

Comment rationaliser le stockage d'échantillons dans les congélateurs - 80°C ?

Véronique Signoret¹, Esther Pelpoir¹, Elsa Desnoues¹

Résumé. Avant 2011, à l'UGAFL (Unité de Génétique et Amélioration des fruits et légumes, INRA), l'utilisation démesurée de la place dans les congélateurs - 80°C pénalisait les futures expérimentations. La réflexion menée dans l'Unité pour gérer le stockage d'échantillons dans les congélateurs -80°C, a permis de sensibiliser les utilisateurs à anticiper le volume d'échantillons à stocker lors de leurs expérimentations. Cette réflexion avait plusieurs objectifs : gérer au mieux l'espace dans ces appareils, faciliter la traçabilité des échantillons, diminuer l'utilisation de consommables et économiser le temps passé à la préparation des échantillons. La validation de cette procédure de stockage s'est faite sur deux années consécutives, dans le contexte d'une thèse au laboratoire pour doser des métabolites et des activités enzymatiques sur la plateforme métabolomique et fluxomique de Bordeaux. Concrètement, nous avons gagné 50% de place dans les congélateurs, tout en conservant un pot d'échantillon de réserve. La traçabilité des échantillons a été facilitée. L'économie de temps passé à la préparation des échantillons a permis d'aborder les campagnes fruitières avec plus de sérénité. Aujourd'hui, cette procédure est utilisée par d'autres équipes de l'Unité de recherche pour l'ensemble des congélateurs.

Mots clés : congélation, échantillon, pulpe, fruit, dosage métabolites, pots, sacs

INTRODUCTION

Dans notre Unité « Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes », les congélateurs - 80°C souffrent de façon chronique d'un encombrement inutile. Il y a deux raisons à cela. D'abord, chaque année, un grand volume d'échantillons est congelé par sécurité, au-delà de la quantité nécessaire pour réaliser nos différents dosages. Ensuite, les contenants utilisés sont souvent surdimensionnés. Tout cela aboutit au final à un manque d'espace de stockage qui pénalise les futures expérimentations. C'est la raison pour laquelle, depuis 2011, nous avons mené une réflexion au sein de l'Unité pour gérer au mieux le stockage d'échantillons. Le nouveau rangement adopté facilite, d'une part, le tri systématique des échantillons et, d'autre part, le grand rangement des congélateurs effectué au moins une fois par an.

L'objectif premier de notre réflexion était de mettre à disposition des utilisateurs une procédure de stockage qui permette une meilleure gestion de l'espace dans les congélateurs.

La mise en place de cette réflexion s'est faite simultanément sur quatre axes :

- par une enquête auprès des personnes concernées ;
- par la sensibilisation des utilisateurs de chaque équipe : l'idée était de les inciter à conduire une réflexion, avant la mise en place de nouvelles expérimentations, sur leurs besoins de stockage à venir dans les congélateurs - 80°C et de les confronter à la place disponible. L'équipe « pêcher » (4 personnes) a initié cette réflexion qui a ensuite été élargie à l'équipe « tomate » (10 personnes) intéressée par cette démarche ;
- par le recensement des besoins de chacun en fonction des dosages réalisés ;

¹ INRA, UR 1052, Génétique et amélioration des fruits et légumes, F-84140 Montfavet, France

Véronique Signoret, Esther Pelpoir, Elsa Desnoues

- par le recensement des différents contenants utilisés dans notre Unité pour stocker, dans un premier temps, les morceaux de chair de fruit et, dans un deuxième temps, les poudres obtenues après broyage.

Ensuite, nous avons comparé les quantités de poudres obtenues aux contenants de départ. Pour finir, nous avons validé une nouvelle procédure de stockage sur deux années consécutives, dans le contexte d'une thèse au laboratoire reposant sur le dosage de métabolites primaires et d'activités enzymatiques sur la plateforme métabolomique et fluxomique de l'UMR Biologie du fruit et Pathologie de Bordeaux.

Les bénéfices de cette procédure sont allés bien au-delà de la simple optimisation de l'espace. Elle a permis, en outre, une simplification de la traçabilité des échantillons, une diminution des consommables et enfin une économie dans le temps de préparation des échantillons.

