

Etablissement organisateur :



N° d'anonymat :

2	9	0	4			
---	---	---	---	--	--	--

Session : 2011

Concours Externe

**CONCOURS D'ACCES AU CORPS DES
ASSISTANTS INGENIEURS DE
RECHERCHE ET FORMATION**

DU MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

BAP B (Sciences chimiques Sciences des matériaux)

**EMPLOI TYPE : ASSISTANT EN TECHNIQUES
D'ANALYSE DE BIOMOLECULES**

EPREUVE ECRITE D'ADMISSIBILITE

DUREE : 3 HEURES – COEFFICIENT : 4

**DATE DE L'EPREUVE :
29 AVRIL 2011 DE 14H00 A 17H00**

LE SUJET COMPORTE 15 PAGES DONT :

- 2 PAGES DE GARDE**
- 11 PAGES POUR LE SUJET**
- 1 PAGE POUR L'ANNEXE 1**
- 1 PAGE POUR L'ANNEXE 2**

(VERIFIEZ QUE VOTRE EXEMPLAIRE EST COMPLET)

**SEUL L'USAGE DES CALCULATRICES NON
PROGRAMMABLES EST AUTORISE**

Sujet 1:

Analyse de résidus d'herbicide par chromatographie couplé à un spectromètre de masse.

Certains pesticides sont très peu transformés dans le sol et sont présents dans les nappes phréatiques et les cours d'eau. La présence de résidus de pesticides dans l'eau potable est un problème important pour la qualité de celle-ci. Bien qu'interdite depuis le 30 septembre 2003 en France, l'atrazine (herbicide utilisé en agriculture) et ses sous-produits peuvent persister jusque dans les eaux potables.

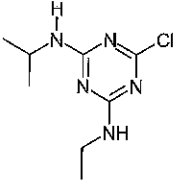
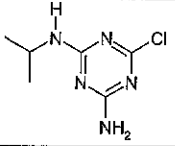
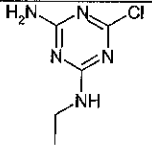
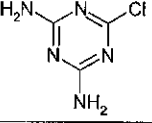
L'analyste doit être capable de déterminer de très faibles quantités de pesticides et de leurs métabolites avec sensibilité et spécificité.

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse ou liquide avec la spectrométrie de masse en tandem (MS / MS) permet d'atteindre cet objectif.

Vous devez identifier et doser l'atrazine et trois de ses produits de décomposition.

Ces composés sont décrits dans le *tableau 1.1*

Tableau 1.1 : Caractéristiques de l'atrazine et de ses dérivés

	Atrazine Formule Brute : $C_8H_{14}ClN_5$ M : 215 g.mol^{-1}
	Desethyl Atrazine (DEA) Formule Brute : $C_6H_{10}ClN_5$ M : 187 g.mol^{-1}
	Desisopropyl Atrazine (DIA) Formule Brute : $C_5H_8ClN_5$ M : 173 g.mol^{-1}
	Deethyldeisopropyl Atrazine (DEDIA) Formule Brute : $C_3H_4ClN_5$ M : 145 g.mol^{-1}

Votre laboratoire dispose de plusieurs chaînes HPLC (Micro, Conventionnelle et très haute pression (1000 bars)) couplées à différents détecteurs (Detector UV 4 longueurs d'ondes, PDA, un R.I et un DEDL). Il dispose également d'un spectromètre de masse simple Quadripôle, d'un spectromètre de masse Triple Quadripôle et d'un spectromètre de masse Q-TOF. Tous les spectromètres de masse sont équipés de source pour les liquides.

Question 1 : Quel est le principe d'un simple Quadripôle, d'un Triple Quadripôle et d'un Q-TOF ?

Question 2 : Quel est celui d'un spectrophotomètre à barrette de diode ?

Question 3 : Décrire le principe du détecteur évaporatif à diffraction de lumière (DEDL).

Question 4 : Quel(s) type(s) de détecteur(s) allez-vous utiliser en priorité pour ce type d'analyse ? Justifier votre réponse.

Question 5 : Quel est l'intérêt d'utiliser une chaîne très haute pression par rapport à une chaîne HPLC conventionnelle (400 bars) ?

