

UNIVERSITE DE LILLE 2 – DROIT ET SANTE -

MINISTERE DE LE JEUNESSE, DE L'EDUCATION NATIONALE ET
DE LA RECHERCHE

CONCOURS EXTERNE D'ASSISTANT INGENIEUR EN TECHNIQUES BIOLOGIQUES – B.A.P A

SESSION : 2002

EPREUVE ECRITE D'ADMISSIBILITE

Le Lundi 2 Septembre 2002 de 9 h 00 à 12 h 00

Durée : 3 heures – Coefficient : 4

Aucun document n'est autorisé

- Le sujet de cette épreuve comporte 5 pages (y compris celle-ci).

Attention : Il vous est rappelé que votre identité ne doit figurer que dans la partie supérieure de la bande en tête des copies mises à votre disposition. Toute mention d'identité portée sur toute autre partie des copies mènera à l'annulation de votre épreuve.

Concours Externe de recrutement d'Assistants Ingénieurs en Techniques Biologiques

L'ATCC (American Type Culture Collection) de Washington D.C. vous a fourni une souche **lyophilisée** d'*Aspergillus fumigatus*, agent fongique d'infections pulmonaires graves. Cette souche sera mise en culture de façon à produire des quantités suffisantes de mycélium et de spores pour permettre d'établir ses caractéristiques biochimiques et génétiques et d'envisager à terme la mise au point de tests de détection et d'une méthode de traitement de ces affections.

- 1)- Comment allez-vous procéder pour cette mise en culture : quelles méthodes, quels milieux ?
- 2)- Quelles **précautions** prendrez-vous, lors de l'**inoculation** et de la **récolte** de ces cultures, pour vous protéger personnellement et préserver l'Environnement?
- 3)- Etant donné le prix exorbitant auquel cette souche vous a été facturée, vous tenez absolument à la conserver. Décrivez et justifiez les protocoles que vous mettrez en œuvre pour assurer d'une part la conservation de cette souche à long terme, **sans modifications de ses caractéristiques**, et d'autre part pour avoir toujours à votre disposition **une source d'inoculum immédiatement disponible**.
- 4)- A partir de cette souche, on envisage de faire des extractions et caractérisations de phospholipides membranaires et d'ADN. Dans un souci de gain de temps, imaginez un protocole expérimental qui vous permettra de réaliser la majorité des extractions **sur les mêmes cultures**.
- 5)- Les **phospholipides** extraits ont été analysés et ont produit le chromatogramme ci-joint. (*Annexe 2*)

En vous servant des informations à votre disposition en *Annexe 1* :

51 - Décrivez la **méthode séparative** utilisée.

52 - Développez et justifiez les choix qui ont été faits pour les **conditions opératoires**, notamment pour la **colonne**, le type d'**élution** et de **gradient**.

53 - Quelles **précautions** devez vous prendre pour vous préserver du risque chimique lors de la **manipulation** des solvants cités ?

54 - Analysez le **chromatogramme** de l'échantillon obtenu en *Annexe 2* (en utilisant le chromatogramme des témoins de cette même *Annexe 2*, la courbe étalon et le tableau de l'*Annexe 3*).

55 - Cinq répétitions ont été réalisées (tableau *Annexe 3*) : les **résultats obtenus** vous paraissent-ils **fiables**? Justifiez votre opinion.

6)- Après avoir extrait l'ADN de votre culture, vous voulez vérifier la **quantité** obtenue et sa **qualité** :

61 – Développez les **méthodes** que vous allez utiliser dans ce but.

62 – Vous effectuez un **séquençage** : expliquez la méthode choisie et le but de cette opération.

63 – Précisez les **précautions qui s'imposent** pour vous protéger personnellement et protéger l'Environnement au cours de cette expérimentation.

7)- Vous voulez fabriquer des **anticorps anti-Aspergillus** qui permettraient de détecter facilement la présence éventuelle de cet organisme dans des produits d'expectoration. Proposez une méthode et discutez en la pertinence.

