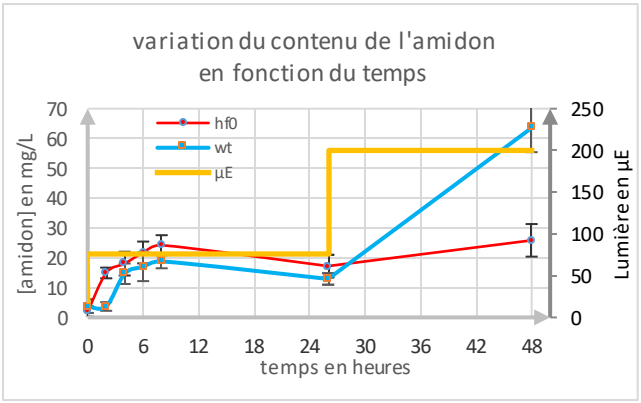


Image 16 : graphique évolution de l'amidon

Sur le graphique, nous représentons également en jaune les intensités lumineuses au cours de l'expérience en µE (micro mole de photon/m^2/seconde)

On observe d'abord une différence peu significative entre les deux souches lorsque l'on passe à 75 µE (accroissement de l'amidon dans les premières heures). Par contre, à fort éclairement (200 µE), le contenu en amidon du mutant ne varie pas alors que celui du sauvage augmente fortement. L'algue stocke sous forme d'amidon, le CO_2 assimilé non nécessaire immédiatement pour sa croissance. En augmentant la lumière, le stock d'amidon va donc s'accroitre. Le mutant ayant du mal à s'adapter aux fortes lumières ne peut assimiler autant de CO_2 que la souche sauvage, sa concentration d'amidon est donc nettement plus faible.

II.3) SPS n°3 Analyse des protéines

II.31) But :

Pour une étude de recherche sur les composants chimiques des Chlamydomonas le laboratoire souhaite confirmer l'efficacité des anticorps sur la protéine cible. Pour cela des échantillons prélevés lors des cultures en PBR vont servir à tester en western blot trois lots d'anticorps que le laboratoire vient de recevoir. Ils vont servir à détecter et quantifier une protéine d'intérêt. Par la suite cette analyse servira à voir la variation de la protéine cible selon les conditions de culture de l'algue afin de voir les accumulations éventuelles.

II.32) Principe :

- Extraction des protéines en lysant les cellules avec un ajout de détergent (Sodium Dodecyl Sulfate SDS) pour les charger négativement.
- L'électrophorèse est une technique séparative qui consiste à soumettre un mélange de molécules chargées à un champ électrique ce qui entraîne leur migration. En fonction de différents paramètres (charge, masse, forme, nature du support, conditions physico-chimiques). La vitesse de migration va varier en fonction de ces différents paramèrtes, ce qui permet la séparation des différentes molécules. Ici nous faisons migrer des protéines en conditions dénaturantes dans un gel de polyacrylamide.

Image 17 : cuve et gel de migration
fr.vwr.com

- Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps, elles sont transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose. Le gel est posé sur la membrane, des papiers filtres imbibés assurent le contact avec des électrodes placées de chaque côté. Les protéines chargées migrent depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel.
- Après le transfert des protéines sur membrane, une coloration des protéines au rouge ponceau est réalisée afin d'observer le résultat de notre transfert. La membrane est ensuite trempée dans du tampon très chargé en protéines (lait écrémé), qui vont venir se fixer sur tous les sites encore disponible de la nitrocellulose. Ceci empêchera les anticorps de venir se fixer de manière non spécifique sur la membrane.
- Western Blot (Immunodétection de protéines sur membrane):