Compte-tenu des disponibilités du matériel, vous pouvez utiliser un spectromètre de masse couplé à une chaîne HPLC.

Le protocole HPLC est le suivant :

- Solvant A : H₂O, 0,1 % acide formique
- Solvant B : acétonitrile, 0,1 % acide formique
- Débit 8 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
- 0 min : 10 % B ; 10 min : 10 % B ; 20 min : 90 % B ; 25 min : 90 % B ; 27 min : 10 % B ; 34 min : 10 % B
- Colonne type C18, injection par boucle de 1 μL d'échantillon

Question 6 : Quelles sont les précautions à prendre pour la préparation de l'éluant ?

Question 7 : Compte tenu des conditions chromatographiques, parmi les colonnes suivantes, sélectionner la plus adaptée :

- Hypersil gold, 100 x 0,32 mm, 5 μ m
- Hypersil gold, 150 x 0,5 mm, 3 μ m
- Hypersil gold, 100 x 2,1 mm, 3 μ m
- Hypersil gold, 150 x 4,6 mm, 3 μ m

Question 8 : A quoi sert l'acide formique ?

Quels autres acides sont également utilisés couramment en HPLC-SM ?

Quels sont les avantages et les inconvénients de chacun de ces acides ?

On procède à une SPE, suivant le protocole suivant :

Prise d'essai : 500 mL.

- Faire passer 2x 5 mL d'acétone, puis 2 x 5mL d'eau Milli-Q, sous vide, sur la cartouche SPE
- Faire passer la prise d'essai en veillant à ne pas laisser la cartouche à sec pendant ses opérations.
- Faire passer 2x 5mL d'Eau Milli-Q, sous vide.
- Laisser ensuite sécher la cartouche 15 minutes sous vide
- Ajouter en trois fois 9 mL d'acétone sur la cartouche à l'aide d'une seringue et récupérer les éluats qui seront évaporés à sec sous vide.
- Reprendre par 150 μ L d'un mélange eau / acétonitrile.

Question 9 : Commenter les étapes.

Question 10 : Définir le terme SPE et l'intérêt de cette technique.

Il est procédé ensuite à l'analyse par LC-MS (/MS) d'un échantillon. La *figure 1.2* correspond à l'acquisition des chromatogrammes en électrospray en mode MRM.