Quantitative Analysis of Phospholipids by HPLC with a Light Scattering Evaporating Detector –

Summary

A method is described for separation and quantitative analysis of various phospholipids and sphingolipids by high performance liquid chromatography on a silica gel column with a mobile phase consisting of chloroform, methanol, and ammonium hydroxide. Gradient elution is necessary.

Key Words:

High performance liquid chromatography
Phospholipids
Light scattering evaporative detector

2.1 Equipment

The chromatographic system comprises the following components:

- 2 pumps LC6A (Shimadzu)
- 1 gradient controller SCL6A (Shimadzu)
- 1 650 μ l mixing chamber for pumps LC6A (Shimadzu)
- 1 autosampler SEDEX 100 (SEDERE, 8 Rue Eugène Henaff, 94403 VITRY-SUR-SEINE Cedex B.P.52, France)
- 1 light-scattering evaporative detector (SEDERE)
- 1 "Autofix II" system fitted with a 125 mm "Lichrocart" cartridge filled with "Lichrospher" Si 60 (5 microns), fitted with a guard column with the same material (Merck)

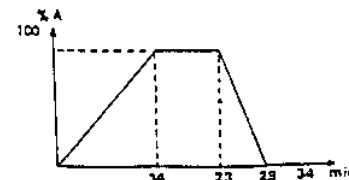
The chromatographic system is equipped with an on-line filter (Waters) without dead volume between the injector and the column. The system allows successive injection of many samples according to a perfectly standardized cycle.

2.2 Reagents and Standards

- chloroform p.a. (Carlo Erba)
- methanol p.a. (Carlo Erba)
- ammonium hydroxide at 30 % (Carlo Erba)

Phospholipids and cerebroside standards were purchased from Sigma.