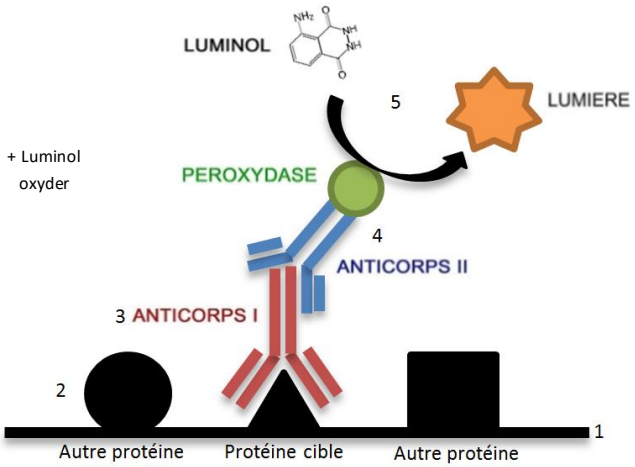


Image 18 : schéma de la réaction d'immundétection de la protéine
Source personnelle

1- la membrane
2- ensemble des protéines de l'algue réparties selon leur taille par électrophorèse
3- anticorps I (primaire) spécifique de la protéine recherchée
4- anticorps II (secondaire) spécifique de l'anticorps primaire conjugué à une enzyme nommée la peroxydase
5- substrat enzymatique qui va réagir avec la peroxydase en émettant de la lumière. Plus il y aura de protéine, plus il y aura d'anticorps fixé donc plus d'enzyme ce qui rendra le spot plus lumineux
6- Mesure du signal et analyse des résultats.

II.33) Mode opératoire :

Matériel : voir II.37) coût de l'analyse, où le matériel est détaillé.

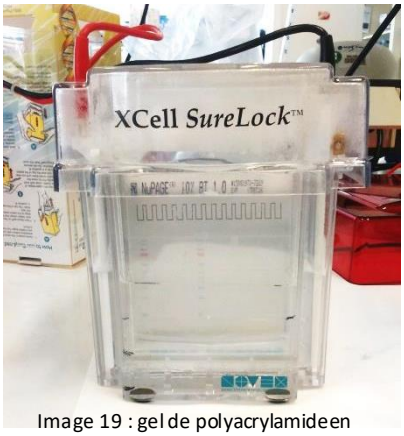
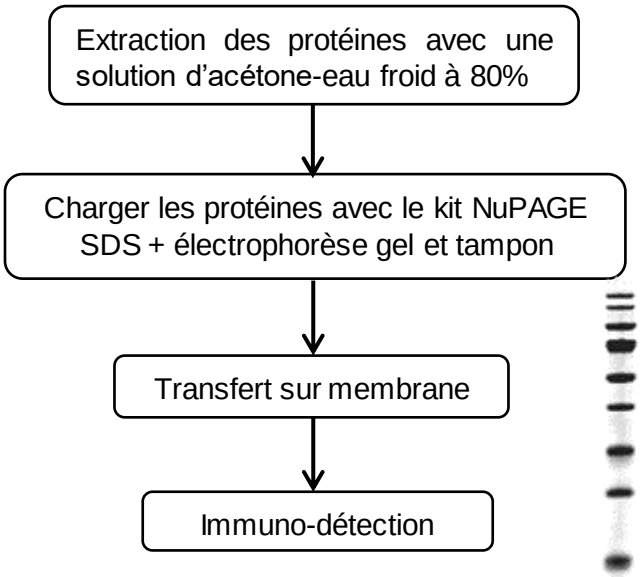


Image 19 : gel de polyacrylamideen cours de migration
Source personnelle



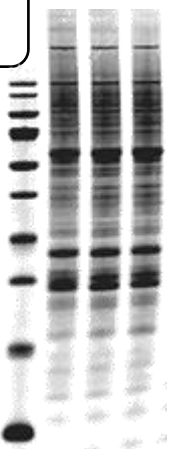


Image 20 : coloration du gel au bleu de comassie, observation des protéines totales
Source personnelle

Dans le détail du protocole n'est décrite que la partie immuno-détection :