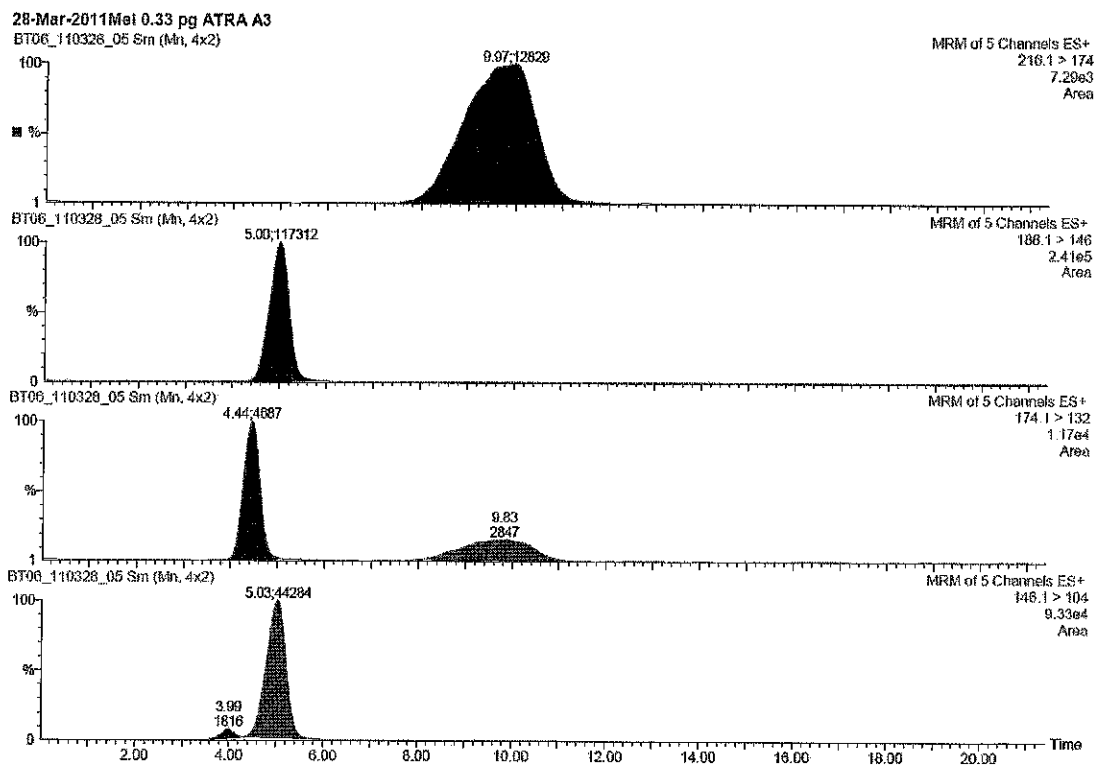


Figure 1.2

Question 11 : Quelles sont les contraintes du couplage HPLC-MS ?

Question 12 : Donner un schéma de principe d'un spectromètre de masse.

Question 13 : Qu'est-ce que l'ionisation par électrospray ? Décrire brièvement son principe.

Question 14 : On a utilisé ici le mode MRM. A quoi correspond cette abréviation ?

Sur quel type de spectromètre de masse peut-on utiliser ce mode ?

Question 15 : Quels sont les avantages du mode MRM par rapport au mode SIR ou Full Scan en spectrométrie de masse ?

Question 16 : A l'aide du *tableau 1.1*, commenter les 4 chromatogrammes obtenus.

Sujet 2 :

Spectrométries d'absorption & d'émission UV-visible

Les algues unicellulaires *Chlorella vulgaris* sont employées comme éléments d'assainissement des eaux et également comme détecteurs de pesticides.

La concentration de dispersions algales peut être estimée par mesure du taux de chlorophylle extraite d'un échantillon de ces dernières, par spectrométrie d'absorption UV-visible.

La chlorophylle, pigment naturel intervenant dans la photosynthèse, existe sous deux formes *a* et *b* (Figure 2.1), de masses molaires respectives :

Chlorophylle *a* : $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ ($893,49 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

Chlorophylle *b* : $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ ($907,47 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

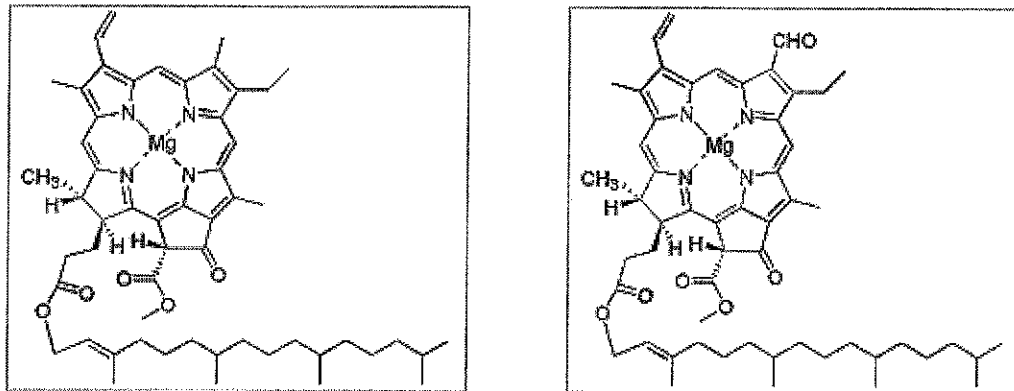


Figure 2.1 : Chlorophylles a et b.

I. Protocole d'extraction des chlorophylles

1. Centrifuger 20 mL exactement de dispersion algale préalablement agitée à $3000 \text{ tr}\cdot\text{mn}^{-1}$ pendant 10 minutes.
2. Remettre le culot en suspension dans 9 mL de méthanol et l'incuber à 45°C à l'obscurité pendant 30 minutes.
3. Centrifuger à $3000 \text{ tr}\cdot\text{mn}^{-1}$ pendant 10 minutes. Prélever le surnageant et le garder dans une fiole de 20 mL.

