

CONCOURS EXTERNE
ADJOINT TECHNIQUE DE RECHERCHE ET DE FORMATION
PRINCIPAL 2EME CLASSE

Branche d'activité professionnelle « A »

-Session 2019-

L'épreuve d'admission est constituée d'un exercice pratique suivi d'un entretien oral de 20 minutes
Coefficient 5

Exercice pratique : durée 1 heure

Dans le cadre d'une extraction d'ADN à partir d'une culture d'*Escherichia coli*, il est demandé de réaliser certaines étapes.

La réalisation des opérations se fera dans l'ordre que vous souhaitez.

Le jury apportera une attention particulière au choix du matériel et à la prévention des risques.

Le cahier de laboratoire est fourni en annexe 3.

1. Préparation du milieu TSA nécessaire à la réalisation de la culture d'*Escherichia coli*.

Un extrait de la fiche technique du milieu TSA est donné en annexe 1.

Réaliser la pesée de milieu déshydraté afin de préparer 250 ml de milieu Trypticase Soja.

Réaliser la pesée du milieu déshydraté en présence d'un examinateur.

2. Extraction d'ADN chromosomique par utilisation du kit DNeasy blood and tissue de QIAGEN®

La fiche technique modifiée du kit DNeasy blood and tissue de QIAGEN® est donnée en annexe 2.

Réaliser les étapes 6, 7 et 8 en présence d'un examinateur.

ANNEXE 1 : Extrait de la fiche technique du milieu TSA (Trypticase Soja Agar) de Biorad ®

DOMAINE D'APPLICATION

Milieu utilisé pour la recherche des bactéries aéro-anaérobies lors de l'analyse des produits alimentaires et lors des contrôles de stérilité et du contrôle de la contamination microbienne dans des produits non obligatoirement stériles de la Pharmacopée.

REFERENCE(S) NORMATIVE(S)

MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS

- **NF EN ISO 10273 (Décembre 2003)** : Microbiologie - Directives générales pour la recherche des *Yersinia enterocolitica* présumées pathogènes (IC : V 08-027)

EAUX

- **NF EN ISO 9308-1 (Septembre 2000)** : Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes - Partie 1 : Méthode par filtration sur membrane (IC : T 90-414)

PRINCIPE

La croissance de la plupart des bactéries aéroanaérobies est favorisée par la présence des substances nutritives apportées par l'hydrolysate tryptique de caséine et la peptone de soja, et par le glucose utilisé comme source énergétique.

PRÉSENTATION

- **Pré-coulé**
90 mm x 20 boîtes **code 356-3884**
- **Prêt à l'emploi**
200 ml x 6 flacons **code 355-5947**
8 ml x 25 tubes inclinés **code 355-5944**
- **Déshydraté**
500 g **code 356-4554**

FORMULE THEORIQUE

Hydrolysate pancréatique de caséine	15 g
Peptone de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

pH (25°C) final = 7,3 ± 0,2

CONSERVATION/VALIDITE/LOT

- Pré-coulé : + 2 - 20°C
- Prêt à l'emploi : + 2 - 25°C
- Déshydraté : +15-25°C, flacon soigneusement fermé dans un endroit frais et sec
- La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement

AUTRE(S) PRODUIT(S) NECESSAIRE(S) (NON FOURNI(S))

- Eau distillée

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI (liste non exhaustive)

- Balance
- Sacs de pesée stériles
- Broyeur
- Plaque chauffante
- Agitateur-homogénéisateur
- Tubes à essais (16 x 160 mm) avec bouchons autoclavables
- Flacons de 225 ml en Pyrex avec bouchons autoclavables
- Bain-marie avec une précision de ± 1°C
- Etuve ou enceinte thermostatée avec une précision de ± 1°C
- Autoclave
- Tout matériel courant d'un laboratoire

PRÉPARATION DU MILIEU DESHYDRATE

Toujours agiter avant chaque utilisation.