Matériel et méthodes

Les trois congélateurs ciblés (deux armoires SANYO et New Brunswick Scientific U725 et un bahut New Brunswick Scientific C660) ont un volume disponible, respectivement, de 700, 725 et 660 litres.

Quels que soient les dosages envisagés, la préparation des échantillons de fruits nécessite deux étapes :

- la découpe du fruit en petits morceaux,
- leur broyage pour obtenir la poudre de fruit qui servira ensuite aux différentes analyses.

En fonction des analyses à réaliser et de la méthode choisie, la quantité de matière nécessaire peut varier de 20 mg à 1 g par mesure (**Tableau 1**).

Tableau 1. Les quantités de poudre nécessaires en fonction du type de dosage

Type de dosages	Poudre congelée	Poudre lyophilisée*
Vit C	50 mg	
Sucres	1 g	
Acide malique	500 mg	
Acide citrique	500 mg	
Différents métabolites**	20 mg	
Activités enzymatiques**	20 mg	
ADN		50 mg à 1 g
ARN		50 mg à 1 g

* Quantité variable en fonction de la méthode d'extraction utilisée

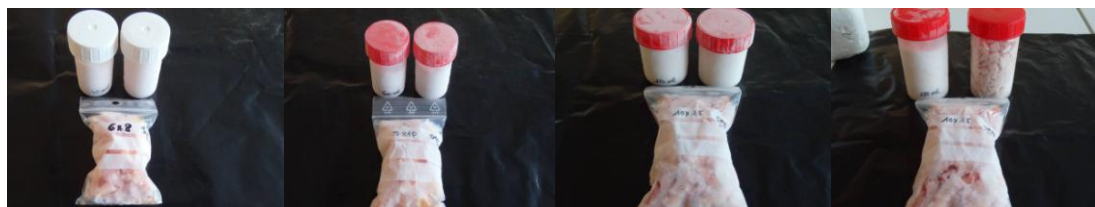
** Dosage sur la plateforme de Bordeaux

Dans l'Unité de Génétique et Amélioration des fruits et légumes, plusieurs types de contenants sont mis à disposition pour le stockage du matériel végétal.

- Les sachets zip, emballages souples, permettent de contenir les morceaux de chair de fruit (pêche, abricot, tomate). Les dimensions respectives sont de 6x8, 7x10, 10x15 et 17x22 cm. Une attention particulière doit être portée lors de la manipulation de ces sachets qui peuvent devenir cassants après congélation.
- Les pots destinés à recevoir la poudre de fruit après broyage ont une contenance de 40 mL, 60 mL, 125 mL et 180 mL. Les pots translucides avec couvercle à vis, en polypropylène, sont les plus adéquats pour

contenir la poudre de fruit après broyage des morceaux. En effet, la matière de ces pots permet une très bonne résistance thermique et chimique.

Photo 1. Les différents types de consommables et leurs contenus.



Le phénotypage, réalisé en 2011 dans le cadre d'une thèse, a permis de mettre en application cette méthode de rationalisation. Elle s'est effectuée sur 1908 échantillons recueillis, congelés dans l'azote liquide, et stockés dans des sachets zip 6x8 cm contenant environ 22 g de morceaux de fruit. Après broyage, nous avons séparé les échantillons en 2 pots de 40 mL dont un de réserve. Sachant que chaque aliquote à doser était constitué de 20mg ($\pm 0,2$ mg) de poudre de chair, chacun des pots pouvait servir à constituer au moins 1100 aliquotes.

Pour faciliter le stockage dans le congélateur, nous avons rassemblé les pots d'échantillons dans des boîtes carton de type emballage de plaques PCR, au format 32x13x9 cm, regroupant 32 pots (**Photo 2**). Cette astuce de récupération est intéressante pour faciliter le rangement de sachets ou de pots, aussi bien dans des congélateurs verticaux que de type bahut. Il faut tout de même être attentif à renforcer au préalable ces boîtes carton avec du scotch car l'humidité les fragilise.

Photo 2. Suggestion de rangement des pots dans des boîtes de plaques PCR récupérées (ouverte et fermée).