- Vérifier l'efficacité du transfert en colorant la membrane au rouge ponceau et laver à l'eau (rincer l'évier rapidement pour pas le tacher)
- Saturer au lait 5% (5g pour 100 mL de TBST = Tris Buffer Salin Tween) pendant 30 min à température ambiante ou une nuit à 4 °C
- laver au TBST
- Rajouter l'anticorps primaire pendant 1h sous agitation
- Lavage 3 fois 5 min au TBST
- Rajouter l'anticorps secondaire (+peroxydase) pendant 1h sous agitation
- Lavage 3 fois 5 min au TBST
- Sortir le kit de révélation de la chambre froide légèrement avant
- Préparer environ 1 mL de solution par membrane (50% de sol A + 50% de sol B = mélange de luminol et peroxyde d'hydrogène)
- Poser la membrane sous la caméra
- A l'aide du logiciel de pilotage du système d'imagerie, prendre une photo en lumière blanche (visualisation des marqueurs de poids moléculaires
- Ajouter la solution de révélation, se mettre dans le noir pour ne pas la dégrader, attendre 3 min
- Toujours dans le noir, lancer une série d'acquisitions du signal lumineux afin de pouvoir localiser et quantifier la protéine détectée par les anticorps
- Sauvegarder le fichier image et l'exporter afin d'analyser les données.

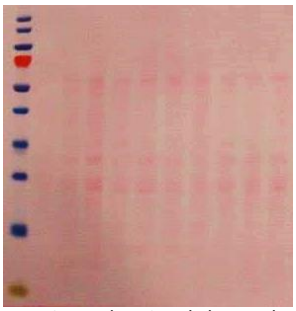


Image 21 : coloration de la membrane de nitrocellulose au rouge ponceau
Source personnelle

II.34) Résultats :

Sur le gel d'électrophorèse ont été déposés 3 fois les échantillons suivant :
M : Marqueurs (10-180 kilo Daltons)

T- : Extrait d'algue n'exprimant pas la protéine cible
WT : Extrait de protéines de la souche sauvage
HF₀ : Extrait de protéines de la souche mutée
La membrane après transfert a été découpée en trois et chaque partie a été traitée avec un anticorps primaire différent :
A : Anticorps provenant d'un lapin ayant subi des injections de la protéine cible entière.
B : Anticorps provenant d'un lapin ayant subi des injections d'un peptide provenant de la protéine cible
C : Anticorps provenant d'un lapin ayant subi des injections d'un second peptide provenant de la protéine cible

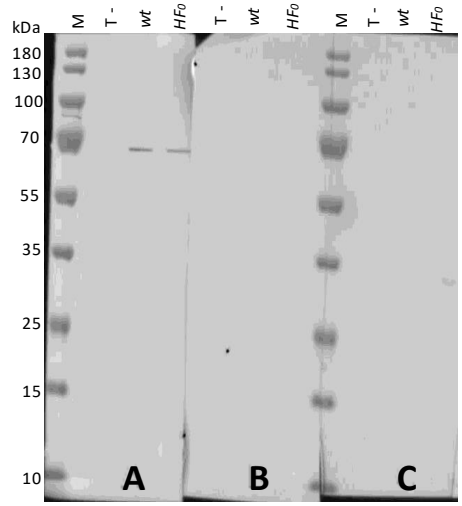


Image 22 : révélation des membranes par chimioluminescence
Source personnelle

L'anticorps secondaire utilisé (anti-lapin), le réactif et les temps d'expositions sont les mêmes pour les 3 membranes.

Grâce au logiciel, on superpose l'image de la membrane (avec les marqueurs) à celle du signal provenant des anticorps. On observe une bande en dessous du marqueur 70 kDa pour les échantillons WT et HF_0 de la membrane A. Les membranes B et C ne laissent apparaître aucune bande, même après des temps d'exposition élevés. Etonnamment, une bande est révélée au niveau des marqueurs de la membrane A entre 100 et 70 kDa.