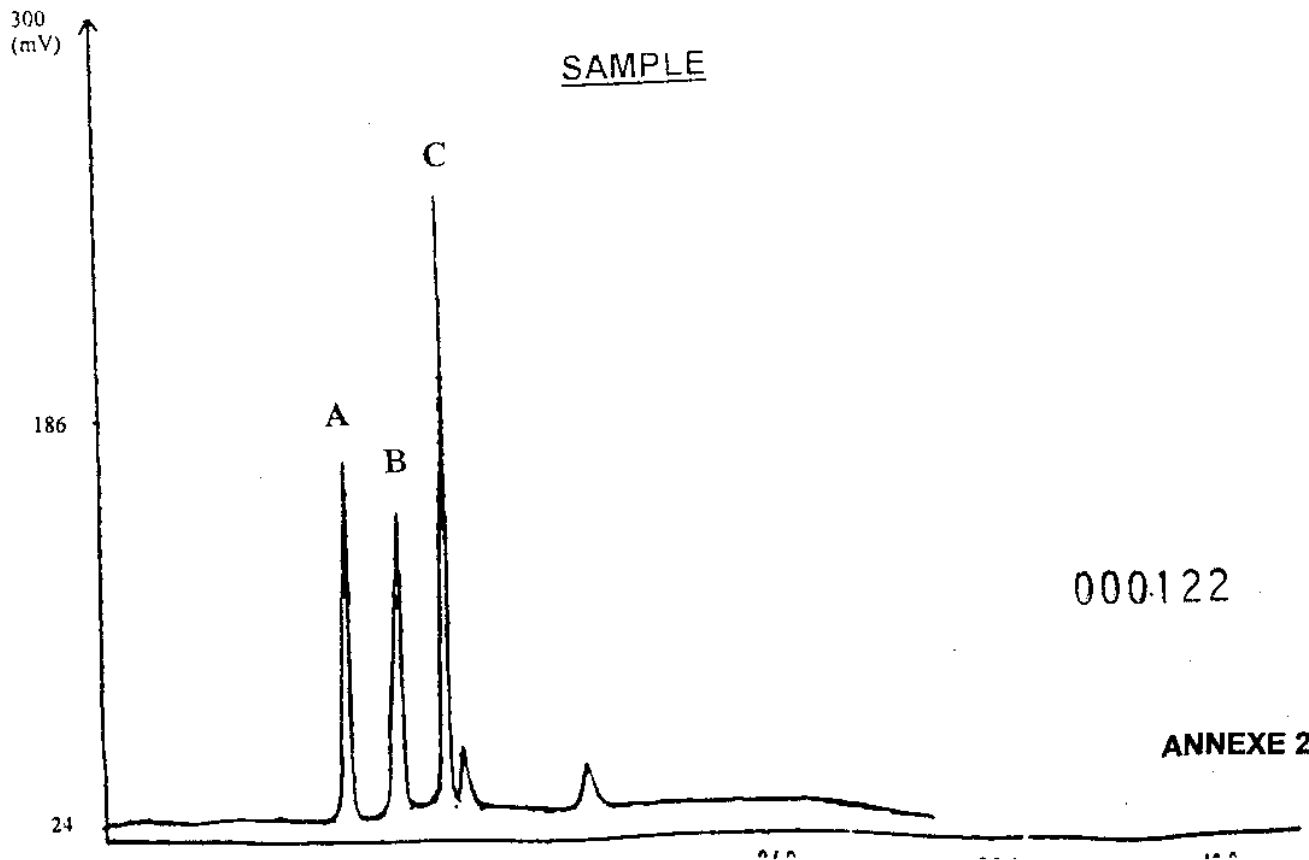
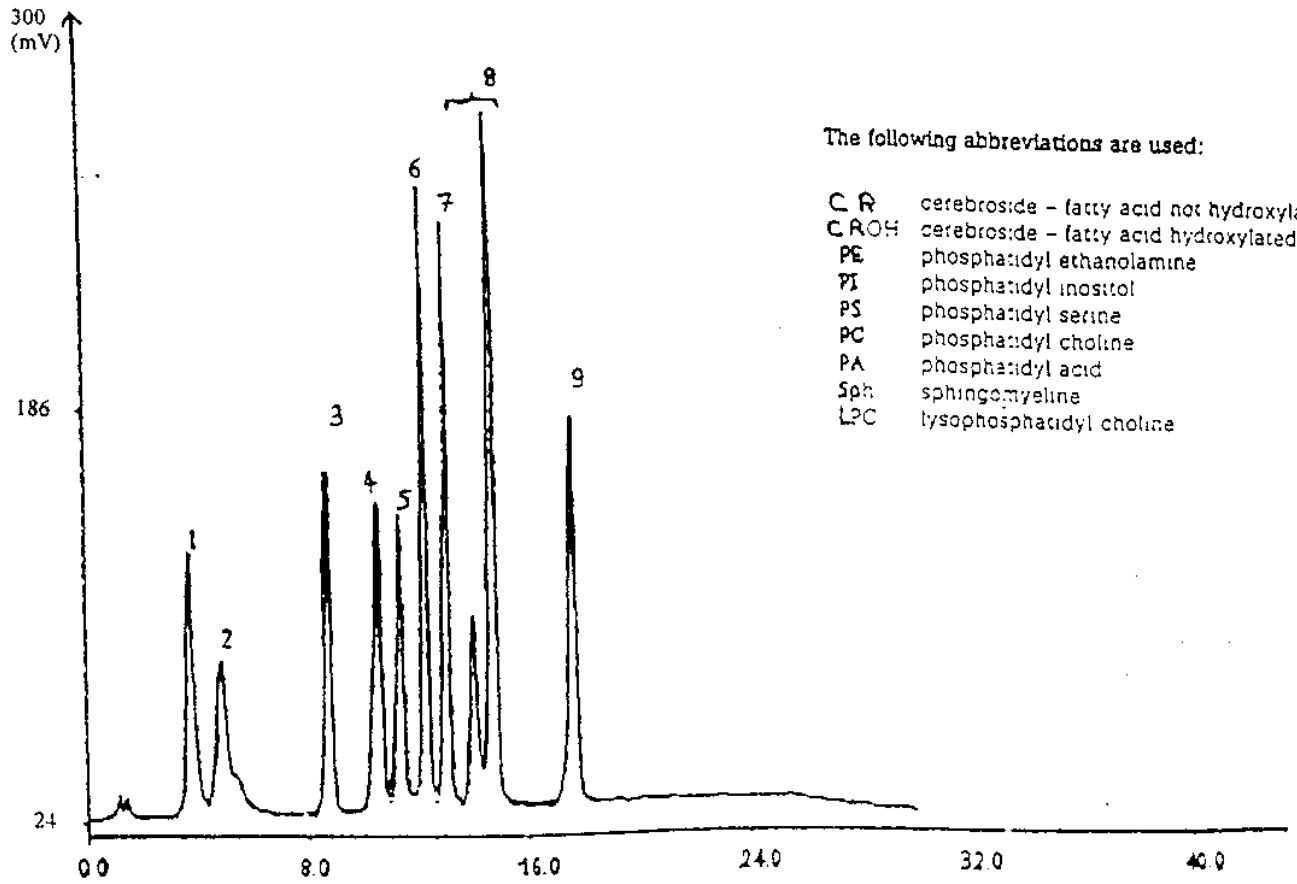
Conditions opératoires	
Colonne :	Lichrospher Si 60 - 5 μ m 12,5 cm x 4 mm
Volume injecté :	10 μ l, quantité injectée : 1 μ g
Phase mobile :	A : CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O/NH ₃ à 30 % (60/34/5,5/0,5) B : CHCl ₃ /MeOH/NH ₃ à 30 % (80/19,5/0,5)
Débit :	1 ml/mn
Pression :	2,2 bars
Gaz :	Air
Température :	Détecteur : 50°C