4. Remettre une nouvelle fois le culot en suspension dans 9 mL de méthanol et l'incuber à 45°C à l'obscurité pendant 30 minutes.
5. Centrifuger enfin à 3000 tr.mn⁻¹ pendant 10 minutes. Prélever le surnageant et l'ajouter au précédent. Ajuster le volume final à 20 mL avec du méthanol.
6. Conserver cet extrait à l'abri de la lumière.

Question 1 : En vous aidant éventuellement d'un schéma, indiquer la fonction des différentes étapes du protocole en précisant la nature des divers surnageants et culots traités.

Question 2 : Quelles sont les précautions à prendre pour les opérations de centrifugation dans ce cas précis ?

Question 3 : L'étiquette du flacon de méthanol vous est fournie (*annexe 1*). Quelles sont les précautions à prendre quand on utilise ce solvant ?

II. Dosage spectrophotométrique UV-visible

Le titrage des chlorophylles extraites est effectué à l'aide d'un spectromètre d'absorption UV-visible bifaisceau, à deux longueurs d'onde.

La *figure 2.2* présente les spectres d'absorption de deux chlorophylles pures dans le méthanol aux concentrations respectives de 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (*a*) et de 2,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (*b*) pour un chemin optique de 1 cm.

Le spectre d'absorption d'un mélange inconnu est donné sur la *figure 2.3*.

Question 4 : En vous appuyant sur un schéma, indiquer les composants essentiels de l'appareil et préciser leur fonction.

Question 5 : Quel est le rôle de la correction de la ligne de base préalable à toute mesure et comment s'effectue-t-elle ?

Question 6 : Détailler le protocole du dosage d'un mélange binaire à deux longueurs d'onde, en précisant les critères de choix de ces dernières.

Question 7 : Mentionner les lois sur lesquelles repose ce type de dosage et leurs conditions d'application.

Question 8 : Déterminer les concentrations respectives des deux chlorophylles.

Question 9 : Avec quelle précision ces résultats peuvent-ils être donnés ?

Question 10 : Si le solvant de mesure était l'heptane, quelle serait son influence éventuelle sur l'allure des spectres ?

Question 11 : A partir du spectre d'absorption (*figure 2.2*), justifier la coloration de la chlorophylle.