II.35) Interprétation :

Membrane A : La protéine cible a une taille théorique de 66 kDa, nos observations correspondent donc à la valeur attendue. Le témoin négatif confirme l'observation et la bande est présente dans les deux souches. Nous pouvons en conclure que les anticorps spécifiques de la protéine entière sont de qualité.
Membranes B et C : sur les deux membranes aucune bande n'apparait ce qui signifie que les anticorps contre les deux peptides sélectionnés dans la protéine ne la reconnaissent pas dans nos conditions. Plusieurs modifications peuvent être effectuées pour pouvoir observer la protéine avec ces anticorps, toutes ont pour but d'obtenir les meilleures conditions d'interaction possibles :

- Changer de type de membrane, afin que la protéine se fixe différemment sur celle-ci et exposes d'autres parties de sa séquence
- Déposer plus de protéines
- Ajouter plus d'anticorps
- Incuber plus longtemps

Bande au niveau des marqueurs : elle correspond à une partie dégradée du marqueur de taille 100 kDa. La reconnaissance de cette protéine par l'anticorps peut peut-être s'expliquer par une homologie entre celle-ci et un contaminant de la protéine utilisée pour l'immunisation (produite dans *E.coli*). Comme la bande n'apparait pas dans les extraits d'algues sur le reste de la membrane, ce dysfonctionnement ne nous inquiète pas.

II.36) Conclusion :

Les anticorps les plus adaptés pour la recherche de notre protéine sont ceux qui ciblent la protéine entière. Les anticorps anti-peptides avaient été commandés avant que la protéine puisse être purifiée. Cette approche est pratique car elle nécessite seulement de connaitre la séquence de la protéine, mais elle ne garantit pas une obtention de bons anticorps à chaque

fois. L'injection de protéines entières est généralement plus efficace, ceci se confirme dans le cas présent.

II.37) Coût de l'analyse :

DESCRIPTIF western blot

PRIX REACTIFS

produit	*conditionnement*	*prix HT (euros)*	*coût HT / échantillon*
SDS 10%	100 mL	3,51	0,035
acétone froid	1000 mL	20,30	0,004
sample buffer	250 mL	34,18	0,062
reducing agent	10 mL	6,50	0,033
tampon	500 mL	61,61	0,246
rouge ponceau	500 mL	24,51	0,098
lait poudre	500 g	3,00	0,015
TBST	1000 mL	7,20	0,108
anticorps I	100 µL	300,00	0,600
anticorps II	1 mL	183,00	0,183
kit de révélation	500 mL	180,90	0,072
		Total Réactifs/Western Blot	**1,456 €**

PRIX GROS MATÉRIEL

matériel	*prix (euros)*	*amortissement sur 5 ans*	*total €/an pour 1000 analyses*
centrie pour falcon réfrigéré	7770,00	1554,000	0,311
rotor tube 15 mL	178,00	35,600	0,007
centrie eppendorf réfrigéré	6310,00	1262,000	0,252
rotor tube 2 mL	556,00	111,200	0,022
vortex	381,00	76,200	0,015
cuve à gel	616,00	123,200	0,025
générateur	532,00	106,400	0,021
Thermo mixeur	1257,00	251,400	0,050
pipette boy	333,00	66,600	0,013
micropipette 1000 µL	241,00	48,200	0,010
micropipette 200 µL	241,00	48,200	0,010
micropipette 10 µl	241,00	48,200	0,010
micropipette 20 µL	241,00	48,200	0,010
		Total gros matériel	**0,756 €**