Dissoudre 40 grammes de poudre dans un litre d'eau distillée, mélanger jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Chauffer lentement, en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Répartir à raison de 10 ml par tube ou 100 ml par flacon et stériliser à l'autoclave à 121 ± 1°C pendant 15 minutes.

Taux de reconstitution : 40 g/l
500 grammes de poudre permettent de réaliser 12,5 litres de milieu.

PROTOCOLE

- **Préparation des échantillons**
A effectuer conformément à la norme ou aux recommandations du produit concerné.

- **Ensemencement et incubation**
Ensemencer avec les souches à étudier et incuber à 37 ± 1°C.

ANNEXE 2 : Fiche technique du kit DNeasy blood and tissue de QIAGEN® modifiée

Composition du kit

Composants	rôles
Protéinase K	Lyse cellulaire
Tampon ATL	Optimise la lyse cellulaire
Tampon AL	Mise en condition saline pour la fixation sélective de l'ADN sur la colonne
Tampon AW1 et AW2	Rinçage de la colonne pour éliminer les contaminants résiduels
Tampon AE	Tampon d'élution
Colonne de silice	Adsorption de l'ADN

Sécurité

- Eviter tout contact entre les tampons AL et AW1 avec l'eau de javel ou les solutions acides.
- Tampons AL et AW1: éviter tout contact avec les yeux et la peau
- Protéinase K :
 - o Pictogramme
 - o Mention d'avertissement : Danger
 - o Mention de danger
 - H 315 provoque une irritation cutanée
 - H 319 provoque une sévère irritation des yeux



Etapes du protocole

- 1- Homogénéiser au vortex la culture de 48h d'*Escherichia coli*.
- 2- Transvaser 1,5 mL de culture bactérienne dans un microtube.
- 3- Centrifuger le microtube contenant 1,5mL de culture bactérienne pendant 10 minutes à 7500 rpm.
- 4- Enlever le surnageant par retournement. Conserver le culot bactérien.
- 5- Reprendre le culot avec 180 µL de tampon ATL. Mélanger avec la pipette automatique par aspiration refoulement.
- 6- Ajouter 20µL de protéinase K dans le microtube noté X. Mélanger au vortex. Placer au bain-marie à 56°C pendant 10 minutes.
- 7- Mélanger au vortex 15 secondes.
- 8- Ajouter 200µL de tampon AL et mélanger au vortex immédiatement.
- 9- Ajouter 200µL d'éthanol à 96% et mélanger au vortex immédiatement de nouveau.
- 10- Placer une colonne dans le tube spécial de 2 mL.
- 11- Récupérer le contenu du tube de l'étape 9 (précipité y compris) et le verser sur la colonne.
- 12- Centrifuger à 8000 rpm durant 1 minute. Jeter le filtrat et conserver la colonne dans le tube.
- 13- Ajouter 500 µl de tampon AW1 à la colonne et centrifuger 1 minute à 8000 rpm. Jeter le filtrat et réutiliser le tube collecteur de 2ml.
- 14- Mettre 500 µl de tampon AW2 et centrifuger 3 minutes à vitesse maximale cette fois, afin de sécher la membrane.
- 15- Après la centrifugation, retirer délicatement la colonne du tube sans que celle-ci n'entre en contact avec le filtrat. Jeter le tube et conserver la colonne.
- 16- Transférer la colonne dans un nouveau tube spécial de 2 ml et ajouter 200 µl de tampon AE directement dans la colonne. Incuber 1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 8000 rpm.
- 17- Répéter l'étape 16 sans changer de tube collecteur.
- 18- Récupérer l'éluant dans un tube collecteur.

ANNEXE 3 : Cahier de laboratoire

Numéro du candidat :

Poste :

Sujet validé le 24/05/2019 à
Franconville par Mme Boulogne,
experte BAP A

~~Sicelyne~~