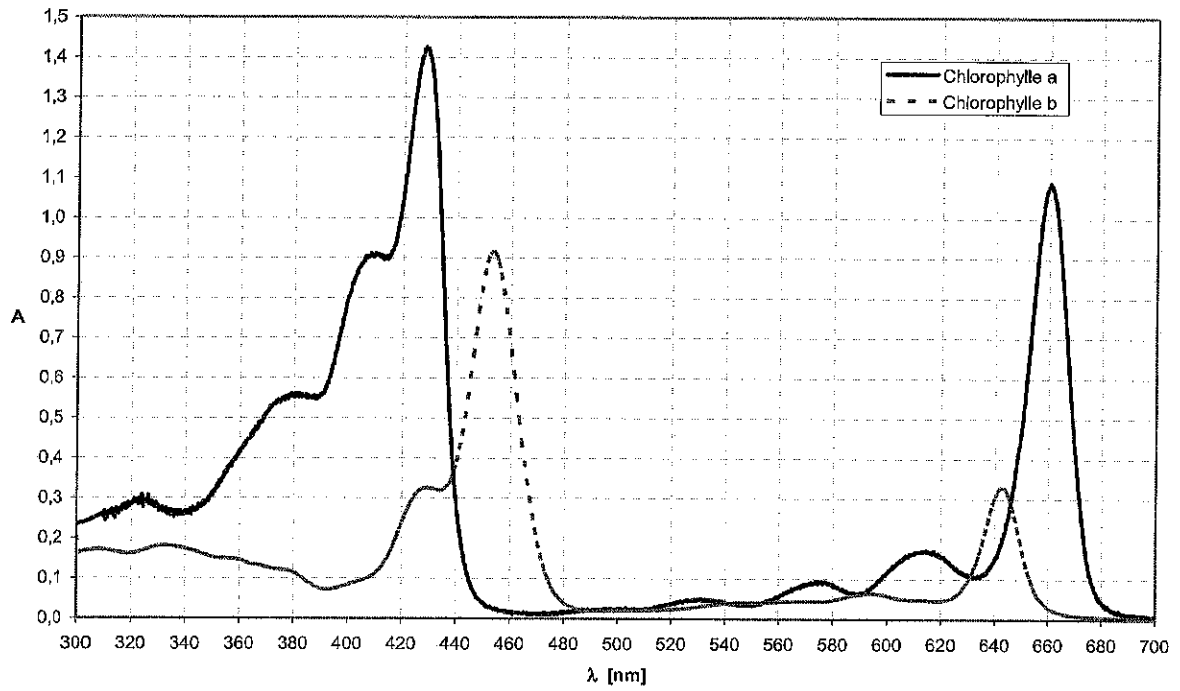


Figure 2.2 Spectres d'absorption des chlorophylles a (—) et b (- - -).

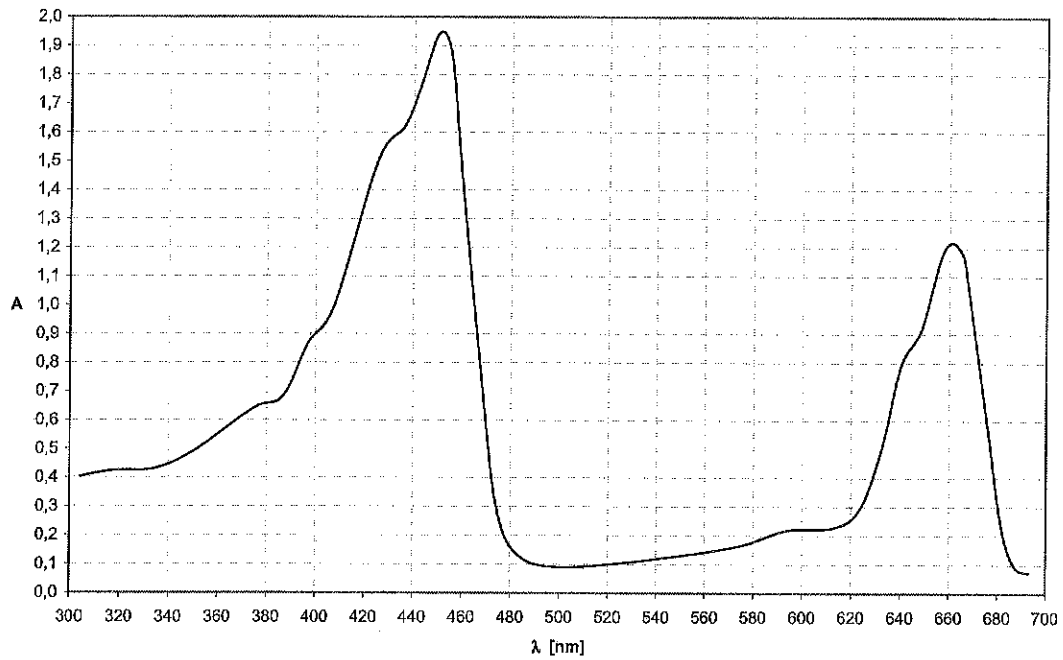


Figure 2.3 : Spectre d'absorption du mélange inconnu de chlorophylles a et b.

III. Fluorescence moléculaire

Les chlorophylles sont naturellement fluorescentes (*Figure 2.4*) et pourraient être utilisées comme réactif de dosage fluorimétrique.

Question 12 : Expliquer le phénomène de fluorescence moléculaire.

Question 13 : Quels sont les critères de choix d'un fluorophore pour un dosage ?

Question 14 : Dans un titrage, quel est l'avantage de la spectrofluorimétrie par rapport à la spectrophotométrie d'absorption ?

Question 15 : Compte tenu des spectres de la *figure 2.4*, à quelle longueur d'onde conviendrait-il d'exciter la fluorescence de la chlorophylle *a* ?