PRIX CONSOMMABLE

produit	*conditionnement*	*prix (euros)*	*coût HT/ échantillons*
falcon de 15 mL (x2)	500	114,00	0,456
eppendorf 2 mL	500	16,35	0,033
eppendorf 1,5 mL	1000	27,80	0,028
pipette 10 mL	800	107,00	0,134
pipette 5 mL	1500	43,00	0,029
cône 1000 µL	2160	62,00	0,029
cône 200 µL (x4)	9600	89,40	0,037
gants nitrile (x2)	100	4,00	0,080
gel commercial 15 puits	10	120,00	0,800
papier filtre et membrane 15 échantillons	10	113,12	0,754
		Total consommables	**2,379 €**

coût total Western Blot HT / échantillon	**3,835 €**

coût total Western Blot	**4,591 €**

MASSE SALARIALE

Masse salariale	*prix (euros)*	*1 heure*	*total 2 h pour 10 ech*
Ingénieur	35000 Euros/an	23 Euros	46 Euros
	par échantillon :		4,6 Euros
		Total masse salariale	**4,60 €**

coût total Western Blot avec main d'œuvre	9,191 €

II.38) La recherche de la qualité qui implique des coûts :

- Le laboratoire peut se permettre d'investir dans du gros matériel de bonne qualité car sa rentabilité sur 5 ans est tout à fait raisonnable. De plus une fois le matériel amorti, le coût devient nul si sa durée de vie est supérieure à 5 ans.
- Le gel commercial est plus cher qu'un gel coulé à la main mais la qualité de résolution est largement supérieure. Pour que chaque gel soit rentable il faut utiliser un maximum des puits qu'il contient.
- En ce qui concerne les gants en nitrile, ils sont plus chers que les gants en latex, mais ils permettent d'éviter des allergies.
- Les centrifugeuses sont réfrigérées, ce qui fait un coût plus important à l'achat mais permet la conservation des échantillons lors de l'utilisation de celle-ci.
- L'ingénieure pour laquelle nous avons calculé la masse salariale coûte très chère à l'entreprise. Néanmoins le salaire choisi est celui d'un CDD qui n'a donc pas d'ancienneté. L'analyse est longue à réaliser ce qui induit un coût d'analyse très élevé. Ceci est le coût dans les conditions réelles de réalisation de la manipulation ; avec un technicien les couts de masse salariale seraient moindres.
- Mes calculs finaux négligent le coût de la maintenance du gros matériel et la vérification de celui-ci

Conclusion générale du rapport :

Mon travail fut majoritairement de la recherche fondamentale mais dans un contexte d'application possible pour la vie de tous les jours. Il y a eu de nombreuses manipulations dont certaines étaient une application de mes cours, d'autres plus nouvelles mais c'est avec joie que j'ai passé la plupart de mes journées à acquérir davantage de connaissances. Ces manipulations m'ont demandé de la rigueur, de la concentration, du temps pour la mise en place et une attention particulière à la traçabilité. Il m'a fallu également apprendre à gérer les logiciels des appareils et à traiter et mettre en forme les données à l'aide d'un tableur.

C'est le premier stage où l'équipe est si conséquente, mais mon intégration s'est faite rapidement ce qui a été moteur dans l'évolution de ma pratique.

La réalisation stage en milieu professionnel est une véritable satisfaction. En effet, cela permet de quitter les bancs de l'école pour voir du concret et de réaliser des heures de TP non-stop ! Au LB3M, mon travail a pris tout son sens par l'application en situation réelle et professionnelle : Les résultats de mes analyses ont servi directement aux chercheurs et aux étudiants. J'ai pu durant huit semaines faire partie intégrante d'une équipe de recherche.

J'ai même eu la chance de pouvoir discuter avec l'ingénieure qualité en confrontant l'approche de la maitrise des risques enseignée au lycée à la politique menée au laboratoire.

Cette expérience m'a confortée dans mon choix de poursuivre mon BAC LCQ par un BTS ANABIOTEC, voire de continuer ensuite. Mon objectif est de travailler plus tard dans un laboratoire avec des techniques de pointes en recherche ou développement, si possible dans le domaine des micro-algues, une de mes passions.

Ce stage au sein du CEA, ce fut plus qu'un rêve, une formidable réalité.