2.3 Elution Gradient

000121

Separation of a standard mixture of nine (phospho) lipids. 1, CR; 2, CROH; 3, PE; 4, PI; 5, PS; 6, PC; 7, PA; 8, Sph double peak; 9, LPC. Conditions in text.



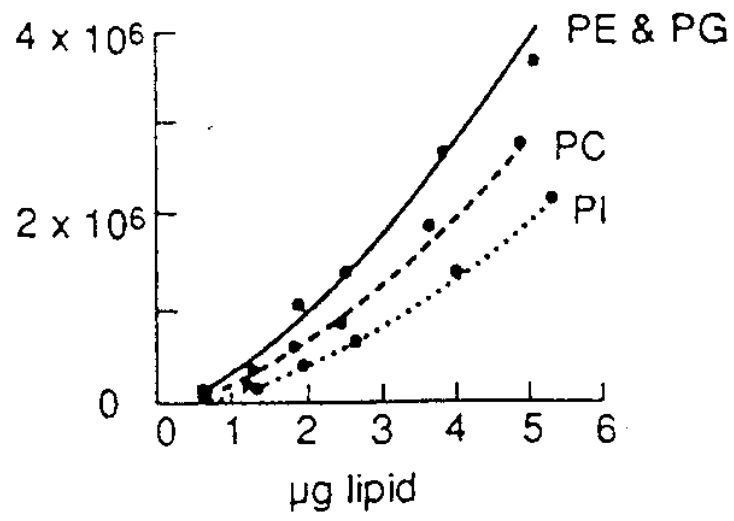


Figure 3. Calibration curves for lipid standards

	AIRES							
	injection 1	injection 2	injection 3	injection 4	injection 5			
PIC A	$2.09 \cdot 10^9$	$2.12 \cdot 10^9$	$2.00 \cdot 10^9$	$1.88 \cdot 10^9$	$1.91 \cdot 10^9$			
PIC B	$0.47 \cdot 10^9$	$0.50 \cdot 10^9$	$0.53 \cdot 10^9$	$0.49 \cdot 10^9$	$0.51 \cdot 10^9$			
PIC C	$1.94 \cdot 10^9$	$1.87 \cdot 10^9$	$2.00 \cdot 10^9$	$2.13 \cdot 10^9$	$2.06 \cdot 10^9$			

000123