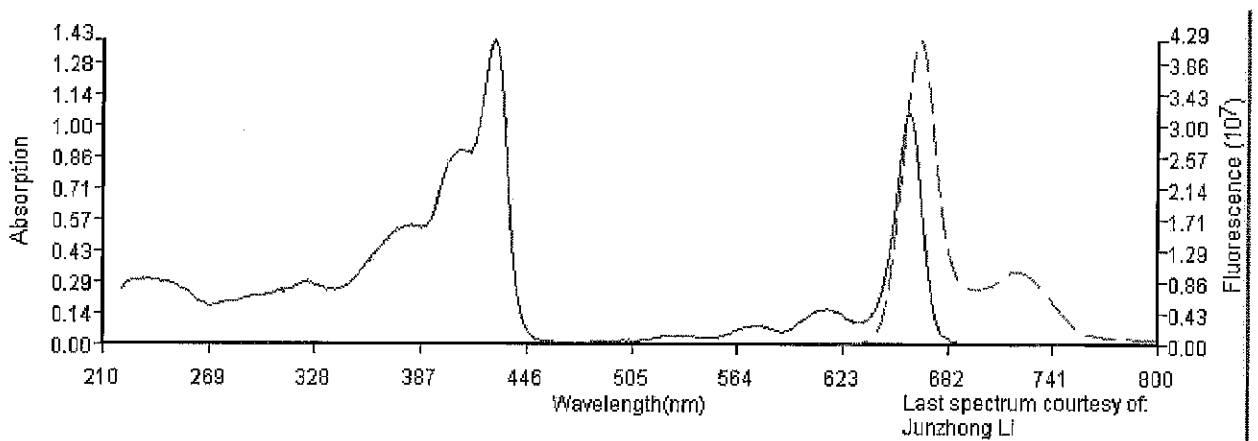


Figure 2.4 : Spectres d'absorption (—) et d'émission (---) de la chlorophylle a

Sujet 3

L'étiquette d'une bouteille d'huile de table porte entre autres, les indications suivantes :

pour 100 g d'huile : Protéines : 0 g

Glucides : 0 g

Lipides : 100 g

dont :

15 % de lipides saturés

20 % de lipides mono-insaturés

65 % de lipides poly-insaturés (acides gras essentiels)

On souhaite préciser la signification de cette étiquette.

Question 1 : Donner les caractéristiques générales des lipides. Indiquer 2 composés appartenant à cette famille.

Question 2 : L'huile considérée étant essentiellement constituée de triglycérides, définir ce terme et écrire la formule générale semi-développée correspondante.

Question 3 : Donner la signification des termes "insaturés" et "saturés" qui figurent sur l'étiquette.

Question 4 : Définir un acide gras.

Question 5 : Donner la formule semi développée (en numérotant les carbones), la formule brute et la masse molaire des acides gras suivants :

- Acide linoléique
- Acide palmitique
- Acide stéarique

Question 6 : Donner la formule brute et la masse molaire correspondants aux désignations suivantes :

- C18 :2 (9,12)
- C17 :0

Question 7 : Indiquer ce qui caractérise un acide gras essentiel.









Question 8 : Indiquer une méthode analytique permettant de séparer et de détecter des lipides.

Un tableau périodique vous est donné en *annexe 2*.

Sujet 4 : Questions d'hygiène et sécurité

Depuis le 1^{er} décembre 2010, le système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques est mis en place.

Indiquer ce que signifient les pictogrammes suivants :

 1	 2
 3	 4
 5	 6
 7	 8

ANNEXE 1

LES PRODUITS CHIMIQUES SA - 12 rue Charleux - 75010 Paris

MÉTHANOL



DANGER

H225	Liquides et vapeurs très inflammables
H302	Toxique en cas d'ingestion
H311	Toxique par contact cutané
H331	Toxique par inhalation
H370	Risque avéré d'effets graves pour les organes
P210	Tenir à l'écart de la chaleur/des étincelles/des flammes nues/des surfaces chaudes. Ne pas fumer
P400/233	Stocker dans un endroit bien ventilé. Maintenir le récipient fermé de manière étanche
P280	Porter des gants de protection/des vêtements/un équipement de protection des yeux/du visage
P302/352	En cas de contact avec la peau : laver abondamment à l'eau et au savon
P301/310	En cas d'ingestion : appeler immédiatement le centre antipoison ou un médecin
P405	Garder sous clé

N° CE : 200-659-6 - N° CAS : 67-58-1