Résultats et validation

Les différents consommables utilisés, leur contenance et leur référence sont regroupés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Caractéristiques des différents consommables utilisés

Dimension	6x8 cm	7x10 cm	10x15 cm	17x22 cm
Epaisseur	50 µm	50 µm	50 µm	30 µm
Contenu morceaux	~22 g	~ 39 g	~116 g	~358 g
Correspondance	2 pots 40 mL	2 pots 60 mL	2 pots 125 mL	2 pots 180 mL
Quantité de poudre obtenue	~29 g	~50 g	~136 g	~359 g
Référence RAJA	PZIPO4B	PZIPO5B	PZIPO8B	123073*
	Pot 40 mL	Pot 60 mL	Pot 125 mL	Pot 180 mL
Diamètre intérieur x hauteur	30x70 mm	33x70 mm	52x74 mm	52x102 mm
Poids à vide (tare)	8,9 g	9,90 g	18,10 g	23,27 g
Poids net de poudre	~12 g	~15 g	~52 g	~55 g
Référence VWR	216-2689	216-2684	216-2589	216-2598

*Les sachets de format 17x22 cm sont commandés aux Emballages Plastiques Avignonnais.

Pour chaque type de sachet sont indiquées les dimensions et la quantité approximative de morceaux de fruit qu'il peut contenir. Pour chaque type de pot, le poids de poudre contenu est précisé. La texture de cette poudre doit ressembler à celle de la farine après broyage. Il est déconseillé d'utiliser les pots pour stocker les morceaux de fruit dans la mesure où ces derniers se prennent en masse après passage dans l'azote liquide et collent aux parois du pot.

L'avantage de la nouvelle procédure réside dans la constitution d'un pot de réserve. En effet, le fait d'avoir deux pots d'un même échantillon permet, pour plus de sécurité, d'en conserver un en réserve dans un second congélateur -80°C, et ainsi de i) limiter les risques de perte d'échantillons en cas de panne de congélateur et ii) limiter les congélations-décongélations lors des pesées des aliquotes avant les dosages. Cela offre également la possibilité de refaire le dosage en question en cas de problème technique ou de résultat suspect.

L'expérimentation de cette procédure sur deux ans dans le cadre d'un travail de thèse intitulé « *Du gène au phénotype. Contrôle génétique et modélisation du métabolisme du fructose chez la pêche* » a permis de la valider. Dans ce contexte, un phénotypage de fruits d'une population interspécifique de pêche récoltés en cinétique a été mené. Cent six génotypes ont été étudiés avec, pour chacun, trois fruits prélevés à six stades physiologiques différents (du petit fruit vert au stade entrée en maturité), soit 1908 échantillons à gérer et stocker en congélateur sur une période de 36 mois. Ces derniers ont été utilisés dans le cadre de mesures enzymatiques à haut débit : mesures de métabolites et d'activités enzymatiques.

Notre démarche avait pour objectif de mettre à la disposition des utilisateurs une procédure de stockage permettant d'optimiser la place dans les congélateurs - 80°C. Nous avons ainsi eu un gain de place de 50 % par rapport aux années précédentes en utilisant des contenants adéquats et un rangement approprié.

Photo 3. Situation à l'intérieur du congélateur avant (1) et après (2) la mise en place de la procédure.



La traçabilité des échantillons a été facilitée par l'étiquetage des boîtes carton par chaque équipe. De plus, l'optimisation des consommables a permis d'abaisser les coûts des consommables utilisés pour une campagne de récolte donnée de 30%. Enfin, nous avons également constaté un gain de temps conséquent lors des différentes étapes. En effet, le protocole d'échantillonnage est finalisé dès la récolte des fruits et seules les quantités nécessaires sont conditionnées en sachet. Au moment des analyses, un seul des 2 lots est manipulé, et à l'étape du broyage, la totalité du matériel est systématiquement broyée.

Dans ce contexte, nous avons pu constater que la gamme de consommables utilisés correspondait bien aux contenants qui nous étaient nécessaires pour le stockage de nos échantillons de poudre.

Conclusion

Depuis 2011, où nous avons initié notre réflexion, les expérimentateurs ont modifié leurs comportements. Ils ont remplacé l'utilisation de pots de 60 ou 125 mL par des pots de 40 mL qui permettent de stocker suffisamment de matière et offrent la possibilité d'avoir un pot d'échantillon de réserve (donc 2 pots de 40 mL au lieu d'un de 60 ou 125 mL). Enfin, l'économie de temps passé à la préparation des échantillons, en période expérimentale chargée, a permis d'aborder les campagnes fruitières avec plus de sérénité.